



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

Departamento de Farmacología
Programa de doctorado: Biomedicina y
Farmacia

**IMPLICACIÓN DE LOS MICROARNs EN LA HIPERTENSIÓN
PULMONAR IDIOPÁTICA.
REGULACIÓN FARMACOLÓGICA**

TESIS DOCTORAL presentada por:

Irene Sarrión Sos

Dirigida por:

Dr. Julio Cortijo Gimeno

Dr. Manuel Mata Roig

Valencia, 2014



DR. JULIO CORTIJO GIMENO
Catedrático Numerario
Departamento de Farmacología
Facultad de Medicina y Odontología
Universidad de Valencia

Certifica:

Que la Tesis Doctoral presentada por Dña. Irene Sarrión Sos, con el título **“IMPLICACIÓN DE LOS MICROARNs EN LA HIPERTENSIÓN PULMONAR IDIOPÁTICA. REGULACIÓN FARMACOLÓGICA”**, ha sido realizada bajo su dirección, y reúne los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Y para que conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado.

En Valencia, 3 de Marzo de 2014.

Dr. Julio Cortijo Gimeno



DR. MANUEL MATA ROIG
Profesor ayudante Doctor
Departamento de Patología
Facultad de Medicina y Odontología
Universidad de Valencia

Certifica:

Que la Tesis Doctoral presentada por Dña. Irene Sarrión Sos, con el título **“IMPLICACIÓN DE LOS MICROARNs EN LA HIPERTENSIÓN PULMONAR IDIOPÁTICA. REGULACIÓN FARMACOLÓGICA”**, ha sido realizada bajo su dirección, y reúne los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Y para que conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado.

En Valencia, 3 de Marzo de 2014.

Dr. Manuel Mata Roig

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han contribuido a que esta Tesis Doctoral haya sido posible.

En primer lugar a mis directores, al Dr. Julio Cortijo Gimeno y al Dr. Manuel Mata Roig, por todo su tiempo, dedicación y profesionalidad, por ser un ejemplo de trabajo y esfuerzo, y por todo lo que he aprendido junto a ellos.

A todos los investigadores de la Fundación de Investigación del Hospital General de Valencia (FIHGUV), en especial a Teresa, Adela, Pili, Patri, Sonia, Silvia y Gracia, por su gran ayuda durante estos años y por todos los buenos momentos que hemos pasado juntas.

A mi familia, me gustaría expresar un agradecimiento muy especial a mis padres Gloria y Paco, y a mi hermano Héctor, por el apoyo y la confianza depositada en mí. También al resto de mi familia abuel@s, ti@s, prim@s, por el cariño y motivación que me han mostrado siempre, con un recuerdo especial a mis abuelos Ana y Pepe.

A mis amig@s de biología, bioquímica y el máster, por vuestro apoyo incondicional, a mis compañeros de la Universidad Católica de Valencia, a mis “British friends”, a mis “salseros” por la motivación que me habéis dado este último año, a las “nenis”, al grupo de las parejitas y a mis amig@s de toda la vida, por teneros a mi lado y siempre haberme apoyado y motivado en cada uno de los objetivos que me he marcado.

ÍNDICE

1. Introducción

1.1. Hipertensión pulmonar.....	1
1.1.1. Clasificación actual de la hipertensión pulmonar	1
1.1.2. Mecanismos moleculares implicados en HP.....	4
1.1.3. El remodelado vascular en la hipertensión pulmonar.....	7
1.1.3.1. Transición celular endotelio–mesénquima (EnMT).....	10
1.1.3.2. Papel de las especies reactivas de oxígeno en la HP....	12
1.1.4. Factores genéticos implicados en el desarrollo de la HPAI.....	13
1.2. Los microARNs.....	15
1.2.1. Biosíntesis y procesamiento de los microARNs.....	15
1.2.2. Implicación de los microARNs en la hipertensión pulmonar y en otras enfermedades cardiovasculares.....	16
1.3. Tratamiento farmacológico de la HPAI	18
1.4. Papel del coactivador 1 de receptor activado por el proliferador de peroxisoma α (PGC-1 α) en la HP.....	20
1.4.1. Características de los PPARs.....	21
1.4.2. Nomenclatura y distribución tisular de los PPAR.....	22
1.4.3. Agonistas del PPAR γ	23

2. Objetivos	25
3. Material y métodos.....	29
Material	31
Métodos	33
3.1. Diseño experimental.....	33
3.2. Población de estudio.....	34
3.3. Cultivos celulares.....	35
3.3.1. Aislamiento de células endoteliales y musculares a partir de arteria pulmonar humana	35
3.3.2. Cultivo de células endoteliales.....	36
3.3.3. Cultivo de células musculares.....	37
3.4. Silenciamiento del miR-23a en células endoteliales.....	37
3.5. Extracción ARN total de células	38
3.6. Extracción de microARNs de sangre completa.....	38
3.7. Procesamiento de los microARNs	40
3.7.1. Preparación de la muestra para microarrays.....	40
3.7.2. Síntesis de la cola Poli A	41
3.7.3. Marcaje con biotina	41
3.7.4. Hibridación, lavado, tinción y escaneado.....	42
3.7.5. Análisis de los datos de microarrays de microARNs.....	44
3.8. Extracción de ARN total de sangre completa	45
3.9. Procesamiento del ARN total extraído de tubos PAXgene.....	46
3.9.1. Preparación de la muestra para microarrays	46
3.9.2. Síntesis de la primera hebra de ADN mediante transcripción inversa..	47
3.9.3. Síntesis segunda hebra de ADN mediante transcripción inversa... .	47
3.9.4. Transcripción in vitro para sintetizar ARNc marcado.	48
3.9.5. Purificación del ARNc	48

3.9.6. Evaluación y fragmentación del ARNc	49
3.9.7. Hibridación, lavado, tinción y escaneado.	49
3.9.8. Análisis de los datos de microarrays de expresión génica	50
3.10. Análisis de expresión mediante RT-PCR.	51
3.10.1. Transcripción inversa (RT)	51
3.10.2. PCR a tiempo real	52
3.10.3. Determinación de la expresión de miR-23a, miR-328, miR-27a, miR-20b y miR-145	53
3.10.3.1. Transcripción inversa (RT)	53
3.10.3.2. RT-PCR a tiempo real	54
3.11. Determinación del estado antioxidante total (TAS).....	55
3.12. Análisis de la actividad glutatión peroxidasa (GPX).....	55
3.13. Análisis de datos	56
4. Resultados y discusión.....	57
4.1. Parámetros bioquímicos y oxidativos de los pacientes incluidos	59
4.2. Análisis de expresión de microARNs en pacientes HPAI	62
4.3. Validación de datos de microarrays	70
4.4. Análisis de correlación múltiple	71
4.5. Implicación del gen PGC-1 α en la HPAI	78
4.5.1. Efecto del silenciamiento del miR-23a en células endoteliales	82
4.6. Regulación farmacológica. Estudios in vivo.	84
4.6.1. Efecto del TGF β 1 y la ET1 sobre células endoteliales de arteria pulmonar.	85
4.6.2. Efecto del TGF β 1 y la ET1 sobre células musculares de arteria pulmonar.	89
4.6.3. Efecto de los agonistas del PPAR γ en células endoteliales estimulados con ET1y TGF β 1	92

4.6.4. Efecto de los agonistas del PPAR γ en células musculares estimulados con ET1y TGF β 1	96
5. Conclusiones	99
6. Referencias bibliográficas	103
7. Abreviaturas	119

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Hipertensión pulmonar.

La hipertensión pulmonar (HP) es un desorden complejo que se caracteriza por un aumento progresivo de la presión arterial pulmonar, ocasionada por el remodelado de las arterias pulmonares fundamentalmente de pequeño calibre, que origina un aumento de resistencias pulmonares y como consecuencia sobrecarga y fallo del ventrículo derecho que si no se trata lleva al fallecimiento del paciente (Caruso et al. 2010).

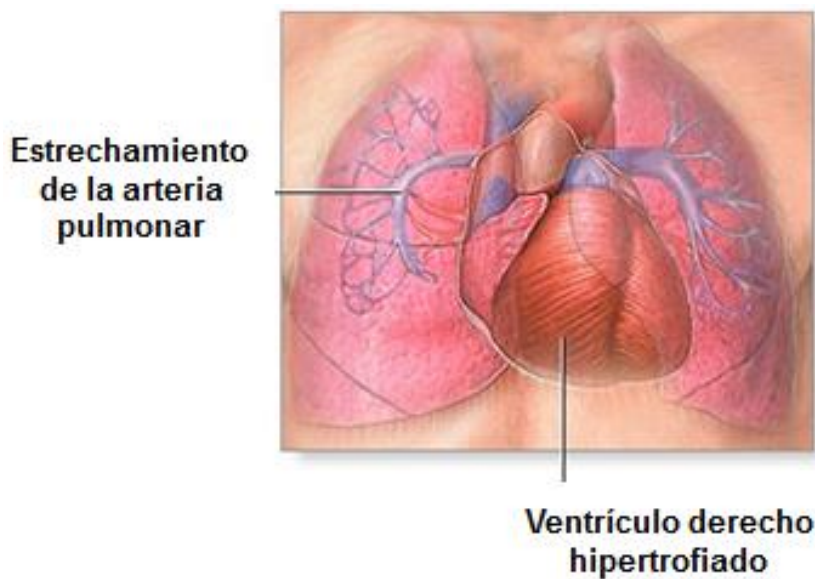


Figura 1. Estructura pulmonar de un paciente HP.

Los síntomas clínicos van a depender de cada individuo, aunque de forma general cabe destacar: cansancio, disnea, vértigos, mareos, síncope, edema en los miembros inferiores, debilidad, cianosis, angina, taquicardia y dolor torácico generalmente en la parte frontal del pecho.

1.1.1 Clasificación actual de la hipertensión pulmonar.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica la HP en 5 grupos, de una manera descriptiva, teniendo en cuenta su mecanismo de producción (Rubin 2004). Concretamente, en el 4º Simposio Mundial de 2008 sobre HP celebrado en Dana Point, California (EEUU), se modificó ligeramente la clasificación clínica de HP, con cambios que competen principalmente al grupo I. (Simonneau et al. 2009; Naval 2011). Las 5 categorías de HP comparten

características patológicas y biopatogénicas, así como similares opciones terapéuticas, y están clasificadas de la siguiente manera:

GRUPOS	CARACTERÍSTICAS
Grupo 1	<p>Las lesiones patológicas afectan a la parte distal de la arteria pulmonar, con un aumento de la presión arterial pulmonar (PAP) media ≥ 25 mmHg. Se caracterizan por la hipertrofia de la túnica media arterial, la íntima proliferativa y cambios fibróticos, engrosamiento de la adventicia con infiltración inflamatoria perivascular, lesiones complejas (plexiforme, lesiones dilatadas) y lesiones trombóticas.</p> <p>La remodelación de las arterias pulmonares provoca un aumento de la resistencia vascular pulmonar (PVR) que conlleva una sobrecarga en el ventrículo derecho (VD), hipertrofia, dilatación, y finalmente a la insuficiencia del VD y la muerte. Estos cambios se deben a una inadecuada adaptación de la contractilidad miocárdica.</p>
Grupo 2	<p>HP debida a problemas en la parte izquierda del corazón: los cambios patológicos en este grupo se caracterizan por el engrosamiento de las venas pulmonares, dilatación de los capilares pulmonares, edema intersticial, hemorragia alveolar y ensanche de vasos y ganglios linfáticos. Las arterias pulmonares distales pueden estar afectadas por hipertrofia de la túnica media arterial y fibrosis de la íntima.</p>
Grupo 3	<p>Enfermedades pulmonares y / o hipoxemia: los cambios patológicos en este grupo incluyen hipertrofia de la túnica media arterial y la proliferación obstructiva de la íntima en las arterias pulmonares distales.</p>
Grupo 4	<p>Las lesiones patológicas se caracterizan por trombos firmemente unidos a la túnica media de la arteria pulmonar en las arterias pulmonares elásticas, reemplazando la íntima normal. Estos pueden obstruir por completo la luz o formar diferentes grados de estenosis.</p>
Grupo 5	<p>HP con mecanismos poco claros y / o multifactoriales: el grupo incluye las condiciones heterogéneas donde la etiología no es clara o multifactorial.</p>

Tabla 1. Clasificación clínica de la Hipertensión pulmonar.

En este estudio nos hemos centrado en el grupo I, que se caracteriza por la afección de los vasos pulmonares de pequeño calibre (enfermedad vascular pulmonar), siendo la lesión plexiforme el hallazgo histopatológico típico, sin que sea patognomónico ni constante, ya que pueden producirse hallazgos clínicos y patológicos similares en algunos tipos de HP secundaria (hipertensión portal, infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, adictos a cocaína por vía inhalatoria y en aquellos pacientes que toman fármacos anorexígenos). En la práctica clínica, una definición útil es la presencia de presión pulmonar elevada, con presión de enclavamiento pulmonar normal y ausencia de causas secundarias.

La Hipertensión Pulmonar Arterial (HPA) se subdivide a su vez en dos tipos: la idiopática (HPAI) y la familiar (HPAF). Es una enfermedad rara y de causa desconocida. Su incidencia en la población general se estima entre un 1 y 2 casos por un millón de habitantes y año. La edad media de diagnóstico es de 36 años, aunque hasta un 9% de los casos comienzan pasada la sexta década. La distribución por razas es homogénea. Es más frecuente en el sexo femenino, tanto en la forma de presentación de los adultos como en la forma infantil.

Los pacientes HP no tratados tienen una supervivencia del 68%, 48% y 34% en el 1^o, 3^o y 5^o año respectivamente. (Waxman et al. 2013; Grant et al. 2013). No obstante aunque hemos visto que los pacientes son tratados con varios medicamentos que incrementan notablemente la supervivencia (entre 91% y el 97% después de un año y entre el 84% y el 91% después del segundo año), no consiguen detener la progresión de la enfermedad y el porcentaje de mortalidad sigue siendo elevado, lo que indica la necesidad de nuevas estrategias terapéuticas que complementen a las ya existentes para el tratamiento de la enfermedad.

1.1.2 Mecanismos moleculares implicados en la HP

Existen tres vías en la génesis de hipertensión pulmonar: la ruta de la endotelina, del óxido nítrico y de la prostaciclina.

Ruta de la endotelina: la endotelina 1 (ET1) es un potente vasoconstrictor que está sobreexpresado en el plasma y pulmones de pacientes con HP, especialmente en la microvasculatura precapilar, lugar donde se produce el incremento de la resistencia vascular en estos pacientes. Los efectos de la ET1 están mediados a través de dos subtipos de receptores de endotelina: el A (ETA) y el B (ETB), a los que la ET1 se une con alta afinidad (Galié et al. 2004; Iglarz et al. 2010). El receptor ETA se encuentra únicamente en células del músculo liso, mientras que el receptor ETB se puede encontrar tanto en las células endoteliales como en las células del músculo liso. La ET1 liberada por el endotelio actúa principalmente sobre las células musculares lisas adyacentes causando vasoconstricción y proliferación. El receptor A se encuentra ligado a las proteínas G y activa la fosfolipasa C, la cual induce un incremento de inositol trifosfato, diacilglicerol y sobretodo un aumento de calcio intracelular que conduce a la contracción de las células de músculo liso. El incremento del diacilglicerol y del calcio estimula también a la proteína quinasa C, la cual media la acción mitógena de la ET1 (figura 2).

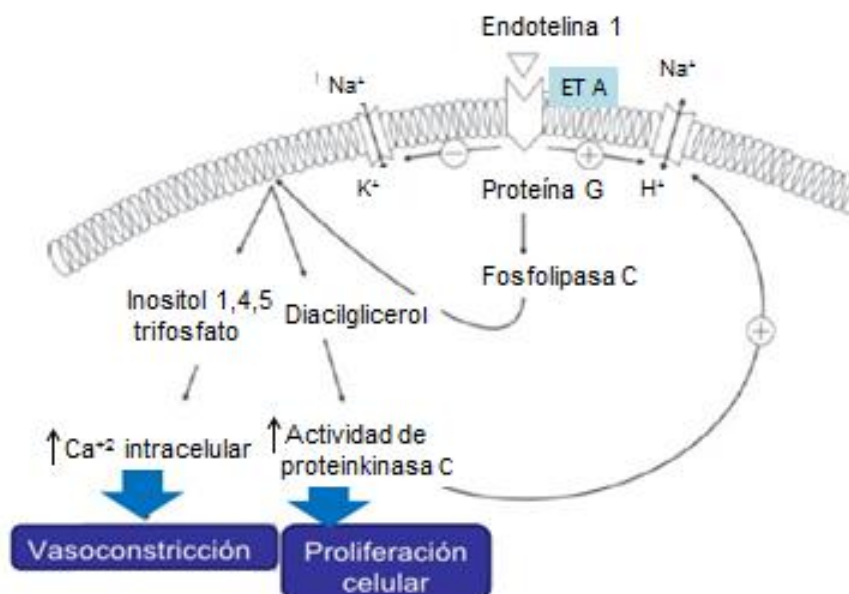


Figura 2. Efectos de la ET1 mediados por el receptor A.

Por otra parte, la ET1 actúa sobre los fibroblastos e induce proliferación y fibrosis, y en el propio endotelio provocando en este caso la vasodilatación por activación de la producción de óxido nítrico y prostaciclina, es decir, la ET1 posee un efecto bifásico: vasoconstrictor y vasodilatador. Estos tres procesos impulsados por la ET1 juegan un papel importante en el remodelado vascular y estructural pulmonar (Iglarz et al. 2010).

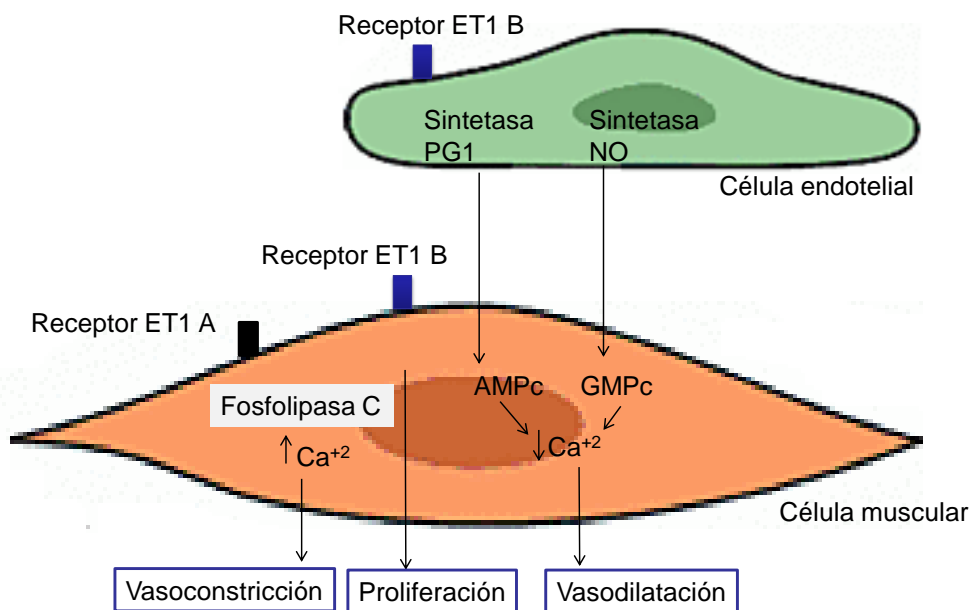


Figura 3. Esquema general de la vía de la endotelina 1. NO: óxido nítrico, GMPc: guanosín monofosfato cíclico, AMPc: adenosina monofosfato cíclico, PG1: prostaciclina.

Ruta del óxido nítrico (NO): el NO es sintetizado en el endotelio vascular a partir de la L-arginina por acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). El NO difunde a las células del músculo liso vascular activando a una guanilato ciclasa citoplasmática que cataliza el paso de guanosín trifosfato (GTP) a guanosín monofosfato cíclico (GMPc). Altos niveles de GMPc provocan la activación de proteínas quinasas inactivas que tras la fosforilación de diversas proteínas conducen a una disminución del Ca^{+2} intracelular. La disminución del Ca^{+2} citosólico tiene como efecto final la vasodilatación e inhibición de la proliferación celular (Crespo et al. 2004).

Los efectos del GMPc están limitados por la degradación enzimática a través de las fosfodiesterasas. Las fosfodiesterasas son una familia de 11 enzimas

que están ampliamente distribuidas en el organismo que actúan en la degradación del AMP o GMP cíclico. En la HP el nivel de fosfodiesterasas se encuentra elevado por lo que se produce una disminución del GMPc, que desencadena un aumento de Ca^{+2} citosólico y por lo tanto una disminución en los niveles de NO lo que conlleva a una vasoconstricción (Giaid et al. 1995).

Ruta de la prostaciclina: las prostaciclinas I2 (PGI2) son derivadas del ácido araquidónico, sintetizadas en el endotelio vascular y son uno de los vasodilatadores más potentes conocidos. Actúan principalmente previniendo la formación y agregación plaquetarias en relación con la coagulación de la sangre. Estos efectos los ejerce por su unión a un receptor de membrana acoplado a la proteína G, con la consiguiente activación de la adenilato ciclasa, lo que provoca un aumento en la producción de 3'5' adenosina monofosfato cíclico (AMPc) disminuyendo los niveles intracelulares de calcio (Rodriguez et al. 2006; Crespo et al. 2004) Los pacientes con HP muestran unos niveles bajos de prostaciclina, lo que provoca un aumento en el nivel de Ca^{+2} intracelular y por lo tanto conlleva a la vasoconstricción arterial.

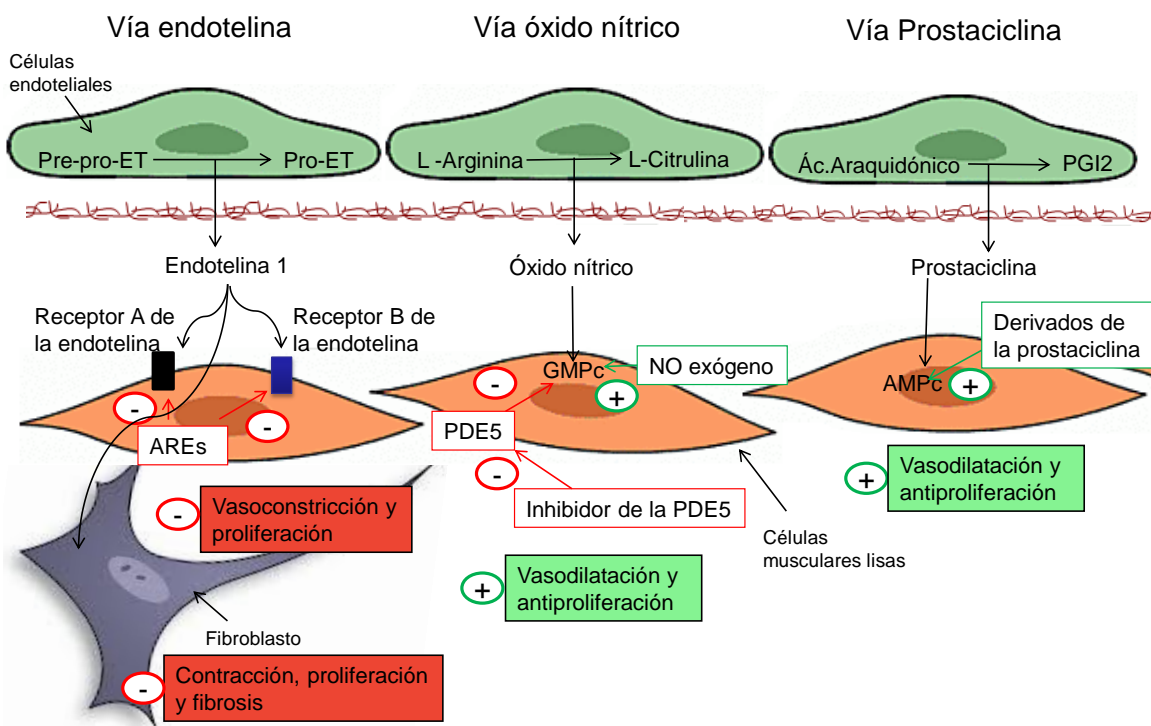


Figura 4. Mecanismo molecular de la hipertensión pulmonar. AREs: antagonistas de los receptores de endotelina, NO: óxido nítrico. PDE5: fosfodiesterasa 5, AMPc: adenosina monofosfato cíclico, GMPc: guanosín monofosfato cíclico. PGI2: prostaciclina 2, ET: endotelina.

1.1.3 El remodelado vascular en la hipertensión pulmonar.

El remodelado vascular se caracteriza por una proliferación de células musculares lisas en respuesta a varios factores de crecimiento liberados por el endotelio y las plaquetas como son el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), y el factor de crecimiento transformante β (TGF β). Como consecuencia de ello se produce el engrosamiento de las paredes de los vasos y aumenta la rigidez de éstos, lo que puede causar una completa oclusión vascular (figura 5), este proceso desencadena una amplia destrucción de arteriolas pulmonares provocando una reducción del área del lecho vascular pulmonar. Los factores de crecimiento liberados por las plaquetas y el endotelio son los que favorecen la proliferación de la íntima, el proceso inflamatorio y la síntesis de la matriz extracelular.

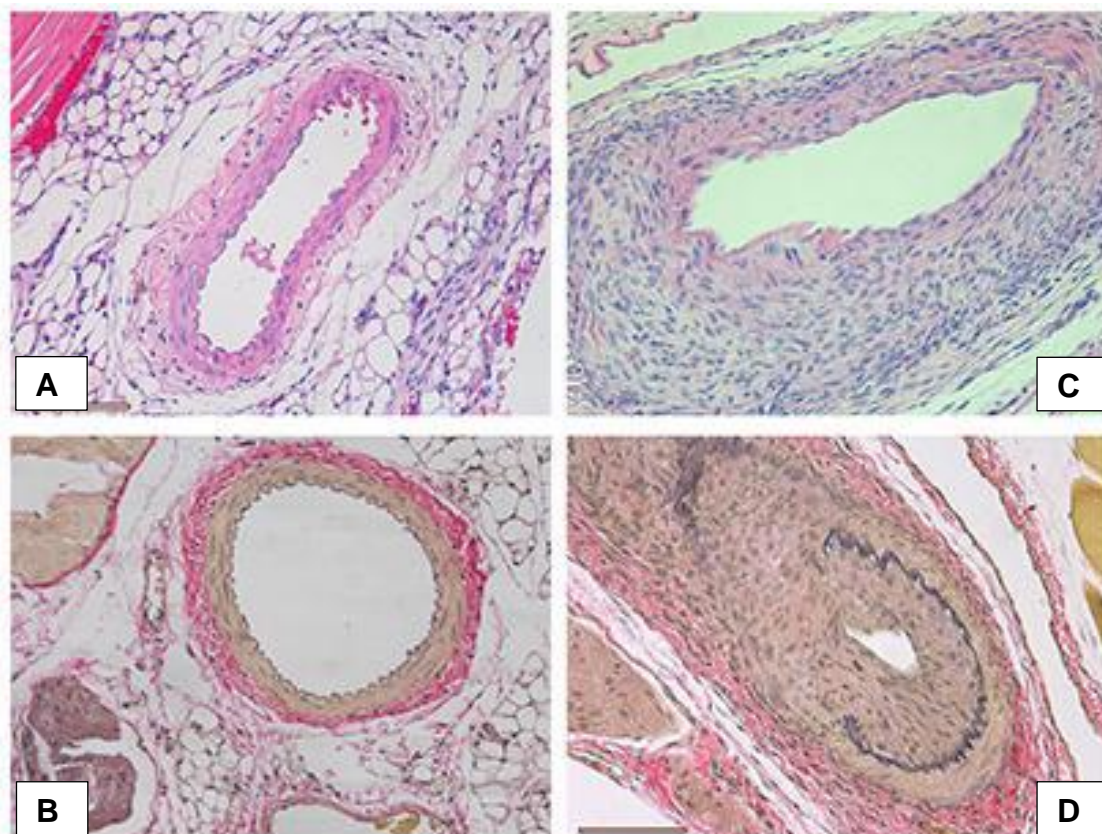


Figura 5. Remodelado vascular en arterias pulmonares de pequeño calibre. A y B) Arteria pulmonar de una persona sana. C y D) Arteria pulmonar de un paciente HPAI.

Durante el remodelado vascular se produce un engrosamiento de la media debido tanto a una proliferación anormal de células musculares lisas como a la migración de miofibroblastos desde la adventicia (Humber et al. 2006; Walker et al. 2006). Algunas de las proteínas encargadas de regular la proliferación celular son las ciclinas, éstas están involucradas en la regulación del ciclo celular, forman complejos con enzimas quinasas dependientes de ciclinas (Cdks) activando en estas últimas su función quinasas. La concentración de las ciclinas varía a lo largo del ciclo celular; cuando su concentración es baja la función de su correspondiente quinasas dependiente de ciclina es inhibida. Existen varios tipos de ciclinas que son activas en distintas fases del ciclo celular: la ciclina A y la ciclina B son proteínas de puntos de control del ciclo celular. Se unen a su correspondiente quinasas dependientes de ciclina Cdk2 para la ciclina A y Cdk1 para la ciclina B, participando en la progresión de la fase S o de síntesis del ciclo celular.

Durante la fase del ciclo celular G1 temprana, la ciclina D se une a las quinasas dependientes de ciclinas 4 o 6 (Cdk4 o Cdk6) y el complejo resultante "libera" el freno que impedía la progresión hacia la G1 tardía y, por lo tanto, el paso a la fase S. La ciclina E se une a la quinasas dependiente de ciclina Cdk2 en la fase G1 del ciclo celular, ya que es necesaria para la transición G1/S. El complejo ciclina E/Cdk2 fosforila a p27Kip1, un inhibidor de la ciclina D, marcándolo para que sea degradado, y promoviendo así la expresión de la ciclina A, lo que permite la entrada y progreso de la fase S.

El desarrollo de trombosis en pequeñas arterias pulmonares conduce a la obstrucción vascular. Se ha descrito que los pacientes con HPAI presentan alteraciones en la coagulación, en la función plaquetaria y en la fibrinólisis. La función plaquetaria puede estar promovida por el daño tisular del endotelio que deja al descubierto el colágeno. Como consecuencia de ello se adhieren las plaquetas, se activan y agregan. La activación plaquetaria no sólo favorece el proceso trombótico sino que además conlleva a la liberación de gránulos que contienen agentes mitógenos y sustancias vasoconstrictoras. Además, el riesgo de trombosis en pacientes con HPAI aumenta por la vida sedentaria a la que están sometidos estos pacientes, la insuficiencia venosa que presentan, y la dilatación de ventrículo izquierdo que padecen en los estadios finales.

Uno de los efectos asociados a la HPAI es la sobrecarga del ventrículo derecho como consecuencia de la vasoconstricción y del aumento de la resistencia vascular pulmonar. Para mantener un flujo adecuado de sangre hacia los pulmones, inicialmente el ventrículo derecho responde con un aumento de la contractilidad, se hipertrofia e incrementa la demanda de oxígeno. Esto puede favorecer el desarrollo de isquemia ventricular y disminución de la contractilidad, en consecuencia el corazón empieza a debilitarse, disminuye el gasto cardiaco, pierde su capacidad para bombear suficiente sangre a los pulmones, aparece congestión venosa sistémica, edema periférico, y de no tratarse esta insuficiencia cardiaca sobreviene la muerte, siendo esta la causa más frecuente de mortalidad en pacientes con HPAI (Rich et al. 1987; D'Alonzo et al. 1991).

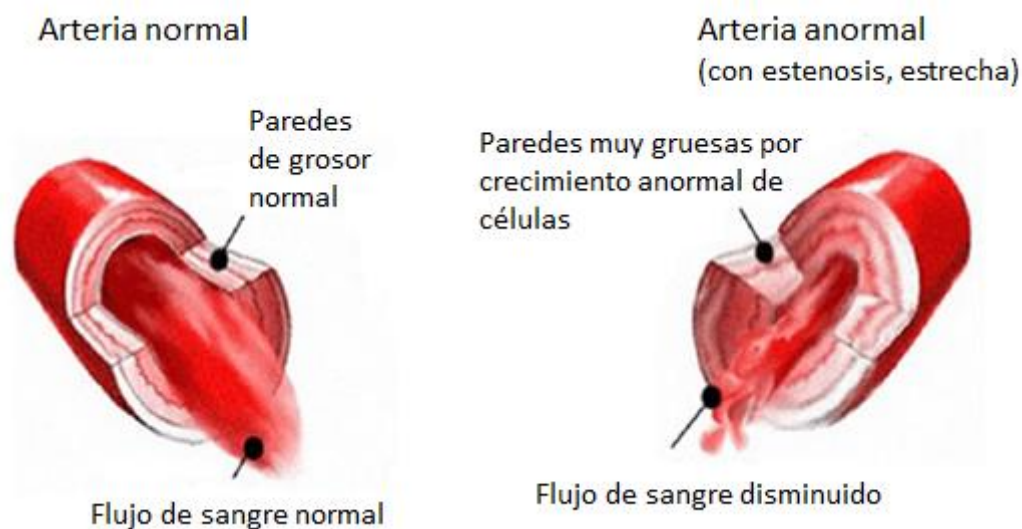


Figura 6. Comparación entre una arteria normal y una arteria procedente de un paciente HPAI.

1.1.3.1 Transición celular endotelio-mesénquima (EnMT)

El permanente estado de hipoxia en los pacientes de HPAI activa un proceso conocido como transición endotelio-mesénquima. La EnMT se caracteriza por la pérdida de contacto célula-célula, donde las células pasan a presentar una morfología estrellada característica del mesénquima alejándose de la morfología celular propia del endotelio. Este proceso desencadena una sobreexpresión de distintos factores tales como el TGF β 1, 2 y 3, el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) entre otros. Todos estos factores se resumen en la siguiente figura:

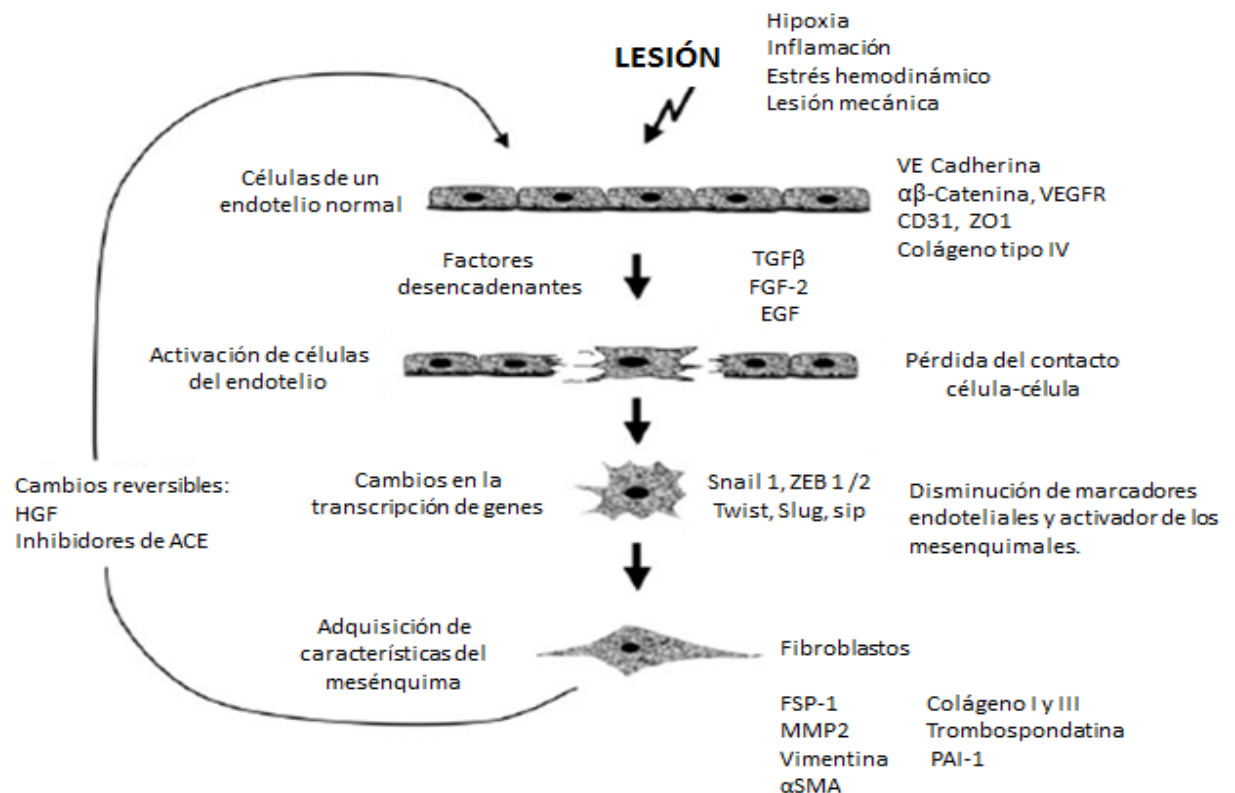


Figura 7. Representación de la transición endotelio-mesénquima (EnMT).

En líneas generales, la EnMT se puede resumir en las siguientes etapas: (i) pérdida de complejos de unión entre las células epiteliales originada por una disminución en la expresión de la cadherina vascular endotelial (VE-cadherina), moléculas de adhesión endotelial (CD31), receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), zonula ocludens 1 (ZO-1), $\alpha\beta$ -catenina y colágeno de tipo IV; (ii) migración y activación del proteoma mesenquimal, influenciado por los factores Snail, Slug, dedo de zinc de la caja E de unión homebox 1 y 2 (ZEB1/2), sip y twist y (iii) adquisición del fenotipo fibroblástico,

con expresión de actina de músculo liso (α SMA), colágenos I y III, trombospondatina, inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1), metaloproteinasa de matriz 2 y 9 (MMP-2,9), y vimentina (Arciniegas et al. 2007). Todo ello provoca los cambios visibles mencionados en el fenotipo de las células.

Algunos marcadores que podemos encontrar en las células endoteliales se encuentran resumidos en la siguiente tabla:

Marcador endotelial	Función	Fuente Bibliográfica
CD31	Implicado en la unión entre células endoteliales y entre éstas y los linfocitos.	Takahashi et al. 2005
VE-cadherina	Encargado de mantener la integridad de las uniones intercelulares y de la permeabilidad en células endoteliales.	Takahashi et al. 2005
VEGFR	Regulador de la angiogénesis, permeabilidad vascular y crecimiento endotelial.	Takahashi et al. 2005

Tabla 2. Marcadores endoteliales. CD31: cluster de diferenciación, VE-cadherina: cadherina vascular endotelial, VEGFR: receptor del factor de crecimiento endotelial.

Por otra parte algunos marcadores que podemos encontrar en células del mesénquima se resumen en la siguiente tabla:

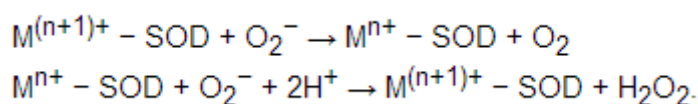
Marcador endotelial	Función	Fuente Bibliográfica
α SMA	Involucrado en la movilidad, estructura e integridad celular.	Choi et al. 2013
ZEB2	Esencial para la diferenciación y movilización de las células madre hematopoyéticas entre otras.	Medici et al. 2008
SNAI1	Represor de E-cadherina implicados en la transición endotelio-mesénquima	Cano A. et al. 2000, Medici et al. 2008 Bolós et al. 2003
SLUG	Represor de E-cadherina implicados en la transición endotelio-mesénquima	Medici et al. 2008 Bolós et al. 2003

Tabla 3. Marcadores mesenquimales. α SMA: α actina de músculo liso, ZEB2: dedo de zinc de la caja E de unión homebox 2.

1.1.3.2 Papel de las especies reactivas de oxígeno en la HP.

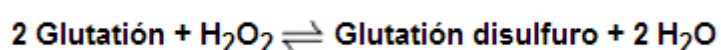
Durante la progresión de la hipertensión arterial pulmonar se produce una situación gradual de hipoxia originada como consecuencia del aumento de la demanda de oxígeno por los cardiomiocitos hipertrofiados y por la reducción de la densidad capilar (Des Tombe et al. 2002; Zong 2005), esta situación provoca un desequilibrio entre los estados oxidante/antioxidante y como consecuencia daño celular, que contribuye al fallo del ventrículo derecho (Sano 2007; Voelkel 2006).

Se ha observado un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno en distintos modelos de experimentación animal de HP y en pacientes diagnosticados de HPAI (Hoshikawa et al. 2001; Liu et al. 2006) que provocan daño en la vasculatura, lo que conlleva al deterioro de la señalización del NO y al desarrollo del remodelado vascular pulmonar (Lakshminrusimha et al. 2006; Ahmed et al. 2012). El NO, tiene acción vasodilatadora, y en los pacientes HPAI se encuentra menos expresado como consecuencia de una menor expresión de la enzima encargada de su síntesis, la NOS (Harrison 1997). En este contexto, el papel de la enzima superóxido dismutasa (SOD) es relevante, ya que está involucrada en la regulación del metabolismo del NO y en la prevención de HP, como se ha descrito en modelos animales adultos (Elmedal et al. 2004). Esta enzima cataliza la dismutación del superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno:



Gracias a esta reacción enzimática la SOD protege a las células de las reacciones dañinas del oxígeno.

Otro enzima antioxidante involucrado en enfermedades cardiovasculares (incluyendo HP) es la glutatión peroxidasa (GPX), esta enzima cataliza la reacción de oxidación de la glutatión a glutatión disulfuro utilizando para ello peróxido de hidrógeno usando como cofactor el selenio.



La GPX tiene como principal función proteger al organismo del efecto degradante de los hidroperóxidos formados de forma endógena.

Un déficit de esta enzima está asociado con un aumento de las especies reactivas de oxígeno y una disminución de NO, que conduce a la disfunción endotelial y a una alterada reactividad vascular (Leopold 2010).

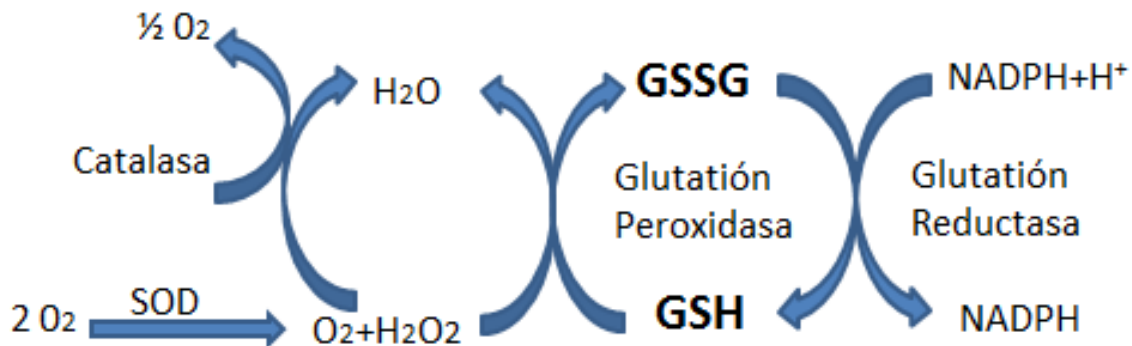


Figura 8. Síntesis del Glutatión. GSSH: glutatión oxidado, GSH: glutatión, SOD: superóxido dismutasa, NADPH: dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato (forma reducida).

1.1.4 Factores genéticos implicados en el desarrollo de la HPAI

A nivel genético, únicamente se han podido identificar mutaciones en tres genes que podrían predisponer a la enfermedad: en gen del receptor tipo II de la proteína ósea morfogenética (BMPR2), en la activina kinasa de tipo 1 (ALK1) y en la serotonina. De ellos las más frecuentes se localizan en BMPR2. Estas mutaciones son responsables del desarrollo del 70% de las hipertensiones pulmonares hereditarias y del 6% de las idiopáticas (Thomson et al. 2000). Estos resultados han sido avalados por diferentes estudios realizados hasta el 2006 (Carrion et al. 2007; Barberá 2001). BMPR2 también ha sido estudiada en modelos de hipertensión no adquirida. Así se ha estudiado en distintos modelos animales de hipertensión pulmonar. Durante el desarrollo de la enfermedad, se produce una disminución en el contenido de dicha proteína que no se correlacionaba con la disminución a nivel de ARN mensajero (Takahashi et al. 2006), de manera que la regulación de la cantidad de dicha proteína debe producirse a nivel post-transcripcional.

Uno de los mecanismos de regulación asociados a esta disminución de proteína es una actividad anómala de los microARNs-17/92. Estos microARNs son inducidos por la interleucina 6 (IL6) y su acción está mediada por el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) (Brock et al. 2009).

La ALK1 es una proteína homodimérica de transmembrana localizada en la superficie celular, y es un receptor tipo I de la superfamilia del TGF β . En situaciones de isquemia, la bajada en la presión de oxígeno en la célula hace que el principal efector molecular de la hipoxia: HIF, se una a elementos funcionales en el promotor de ALK1, estimulando transcripcionalmente su expresión. De este modo, la señalización en la célula endotelial, mediada por ALK1, es clave para la respuesta ante situaciones de emergencia celular (daño e hipoxia) mediante estimulación de angiogénesis, y para evitar las complicaciones patológicas que derivarían de la pérdida de la integridad endotelial, por lo que mutaciones en dicha proteína causan trastornos vasculares (Lux A. et al. 2006; Galiè et al. 2004).

Finalmente algunos autores han asociado determinados polimorfismos en un único nucleótido (SNPi) en la región promotora del gen codificado para el transportador de serotonina (SERT) con el desarrollo de la HP. No obstante estos resultados no son concluyentes. (MacLean 2007).

Las mutaciones en dichas proteínas explican únicamente el 60% de causas de la HPAI, por lo que existe un alto porcentaje de casos no asociados a dichas mutaciones, no obstante existen personas con mutaciones en BMPR2 que no padecen la enfermedad, lo que indica que además de las mutaciones genéticas debe haber otro factor desencadenante. Como ya hemos mencionado recientemente se están empezando a estudiar modificaciones a nivel epigenético que se producen en el desarrollo de las enfermedades vasculares y se ha visto como el papel de los microARNs va cobrando más fuerza (Morrell et al. 2009; McDonald et al. 2012).

1.2 Los microARNs.

En la última década se caracterizó una familia de ARNs no codificantes relacionada con gran cantidad de procesos biológicos que, por su pequeño tamaño, ha recibido el nombre de microARN (miARN). Están compuestos por una cadena sencilla de ARN de unos 19-22 nucleótidos y son capaces de controlar la expresión génica a nivel postranscripcional regulando la expresión de otros genes (induciendo la degradación del ARNm o inhibiendo su traducción, según el grado de complementariedad).

1.2.1 Biogénesis y procesamiento de los microARNs

Los microARN son producidos endógenamente con una maquinaria enzimática muy conservada en la escala filogenética (figura 9). Se transcriben a partir de un precursor de gran tamaño que puede contener múltiples microARNs (denominado micro-ARN primitivo).

Este microARN es procesado en el núcleo celular por un complejo que incluye la ARNasa III Droscha (pre-microARN) y es exportado al citoplasma celular por la proteína exportina 5 mediante un mecanismo Ran-GTP dependiente. Una vez allí, otra ARNasa denominada Dicer procesa este precursor para generar la forma madura del microARN, convirtiendo el pre-microARN en un dúplex de 21 nucleótidos aproximadamente.

El paso final de su maduración consiste en acoplar la cadena funcional del microARN al complejo multiproteico inductor de silenciamiento de ARN (RISC), cuya proteína más relevante es Argonaute2. Una vez en el RISC, el microARN reconoce a su ARNm diana gracias a la homología parcial que presentan sus secuencias, habitualmente restringida a los 6-8 nucleótidos situados en la región 3'UTR (región no traducida) del ARNm diana (secuencia semilla o seed sequence). Una baja complementariedad entre las secuencias conduce a una inhibición de la traducción del ARNm, mientras que un alto grado de homología conduce a la degradación del ARNm, ya sea a través de la acción directa de Argonaute2 en el RISC o a través de su digestión en cuerpos especializados de procesamiento (Jakymiw et al. 2005).

Se trata de un sistema muy complejo que regula la expresión de entre el 30 y el 50 % de los genes contenidos en el genoma.

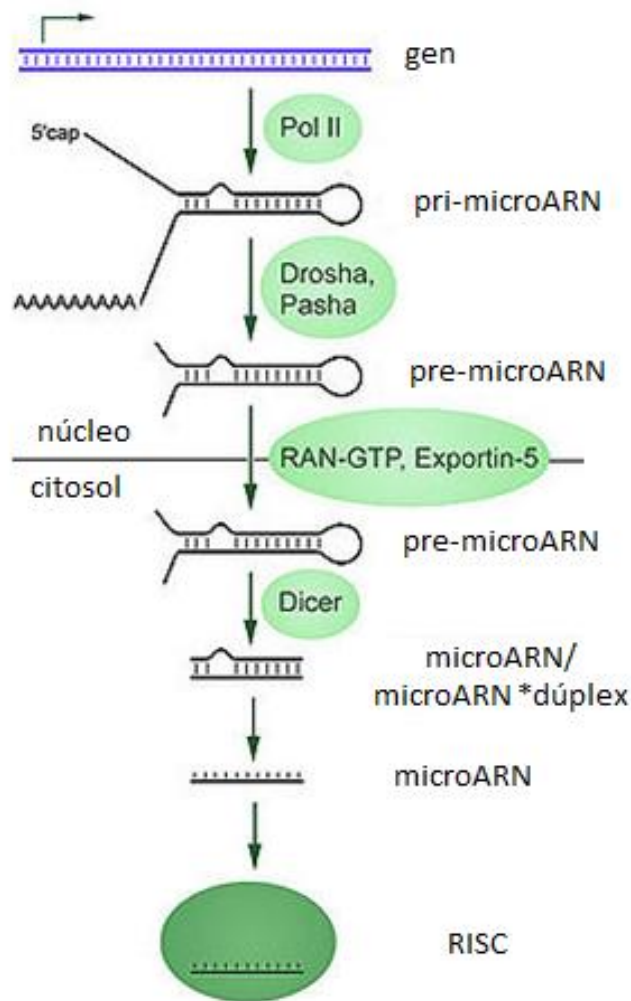


Figura 9. Biogénesis y procesamiento de los microARNs. Los microARNs se producen a partir de un microARN precursor (pre-microARNs), que a su vez se ha formado a partir de un transcrito de microARN primario (pri-microARN).

1.2.2 Implicación de los microARNs en la hipertensión pulmonar y en otras enfermedades cardiovasculares.

Existen múltiples evidencias que relacionan la importancia de los microARNs en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares pero todavía queda mucho por estudiar referente a su papel en la fisiopatología de la hipertensión pulmonar.

Uno de los modelos de experimentación animal más utilizados en el estudio de la HP es el de inducción en rata por exposición crónica a hipoxia. En este modelo se produce una disminución en la expresión de Dicer y por lo tanto una atenuación en la expresión de diversos microARNs, entre ellos el miR-21, que también fue estudiado en plasma de pacientes HP obteniendo resultados similares (Caruso et al. 2010)

En humanos existen evidencias de que los microARNs tienen gran importancia en enfermedades cardiovasculares (Schroen et al. 2009). La siguiente tabla muestra algunos ejemplos:

microARN	Implicación	Referencias
miR-122	-Hipertensión con mutación en SCL7A1	Yang et al. 2007
miR-1	-Arritmias cardíacas -Crecimiento de cardiomiocitos -Hipertrofia y fallo cardíaco	Schroen et al. 2009
miR-33	-Hipertrofia de cardiomiocitos	Schroen et al. 2009
miR-133	-Arritmias cardíacas	Schroen et al. 2009
miR-30	-Fibrosis cardíaca	Schroen et al. 2009
miR-133b	-Fibrosis cardíaca	Schroen et al. 2009
miR-29	-Fibrosis cardíaca	Schroen et al. 2009
miR-195	-Alzheimer	Zhu et al. 2012
miR-145	-Angiogénesis y remodelado vascular	Caruso et al. 2012
miR-126	-Angiogénesis y remodelado vascular	Bockmeyer et al. 2012
miR-204	-Angiogénesis y remodelado vascular	Bockmeyer et al. 2012
miR-21	-Angiogénesis y remodelado vascular	Bockmeyer et al. 2012
miR-20a	-Angiogénesis y remodelado vascular	Brock et al. 2012
miR-17	-Remodelación vascular -Arritmias cardíacas	Pullmsetti et al. 2012
miR1-2	-Desregulación de la cardiogénesis	Zhao et al.2007

Tabla 4. Implicación de los microARNs en diferentes fisiopatologías.

Aunque los microARNs podrían estar implicados en el proceso patológico y posiblemente usarse como biomarcadores de pronóstico de la enfermedad, no existen estudios en sangre circulante en pacientes. Por otra parte, en muchos casos el uso de técnicas invasivas está totalmente contraindicado es estos enfermos.

1.3 Tratamiento farmacológico de la HPAI

Existe una gran variedad de fármacos para el tratamiento de la enfermedad (Galiè et al. 2009; Román et al. 2008), la tabla siguiente los resume:

Grupos	Mecanismo de acción	Principio activo
Diuréticos (Tiazidas y del asa)	Producen una pérdida neta de sodio y agua del organismo, actuando directamente sobre el riñón, y previniendo la retención hidrosalina.	-Clorotiazida -Furosemida -Torasemida
Anticoagulantes	Puesto que en la HP existe trombosis en la microvasculatura pulmonar y un alto riesgo de eventos trombóticos, el uso de anticoagulantes orales se relaciona con un aumento de la supervivencia, así como con una disminución de la trombosis venosa profunda y la embolia pulmonar.	-Heparina -Warfarina
Bloqueantes β	Producen un bloqueo competitivo y reversible de las acciones de las catecolaminas mediadas a través de la estimulación de los receptores beta adrenérgicos	-Atenolol, bisoprolol, metoprolol, nadolol, oxprenolol, propranolol, timolol, labetalol, carvedilol
Antagonistas de canales de calcio	Inhiben el flujo de entrada de calcio a través de los canales de calcio tipo L de las membranas celulares, disminuyendo como consecuencia la concentración de calcio vascular y produciendo vasodilatación arteriovenosa que reduce la PA.	- Nifedipino - Diltiazem -Amlodipino
Antagonistas de receptores de endotelina	Bloquean los receptores de endotelina, por lo que se inhibe la síntesis de dicha enzima y como consecuencia no provoca su efecto vasoconstrictor en la arteria.	-Bosentan -Sitaxentan -Ambrisentan
Bloqueantes α	Bloquean de forma selectiva y competitiva los receptores α -1-adrenérgicos postsinápticos vasoconstrictores, produciendo como consecuencia	-Prazosina -Urapidilo -Doxazosina -Indoramina

	vasodilatación arteriovenosa y reducción de las resistencias vasculares periféricas y de la PA.	-Terazosina
Bloqueantes $\alpha + \beta$	Bloqueantes β -adrenérgicos no selectivos, con propiedades vasodilatadoras derivadas de su acción bloqueante de los receptores α -1-adrenérgicos.	-Carvedilol -Labetalol
Inhibidores de la PDE-5	Inhiben la acción de la PDE-5, enzima implicada en la degradación del GMPc y por lo tanto consiguen una vasodilatación.	-Sildenafil

Tabla 5. Tratamientos farmacológicos para pacientes HPAI

De todos ellos podemos destacar el papel de los antagonistas de receptores de endotelina, de los inhibidores de la fosfodiesterasa tipo 5 (PDE-5) y el uso de análogos de las prostaciclina.

Los antagonistas de endotelina han demostrado una mejora en la capacidad de ejercicio, una mejora de la función pulmonar a nivel hemodinámico y como consecuencia una disminución en el número de hospitalizaciones en estos pacientes (Steiner et al. 2008).

Podemos distinguir tres tipos de antagonistas de receptores de endotelina: el bosentan (antagonista dual), el ambrisentan (antagonista específico de los receptores A para pacientes de clase II y III de HP), y el sitaxentan (antagonista de los receptores A y B de endotelina (ETA) y (ETB), aproximadamente 6.500 veces más selectivo para ETA que para ETB).

Otro importante fármaco con reconocidos efectos beneficiosos en este tipo de pacientes es el sildenafil; dicho fármaco es un importante vasodilatador cuyo mecanismo de acción cursa con el aumento del GMP cíclico producido como consecuencia de la inhibición de la PDE-5, enzima implicada en la degradación del mismo.

El saber que los pacientes con HPAI tenían déficit de prostaciclina, condujo al intento de administrar este compuesto de forma crónica. El primer fármaco

empleado fue el epoprostenol, un análogo de prostaciclina de administración intravenosa continua. Los resultados fueron muy buenos y fue el primer fármaco aprobado por la Agencia de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) para el tratamiento de la HAP, al demostrar un impacto no sólo en la calidad de vida sino también en la supervivencia de los enfermos. Ante el éxito del epoprostenol y dadas las dificultades y riesgos para la administración del mismo, pronto aparecieron otros análogos a las prostaciclinas para uso subcutáneo (treprostinil), por vía inhalada (iloprost) y por vía oral (beraprost) (Barbera 2002).

1.4 Papel del coactivador 1 de receptor activado por proliferador de peroxisoma α (PGC-1 α) en la HP.

El PGC-1 α es un coactivador transcripcional que regula los genes implicados en el metabolismo energético, siendo un regulador de la biogénesis y la función mitocondrial (Wu et al. 1999; Puigserver et al. 2003). Estudios recientes han sugerido que los niveles de su expresión en células mononucleares en sangre de pacientes con infarto de miocardio pueden relacionarse con el tamaño del área hipóxica, apoyando el papel de esta proteína en la protección de los miocardiocitos. De hecho, la capacidad de un tejido para inducir PGC-1 α tras un evento hipóxico, tal como un infarto de miocardio, está relacionado con la capacidad regenerativa del tejido (Fabregat-Andrés et al. 2011). Muy recientemente Mata et al. 2012 han demostrado cómo niveles de PGC-1 α se relacionan con la función pulmonar como la presión arterial pulmonar (PAP) y la resistencia vascular pulmonar (PVR) entre otros.

El PGC-1 α interacciona con diversos receptores activados por los proliferadores de peroxisomas (PPARs) (Finck et al. 2007), permitiendo la interacción de esta proteína con múltiples factores de transcripción entre los que se encuentra el elemento de respuesta a AMPc (CREB). Su activación está relacionada con la regulación de la biogénesis mitocondrial. Esta proteína podría estar también involucrada en la regulación de la homeostasis del colesterol celular y el desarrollo de la obesidad (Austin et al. 2012).

1.4.1 Características de los PPARs.

Los receptores PPARs son un grupo de proteínas pertenecientes a la familia de receptores nucleares que funcionan como factores de transcripción regulando la expresión de genes (Michalik et al. 2006) mediante la unión a elementos de respuesta específicos dentro de los promotores (PPREs), mediante secuencias de seis nucleótidos repetidas y separadas por un nucleótido, conocidas como elementos de respuesta DR-1 (Parra et al. 2001). Los PPAR se unen como heterodímeros con un receptor de retinoide X (RXR) y aumentan la tasa de iniciación de la transcripción.

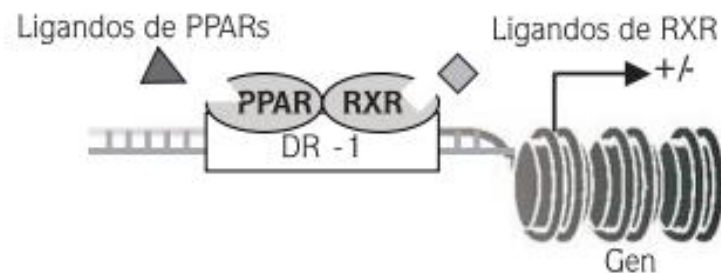


Figura 10. Modulación de la transcripción mediante la unión del heterodímero PPAR/RXR a elementos de respuesta DR-1 en la región promotora.

Los PPAR juegan un papel fisiológico crítico como sensores de lípidos y reguladores del metabolismo lipídico, mediante unión a sus ligandos naturales (ácidos grasos icosanoides). El uso de ligandos artificiales (fibratos y tiazolidinedionas (TZD)) ha permitido a los investigadores dar a conocer muchos papeles potenciales para los PPAR en la regulación de la diferenciación celular, el desarrollo y el metabolismo (hidratos de carbono, lípidos, proteínas), así como su papel en el desarrollo de patologías como la aterosclerosis, inflamación, cáncer, infertilidad, y la desmielinización (Berger 2002, Feige 2006).

1.4.2 Nomenclatura y distribución tisular de los PPAR

Hasta la fecha se han identificado tres tipos de PPAR: alfa, beta/delta y gamma (Berger 2002), en la siguiente tabla se detallan algunas de sus características:

Tipos de PPAR	Distribución anatómica
PPAR α	Hígado, riñón, corazón, músculo y en el tejido adiposo entre otros.
PPAR β / δ	Cerebro, tejido adiposo y en piel entre otros.
PPARγ1	Prácticamente en todos los tejidos, incluyendo el corazón, músculo, colon, riñón, páncreas y el bazo.
PPARγ2	Tejido adiposo.
PPARγ3	Macrófagos, en intestino grueso y en tejido adiposo blanco.

Tabla 6. Tipos de PPARs.

PPAR α y PPAR γ son las dianas moleculares de un gran número de fármacos comercializados. Los PPAR α participan tanto en el catabolismo de los ácidos grasos como en el transporte extracelular de lípidos; los fibratos hipolipemiantes (bezafibrante, ciprofibrato, clofibrate, gemfibrozilo y el fenofibrato) y sus agonistas, tienen utilidad ampliamente demostrada en el manejo de algunas dislipidemias. Las TZD utilizadas como fármacos antihiperlipemiantes (troglitazona, que ha sido retirada recientemente, pioglitazona y la ciglitazona), son agonistas de los PPAR γ ; todavía existen muchos interrogantes acerca de su relación con el metabolismo de los carbohidratos pero su uso en el manejo de la diabetes mellitus tipo 2 cada vez gana más importancia. Por otro lado, los antiinflamatorios no esteroideos se relacionan con las funciones de los PPAR δ

Otros fármacos como ácido perfluorooctanóico sintético activa PPAR α , el Berberine activa PPAR γ , mientras que el ácido perfluorononanoico sintético activa tanto PPAR α como PPAR γ .

1.4.3 Agonistas del PPAR γ

Las TZD, denominadas también glitazonas o agonistas PPAR γ , son ligandos hipoglucemiantes selectivos de PPAR γ y regulan el metabolismo de carbohidratos y lípidos.

El primer principio activo de este grupo farmacológico fue la ciglitazona sintetizada en 1982. Esta molécula disminuye la resistencia a insulina en pacientes con diabetes, obesidad o ambas. Posteriormente se desarrollaron tres principios activos: la troglitazona, la rosiglitazona y la pioglitazona.

Las TZD se unen al PPAR γ , aumentando la transcripción de genes implicados en el metabolismo lipídico (Yki-Jarvinen 2004). Otro efecto conocido de las TZDs es la activación de GLUT4, un transportador de glucosa en tejido adiposo y músculo. Este efecto podría explicar su efecto hipoglucemiante. (Moreno et al. 1999).

De forma directa los PPAR γ participan en la adipogénesis, es decir en la diferenciación de preadipocitos en adipocitos así como también en la proliferación de estos. Las TZD ejercen la sensibilización a insulina tanto directa como indirectamente. Directamente actúan aumentando el número de adipocitos y consecuentemente la masa de tejido adiposo subcutáneo, lo que aumenta la lipogénesis y disminuye la lipólisis, originando un descenso de ácidos grasos libres y triglicéridos en sangre, que contribuye a aumentar la sensibilidad a insulina.

Indirectamente las TZD modifican la secreción de adipocitoquinas: aumenta la adiponectina, reduce los niveles del factor de necrosis tumoral (TNF α) y de resistina. De éstos, la adiponectina aumenta la sensibilidad de insulina, y el factor de necrosis tumoral, la resistina y la β -hidroxiesteroide deshidrogenasa inducen resistencia de insulina en roedores (Ferré 2004; Yamauchi et al. 2001). Por otra parte, se ha observado que la rosiglitazona inhibe la transición endotelio-mesénquima (Liu et al. 2011).

En resumen, las TZD provocan un aumento en la captación de insulina en tejido adiposo y músculo esquelético, disminuyen la cantidad de glucosa que libera el hígado y mejoran la función de las células beta.

2. OBJETIVOS

Los objetivos del presente estudio son:

- 1) Evaluar si existe expresión diferencial entre microARNs en sangre de pacientes y voluntarios sanos.
- 2) Analizar si los microARNs diferentemente expresados entre pacientes HPAI y controles correlacionan con la fisiopatología de la enfermedad.
- 3) Evaluar si existe una correlación entre los microARNs expresados y los genes cuya expresión está controlada por estos microARNs.
- 4) Estudiar el posible papel de agonistas de PPAR γ como nuevos agentes farmacológicos potencialmente útiles para el tratamiento de la HPAI.

3.MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL**Cultivos celulares:**

Material	Casa comercial
Endotelina	Sigma Aldrich, Madrid, España
TGFβ1	Sigma Aldrich, Madrid, España
Medio EBM2-MV con L-glutamina	Lonza Group LTD, Basel, Suiza
Single quots (SQ) EGM2 MV	Lonza Group LTD, Basel, Suiza
Medio SmBM	Lonza Group LTD, Basel, Suiza
Single quots SmBM	Lonza Group LTD, Basel, Suiza
Ciglitazona	Cayman Chemical Company. Michigan, USA
miRNA23a Inhibitor	Ambion, Paisley, UK
Lipofectamina RNAiMAX Reagent	Invitrogen, Madrid, España
Dynabeads CD31 endothelial kit	Dynal Biotech, Hamburgo, Alemania
Triple	Gibco, Barcelona, España
Opti-MEM	Gibco, Barcelona, España
Colagenasa 1%	Gibco, Barcelona, España
GFP-expressing plasmid DNA (25 ug)	Altogen Byosystems, USA

Reactivos químicos:

Material	Casa comercial
Trizol	Invitrogen, Madrid, España
Cloroformo	Panreac, Barcelona, España
Isopropanol	Sigma Aldrich, Madrid, España
Etanol Absoluto	Panreac, Barcelona, España
Glucógeno	Calbiochem, California, EEUU

Microarrays:

Material	Casa comercial
Microarrays para microARNs	Affymetrix, CA, USA
Microarrays para ARNs	Affymetrix, CA, USA
3DNA Array Detection Flash Tag™ Biotin HSR	Genisphere, Hatfield, USA
Tubos PAXgene Blood miRNA	(Qiagen, CA, USA)
kit de PAXgene Blood miRNA	(Qiagen, CA, USA)
kit de PAXgene Blood RNA	(Qiagen, CA, USA)

Se utilizó el Gene Chip miRNA array que contiene 46228 sondas que se agrupan en 7815 conjuntos de sondas, con un mínimo de cuatro sondas por secuencia analizada. Además de incluir todas las secuencias de todos los microARNs descritos hasta la fecha (6703), incluye 499 ARNs nucleares pequeños (snoARNs, implicados en el splicing alternativo).

RT-PCR:

Material	Casa comercial
TaqMan® Reverse Transcription Reagents	Applied Biosystems, Madrid, España
TaqMan® Gene Expression Assays:	Applied Biosystems, Madrid, España
TaqMan preamp master mix	Applied Biosystems, CA, USA
TaqMan microARN transcriptasa reversa.	Applied Biosystems, , Madrid, España
TaqMan Universal PCR Master Mix II, no UNG	Applied Biosystems, Madrid, España
CitC	Applied Biosystems, CA, USA (Hs_01588973)
SOD	Applied Biosystems, CA, USA (Hs_00167309)
PGC-1 α	Applied Biosystems, CA, USA (Hs_01016719)
GAPDH	Applied Biosystems, CA, USA (4326317)
miR-23a	Applied Biosystems, CA, USA (000399)
miR-20b	Applied Biosystems, CA, USA (001014)
miR-145	Applied Biosystems, CA, USA (002278)
miR-328	Applied Biosystems, CA, USA (000543)
miR-27a	Applied Biosystems, CA, USA (000408)
CCNA2	Applied Biosystems, CA, USA (PR4448B)
CCNH	Applied Biosystems, CA, USA (PV3868)
CCNE2	Applied Biosystems, CA, USA (HS00180319_m1)
CDKN2	Applied Biosystems, CA, USA (HS00923894_m1)

Otro material:

Material	Casa comercial
Kit de ensayo antioxidante total	Cayman Chemical Company, Michigan, EE.UU.
Kit de ensayo GPX	Cayman Chemical Company, Michigan, EE.UU.

MÉTODOS

3.1 Diseño experimental.

En este trabajo hemos empleado muestras sanguíneas procedentes de pacientes diagnosticados HPAI y de voluntarios sanos. Todos los procedimientos han sido aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) y la Comisión de Investigación del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia.

Se seleccionaron pacientes con hipertensión arterial pulmonar idiopática que ya estaban siendo tratados. A dichos pacientes se les solicitó una muestra de sangre, a partir de la cual se realizó una extracción de microARN que fue analizada mediante microarrays de Affymetrix para microARNs. El estudio fue realizado con 12 pacientes y los resultados fueron comparados frente a 9 voluntarios sanos. Posteriormente se analizaron informáticamente las posibles dianas de los microARNs analizados y se validaron mediante RT-PCR.

Por otra parte hemos utilizado un modelo de células endoteliales procedentes de microvasculatura pulmonar y células musculares pulmonares estimuladas con ET1 20nM o TGF β 5ng/mL en presencia o ausencia de ciglitazona 3 μ M.



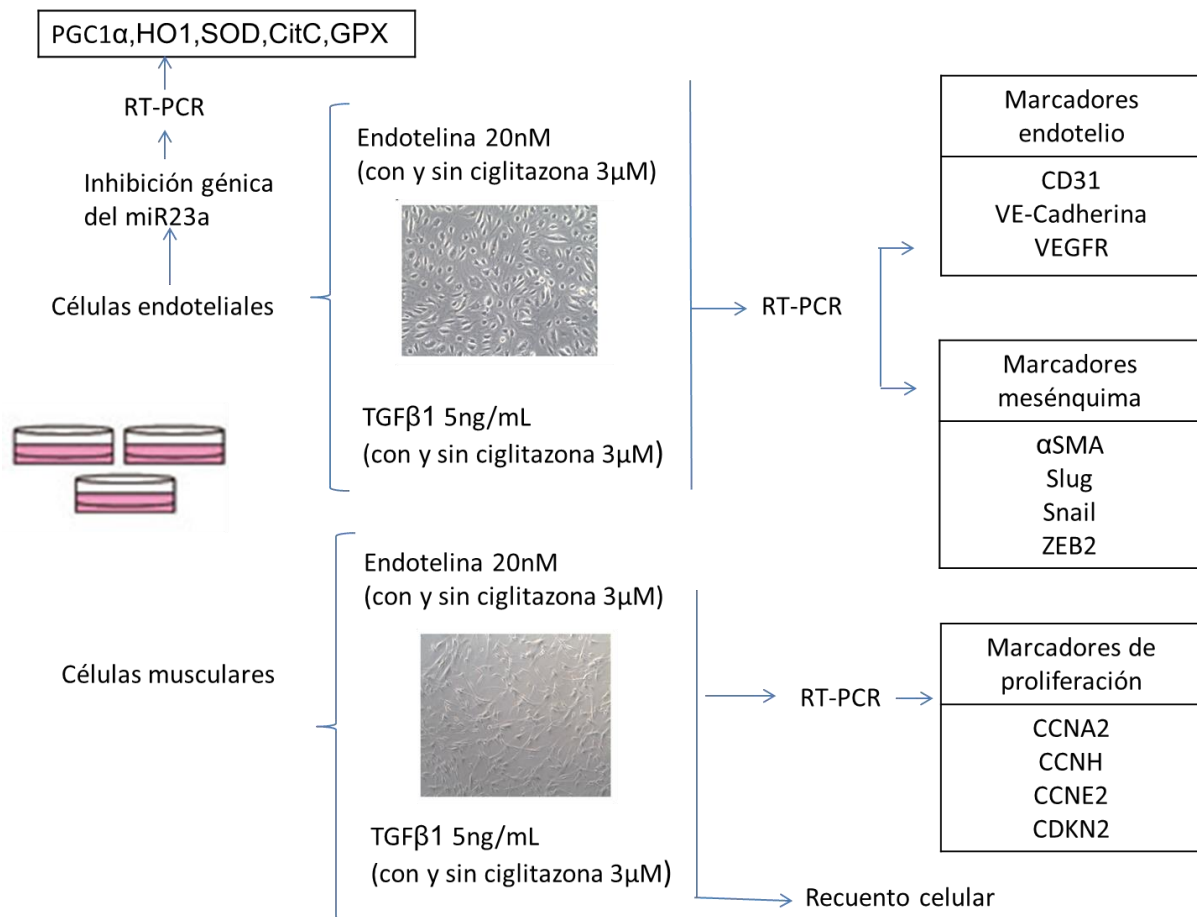


Figura 11. Diseño experimental.

3.2 Población de estudio.

Criterios de inclusión:

-Pacientes diagnosticados de hipertensión pulmonar (PAP > 25 mmHg), en concreto pacientes pertenecientes al grupo I, que se caracteriza por la presencia de hipertensión pulmonar capilar en ausencia de factores desencadenantes de la misma como pueden ser las enfermedades pulmonares, hipertensión pulmonar tromboembólica u otras enfermedades raras.

-Consentimiento informado de todos los pacientes incluidos en el estudio.

Criterios de exclusión:

-Pacientes HP no pertenecientes al grupo I.

-No disponibilidad del consentimiento informado firmado.

3.3 Cultivos celulares

Todos los experimentos in-vitro se realizaron en una sala blanca usando una campana de flujo laminar (Telsar. Bioestar España).

3.3.1 Aislamiento de células endoteliales y musculares a partir de arteria pulmonar humana.

A partir de segmentos de arteria pulmonar humana obtenidas de lobectomías de pacientes operados de cáncer de pulmón previo consentimiento informado se aislaron células endoteliales y musculares.

En primer lugar se limpió la arteria, se abrió cuidadosamente mediante un corte longitudinal evitando tocar la capa más interna y se cortó en pequeñas porciones de 2 milímetros aproximadamente. A continuación se preparó en una placa de 6 pocillos 2 mL de colagenasa 1% (Gibco, Barcelona, España) en la parte basal del pocillo, en la parte apical se colocaron los fragmentos de arteria de modo que la parte interna, donde se encuentra el endotelio, fuese la que mantuviese el contacto con la colagenasa y se incubó durante 30 minutos a 37°C, una vez transcurrido el tiempo se neutralizó con la solución RPMI + SBF al 10% usando el doble de volumen que de colagenasa, se recogió y se centrifugó durante 5 minutos a 1.200 rpm. Transcurrido ese tiempo el sobrenadante se descartó, el pellet se reconstituyó con 1 mL de medio para células endoteliales EBM2-MV suplementado con sus alícuotas específicas (Lonza, Basel, Suiza), las células obtenidas se sembraron y se incubaron a 37°C. El medio se cambió cada 2 días. En este pocillo fueron creciendo las células tanto endoteliales como musculares por lo que el siguiente paso fue separar ambos tipos celulares. Cuando se alcanzó una confluencia del 50% se prepararon los dynabeads CD31 endothelial kit (Dynal Biotech, Hamburgo, Alemania), para ello se lavaron con el buffer PBS (Sigma Aldrich, Madrid, España) + 0,1% BSA pH 7.4 a una proporción aproximada de 1 mL de buffer/18 µL de dynabeads, se colocó el tubo en un concentrador de partículas magnéticas (Dynal, Hamburgo, Alemania) durante 1 minuto para el lavado de los dinabeads; se descartó el sobrenadante, posteriormente se retiró el tubo de la gradilla imantada y se resuspendieron las dynabeads lavadas en la misma

cantidad de buffer 1 empleado para el lavado. A continuación se transfirió 1 mL ($1 \cdot 10^8$) de células procedentes del cultivo a un vial, se añadió 25 μ L de los dynabeads resuspendidos y se agitó suavemente durante 20 minutos a 4°C en el termomezclador eppendorf thermomixer confort (eppendorf Ibérica, Madrid, España).

A continuación y empleando el concentrador de partículas magnéticas se procedió a la separación de los dos subtipos celulares; empleando dicho dispositivo las células musculares las podemos encontrar en el sobrenadante y las endoteliales adheridas a los dinabeads magnetizados que estarán adheridas a la parte posterior del tubo, correspondiendo con la porción imantada de la gradilla.

En el sobrenadante están las células musculares, agitamos e imantamos y repetimos la operación 5 o 6 veces. Estas células las sembramos en un frasco de 25 cm² donde crecerán las musculares.

Las células endoteliales que permanecen pegadas a las dynabeads, se resuspendieron en medio adecuado y se cultivaron en frascos de 25 cm². Únicamente se utilizaron cultivos entre pases 3-9.

3.3.2 Cultivo de células endoteliales

Tras el aislamiento de las células endoteliales, se cultivaron en frascos 75 cm² en medio EBM2-MV con L-glutamina 1 mM (Lonza, Basel, Suiza) a relación de 5000 células por cm².

El medio empleado fue reconstituido con las alícuotas EGM2 MV compuestas por: factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (rhEGF), factor de crecimiento fibroblástico humano recombinante (rhFGF), ácido ascórbico, hidrocortisona, suero bobino fetal (FBS), gentamicina sulfato-anfotericina y factor de crecimiento de la insulina R3. Además, este medio también está suplementado con 2% penicilina / estreptomina y 1% anfotericina B.

Los frascos se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada del 5% de CO₂.

3.3.3 Cultivo de células musculares

Se cultivaron en frascos de 75 cm² a 5000 células por cm² en medio basal para células musculares lisas SmGM (Lonza, Basel, Suiza) El medio empleado fue reconstituido con las alícuotas SmGM-SQ (Lonza Basel, Suiza) compuestas por: insulina, FBS, GA1000, factor de crecimiento fibroblástico (hFGF-B) y factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF)

Además, este medio también está suplementado con: 2% penicilina / estreptomicina y 1% anfotericina B.

Los frascos se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada del 5% de CO₂.

3.4 Silenciamiento del miR-23a en células endoteliales

Se cultivaron células endoteliales en placas de 6 pocillos hasta alcanzar una confluencia celular del 60-80% y se siguió el siguiente protocolo de transfección:

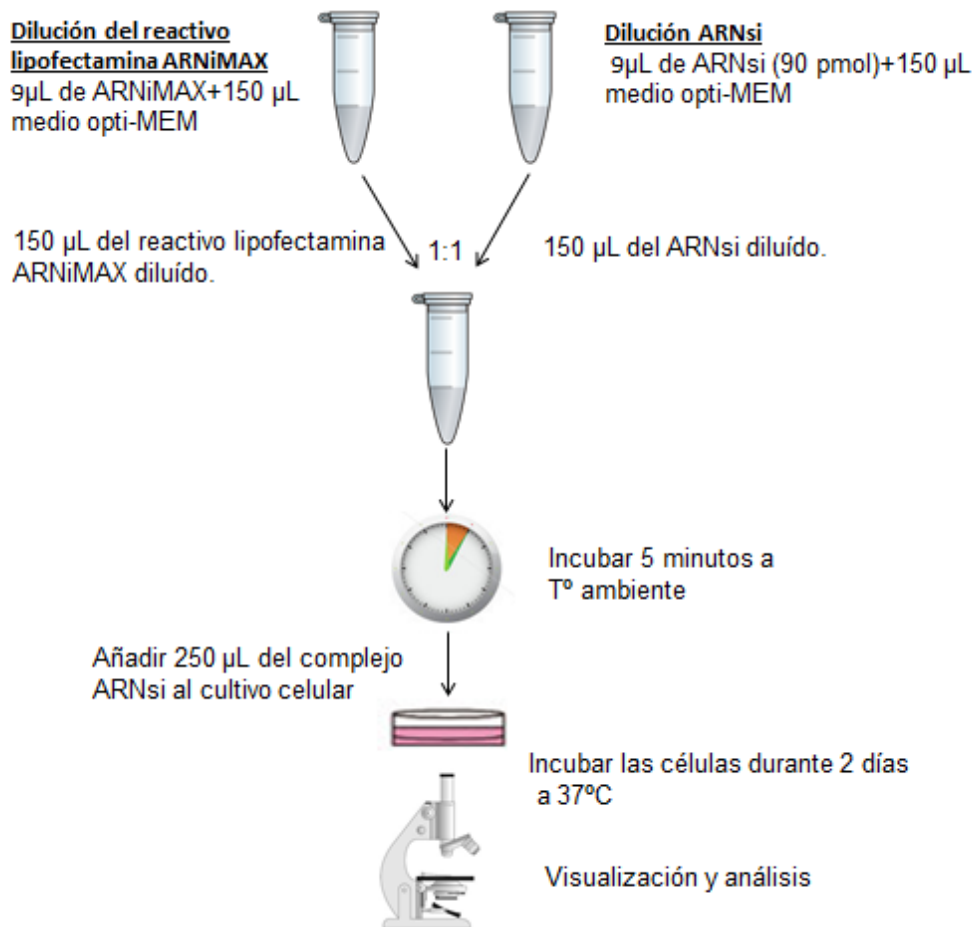


Figura 12. Protocolo de silenciamiento de miR-23a.

Como control positivo se utilizó el plásmido codificante para la proteína verde fluorescente (GFP) (Altogen Biosystems, Las Vegas, USA).

3.5 Extracción ARN total de células.

Para la extracción del ARN total se utilizó el reactivo Trizol (Invitrogen, Madrid, España).

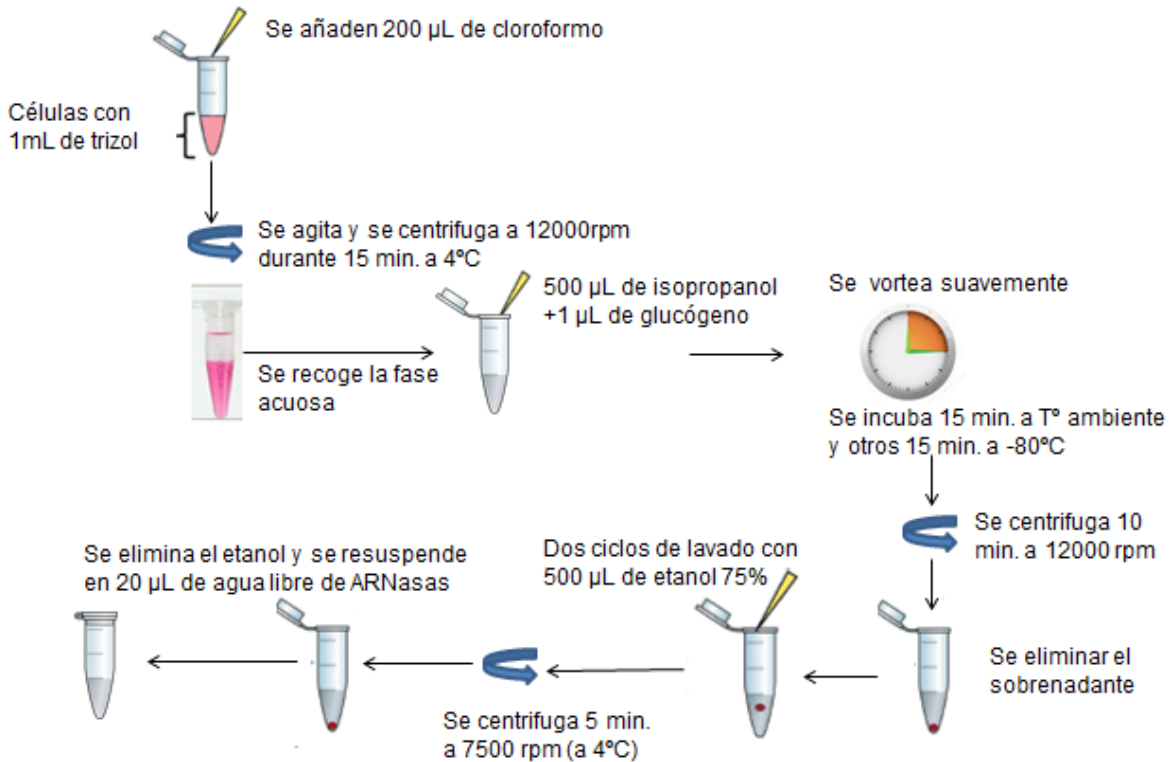


Figura 13. Protocolo de extracción de ARN total de células.

La concentración se valoró por absorbancia a 260 y 280 nm en un espectofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA)

3.6 Extracción de microARNs de sangre completa.

Se utilizaron 2,5 mL de sangre periférica en tubos de PAX Gene (Qiagen, CA, USA)

Para la extracción de microARNs se utilizó el kit de PAXgene Blood miRNA (Qiagen, CA, USA) siguiendo el siguiente protocolo:

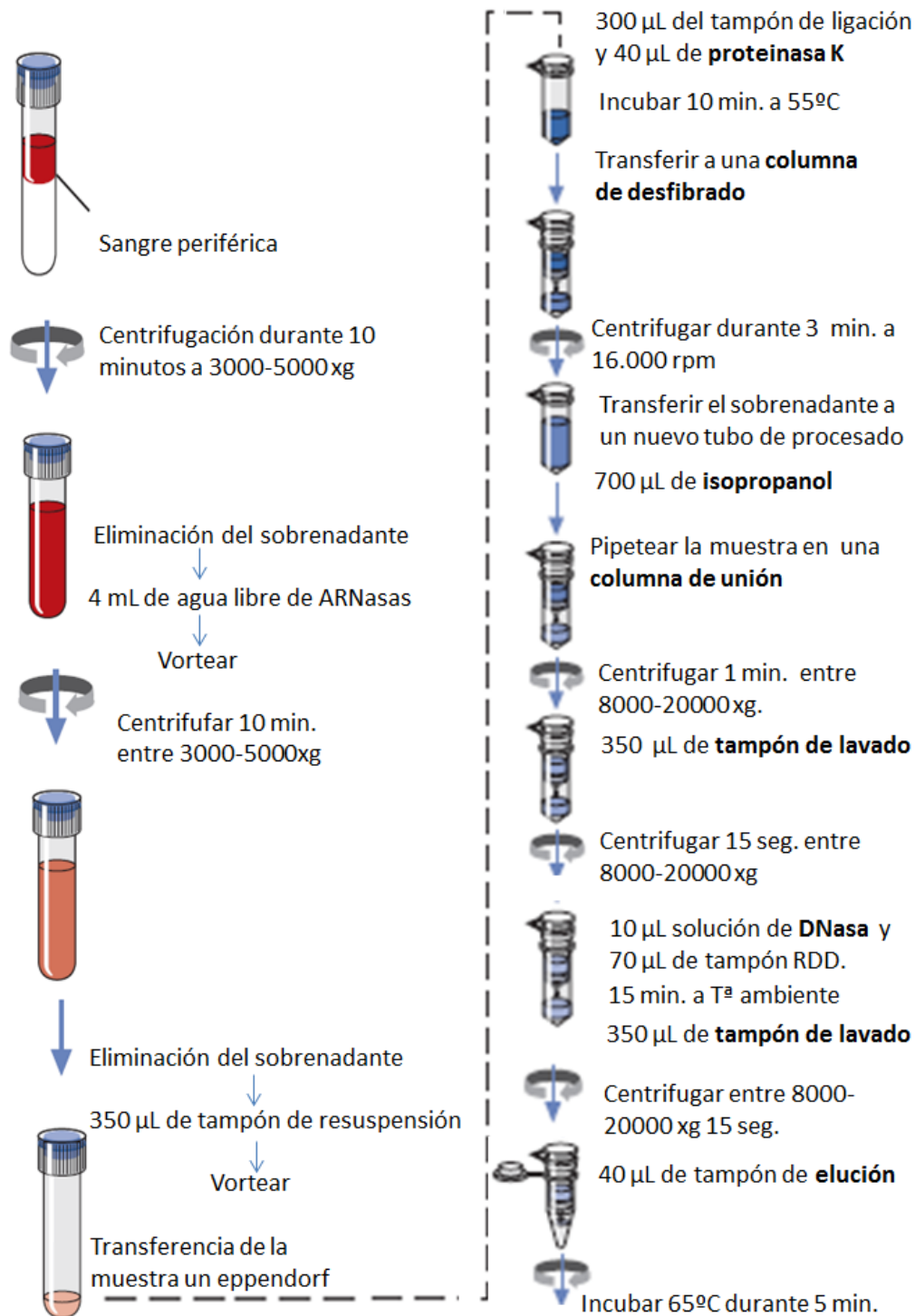


Figura 14. Protocolo de extracción de microARNs de sangre completa.

Una vez extraído, la concentración de ARN se determinó mediante espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA)

Únicamente se consideraron para el estudio las extracciones con un ratio 260/280 nm >1,4.

3.7 Procesamiento de los microARNs

3.7.1 Preparación de la muestra para microarrays.

Las muestras fueron procesadas utilizando el kit 3DNA Array Detection Flash Tag™ Biotin HSR de la empresa Genisphere siguiendo el protocolo específico desarrollado para preparar muestras para microarrays (Affymetrix, CA, USA). Dicho sistema utiliza entre 100 y 1000 ng de ARN total y se puede resumir en la siguiente figura:

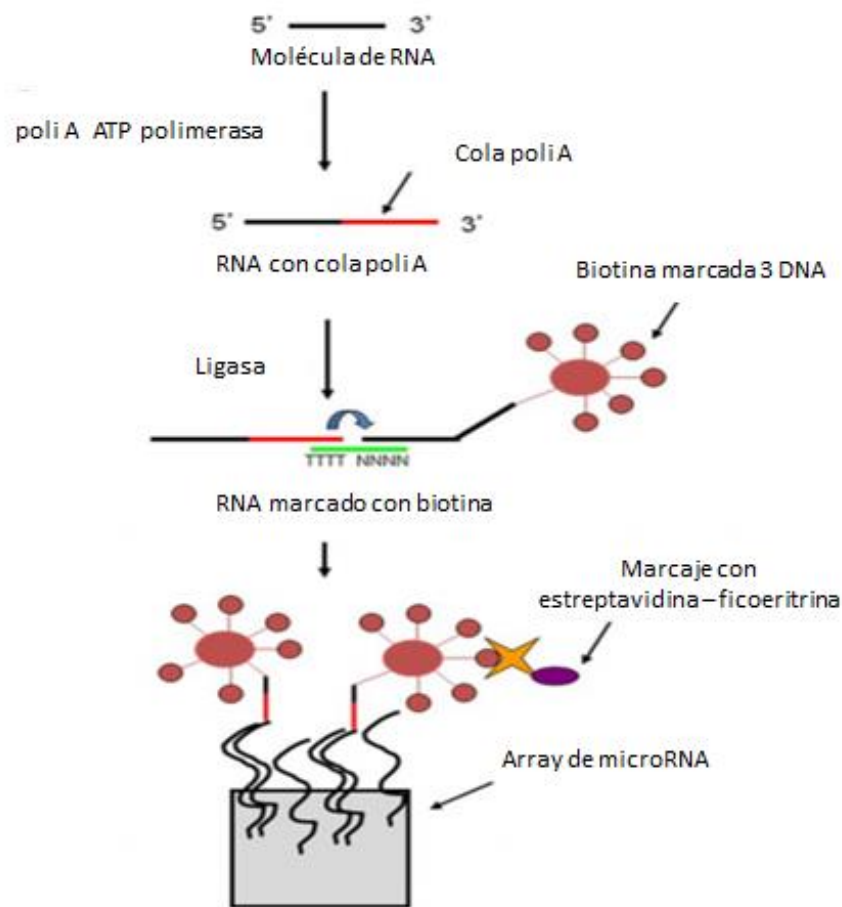


Figura 15. Proceso del marcaje con Biotina.

Una vez la muestra fue marcada con biotina, se introdujo en el array para su hibridación, posteriormente se llevó a cabo el lavado, tinción y escaneado. Finalmente los datos fueron analizados. Todos los pasos se detallan a continuación:

3.7.2 Síntesis de la cola Poli A

Para ello se mezclaron 8 μL de la extracción de ARNt previamente extraído con 2 μL de oligonucleótidos de control externo. Fue diluido en tampón Tris ((hidroximetil) aminometano) 1 mM. Se preparó una mezcla de los siguientes viales con la siguiente composición:

Componentes	Cantidad
10X Buffer de reacción	1,5 μL
MnCl ₂ (25mM)	1,5 μL
Mezcla de ATP (1mM)	1,0 μL
Enzima Fosfatasa ácida (2U/ μL)	1,0 μL

Tabla 7. Composición de los viales utilizados en la síntesis de la cola Poli A.

A continuación se mezclaron 5 μL de la mezcla preparada con los 10 μL ARN/Controles de marcaje de cada muestra, se mezcló bien (sin vortear), se centrifugó y se incubó a 37°C durante 15 minutos.

3.7.3 Marcaje con biotina

La biotina se incorporó mediante ligación con la enzima T4 ADN ligasa a 25°C. La reacción se paró a los 30 minutos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.5 M pH 8.

3.7.4 Hibridación, lavado, tinción y escaneado.

Se añadieron los compuestos de la tabla 8 a cada muestra marcada con biotina:

Compuestos	Volumen para formato 400/169 Array (miARN 1.0 and 2.0 Arrays)	Concentración final
2X mezcla de hibridación	50	1X
27.5% Formamida	15 μ L	4%
DMSO (10%)	10 μ L	9,7%
20XControl de hibridación	5 μ L	1X
Control Oligo B2, 3nM	1,7 μ L	50 pM
Agua libre de ARNsas	N/A	
Volume total	81,7 μL	

Tabla 8. Concentración de los compuestos utilizados para la hibridación.

Se Incubó 5 minutos a 99°C y posteriormente a 45°C otros 5 minutos.

Se inyectó 100 μ L de la mezcla de hibridación en cada array. Se cubrieron los orificios posteriores con pegatinas para evitar posibles fugas o la evaporación.

Se colocaron los arrays en las bandejas del horno de hibridación y fueron incubados durante 16 horas a 48°C a 60 rpm.

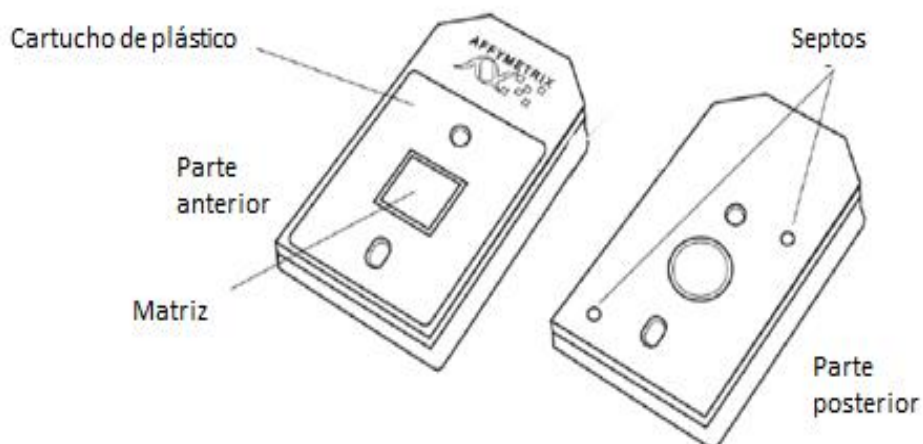


Figura 16. Representación esquemática de un microarray.

Posteriormente el array se tiñó y lavó utilizando el protocolo de Affymetrix FS450_0003, que se describe a continuación:

Protocolo FS450_0003 Estación de fluidos.	
Lavado post hibridación 1	10 ciclos de 2 mezclas/ ciclo con tampón de lavado A a 25°C
Lavado post hibridación 2	8 ciclos de 15 mezclas/ ciclo con tampón de lavado B a 50°C
Primera tinción	Tinción con solución SAPE durante 10 minutos con la mezcla de tinción 1 (Vial en posición 1) a 25°C
Lavado post tinción	10 ciclos de lavado de 4 mezclas/ ciclo con tampón de lavado A a 30°C
Segunda tinción	Tinción con solución SAPE durante 10 minutos con la mezcla de tinción 2 (Vial en posición 2) a 25°C
Tercera tinción	Tinción con solución SAPE durante 10 minutos con la mezcla de tinción 1 (Vial en posición 1) a 25°C
Último lavado	15 ciclos de 4 mezclas/ciclo con tampón de lavado A a 35°C
Buffer de mantenimiento	Llenado del array con el tampón de mantenimiento (Vial en posición 3)

Tabla 9. Protocolo de lavado y tinción de los microarrays en la estación de fluidos.

Tras los lavados y la tinción las muestras fueron escaneadas siguiendo el manual de Affymetrix Command Console Software.

3.7.5 Análisis de los datos de microarrays de microARNs.

Una vez obtenidas las imágenes digitalizadas de los microarrays fueron importadas al programa miRNAQC Tool (Affymetrix, CA, USA) para su análisis (<https://sites.google.com/site/dchipsoft/downloading-dchip-software>). Tras la detección y sustracción del ruido de fondo, los datos fueron normalizados y exportados en un archivo de texto para su posterior análisis mediante el programa DNA Chip analyzer (<http://biosun1.harvard.edu/complab/dchip/>).

Una vez extraídos los datos de microarrays se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) y se consideraron significativos aquellas variaciones con un $p < 0,05$. Como algoritmo de detección de falsos positivos se utilizó el False Discovery Rate (FDR) que fue del 95,5%. A continuación se realizó un filtrado de los datos, considerando únicamente aquellos microARNs con un Fold Change (FC) mayor de 2 en valor absoluto.

3.8 Extracción de ARN total de sangre completa.

Se utilizaron 2,5 mL de sangre periférica en tubos de PAX Gene (Qiagen, CA, USA)

Para la extracción de microARN se utilizó el kit de PAXgene Blood miRNA (Qiagen, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante:

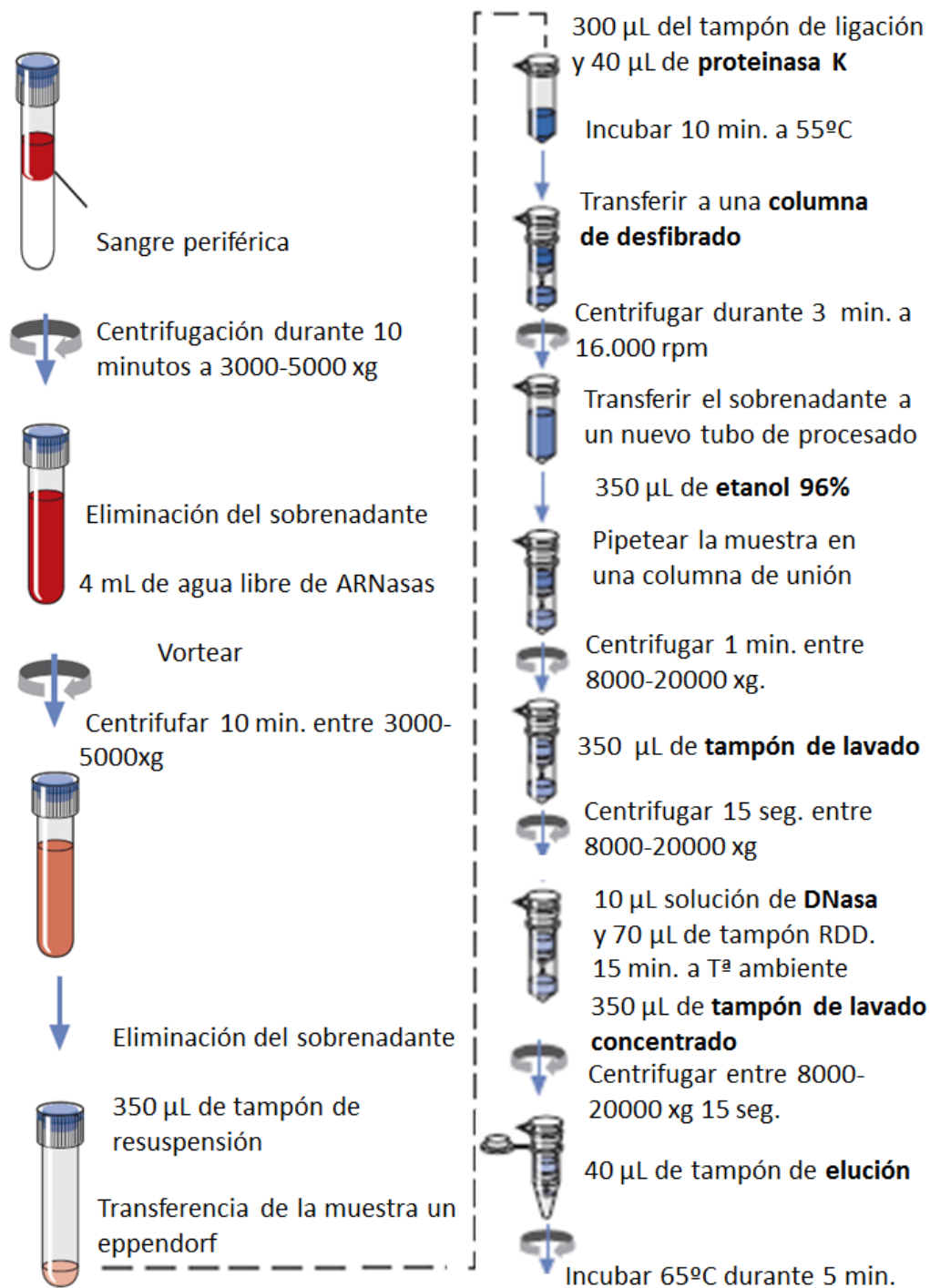


Figura 17. Protocolo de extracción de ARN total de sangre completa.

Una vez extraído, la concentración de ARN se determinó mediante espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA). Únicamente se consideraron para el estudio las extracciones con un ratio 260/280 nm >1,4.

3.9 Procesamiento del ARN total extraído de tubos PAXgene

3.9.1 Preparación de la muestra para microarrays.

Para ello se utilizó el kit GeneChip® 3' IVT Express Labeling Assay (Genisphere, Halfield, USA) siguiendo el protocolo específico desarrollado para preparar muestras para microarrays (Affymetrix, CA, USA). Dicho sistema utiliza entre 100 y 1000 ng de ARN total y se puede resumir en la siguiente figura:

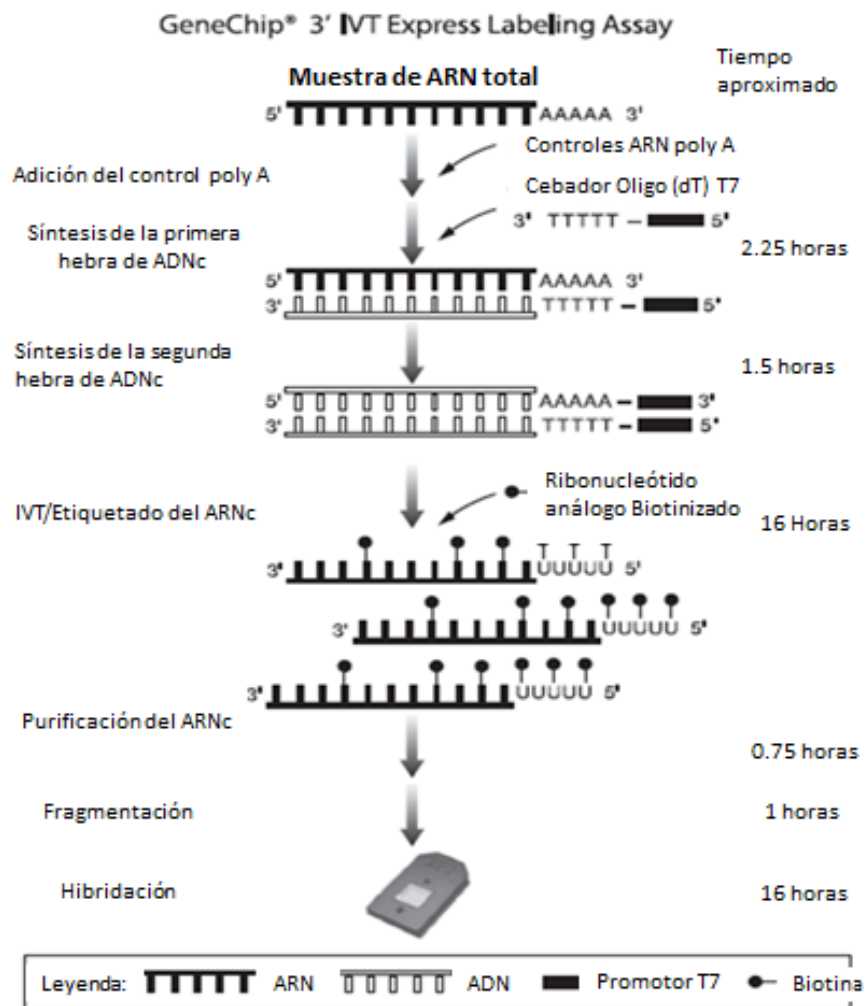


Figura 18. Preparación de la muestra para microarrays.

3.9.2 Síntesis de la primera hebra de ADN mediante transcripción inversa.

Para cada muestra se reparó la siguiente mezcla de reacción:

Compuesto	Cantidad
Tampón de la primera hebra	4 μ L
Enzima de la primera hebra	1 μ L
Volumen total	5 μ L

Tabla 10. Composición de los viales utilizados en la síntesis de la primera hebra.

Se añadió a cada muestra el reactivo ARN total /Control poly-A y se incubó durante 2 horas a 42°C en un termociclador veriti (Applied Biosystems, CA, USA)

3.9.3 Síntesis de la segunda hebra de ADN mediante transcripción inversa

Se preparó la siguiente mezcla para cada muestra:

Compuesto	Cantidad
Agua libre de ARNasas	13 μ L
Buffer de la segunda hebra	5 μ L
Enzima de la segunda hebra	2 μ L
Volumen total	20 μ L

Tabla 11. Composición de los viales utilizados en la síntesis de la segunda hebra.

Se transfirieron los 20 μ L de la mezcla a cada muestra de ADNc y se incubó una hora a 16°C y 10 minutos a 65°C en el termociclador veriti (Applied Biosystems, CA, USA)

3.9.4 Transcripción in vitro para sintetizar ARNc marcado

A temperatura ambiente se preparó la siguiente mezcla IVT (Transcripción in vitro):

Compuesto	Cantidad
IVT Marcador de Biotina	4 μ L
IVT Buffer de marcaje	20 μ L
IVT Mezcla de enzimas	6 μ L
Volumen total	30 μ L

Tabla 12. Composición de los viales utilizados en la transcripción in vitro para sintetizar ARNc marcado.

Se transfirieron 30 μ L de la mezcla anterior a la muestra de doble cadena de ADNc y se incubó la reacción IVT a 40°C durante 14 horas.

3.9.5 Purificación del ARNc

Para purificar el ARNc, se preparó la siguiente mezcla a temperatura ambiente.

Compuesto	Cantidad
Partículas de unión al ARN	10 μ L
ARNc Buffer de ligación concentrado	50 μ L

Tabla 13. Composición de los viales utilizados en la purificación del ARNc.

A cada muestra se añadieron 60 μ L de la mezcla y se transfirieron a una placa UBotton, se añadieron 120 μ L de etanol 100% (Panreac, Barcelona, España) a cada muestra y se agitó la placa durante 2 minutos de modo que la muestra de ARNc se ligó a las partículas de unión del ARN, a continuación se colocó la placa sobre el soporte magnético durante 5 minutos y trascurrido ese tiempo se eliminó el líquido transparente con cuidado de no arrastrar las bolitas que tienen unido el ARNc, posteriormente se añadieron 100 μ L de solución de lavado y se agitó de nuevo la mezcla durante 1 minuto. La placa se colocó en el soporte magnético y se aspiró el sobrenadante. Finalmente se eluyó el ARNc purificado añadiendo 50 μ L de la solución de elución previamente calentada (50-60°C), se agitó la placa durante 3 minutos y se colocó de nuevo en el soporte magnético, en esta ocasión se recogió y guardó el sobrenadante en un tubo de PCR.

3.9.6 Evaluación y fragmentación del ARNc.

La concentración de ARN se determinó por absorbancia utilizando un espectrofotómetro nanodropt 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) y se preparó la siguiente mezcla de reacción:

Compuesto	49/64 Formato
ARNc	15 µg (1-32 µL)
5x Array buffer de fragmentación	8 µL
Agua libre de nucleasas	Variable (hasta los 40 µL finales)
Volumen total	40 µL

Tabla 14. Composición de los viales utilizados en la fragmentación del ARNc.

Las muestras se incubaron a 94°C durante 35 minutos.

3.9.7 Hibridación, lavado, tinción y escaneado.

Se preparó la siguiente mezcla de hibridación:

Compuestos	49/64 Formato
Fragmentación y etiquetado de ARNc	12,5 µg (33,3 µL)
Control de Oligonucleótido B2 (3 nM)	4,2 µL
20X Controles de hibridación (bioB, bioC, bioD, cre)	12,5 µL
2X mezcla de hibridación	125 µL
DMSO	25 µL
Agua libre de ARNasas	50 µL
Volumen total	250 µL

Tabla 15. Composición de los viales utilizados en la hibridación.

Tras calentar la mezcla de hibridación a 99°C durante 5 minutos, se introdujo a 45°C durante 5 minutos y se transfirió al array. Tras 16 horas de incubación a 45°C en un horno de hibridación a una rotación de 60 rpms, el array se tiñó y lavó utilizando el protocolo de Affymetrix FS450_0002, que se describe a continuación:

Protocolo FS450_0002	Estación de fluidos.
Lavado post hibridación 1	10 ciclos de 2 mezclas/ ciclo con tampón de lavado A a 30°C
Lavado post hibridación 2	6 ciclos de 15 mezclas/ ciclo con tampón de lavado B a 50°C
Primera tinción	Tinción del conjunto de sondas durante 5 minutos con la mezcla de tinción 1 (Vial en posición 1) a 35°C
Lavado post tinción	10 ciclos de lavado de 4 mezclas/ciclo con tampón de lavado A a 30°C
Segunda tinción	Tinción del conjunto de sondas durante 5 minutos con la mezcla de tinción 2 (Vial en posición 2) a 35°C
Tercera tinción	Tinción de conjunto de sondas durante 5 minutos con la mezcla de tinción 1 (Vial en posición 1) a 35°C
Último lavado	15 ciclos de 4 mezclas/ ciclo con tampón de lavado A a 35°C
Buffer de mantenimiento	Llenado del array con el tampón de mantenimiento (Vial en posición 3)

Tabla 16. Protocolo de lavado y tinción de los microarrays en la estación de fluidos.

Tras los lavados y la tinción las muestras fueron escaneadas siguiendo el manual de Affymetric Command Console Software.

3.9.8 Análisis de los datos de microarrays de expresión génica.

Los microarrays de expresión génica fueron analizados utilizando el programa programa DNA Chip analyzer (<http://biosun1.harvard.edu/complab/dchip/>). Los archivos cel fueron generados mediante el programa GeneChip Operating Software (GCOS, Affimetrix, CA, USA). Posteriormente fueron importados en el programa DNA Chip analyzer y normalizados utilizando el algoritmo basado en invariant sets (Li et al. 2001). Como sistema de corrección del p valor se utilizó el False Discovery Rate (FDR). Se consideraron significativos aquellas variaciones con un $p < 0,05$.

3.10 Análisis de expresión mediante RT-PCR.

Determinamos de la expresión de PGC-1 α , CYTC, SOD, SLUG, SNAIL, ZEB2, ASMA, CD31, VEGFR, VE-cadherina, CCNA2, CCNH, CCNE2 y CDKN2 por real time RT-PCR.

Para la determinación de PGC-1 α , CYTC y SOD usamos las mismas extracciones de ARN utilizadas para los estudios de microarrays.

Para la determinación de la expresión de SLUG, SNAIL, ZEB2, ASMA, CD31, VEGFR y VE-cadherina utilizamos las extracciones de ARN obtenidas de cultivos de células endoteliales en las distintas condiciones y para el estudio de la expresión de CCNA2, CCNH, CCNE2 y CDKN2 usamos las extracciones de ARN obtenidas a partir de los cultivos celulares musculares en las distintas condiciones.

El ADNc se sintetizó usando los reactivos TaqMan RT (Applied Biosystems, CA, USA) y las reacciones fueron diluidas 1/2. En aquellos casos en los que la expresión era muy baja se realizó una preamplificación utilizando TaqMan preamp master mix (Applied Biosystems, CA, USA) siguiendo el manual de usuario.

La expresión de los genes se determinó mediante Real time RT-PCR en un termociclador 7900HT (Applied Biosystems, CA, USA).

El método Ct comparativo se utilizó para calcular los niveles relativos de expresión de los genes. La ecuación que permite la cuantificación por este método viene dada por $2^{-\Delta\Delta Ct}$ donde:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct 1 - \Delta Ct 2$$

Siendo:

$$\Delta Ct 1 = (Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ gen referencia}) \text{ de la muestra 1}$$

$$\Delta Ct 2 = (Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ gen referencia}) \text{ de la muestra 2}$$

3.10.1 Transcripción inversa (RT)

El proceso de transcripción inversa se llevó a cabo en el termociclador veriti (Applied Biosystems, CA, USA), con las siguientes condiciones experimentales: incubación a 25°C durante 10 minutos, seguida de un ciclo a 48°C durante 30 minutos. Finalmente la transcriptasa reversa fue inactivada mediante una incubación a 95°C durante 5 minutos.

Componentes	Volumen (10 µL)	Concentración final
Tampón de RT (10X)	1µL	1X
MgCl ₂ 25 mM	2,2 µL	5,5 mM
<i>Random Hexamer</i>	0,5 µL	2,5 µM
Mezcla dNTP	2 µL	500 µM de cada dNTP
Inhibidor ARNasa	0,2 µL	0,4 U/ µL
<i>MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/µL)</i>	0,25 µL	1,25 U/ µL
ARN	3,85 µL	
Agua DEPC- ARN		

Tabla 17. Composición de la reacción de retrotranscripción.

3.10.2 PCR a tiempo real

Se analizaron mediante RT-PCR los siguientes genes: PGC-1 α , HO1, CYTC, SOD, GAPDH, CCNA2, CCNH, CCNE2 y CDKN2.

La composición para cada reacción de la PCR fue la siguiente:

Componentes	Volumen (5µL)	Concentración
<i>Máster Mix(2X)</i>	2,5µL	1X
<i>TaqMan Gene Expression Assays (20X)</i>	0,25µL	1X
ADNc (Diluido ½)	1µL	
Agua DEPC	1,25µL	

Tabla 18. Composición de la reacción de RT-PCR

Por otro lado los genes: SLUG, SNAIL, ZEB2, α SMA, CD31, VEGFR y VE-cadherina fueron analizados siguiendo el siguiente protocolo:

Componentes	Volumen (5µL)	Concentración
<i>Máster Mix(2X)</i>	2,5µL	1X
<i>TaqMan Gene Expression Assays (20X)forward</i>	0,1µL	1X
<i>TaqMan Gene Expression Assays (20X)reverse</i>	0,1µL	
ADNc (Diluido ½)	1µL	
Agua DEPC	1,3µL	

Tabla 19. Composición de la reacción de RT-PCR

Una vez preparadas las mezclas se introdujeron en el termociclador *ABI Prism 7900 Sequence Detection System®* (Applied Biosystems, CA, USA) siguiendo las siguientes condiciones de amplificación: 1 ciclo a 95° C de 10 minutos, y 40 ciclos a 95° C de 15 segundos seguidos de 60° C durante 1 minuto.

3.10.3 Determinación de la expresión de miR-23a, miR-328, miR-27a, miR-20b y miR-145

El análisis se realizó utilizando sondas TaqMan para microARNs (Applied Biosystems, CA, USA).

3.10.3.1 Transcripción inversa (RT)

Para realizar la retrotranscripción se utilizó el kit TaqMan microARN transcriptasa reversa (Applied Biosystems, CA, USA), para cada microARN se preparó la siguiente mezcla:

Componentes	Volumen del máster mix para 15 μL de reacción
100 mM dNTPs	0,15 μL
MultiScribe Reverse Transcriptase, 50 U/ μL	1,00 μL
10X Reverse Transcription Buffer	1,50 μL
Inhibidor de ARNasas, 20U/ μL	0,19 μL
Agua libre de nucleasas	4,16 μL
Volumen total	7,00 μL

Tabla 20. Composición de la reacción de retrotranscripción para cada microARN.

A los 7 μL de la mezcla anterior se le añadieron 3 μL del primer 5X RT microARN y 5 μL de la muestra (10 ng de ARN por reacción).

Se utilizó el termociclador veriti (Applied Biosystems, CA, USA) siguiendo las siguientes condiciones de amplificación: incubación a 16°C durante 30 minutos, 30 minutos a 42°C y 5 minutos a 85°C.

3.10.3.2 RT-PCR a tiempo real

Una vez preparada la muestra de reacción se introdujo la placa en el termociclador *ABI Prism 7900 Sequence Detection System®* (Applied Biosystems, CA, USA) siguiendo las siguientes condiciones de amplificación: 1 ciclo a 95° C de 10 minutos, y 40 ciclos a 95° C de 15 segundos seguidos de 60° C durante 1 minuto.

Se tomó como control interno los microARNs estándares miR-223 y miR-26.

Componentes	Volumen para 20 μL de reacción
TaqMan Small RNA Assay miARN (2X)	1,00 μL
TaqMan Universal PCR Master Mix II, no UNG	10,00 μL
Nuclase-free water	7,67 μL
Producto de la reacción de RT	1,33 μL
Volumen total	20,00 μL

Tabla 21. Composición de la reacción de RT-PCR para cada microARN.

3.11 Determinación del estado antioxidante total (TAS)

Este ensayo se basa en la capacidad de los antioxidantes de la muestra para inhibir la oxidación de ABTS (2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolin sulfonato]) para ABTS + por metmioglobina.

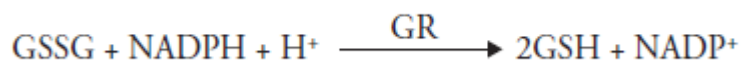
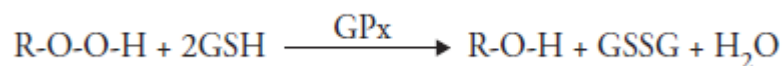
La capacidad antioxidante en la muestra para evitar la oxidación de ABTS se compara con la de Trolox, un análogo de tocoferol soluble en agua. Los resultados se expresan como equivalentes de Trolox mM.

El estado antioxidante total (TAS) se determinó en muestras de plasma utilizando el kit de ensayo antioxidante total (Cayman Chemical Company, Michigan, EEUU.) siguiendo las instrucciones del proveedor.

3.12 Análisis de la actividad glutatión peroxidasa (GPX)

Este ensayo mide la actividad de GPX indirectamente mediante una reacción acoplada con la enzima glutatión reductasa (GR).

La glutatión peroxidasa cataliza la oxidación del glutatión (GSH) por el hidroperóxido de cumeno. El glutatión oxidado (GSSG) en presencia de la glutatión reductasa y NADPH es inmediatamente convertido en su forma reducida (GSH), con una oxidación de NADPH en NADP⁺. La actividad GPX se evaluó calculando el cambio en la absorbancia a 340 nm (nm ΔA_{340} / min) interpolando en la recta de calibrado. Los resultados se presentan como nmol / min / mL



La actividad de la GPX se estimó en muestras de plasma utilizando el kit GPX (Cayman Chemical Company, Michigan, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del proveedor.

3.13 Análisis de datos

El análisis de datos de microarrays se realizó tal y como se detalla en las secciones 3.7.5 y 3.9.8.

Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo por el test no paramétrico de Mann-Whitney y el análisis de correlación no paramétrico de Spearman utilizando el software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para valores $p < 0,05$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Parámetros bioquímicos y oxidativos de los pacientes

Para este estudio seleccionamos pacientes diagnosticados de hipertensión pulmonar idiopática (Presión arterial pulmonar (PAP) >25 mmHg) cuyas características clínicas, moleculares y bioquímicas se muestran en la tabla 22.

En primer lugar nos planteamos determinar el estado oxidativo de los pacientes, para ello analizamos el estado antioxidante total (TAS), la actividad superóxido dismutasa (SOD) y glutation peroxidasa (GPX), los resultados se muestran en la siguiente figura:

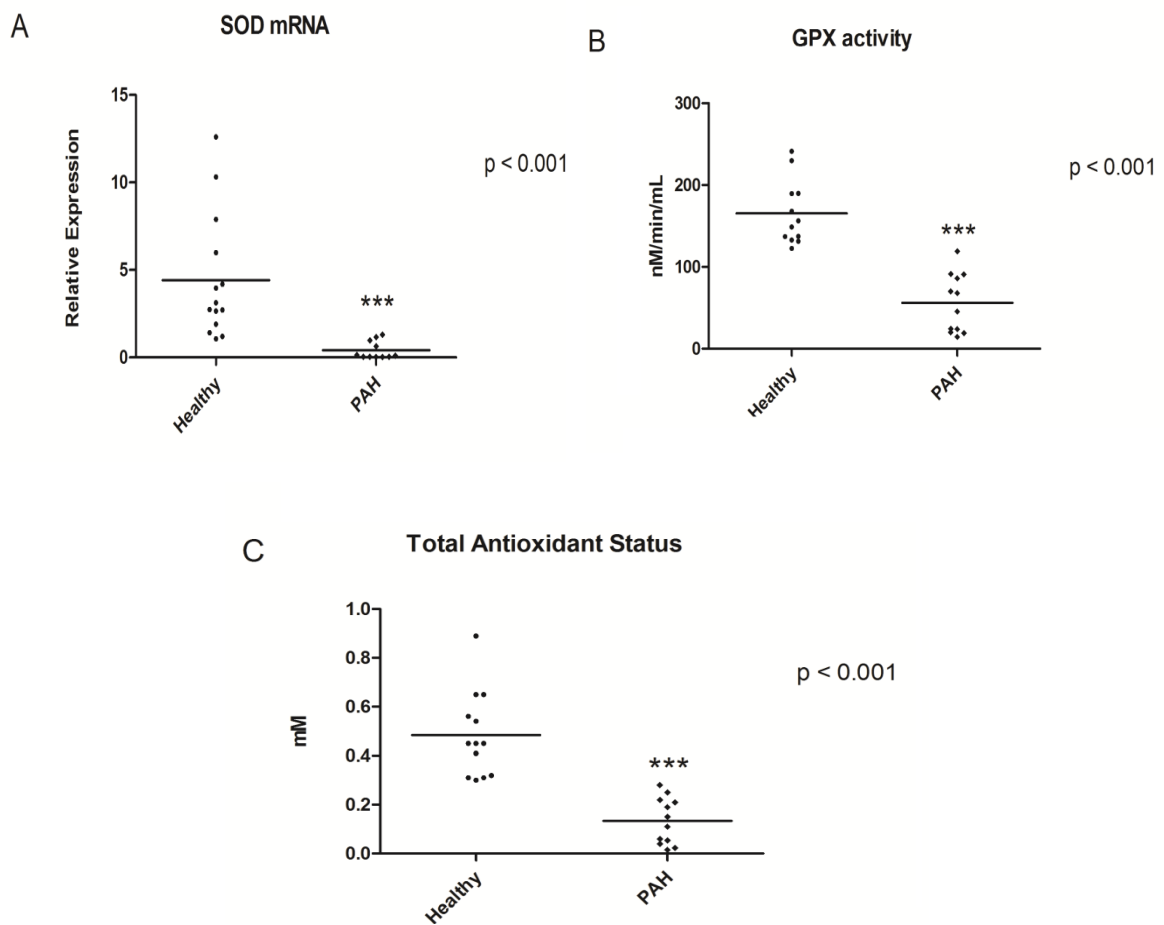


Figura 19. Análisis de la expresión de SOD, GPX y TAS en pacientes HPAI. Se analizaron un total de doce muestras procedentes de pacientes diagnosticados de HPAI y de 14 controles. A) Expresión de SOD se determinó mediante RT-PCR a partir de muestras sanguíneas. B), La actividad de la GPX se estimó en muestras de plasma utilizando el ensayo de GPX kit. C) El estado antioxidante total (TAS) se determinó en muestras plasma utilizando el kit de ensayo antioxidante total. Los resultados obtenidos se analizaron mediante el test de Wilcoxon signed-rank. Los datos se presentan como la media ± error estándar de la media (ESM).

ID	Edad (años)	SEXO	PaO ₂ (mmHg)	6MWT (m)	PAP (mmHg)	IC (L/min/m ²) (dyn/sec/cm ²)	PVR	VR	Tratamiento
HP1	45	F	67	595	48	1.3	12.4	NO	e+b
HP2	75	M	62	255	70	1.8	11	NO	a + s + i
HP3	34	F	85	554	35	2.8	6.2	YES	n
HP4	58	F	70	380	48	2.2	12	NO	b+t
HP5	38	F	83	450	38	3.24	6.1	YES	n
HP6	63	F	68	360	40	2.1	8.5	NO	i+b+s
HP7	64	M	60	240	53	2.3	7.7	NO	b+s+t
HP8	66	M	57	334	50	1.8	8.6	NO	s+i+b
HP9	60	F	58	120	49	1.1	18.9	NO	s+b
HP10	55	F	63	320	31	2.5	7.5	YES	b+s
HP11	48	F	62	534	59	1.4	13.6	YES	e+s+b
HP12	72	F	60	280	65	2.2	12.5	NO	i+b

Tabla 22. Características clínicas, moleculares y bioquímicas de los pacientes HPAl.

PaO₂: presión parcial de oxígeno en sangre arterial, 6MWT: 6 minutos marcha, PAP: presión arterial pulmonar, IC: índice cardíaco, PVR: resistencia vascular pulmonar, VR: vasoreactividad, a: ambrisentan e: epoprostenol, s: sildenafil, i: iloprost, b: bosentan, t: treprostinil, n: nifedipina.

Como indicadores del estado oxidativo de los pacientes incluidos determinamos la expresión de SOD, la actividad GPX y el TAS. Nuestros resultados indican una disminución significativa en los valores de SOD en los pacientes HPAI en comparación con voluntarios sanos, asimismo la actividad GPX fue mucho menor en pacientes (50 nM/min/mL frente a 180) y el TAS también disminuía significativamente en pacientes (figura 19).

Los resultados son coherentes con la literatura, pues anteriormente se había visto cómo la sobreexpresión de SOD aminoraba la progresión de la enfermedad inducida por hipoxia en ratones y en cultivos de células endoteliales primarias humanas (Ahmed et al. 2012). El hecho de observar una disminución de los niveles de SOD en pacientes indica el estado de estrés oxidativo en el que se encuentran los pacientes HP. Esta aminoración de la SOD reduce la capacidad de respuesta frente al estrés y podría explicar en parte la situación de hipoxia a nivel sistémico de los pacientes.

Nuestros resultados indican que la actividad GPX es menor en pacientes que en donantes sanos (figura 19, panel B). Esta enzima cataliza la reacción de oxidación de la glutatona a glutatona disulfuro, protegiendo al organismo del efecto degradativo de los hidroperóxidos formados de forma endógena, similar a lo que ocurre con la SOD. El déficit en esta enzima está asociado con un aumento de especies reactivas de oxígeno y una disminución de NO, lo que conduce a una pérdida de la función endotelial adecuada y una alterada reactividad vascular (Leopold 2010). Aunque la SOD y la GPX son enzimas clave en el control del balance oxidativo existen otros componentes que lo controlan, por lo que nos planteamos determinar si el TAS estaba alterado, esta prueba determina la capacidad de respuesta del sistema biológico ante situaciones oxidativas. Representa el equilibrio entre las moléculas oxidantes y antioxidantes a nivel global, en el estudio hemos encontrado una disminución significativa de la TAS en pacientes HPAI en comparación con donantes sanos (figura 19, panel C), lo que corrobora de nuevo la alteración del balance oxidativo de los pacientes HPAI.

En conjunto, los resultados mostraron que existía una alteración en el estado del balance oxidativo de los pacientes, lo que podría provocar la disfunción endotelial característica de los pacientes HPAI.

4.2 Análisis de la expresión de microARNs en pacientes HPAI.

A continuación, nos planteamos analizar mediante microarrays de Affymetrix, la variación en los perfiles de expresión de microARNs comparando extracciones de microARNs de sangre periférica de pacientes diagnosticados de HPAI comparados con voluntarios sanos.

Para ello se analizaron muestras de 12 pacientes y de 9 controles, tal y como se describe en material y métodos. Se observaron cambios significativos en 61 microARNs. Los resultados obtenidos se resumen en la siguiente tabla:

MicroARNs	Media controles	Media pacientes	Fold Change
hsa-let-7d-star	0.78	3.33	4.29
miR-7-1	0.33	1.08	3.25
miR-10b	0.78	0.17	-4.67
miR-138-1	1.78	0.50	-3.56
miR-520h	0.78	0.17	-4.67
miR-559	1.11	0.25	-4.44
miR-593	0.67	0.17	-4.00
miR-601	0.56	0.08	-6.67
miR-616	0.89	0.17	-5.33
miR-543	1.11	0.25	-4.44
miR-1184	0.33	1.67	5.00
miR-1285	1.89	6.00	3.18
miR-1286	0.11	0.58	5.25
miR-3153	0.78	0.17	-4.67
miR-3156	0.89	0.17	-5.33
miR-4301	0.78	0.25	-3.11
miR-4304	0.89	0.25	-3.56
miR-4313	1.22	0.33	-3.67
miR-1-2	0.11	0.92	8.25
miR-1259	0.67	0.17	-4.00
miR-1263	0.22	0.83	3.75
miR-193a	0.22	0.75	3.38
miR-195	0.22	0.75	3.38
miR-30c-2	0.67	0.08	-8.00
miR-3120	0.89	0.17	-5.33
miR-3145	0.67	0.17	-4.00
miR-3184	0.33	1.08	3.25
miR-340	0.56	0.08	-6.67
miR-4261	0.78	0.25	-3.11
miR-524	0.56	0.08	-6.67
miR-606	0.89	0.25	-3.56
miR-634	0.56	0.08	-6.67
miR-921	0.56	0.08	-6.67
miR-99a	0.67	0.08	-8.00

miR-181d	0.89	0.17	-5.33
miR-1893	0.89	0.25	-3.56
miR-1934	0.56	0.08	-6.67
miR-1944	0.33	1.08	3.25
miR-1957	0.11	0.83	7.50
miR-1981	0.11	0.75	6.75
miR-20a	0.25	0.79	3.15
miR-145	0.12	0.39	3.21
miR-27a	0.17	0.53	3.12
miR-328	0.89	0.28	-3.15
miR-23a	0.33	1.08	3.25
miR-2145-2	0.22	0.75	3.38
miR-291a	0.56	0.08	-6.67
miR-293	0.11	0.58	5.25
miR-327	0.11	0.58	5.25
miR-423	0.22	0.92	4.13
miR-465b-2	0.22	0.75	3.38
miR-719	0.89	0.25	-3.56
miR-744	0.11	0.83	7.50
miR-124-1	0.11	0.58	5.25
miR-184	0.78	0.25	-3.11
miR-199a	0.67	0.08	-8.00
miR-30e	0.67	0.17	-4.00
miR-330	0.67	0.08	-8.00
miR-362	0.78	0.25	-3.11
miR-513	0.56	0.08	-6.67
miR-666	0.11	0.67	6.00

Tabla 23. microARNs diferencialmente expresados en pacientes diagnosticados de HPAI y voluntarios sanos. Se analizaron un total de 12 muestras de sangre procedentes de pacientes diagnosticados de HPAI y 9 de controles mediante microarrays de alta densidad de ADN complementario de Affymetrix. Los resultados obtenidos se analizaron mediante ANOVA considerando significativo un $p < 0,05$. Los resultados obtenidos se filtraron para un FC en valor absoluto > 2 . FDR: 95'5%

Una vez seleccionados los microARNs cuya expresión variaba significativamente entre el grupo de pacientes y el control, nos planteamos analizar si dichas variaciones permitían diferenciar entre los dos grupos experimentales, para ello utilizamos dos sistemas de clasificación no supervisados: un análisis de cluster y un análisis de componentes principales (ACP). Los resultados obtenidos se representan en las figuras 20 y 21.

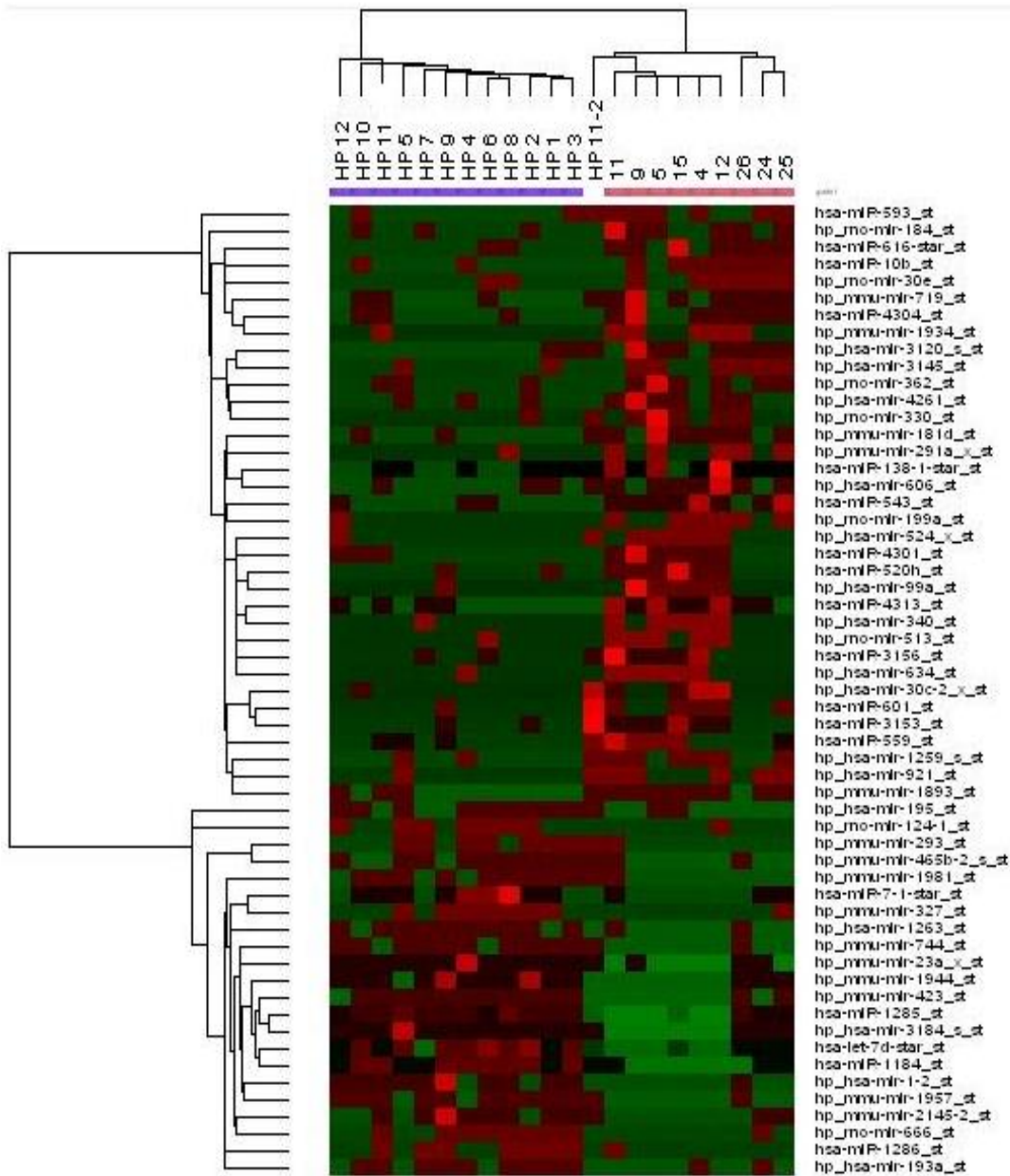


Figura 20. Cluster jerárquico no supervisado. Se analizaron un total de doce muestras sanguíneas procedentes de pacientes diagnosticados de HPAI (azul) y de 9 controles (rojo) mediante microarrays de alta densidad de ADN complementario de Affymetrix. Los resultados obtenidos se analizaron mediante ANOVA considerando significativo un $p < 0,05$. Los resultados obtenidos se filtraron para un FC en valor absoluto > 2 . El dendrograma se construyó utilizando el programa Dchip analyzer. Como distancia métrica se utilizó 1-correlación, y como método de asociación por centroides.

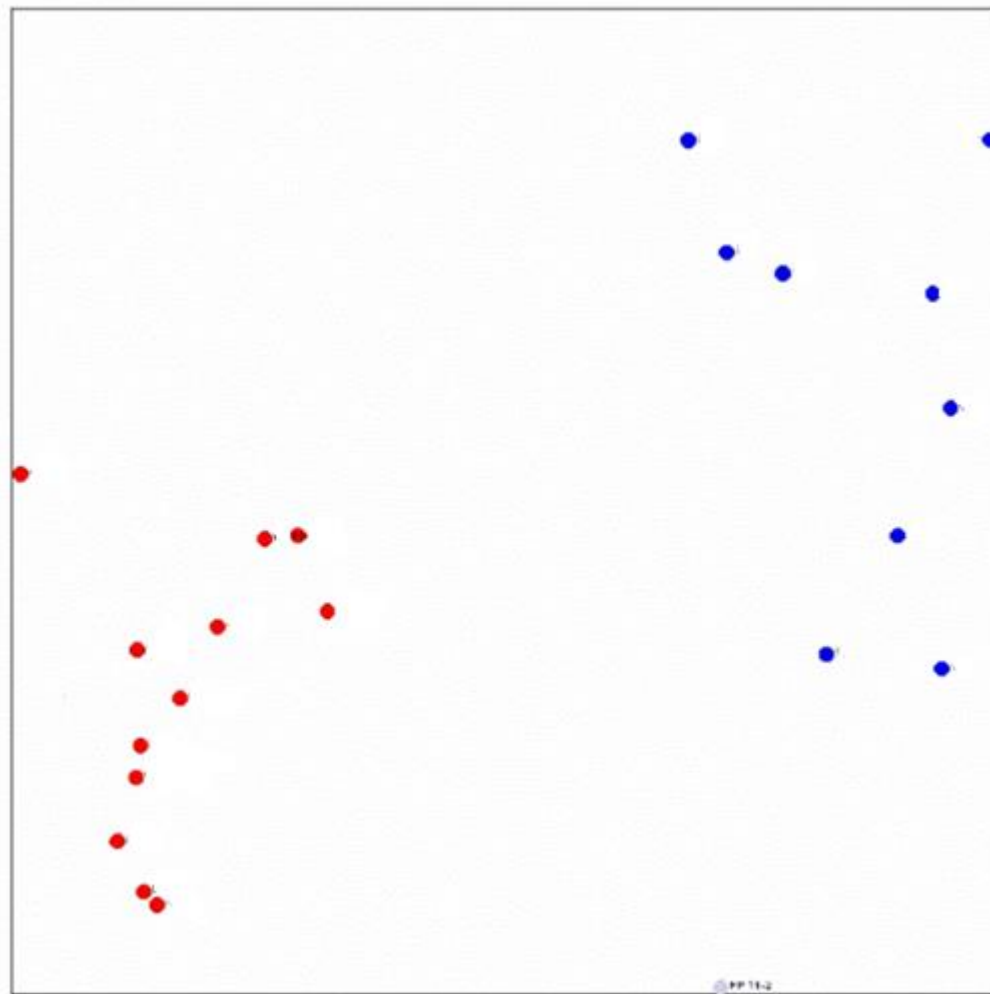


Figura 21. Análisis de Componentes Principales (ACP). Se analizaron un total de doce muestras sanguíneas procedentes de pacientes diagnosticados de HPAI (rojo) y de 9 controles (azul) mediante microarrays de alta densidad de ADN complementario de Affymetrix. Los resultados obtenidos se analizaron mediante ANOVA considerando significativo un $p < 0,05$. Los resultados obtenidos se filtraron para un FC en valor absoluto >2 . El ACP se realizó utilizando el programa DCHIP analyzer. Los resultados representan las dos componentes principales del análisis, que explican el 98,2% de la variabilidad encontrada.

El análisis de expresión completa de los microARNs nos permitió diferenciar entre los pacientes y los voluntarios sanos. Aunque el número de pacientes (n) es bajo y podría resultar una limitación, existen diferencias notables en la expresión de los microARNs entre ambos grupos.

Tal y como puede apreciarse, los dos sistemas de clasificación concluyen que la matriz de microARNs utilizada, permite la clasificación de las muestras incluidas en el estudio con concordancia respecto al grupo experimental asociado. En este punto es interesante analizar los resultados obtenidos frente a la muestra 11. Dicha muestra procede de una persona con una HPAI reactiva a la que se tomó una muestra de sangre en el ingreso, en el que presentaba una situación grave con una PAP de 59 mmHg y una PaO₂ de 62 mmHg. Tras el tratamiento con eprostenol combinado con sildenafil y bosentan, dicho paciente se estabilizó, llegando a una PAP y a una PaO₂ normales, medidas por cateterismo. En este momento se le tomó una segunda muestra de sangre. La primera de las muestras fue clasificada dentro del grupo de HPAI, mientras que a la segunda no se le asignó ningún atributo, aunque los datos se incluyeron en el análisis de clusters y de ACP. Ambos sistemas de clasificación no supervisados, incluyeron la segunda muestra dentro del grupo control, lo que podría indicar el valor predictivo de esta herramienta de trabajo, no sólo para analizar diferencias entre grupos de pacientes, sino como indicador del estado fisiológico de un paciente, lo que tiene una gran importancia desde el punto de vista terapéutico, ya que podría permitir evaluar la efectividad del tratamiento utilizado y la progresión de la enfermedad.

En cuanto a los microARNs detectados, hemos encontrado algunos coincidentes con la literatura como es el caso del miR-1-2, miR-145, miR-20a, miR-27a, miR-23a y el miR-328 cuyas características se resumen en la tabla 24.

microARN	Implicación	Referencia
miR-1-2	Desregulación de la cardiogénesis, se encuentra en el músculo cardiaco y promueve la diferenciación de células madre a cardiacas en ratones y humanos, su delección puede conllevar a una serie de anormalidades. También se ha visto que podría desempeñar un papel en la inducción de la respuesta antioxidante en el músculo esquelético.	Mishima et al. 2007 Kimberly et al. 2010 Safdar et al. 2009
miR-145	Implicado en la remodelación vascular y sus niveles de expresión se encuentran elevados en pacientes HP, anteriormente se ha observado que mutaciones en BMPR2 provocaban un aumento de expresión de este microARN en células del músculo liso, por otra parte estudios en modelos de animales en situación de hipoxia han determinado un aumento de su expresión respecto a los controles tanto en el pulmón como en el ventrículo derecho.	Caruso et al. 2012
miR-20a	Actúa regulando la expresión de BMPR2 y desarrollando una remodelación vascular cuando se encuentra sobreexpresado, la activación constante de STAT3 provoca una activación del miR-20a maduro, lo que conlleva a una disminución de BMPR2 pues el receptor es bloqueado, este receptor es esencial en la modulación de la diferenciación, la proliferación y la producción por parte de la matriz fibrosa de células endoteliales y células del músculo liso, todos estos cambios en la expresión de BMPR2 provocan la remodelación vascular.	Brock et al. 2012

miR-27a	Se encontraba sobreexpresado en pacientes HP, anteriormente se había encontrado en pacientes con hipertensión pulmonar hereditaria y se cree que está involucrado con la proliferación celular mediada por BMPR2. Se ha estudiado previamente como regulador de la diferenciación de adipocitos, del metabolismo de las grasas y de la proliferación celular.	Drake et al. 2011
miR-328	Se encontraba poco expresado en pacientes de hipertensión pulmonar causada por hipoxia (grupo 3), lo que provoca una vasoconstricción y remodelación vascular. Este microARN es un factor importante de protección frente a la HP, actúa inhibiendo la expresión del canal de calcio α_1C tipo L, principal entrada del Ca^{+2} en las células del músculo liso, y bloqueando el receptor 1 del factor de crecimiento de insulina, lo que conlleva a la autoapoptosis de las células musculares lisas de arteriales pulmonares.	Guo et al. 2012
miR-23a	Se encontraba sobreexpresado en pacientes HPAI, anteriormente se había estudiado su papel en la hipertrofia cardíaca, investigaciones habían observado cómo un aumento de dicho microARN provocaba cambios morfológicos en los cardiomiocitos. También se había estudiado cómo una disminución de su expresión aumentaba los niveles de PGC-1 α , por lo que habían concluido que uno de los mecanismos por los que suele actuar es mediante la represión de PGC-1 α .	Van Rooij et al. 2006 Saldar et al. 2009

Tabla 24. MicroARNs detectados coincidentes con la literatura.

Hemos encontrado numerosos microARNs cuya expresión se diferencia notablemente entre pacientes y controles, algunos de los microARNs que se encuentran menos expresados en pacientes son el miR-330, el miR-199a y el miR-340, por otra parte los microARNs sobreexpresados en pacientes son el miR-1957, miR-744 y el miR-1981.

- El miR-330 se encuentra en células del linaje de la renina en riñones adultos y regula la expresión de genes del músculo liso renal (Medrano et al. 2012).
- El miR-199a juega un papel importante en la regulación de la expresión de HIF α en condiciones de hipoxia para evitar el daño celular en cardiomiocitos. En situación normal el miR-199 inhibe HIF α pero tras un evento de hipoxia la expresión de miR-199 decae de modo que aumenta HIF α (Rane et al. 2009).
- Del miR-340 no existe bibliografía al respecto.

Por otra parte el miR-744 y el miR-1981 se encuentran sobreexpresados en paciente HP, se ha visto que el miR-744 se encuentra sobreexpresado en varios cánceres como el de cabeza y cuello (Huang et al. 2012) mientras que del miR-1981 no existe bibliografía al respecto.

Estos microARNs encontrados están involucrados en procesos de remodelación vascular y cardiogénesis; todos estos hallazgos tienen sentido, pues la hipertensión pulmonar es provocada debido a un remodelado de las arterias pulmonares, lo cual origina un aumento de resistencias pulmonares y como consecuencia se produce una sobrecarga y fallo del ventrículo derecho.

4.3 Validación de datos de microarrays.

A continuación, una vez analizados los datos de microarrays decidimos escoger algunos de ellos para su validación mediante la técnica de referencia: RT-PCR a tiempo real. Los resultados de la validación se resumen en la figura 22, e indican una buena correlación entre los datos obtenidos mediante microarrays y los resultados validados por RT-PCR.

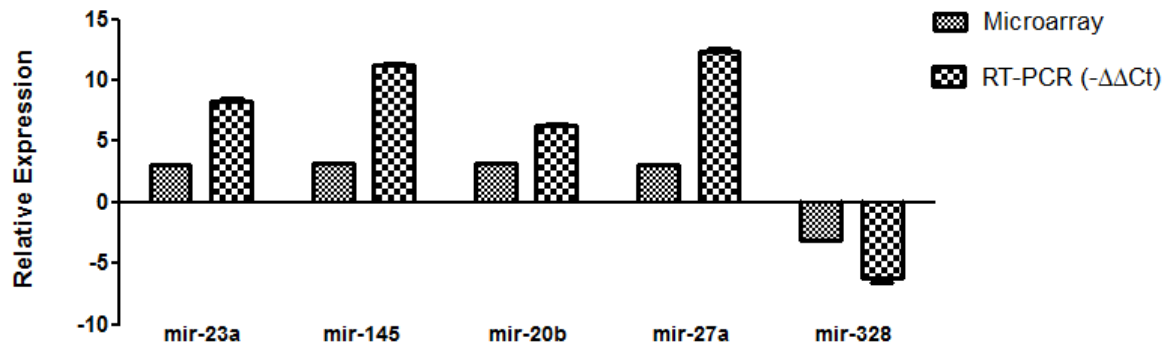


Figura 22. Validación de datos de microarrays. Se analizaron un total de doce muestras procedentes de pacientes diagnosticados de HPAI y de 9 controles mediante microarrays de alta densidad de ADNc de Affymetrix y mediante RT-PCR a tiempo. Los resultados se presentan como media \pm ESM (la intensidad media normalizada para los microarrays y $-\Delta\Delta C_t$ para RT-PCR a tiempo real).

4.4 Análisis de correlación múltiple.

Tras validar los datos de microarrays, nuestro siguiente objetivo fue ver si estos microARNs se correlacionaban con la función pulmonar. Para ello se realizó un análisis multivariante cuyo resultado se muestran en la siguiente tabla:

	6 MWT (m)	EDAD (años)	PAP (mmHg)	IC (L/min/m ²)	PVR (dyn/sec/cm ²)
miR-20a	0,7057	0,8194	0,5142	0,1010	0,1220
miR-30	0,9906	0,9459	0,5038	0,8040	0,8471
miR-27a	0,0082	-0,07082	0,2886	-0,04763	0,1638
miR-23a	0,1784	0,0187	0,0001	0,0055	0,0426
miR-328	0,5775	0,4624	0,8011	0,6718	0,2902
miR-145	0,7075	0,1448	0,8167	0,5385	0,2266
miR-330	0,9631	0,9035	0,3620	0,5592	0,1854
miR-199a	0,0459	0,2731	0,0474	0,9399	0,6636
miR-920	0,5408	0,7887	0,9285	0,0971	0,7487
miR-744	0,4871	0,7329	0,4013	0,1400	0,0124

Tabla 25. Correlación de los microARNs y la función pulmonar. Los datos presentados en la tabla muestran los resultados del p valor del análisis multivariante. Para analizar los datos se utilizó la prueba no paramétrica de Spearman considerando diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$. PAP: presión arterial pulmonar, IC: índice cardiaco, PVR: resistencia vascular pulmonar.

De los microARNs analizados, el miR-23a es el que correlacionaba con más parámetros de la función pulmonar (PVR, CI, PAP y la edad).

Con la finalidad de analizar si las alteraciones en la expresión de este microARN tenían reflejo a nivel de genes cuya expresión controla, seleccionamos los genes regulados por el miR-23a utilizando la base de datos: <http://www.mirbase.org>, de todos ellos seleccionamos los que se encontraban significativamente alterados (un 3% de ellos) y fueron los siguientes: CAB39, SLC4A4, PDE7A, PPARGC1A, DEPDC1, TMPO, PCDH18, ZNF208, IL6R, CEP85L, CENPN, HPGD, NAA15, ST18, NKAIN2, SEC23A, NOX4, ODF2L, MBNL1, TNKS2, ZNF423 y ZNF117. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Gen	Signal log ratio	p valor	Gen	Signal log ratio	p valor
CAB39	-1.21	0.000633	HPGD	-1.21	0.030019
SLC4A4	1.21	0.000962	NAA15	-1.22	0.000892
PDE7A	-1.21	0.001261	ST18	1.23	0.000032
PPARGC1A	1.73	0.000185	NKAIN2	1.21	0.004282
DEPDC1	1.29	0.001892	SEC23A	-1.23	0.003843
TMPO	-1.31	0.009205	NOX4	1.21	0.003780
PCDH18	1.22	0.000422	ODF2L	-1.23	0.011408
ZNF208	1.23	0.014737	MBNL1	-1.27	0.000277
IL6R	1.20	0.002145	TNKS2	-1.26	0.005704
CEP85L	-1.33	0.000022	ZNF423	1.21	0.001107
CENPN	1.23	0.000569	ZNF117	1.25	0.019729

Tabla 26. Genes significativamente alterados regulados por miR-23a. Los microarrays de expresión génica fueron analizados utilizando el programa DNA Chip analyzer. Posteriormente fueron importados en el programa DNA Chip analyzer y normalizados utilizando el algoritmo basado en invariant sets. Como sistema de corrección del p valor se utilizó el False Discovery Rate (FDR). Se seleccionaron los genes que variaban significativamente con un $p < 0,05$ y que estuvieran regulados por miR-23a.

A continuación, analizamos su expresión utilizando dos sistemas de clasificación no supervisados, realizamos un análisis de cluster y un análisis de componentes principales (ACP) para observar si su expresión variaba significativamente y se podía distinguir entre el grupo de pacientes y el grupo control. Los resultados obtenidos se representan en las figuras 23 y 24.

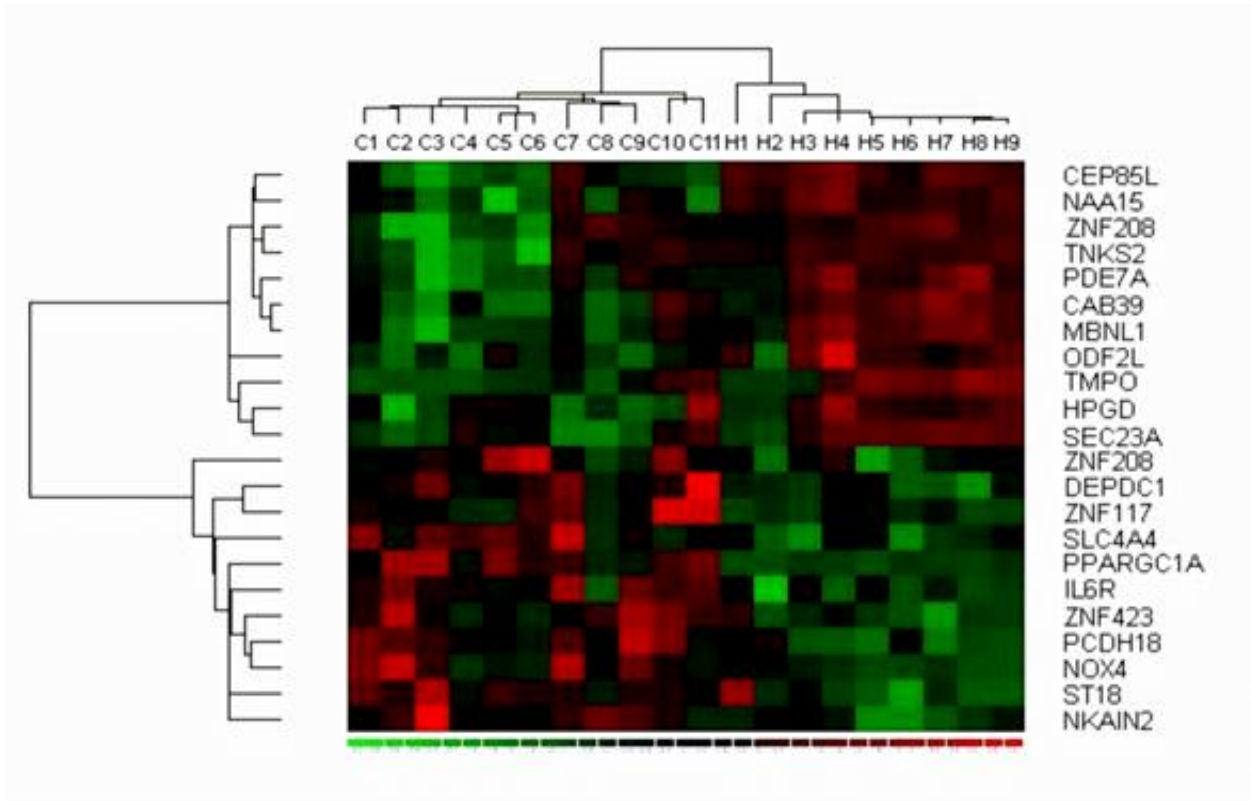


Figura 23. Cluster jerárquico no supervisado. Se analizaron un total de nueve muestras sanguíneas procedentes de pacientes diagnosticados de HPAI y de once controles mediante microarrays de alta densidad de ADN complementario de Affymetrix. Los resultados obtenidos se analizaron mediante ANOVA considerando significativo un $p < 0,05$. Los resultados obtenidos se filtraron para un FC en valor absoluto > 2 . El dendograma se construyó utilizando el programa Dchip analyzer. Como distancia métrica se utilizó 1-correlación, y como método de asociación por centroides.

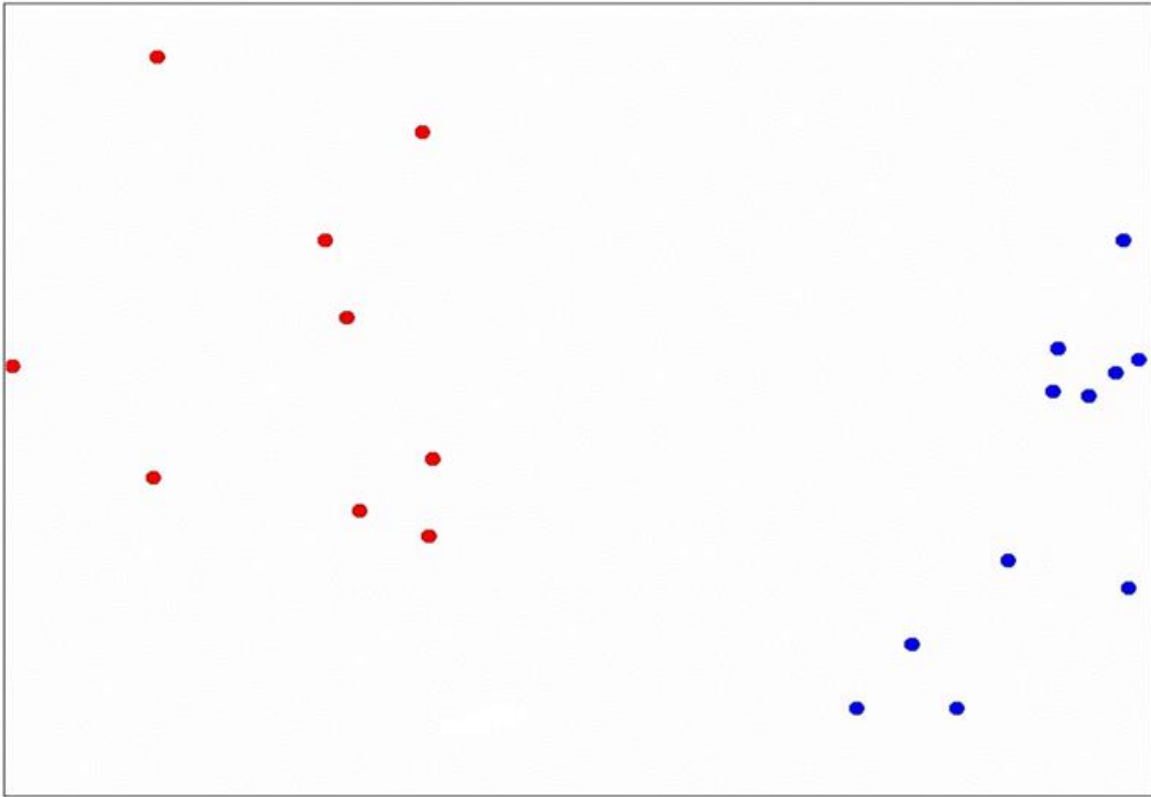


Figura 24. Análisis de Componentes Principales (ACP). Se analizaron un total de nuevemuestras sanguíneas procedentes de pacientes diagnosticados de HPAI (rojo) y de once controles (azul) mediante microarrays de alta densidad de ADN complementario de Affymetrix. Los resultados obtenidos se analizaron mediante ANOVA considerando significativo un $p < 0,05$. Los resultados obtenidos se filtraron para un FC en valor absoluto >2 . El ACP se realizó utilizando el programa DCHIP analyzer. Los resultados representan las dos componentes principales del análisis, que explican el 98,2% de la variabilidad encontrada.

Tras el análisis observamos diferencias notables en la expresión de genes entre los grupos control y HPAI.

Los genes que se encuentran más expresados en los pacientes que en el grupo control son el: CEP85L, NAA15, ZNF208, TNKS2, PDE7A, CAB39, MBNL1, ODF2L, TMPO, HPGD y SEC23A. La siguiente tabla muestra las características de cada uno de ellos.

Gen	Características	Referencias
CEP85L	Proteína centrosomal de 85 Kda identificado como antígeno para el cáncer de pecho.	Winkelmann et al. 2013
NAA15	Acetil transferasa involucrada en el crecimiento y desarrollo vascular, neuronal y hematopoyético.	Fluge et al. 2002
ZNF208	Proteína dedos de zinc encargada de regular la transcripción.	Eichler et al. 1998
TNKS2	PoliADN ribosil transferasa implicada en varios procesos tales como la vía de señalización, longitud de los telómeros y el tráfico vesicular.	Chiang et al. 2006
PDE7A	Gen que codifica una enzima denominada fosfodiesterasa 7a que hidroliza el segundo mensajero, AMPc, que es un regulador y mediador de una serie de respuestas celulares a través de señales extracelulares.	Michaeli et al. 1993
CAB39	Codifica a la proteína de unión a calcio 39.	Ponce-Coria et al. 2012
MBNL1	Codifica una proteína encargada de la regulación del splicing de los preARNm.	Ishikawa et al. 1997
ODF2L	Codifica a la proteína del exterior de fibra densa 1, que son estructuras del citoesqueleto que rodean el axonema en la pieza central y la pieza principal de la cola de los espermatozoides.	Nagase et al. 1999
TMPO	Codifica a la proteína polipeptídica 2 asociada a la lámina.	Harris et al. 1995
HPGD	Codifica a la enzima deshidrogenasa hydroxy-prostaglandina 15, que es responsable del metabolismo de las prostaglandinas, que funcionan en una variedad de procesos fisiológicos y celulares como la inflamación.	Persson et al. 2009
SEC23A	Codifica a la proteína Sec23 homóloga a Sec23p de <i>S. cerevisiae</i> , que asociada con otros complejos forma parte de las vesículas de transporte.	Paccaud et al. 1996

Tabla 27. Características de los genes sobreexpresados en pacientes cuya expresión controla miR-23a

Por otra parte los genes que se encuentran menos expresados en las pacientes respecto al grupo control son el: DEPDC1, ZNF117, SLC4A4, PPARGC1A, IL6, ZNF423, PCDH18, NOX4, ST18 y NKAIN2.

Gen	Características	Referencias
NOX4	Protege a la vasculatura frente a la isquemia y el daño por estrés inflamatorio.	Schroder et al. 2012
ST18	Codifica una proteína dedos de zinc que actúa en la supresión de la tumorigeneidad de la proteína 18.	Jandrig et al. 2004
NKAIN2	Codifica una proteína transmembrana que actúa como una Na ⁺ /K ⁺ ATPasa.	Kim et al. 2013
PCDH18	Protocadherina 18 encargada de establecer las uniones célula-célula en el cerebro.	Yokota et al. 2011
PPARGC1A (PGC-1α)	Coactivador transcripcional que regula los genes implicados en el metabolismo energético y está involucrado en la regulación de distintos procesos metabólicos. Este microARN está relacionado con hipertrofia de cardiomiocitos y diversas patologías relacionadas con el sistema circulatorio.	Lin et al. 2009; Han et al. 2011
ZNF423	Funciona como un factor de transcripción de unión a ADN mediante el uso de dedos de zinc actuando en diferentes vías de señalización. Por lo tanto, se cree que este gen puede tener múltiples funciones en la transducción de la señal durante el desarrollo.	Ingle et al. 2013
IL6	Citoquina pleiotrópica potente que regula el crecimiento y la diferenciación celular y juega un papel importante en la respuesta inmune. La producción desregulada de IL6 está implicada en la patogénesis de muchas enfermedades, tales como el mieloma múltiple, las enfermedades autoinmunes y el cáncer de próstata.	Bae et al. 2013
DEPDC1	Dominio que contiene la proteína 1a y está involucrado en la regulación transcripcional como correpresor transcripcional.	Kanehira et al. 2007

ZNF117	Gen que codifica una proteína dedos de zinc implicada en la regulación de la transcripción.	Bellefroid et al. 1992
SLC4A4	Cotransportador de bicarbonato de sodio que media el movimiento acoplado de iones de sodio y bicarbonato a través de la membrana plasmática de muchas células por lo que participa en la secreción / absorción de bicarbonato y regulación del pH intracelular.	Choi 2012

Tabla 28. Características de los genes que se encuentran menos expresados en pacientes respecto a voluntarios sanos cuya expresión controla miR-23a.

De todos ellos destacamos el PGC-1 α , pues suele estar sobreexpresado en situaciones de estrés oxidativo (Austin et al. 2012) y sin embargo en el estudio se vio que estaba menos expresado en pacientes HPAI, lo que nos incitó a pensar que miR-23a podría estar reprimiendo su expresión, lo que podría contribuir al estado de hipoxia de los mismos. Estas observaciones coincidían con las de Safdar et al. 2009.

4.5 Implicación del gen PGC-1 α en la HPAI.

Debido a los estudios que reflejan una posible relación entre los niveles de miR-23a y PGC- α decidimos analizar la expresión de dicho gen mediante RT-PCR a tiempo real y estudiar si existía una correlación con la expresión de miR-23a. Los resultados obtenidos se representan en la siguiente figura:

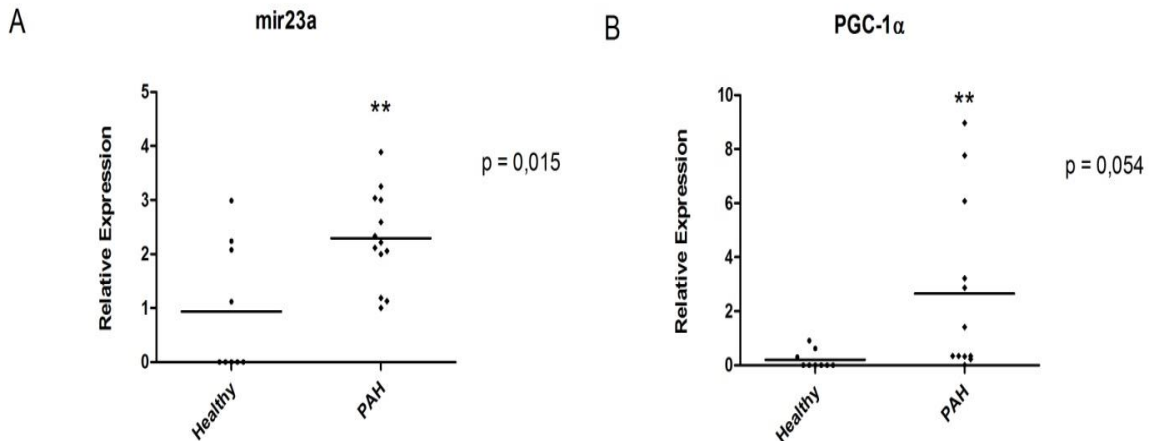


Figura 25. Expresión comparativa de PGC-1 α y miR-23a. Se analizaron un total de doce muestras procedentes de pacientes diagnosticados de HPAI y de 9 controles. Los niveles de expresión de miR-23a se determinaron mediante microarrays de alta densidad de Affymetrix (panel A). La expresión relativa del gen PGC-1 α mediante Real time RT-PCR (panel B). Los resultados obtenidos se analizaron mediante el test no paramétrico de Mann Whitney (paneles A y B), considerando como significativo un $p < 0,05$.

Tal y como puede apreciarse, existe una expresión diferencial significativa en los niveles de miR-23a y de PGC-1 α entre los pacientes de HPAI y los voluntarios sanos. De hecho la expresión de ambos transcritos únicamente fue detectable en tres voluntarios sanos, mientras que todos los pacientes incluidos presentaban niveles significativamente expresados.

En teoría, miR-23a reprime a PGC-1 α . Dicho gen únicamente debería inducirse en situaciones de estrés oxidativo, lo que podría explicar la ausencia de niveles detectables de dicho microARN en los voluntarios sanos. Ahora bien, en una situación de hipoxemia, los pacientes con niveles aumentados de miR-23a deberían presentar una menor inducción de PGC-1 α , y por tanto una menor

capacidad de respuesta ante dicha situación patológica. Para analizar dicha hipótesis realizamos una correlación entre los niveles de expresión de ambos marcadores, paciente por paciente se analizó la expresión del miR-23a y del marcador PGC-1 α . Los resultados obtenidos se resumen en la siguiente figura:

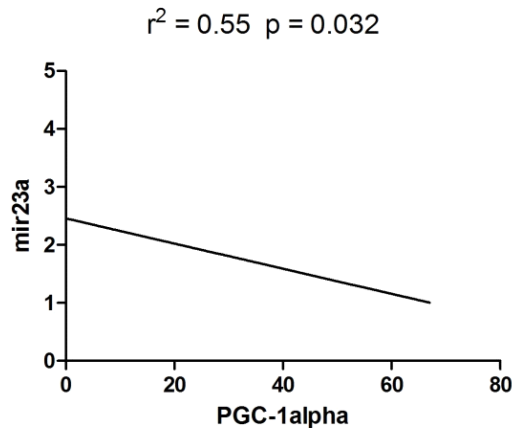


Figura 26. Correlación entre niveles relativos de expresión de PGC-1 α y de miR-23a. Se analizaron doce muestras de pacientes diagnosticados de HPAI. Los niveles de expresión de PGC-1 α se determinaron mediante RT-PCR a tiempo real, mientras que los de miR-23a mediante microarrays. El análisis de correlación se realizó mediante el test no paramétrico de Spearman. El gráfico representa la regresión lineal entre la expresión relativa de ambos marcadores, con un r^2 de 0,55 y una pendiente de -0.02169 ± 0.01287 .

Tal como puede apreciarse existe una correlación negativa entre los niveles de expresión de PGC-1 α y los de miR-23a, es decir, el paciente que tiene muy elevado el nivel del miR-23a tiene niveles bajos de PGC-1 α lo que, pese al reducido número de pacientes incluidos, podría sustentar dicha hipótesis.

Continuando con esta línea de razonamiento, nos planteamos analizar si PGC-1 α podría estar relacionado con el estado de progresión de la enfermedad en los pacientes incluidos en este estudio. Con esta idea realizamos un estudio de correlación múltiple entre los valores de expresión de dicho gen y las características clínicas, moleculares y bioquímicas de dichos pacientes resumidas en la tabla 22. Los resultados pueden resumirse en la siguiente figura:

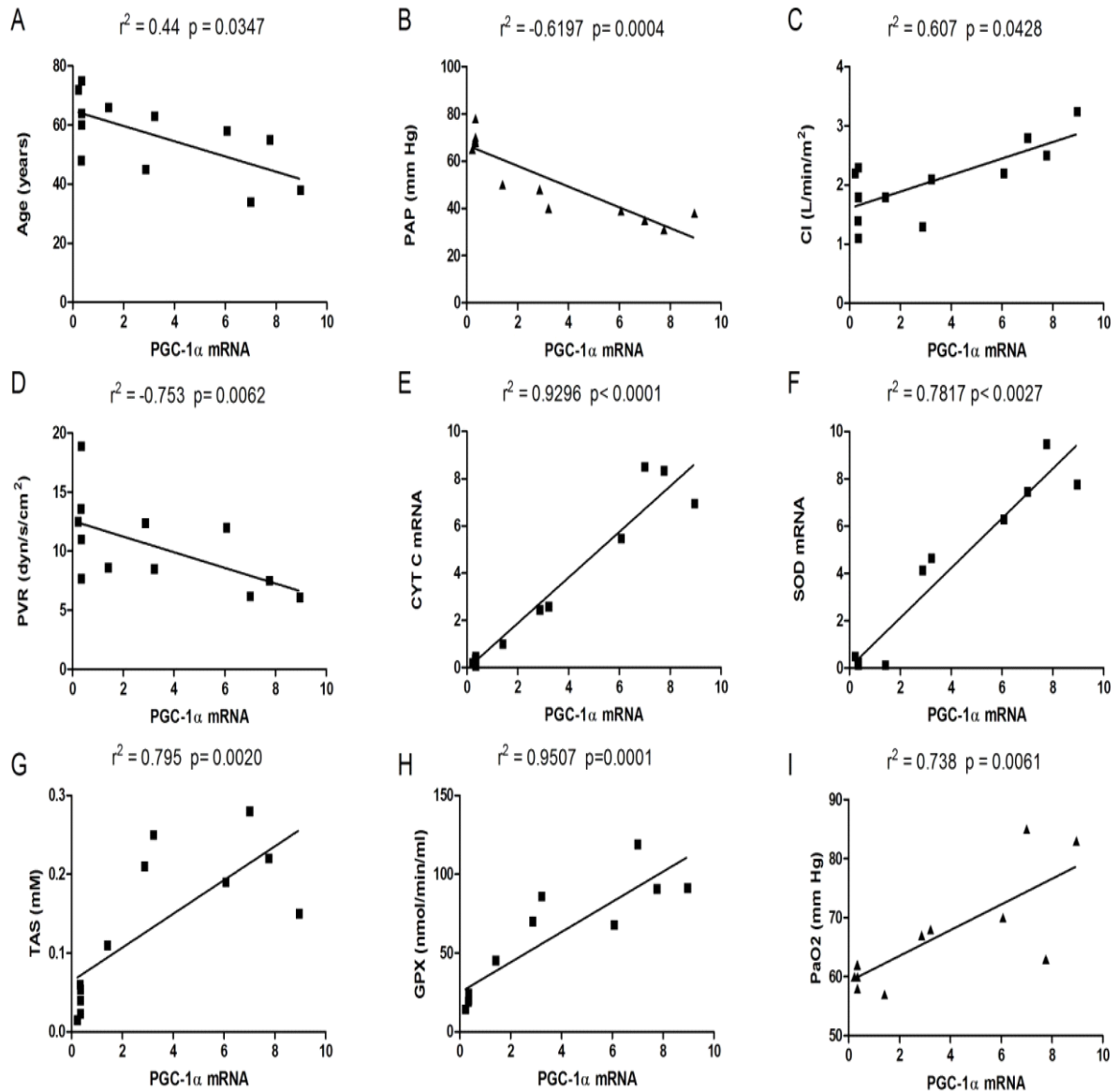


Figura 27. Correlación de PGC-1α, con características clínicas, bioquímicas y moleculares.

Se analizó la sangre periférica de 12 pacientes con HPAI y 9 donantes sanos mediante RT-PCR a tiempo real utilizando primers específicos contra el PGC-1α, citocromo (CYTC) y superóxido dismutasa (SOD). El estado antioxidante total (TAS) y la actividad glutatión peroxidasa (GPX) se evaluaron en plasma. Para analizar los datos se utilizó la prueba no paramétrica de Spearman. Considerando diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

Los valores obtenidos indican una correlación negativa entre los niveles de PGC-1 α y la edad del paciente, el PAP y PVR (gráficas A, B y D), mientras que muestran una correlación positiva entre los niveles de PGC-1 α y IC, CYT C, SOD, TAS, GPX y PaO₂ (gráficas C, E, F, G, H e I).

Ello indica que los pacientes con altos niveles de PGC-1 α presentan una mejora en la función pulmonar y cardíaca.

El PGC-1 α es un coactivador transcripcional, se ha demostrado que activa una amplia gama de factores de transcripción y regula los genes que codifican proteínas mitocondriales incluyendo CYTC bajo hipoxemia, como se ha demostrado en modelos animales (Calvo et al. 2008; Lin et al. 2002; Leick et al. 2010). El estudio demuestra una buena correlación entre los niveles de expresión de PGC-1 α y CYTC en sangre circulante de los pacientes HPAI (Mata et al. 2012).

Los resultados obtenidos demostraron una clara relación entre ambos marcadores, al inhibir miR-23a la expresión de PGC-1 α aumentaba progresivamente (figura 28, panel B), por otra parte se determinó la expresión de distintos marcadores de estrés oxidativo como son el CitC, SOD, GPX y HO1 y se observó cómo al inhibir dicho microARN aumentaba la expresión de estas enzimas encargadas de proteger frente al daño oxidativo (figura 28, panel C), a las 48 horas se observó un cambio significativo en la expresión de Cit C,GPX y HO1 que se fue acentuando a las 72 horas.

Estos resultados demostraron una buena correlación entre los niveles de expresión de miR-23a y PGC-1 α de modo que cuando se inhibe dicho microARN el nivel de expresión de PGC-1 α aumenta significativamente.

Se ha visto cómo el PGC-1 α interacciona con los PPAPs, en especial con PPAR γ (Finck et al. 2007), que permite la interacción de esta proteína con múltiples factores de transcripción y por lo tanto regular distintas actividades de la proteína de unión al elemento de respuesta AMPc (CREB) y factores respiratorios nucleares.

El PPAR γ es diana molecular de un gran número de fármacos comercializados, como las TZD, que se unen a éste y dicha interacción produce la activación de este receptor.

4.6 Regulación farmacológica. Estudios *in vitro*.

La hipertensión arterial idiopática es una enfermedad rara, cuyo tratamiento es sintomático y bastante heterogéneo. Esto implica dos problemas a la hora de establecer qué efectos pueden tener los fármacos en la regulación de fenómenos fisiopatológicos mediados por microARNs, ya que por un lado el número de pacientes es limitado, y por otro la medicación que reciben es altamente heterogénea, tal y como se resume en la tabla 22. Por este motivo nos planteamos poner en marcha un modelo celular *in vitro*, a fin de estudiar dichos efectos. Para ello utilizamos células endoteliales y musculares de arteria pulmonar humana estimuladas con endotelina 20 nM o TGF β 1 5 ng/mL durante 72 horas en presencia o ausencia de ciglitazona 3 μ M.

En situaciones de hipoxia, y ante determinados estímulos como el TGF β y la ET1, el endotelio sufre una serie de complicados procesos de cambio fenotípico, que a menudo son reversibles, conocidos como transición endotelio-mesénquima (EnMT). En este proceso, las células endoteliales dejan de expresar marcadores característicos de endotelio (como la CD31, la VE-cadherina y el VEGFR) y se incrementa la expresión de marcadores mesenquimales (como α SMA, SLUG, SNAIL y ZEB2) (Morrell et al. 2009). Nuestro primer objetivo en este apartado fue estudiar si el modelo utilizado podía aproximarse a un modelo de remodelado vascular característico de enfermedades mediadas por procesos oxidativos como la HPAI (Mata et al. 2012). Para ello estudiamos los cambios morfológicos generados en los cultivos de células endoteliales y musculares como consecuencia de la exposición a endotelina 20 nM y TGF β 1 5 ng/mL mediante microscopía de contraste de fases, y analizamos la expresión de marcadores genéticos de endotelio y mesénquima.

4.6.1 Efecto del TGF β 1 y la ET1 sobre células endoteliales de arteria pulmonar.

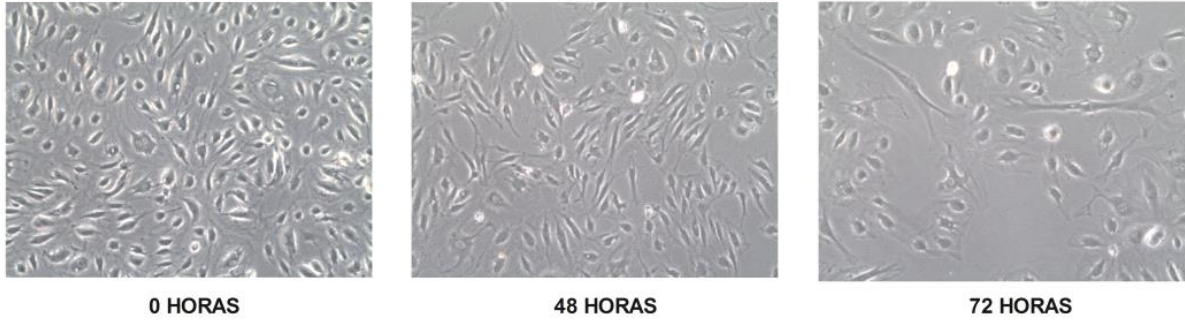
Mediante microscopía de contraste de fases se observó el cambio morfológico que habían sufrido las células, de poseer una morfología aplanada estableciendo fuertes uniones entre ellas característico de las células endoteliales, al ser estimuladas con TGF β 1 comenzaron a separarse y adquirir una morfología estelar característica de células propias del mesénquima (figura 29, panel A).

Se observó un incremento significativo en la expresión relativa de los marcadores de mesénquima incluidos (como α SMA, SLUG, SNAIL o ZEB2), así como una disminución en los marcadores de endotelio (como CD31, VE-cadherina, VEGFR) (figura 29, panel B y panel C).

Los resultados obtenidos son coherentes con los estudios de Felton et al. 2009 y Arciniegas et al. 2007, en los que a partir de experimentos tanto in-vitro como in-vivo destacaban el papel del TGF β 1 como inductor en la transición endotelio-mesénquima.

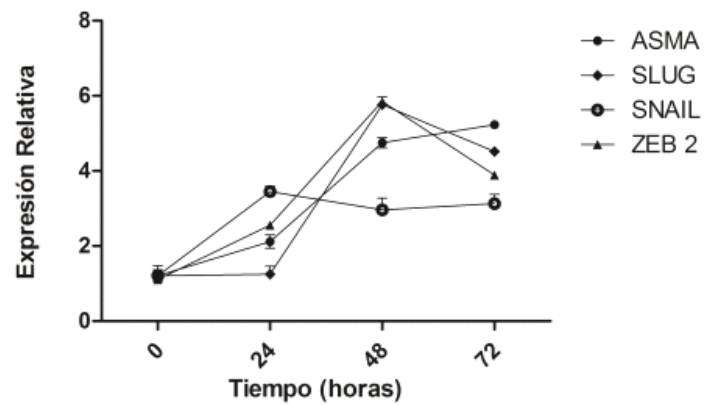
Al igual que en los estudios citados, el marcador mesenquimal α SMA es el que se encuentra mayormente expresado a las 72 horas de exposición al estímulo en nuestro experimento, esta proteína se encuentra involucrada tanto en la movilidad como en la integridad y estructura celular (Choi et al. 2013) por lo que es razonable su aumento de expresión al inducir la inducción endotelio-mesénquima con TGF β 1.

A



B

MARCADORES MESENQUIMA



C

MARCADORES ENDOTELIO

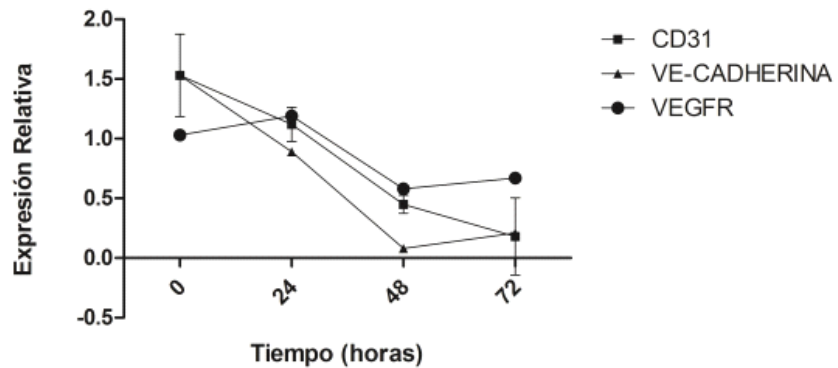
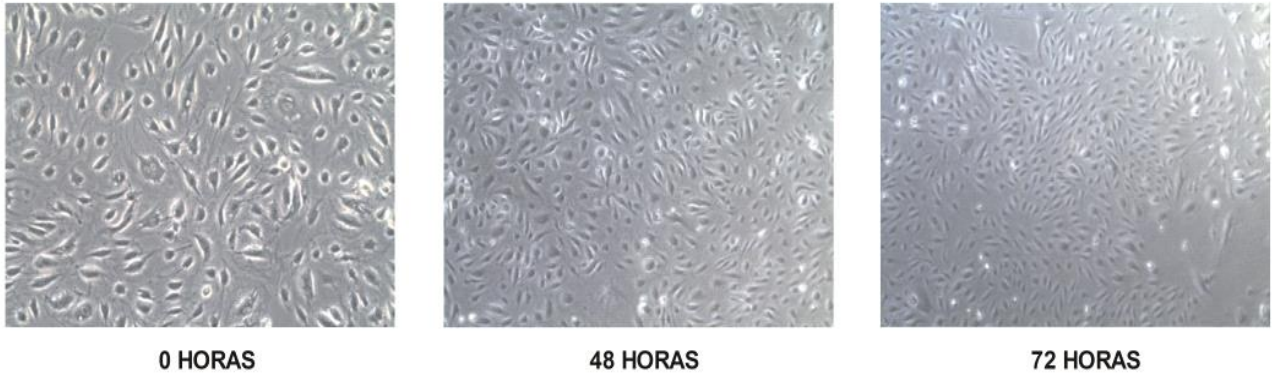


Figura 29. El TGFβ1 induce transición endotelio-mesénquima en células endoteliales arteriales pulmonares humanas. Las células se estimularon con TGFβ1 5ng/mL durante 72 horas. Los cambios morfológicos se analizaron por microscopía de contraste de fases (panel A). La expresión génica de SNAIL, SLUG, SM22, ZEB2, ASMA, VECADH, VEGFR y CD31 se analizó por RT-PCR a tiempo real (panel B Y c). Los resultados se analizaron mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Los resultados se representan como media ± ESM de tres experimentos independientes. * p< de 0.05 comparado con el grupo control.

Por otra parte se estudió el efecto de la ET1 sobre células endoteliales de arteria pulmonar. Las imágenes obtenidas por microscopía de contraste de fases (figura 30, panel A) permitían observar la transición morfológica endotelio mesénquima y a su vez un aumento en la proliferación celular. Aunque los resultados no fueron tan notables como los obtenidos con el TGF β 1, sí se observaba un cambio en la morfología celular, las células pasaron de presentar una morfología aplanada y con fuertes uniones entre ellas característica del endotelio a presentar una morfología estelar y con pocas uniones entre ellas tras la exposición a ET1. Los resultados indicaron un incremento significativo en la expresión relativa de los marcadores mesenquimales incluidos, (figura 30, panel C), sin embargo a diferencia de los resultados obtenidos con el modelo de TGF β 1 los resultados de la inducción muestran un aumento en los marcadores de endotelio (figura 30, panel B), estos resultados podrían deberse a que la ET1 es producida en condiciones fisiológicas en pequeñas cantidades, mayormente en las células endoteliales, y actúa principalmente como un mediador autocrino / paracrino (Böhm et al. 2007), su actividad está relacionada con la angiogénesis vascular (Kuhlmann et al. 2005) de ahí que se observe un incremento en los marcadores endoteliales.

En condiciones normales, la ET1 se secreta en cantidades mínimas en la vasculatura pulmonar. Es interesante destacar que en pacientes con HP la producción está claramente aumentada (Giaid et al. 1993) y se correlaciona directamente con la gravedad de la enfermedad y el grado de desarrollo de las lesiones plexiformes; es decir, una alteración en la función endotelial generaría una mayor cantidad de ET1, la cual es responsable en gran medida del aumento de la resistencia vascular pulmonar, al actuar como el potente vasoconstrictor que es. Por otra parte, la ET1 también se ha relacionado con la inducción del remodelado vascular, ya que aumenta la expresión del receptor 1b de la serotonina en la célula de músculo liso vascular (Rondelet et al. 2003). También induce la formación de proteínas de la matriz extracelular y fibronectina, y potencia el efecto del TGF β y del PDGF (Lüscher et al. 2000).

A



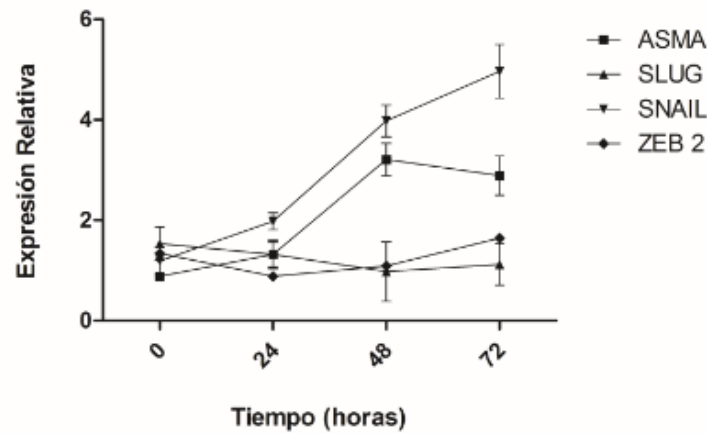
0 HORAS

48 HORAS

72 HORAS

B

MARCADORES MESENQUIMA



C

MARCADORES ENDOTELIO

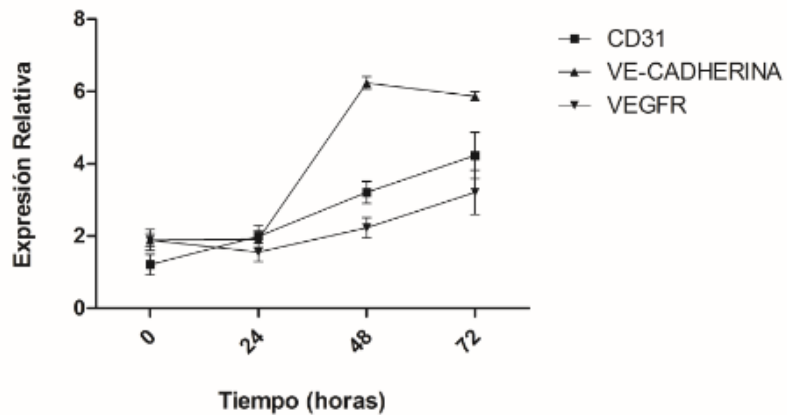


Figura 30. La ET1 induce transición endotelio-mesénquima en células endoteliales arteriales pulmonares humanas. Las células se estimularon con ET1 20nM durante 72 horas. Los cambios morfológicos se analizaron por microscopía de contraste de fases (panel A). La expresión génica de SNAIL, SLUG, SM22, ZEB2, ASMA, VECADH, VEGFR y CD31 se analizó por RT-PCR a tiempo real (panel B Y c). Los resultados se analizaron mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Los resultados se representan como media \pm ESM de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$ comparado con el grupo control.

4.6.2 Efecto del TGF β 1 y la ET1 sobre células musculares de arteria pulmonar.

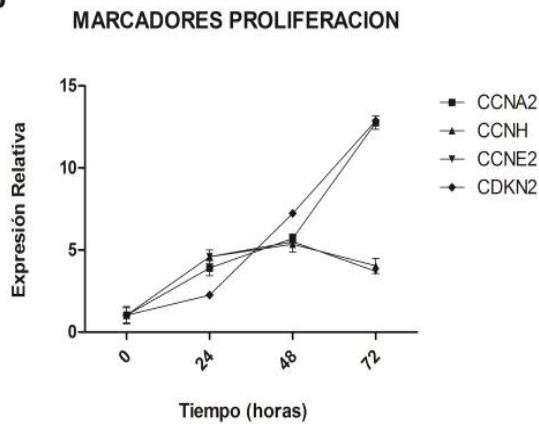
Respecto a los cultivos de células musculares estimuladas con TGF β 1, se observaron cambios significativos en la confluencia celular en las imágenes obtenidas mediante microscopía de contraste de fases desde las 0 horas hasta las 72 de estímulo (figura 31, panel A), en concordancia con las imágenes, el recuento celular mostró un aumento en la proliferación celular, acentuándose a las 48h posteriores a la estimulación con TGF β 1 (figura 31, panel C), del mismo modo los marcadores de proliferación aumentaron considerablemente durante los tiempos de exposición al estímulo (figura 31, panel B).

Estos resultados están en concordancia con estudios recientes que ya habían demostrado cómo el TGF β 1 estimulaba la proliferación y migración celular en células lisas de músculo humano (Feng et al. 2013). Los estudios realizados por Díez et al. 2010, en células de la musculatura lisa de arterias pulmonares evaluaban el papel del TGF β 1 en el mecanismo de transición endotelio-mesénquima determinando la expresión de marcadores del endotelio como el CD31 y del mesénquima como el α SMA tras la estimulación con TGF β 1 y los resultados fueron semejantes a los obtenidos en nuestro estudio, concluyeron que durante la transición endotelio-mesénquima, las células musculares lisas de la capa media son activadas por factores como el TGF β 1 con lo que se produce un cambio fenotípico: las células musculares lisas de fenotipo “contráctil” no proliferativo se transforman en células proliferativas, migran atraídas por distintos agentes quimiotácticos y producen matriz extracelular (colágeno, elastina y proteoglucanos).

A



B



C

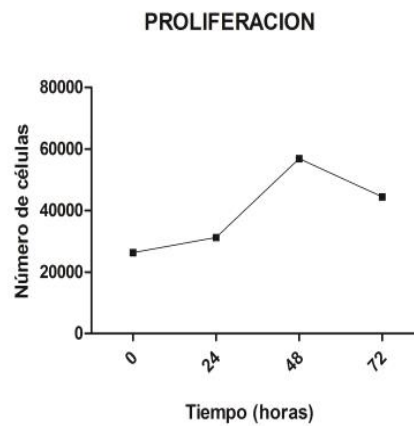


Figura 31. TGF β 1 induce la proliferación celular en células musculares arteriales pulmonares humanas. Las células se estimularon con TGF β 1 5ng/mL durante 72 horas. La proliferación celular se analizó por microscopía de contraste de fases (panel A) y mediante recuento celular (panel C). La expresión génica de CCNA2, CCNH, CCNE2 y CDKN2 se analizó por RT-PCR a tiempo real (panel B). Los resultados se analizaron mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Los resultados se representan como media \pm ESM de tres experimentos independientes. * $p <$ 0.05 comparado con el grupo control.

Por otra parte, los cultivos de células musculares fueron estimulados con ET1 20 nM, se evaluó la expresión relativa de marcadores de proliferación como son la CCNA2, CCNH, CCNE2 y CDKN2 y se realizó un recuento de células a los diferentes tiempos de exposición al estímulo.

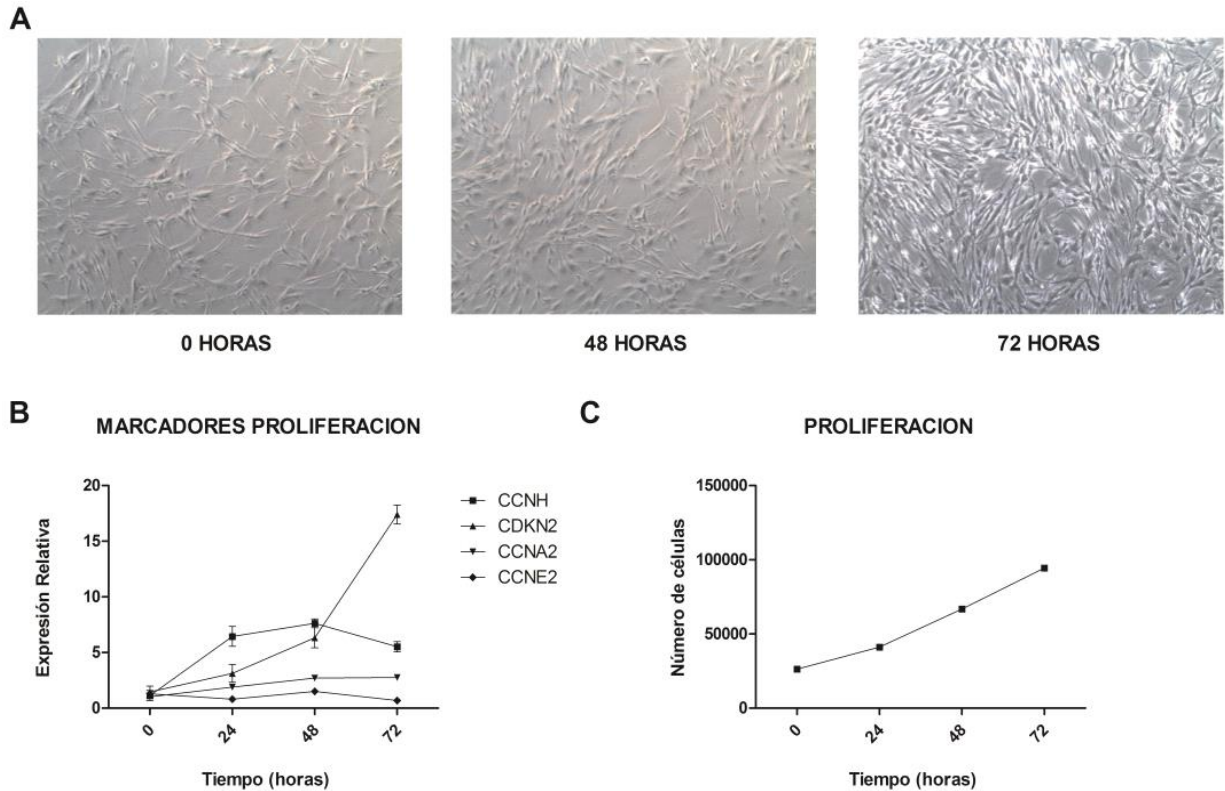


Figura 32. La ET1 induce la proliferación celular en células musculares de arteria pulmonar humana. Las células se estimularon con ET1 20nM durante 72 horas. La proliferación celular se analizó por microscopía contraste de fases (panel A) y mediante recuento celular (panel C). La expresión génica de CCNA2, CCNH, CCNE2 y CDKN2 se analizó por RT-PCR a tiempo real (panel B). Los resultados se analizaron mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Los resultados se representan como media \pm ESM de tres experimentos independientes. * $p <$ de 0.05 comparado con el grupo control.

Las imágenes mostraron un incremento en la proliferación celular a medida que aumentaba el tiempo de exposición a ET1 20 nM (figura 32, panel A), que se relacionó con el aumento en la expresión de CDKN2 y CCNH (figura 32, panel B). Los datos de conteo celular confirmaron dicha multiplicación celular (figura 32, panel C). Estos datos se correlacionan con los obtenidos por otros autores como McLaughlin et al. 2009, Humbert et al. 2006 y Rubin et al. 2002.

4.6.3 Efecto de los agonistas del PPAR γ en células endoteliales estimulados con ET1 y TGF β 1.

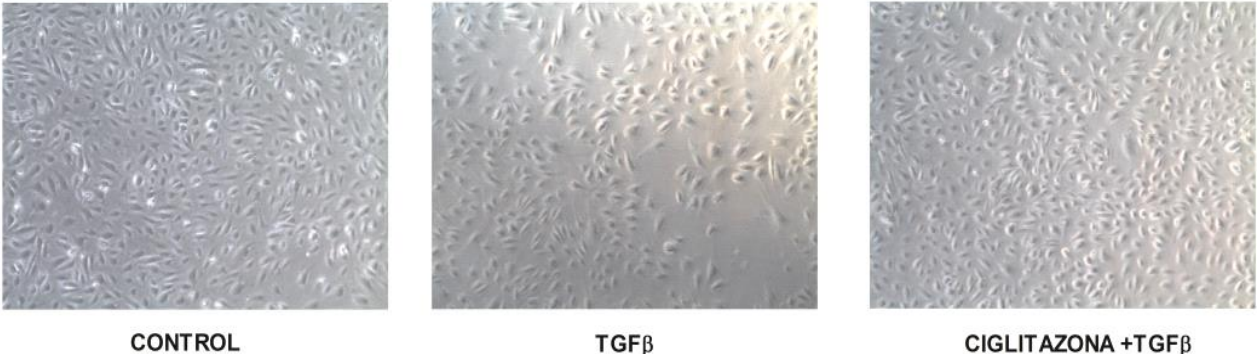
Los cultivos de células endoteliales se trataron con ciglitazona 3 μ M y transcurridos 30 minutos se estimularon con TGF β 1 5 ng/mL durante 72 horas.

Mediante microscopía de contraste de fases se observó el cambio morfológico que habían sufrido las células al inducir el cultivo con TGF β 1 y tratarlas con ciglitazona (figura 33, panel A). De poseer una morfología aplanada estableciendo fuertes uniones entre ellas característico de las células endoteliales, comenzaron a separarse y adquirir una morfología estelar característica de células propias del mesénquima, sin embargo, en los cultivos que habían sido tratados previamente con ciglitazona la morfología celular era similar al cultivo control.

Respecto a los estudios de expresión, la ciglitazona inhibía significativamente el incremento de marcadores mesenquimales (α SMA, SLUG, SNAIL y ZEB2) y el descenso de marcadores endoteliales (CD31, VE-cadherina y VEGRF) provocado por la inducción con TGF β 1 (figura 33, paneles B y C).

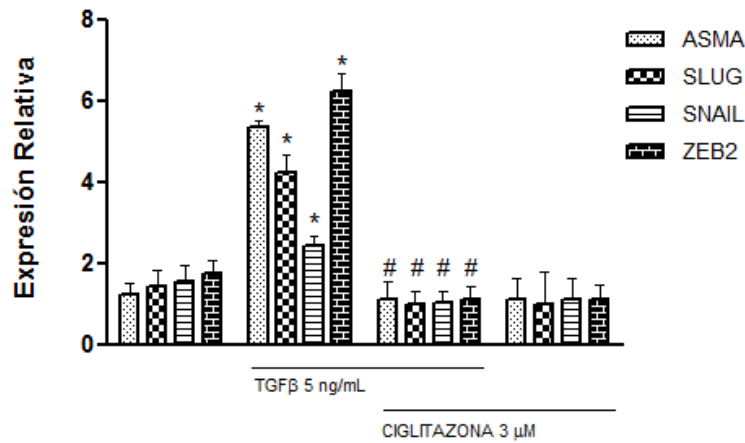
Estos hallazgos apoyan el posible papel regulador de la ciglitazona como inhibidor de la remodelación celular en células endoteliales.

A



B

MARCADORES MESÉNQUIMA



C

MARCADORES ENDOTELIO

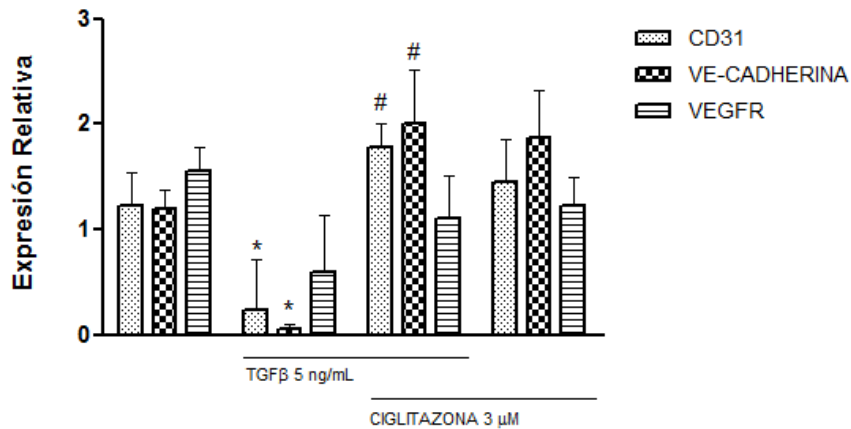


Figura 33. La ciglitazona revierte el efecto del TGFβ1 en células endoteliales arteriales pulmonares humanas. Las células se estimularon con TGFβ1 5 ng/mL en presencia o ausencia de ciglitazona 3 μM durante 72 horas. Los cambios morfológicos se analizaron por microscopía de contraste de fases (panel A). La expresión génica de SNAIL, SLUG, ZEB2, ASMA, VECADH, VEGFR y CD31 se analizó por RT-PCR a tiempo real (panel B). Los resultados se analizaron mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Los resultados se representan como media ± ESM de tres experimentos independientes. * p< de 0.05 comparado con el grupo control.

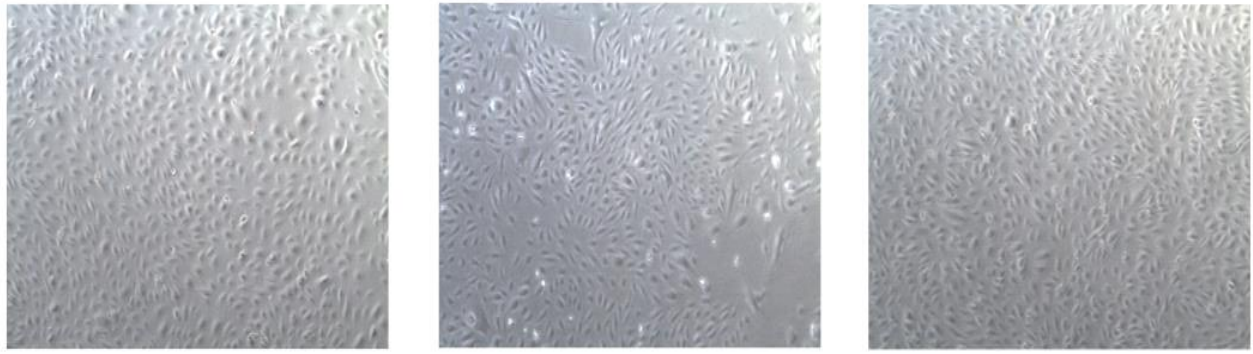
Por otra parte, los cultivos de células endoteliales fueron tratados con ciglitazona 3 μ M, transcurridos 30 minutos se estimularon con ET1 20 nM durante 72 horas.

Mediante microscopía de contraste de fases se observó el cambio morfológico que habían sufrido las células al inducir con ET1 (figura 34, panel A). De poseer una morfología aplanada estableciendo fuertes uniones entre ellas característico de las células endoteliales, comenzaron a separarse y adquirir una morfología estelar característica de células propias del mesénquima, sin embargo en los cultivos que habían sido tratados previamente con ciglitazona la morfología celular era similar al cultivo control.

Los resultados mostraron cómo al estimular con ET1 20 nM se producía un incremento significativo de la expresión de los marcadores mesenquimales α SMA, y SNAIL, estos valores revertían asemejándose a la expresión del cultivo control al ser tratados con ciglitazona 3 μ M (figura 34, panel B). Por otra parte, la expresión de marcadores de endotelio, como el CD31 y la VE-cadherina aumentaron significativamente al tratar con ET1, como ya hemos dicho en el apartado anterior, este aumento es debido a que la ET1 es producida en condiciones fisiológicas en pequeñas cantidades pues se encuentra involucrada en la angiogénesis vascular (Kuhlmann et al. 2005). Todos estos cambios fueron inhibidos por la ciglitazona (figura 34, panel C)

Los resultados obtenidos en este trabajo de experimentación junto con las publicaciones hasta la fecha destacan el potencial uso de los agonistas de PPAR γ como atenuadores de los efectos de la ET1 en células endoteliales pulmonares (Lee et al 2006; Yamashita et al 2001; Kang et al. 2011; Tian et al. 2010).

A



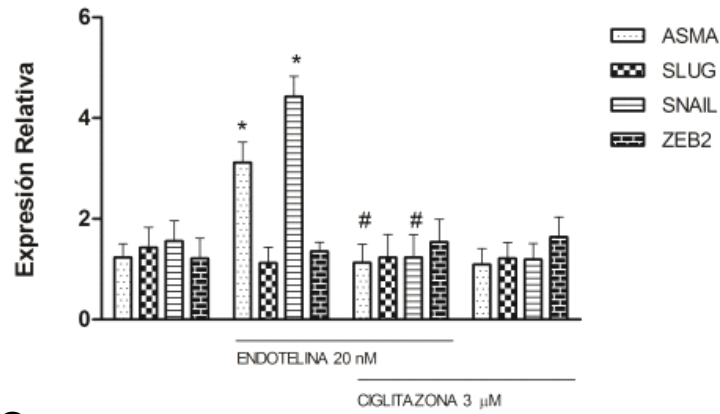
CONTROL

ENDOTELINA

CIGLITAZONA + ENDOTELINA

B

MARCADORES MESENQUIMA



C

MARCADORES ENDOTELIO

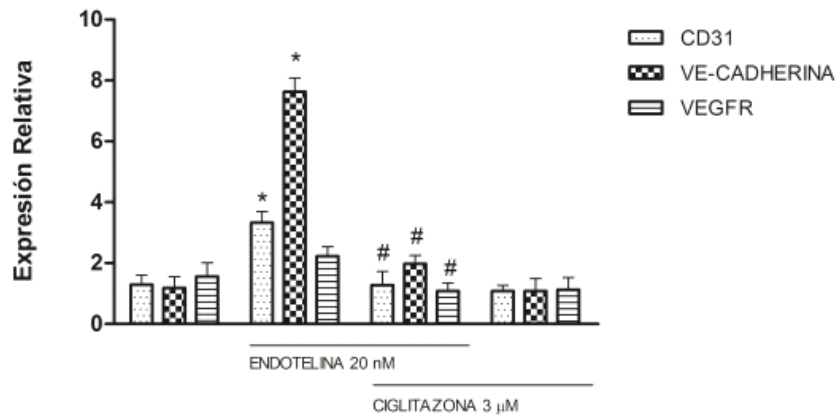


Figura 34. La ciglitazona revierte el efecto de la ET1 en células endoteliales arteriales pulmonares humanas. Las células se estimularon con ET1 20 nM en presencia o ausencia de ciglitazona 3 μM durante 72 horas. Los cambios morfológicos se analizaron por microscopía de contraste de fases (panel A). La expresión génica de SNAIL, SLUG, ZEB2, ASMA, VE-cadherina, VEGFR y CD31 se analizó por RT-PCR a tiempo real (panel B). Los resultados se analizaron mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Los resultados se representan como media ± ESM de tres experimentos independientes. * p< de 0.05 comparado con el grupo control.

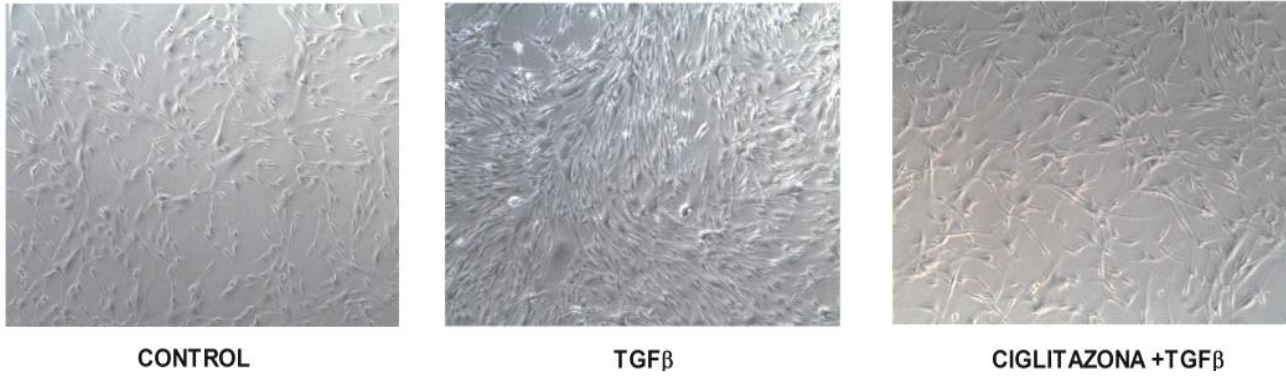
4.6.4 Efecto de los agonistas del PPAR γ en células musculares estimuladas con ET1 y TGF β 1.

Cuando el cultivo se encontraba a una confluencia del 70%, las células se trataron con ciglitazona 3 μ M, tras 30 minutos fueron estimuladas con TGF β 1 5 ng/mL durante 72h, transcurrido ese tiempo se tomaron imágenes de las tres condiciones, se analizaron marcadores de proliferación celular como son las ciclinas CCNA2, CCNH, CCNE2 y CDKN2 y se contó el número de células en cada condición.

En los cultivos estimulados con TGF β 1 obtuvimos un aumento en la proliferación celular, que se correlacionaba con un aumento de expresión de marcadores proliferativos. La ciglitazona atenuó todas estas alteraciones hasta niveles próximos al cultivo control (figura 35).

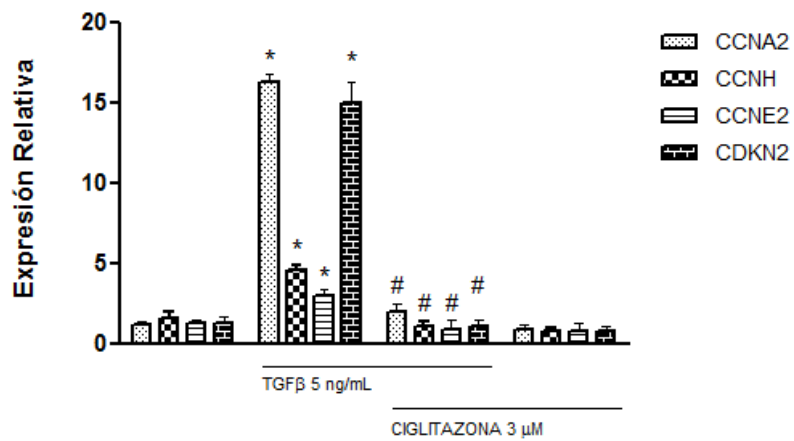
Por otra parte las células musculares cultivadas fueron tratadas con ciglitazona 3 μ M, tras 30 minutos fueron estimuladas con ET1 20 nM durante 72h, se tomaron imágenes mediante microscopía de contraste de fases de las tres condiciones, se analizaron marcadores de endotelio y mesénquima mediante RT-PCR y se contó el número de células en cada condición. Al igual que al utilizar TGF β 1, al estimular con ET1 se observó un aumento en la proliferación celular, que se correlacionaba con un aumento de expresión marcadores proliferativos(CCNA2, CCNH y CDKN2), mientras que los cultivos que habían sido tratados a su vez con ciglitazona mostraban una proliferación y expresión de marcadores proliferativos similar al cultivo control (figura 36)

A



B

MARCADORES PROLIFERACIÓN



C

PROLIFERACIÓN

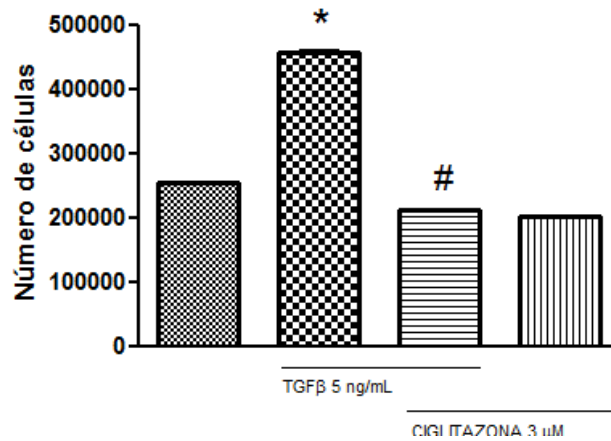


Figura 35. La ciglitazona revierte el efecto proliferativo causado por el TGFβ1 en células musculares. Las células se estimularon con TGFβ1 5ng/mL en presencia o ausencia de ciglitazona 3 μM durante 72 horas. Los cambios en la proliferación celular se analizaron por microscopía de contraste de fases (panel A) y conteo celular (panel C). La expresión génica de los marcadores de proliferación celular CCNA2, CCNH, CCNE2 y CDKN2 se analizó por RT-PCR a tiempo real (panel B). Los resultados se analizaron mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Los resultados se representan como media ± ESM de tres experimentos independientes. * p< de 0.05 comparado con el grupo control.

5. CONCLUSIONES

1. Existe un patrón de expresión diferencial de microARNs circulantes en pacientes de HPAI que se correlaciona con el estado oxidativo y la función pulmonar de los mismos.
2. Las diferencias de expresión de microARNs se correlacionan con cambios a nivel de expresión génica de genes inflamatorios y de respuesta a estrés oxidativo.
3. El miR-23a está sobreexpresado en pacientes HPAI. La inhibición del mismo produce in vitro un aumento significativo de PGC-1 α , lo que ayuda a recobrar el balance oxidativo de la célula. Dicha inhibición también aumenta la expresión de moléculas y enzimas encargadas de proteger frente al daño oxidativo como son la CitC, SOD, GPX y HO1.
4. Los agonistas de PPAR γ inhiben el remodelado vascular a nivel de EnMT y proliferación de músculo liso in vitro, lo que apoya su potencial uso para el tratamiento de la HPAI.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed MN, Zhang Y, Codipilly C, Zaghloul N, Patel D, Wolin M, Miller EJ. "Extracellular superoxide dismutase overexpression can reverse the course of hypoxia-induced pulmonary hypertension". *Mol Med*. 2012; 18(1):38-46.
- Arciniegas E, Frid MG, Douglas IS, Stenmark KR. "Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007; 293(1):L1-8.
- Austin S, St-Pierre J. "PGC-1 α and mitochondrial metabolism--emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders". *J Cell Sci*. 2012; 125(Pt 21):4963-4971.
- Bae YJ, Kim SH, Chung JH, Song SW, Kim KS, Kim MK, Kwon O, Choi MS, Sung MK. "Evaluation of adiposity-related biomarkers as metabolic syndrome indicators". *Clin Nutr Res*. 2013; 2(2):91-99.
- Barberà J.A. "Buenas noticias sobre la hipertensión pulmonar". *Arch Bronconeumol*. 2001; 37: 105-107
- Barberà J.A. "Hipertensión pulmonar: criterios actuales de diagnóstico y tratamiento". *Med Clin (Barc)*. 2002; 118(15):590-596.
- Bellefroid EJ, Ried T, Rivière M, Marine JC, Levan G, Szpirer J, Szpirer C, Ward DC, Martial JA. "Localization of the human KRAB finger gene ZNF117 (HPF9) to chromosome 7q11.2". *Genomics*. 1992; 14(3):780-781.
- Berger J, Moller DE. "The mechanisms of action of PPARs". *Annu Rev Med*. 2002; 53:409-435.
- Bockmeyer CL, Maegel L, Janciauskiene S, Rische J, Lehmann U, Maus UA, Nickel N, Haverich A, Hoepfer MM, Golpon HA, Kreipe H, Laenger F, Jonigk D. "Plexiform vasculopathy of severe pulmonary arterial hypertension and microRNA expression". *J Heart Lung Transplant*. 2012; 31(7):764-772.
- Böhm F, Pernow J. "The importance of endothelin-1 for vascular dysfunction in cardiovascular disease". *Cardiovasc Res*. 2007; 76(1):8-18.
- Bolós V, Peinado H, Pérez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, Cano A. "The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors". *J Cell Sci*. 2003; 116(Pt 3):499-511.

- Brock M, Trenkmann M, Gay RE, Michel BA, Gay S, Fischler M, Ulrich S, Speich R and Huber LC. "Interleukin-6 Modulates the Expression of the Bone Morphogenic Protein Receptor Type II Through a Novel STAT3-miRNA Cluster 17/92 Pathway". *Circ. Res.* 2009; 104: 1184-1191.
- Brock M, Samillan VJ, Trenkmann M, Schwarzwald C, Ulrich S, Gay RE, Gassmann M, Ostergaard L, Gay S, Speich R, Huber LC. "AntagomiR directed against miR-20a restores functional BMP2 signalling and prevents vascular remodelling in hypoxia-induced pulmonary hypertension". *Eur Heart J.* 2012. In Press.
- Calvo JA, Daniels TG, Wang X, Paul A, Lin J, Spiegelman BM, Stevenson SC, Rangwala SM. "Muscle-specific expression of PPARgamma coactivator-1alpha improves exercise performance and increases peak oxygen uptake". *J Appl Physiol.* 2008; 104:1304-1312.
- Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA. "The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression". *Nat Cell Biol.* 2000; 2(2):76-83.
- Carrión García JL, Vicente Guillén R, Rodríguez Argente G. "Pulmonary hypertension: pathophysiology, diagnosis, treatment and anesthetic considerations". *Rev Esp Anestesiol Reanim.* 2007; 54(2):93-108.
- Caruso P, MacLean MR, Khanin R, McClure J, Soon E, Southgate M, MacDonald RA, Greig JA, Robertson KE, Masson R, Denby L, Dempsie Y, Long L, Morrell NW, Baker AH. "Hypertension due to Chronic Hypoxia and Monocrotaline. Dynamic Changes in Lung MicroARN Profiles During the Development of Pulmonary". *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30: 716-723.
- Caruso P, Dempsie Y, Stevens H, McDonald RA, Long L, Lu R, White K, Mair K, McClure JD, Southwood M, Upton P, Xin M, van Rooij E, Olson E, Morrell NW, Maclean MR, Baker AH. "A role for miR-145 in pulmonary arterial hypertension: evidence from mouse models and patient samples". *Circ Res.* 2012; 111(3):290-300.
- Chiang YJ, Nguyen ML, Gurunathan S, Kaminker P, Tessarollo L, Campisi J, Hodes RJ. "Generation and characterization of telomere length maintenance in tankyrase 2-deficient mice". *Mol Cell Biol.* 2006; 26(6): 2037-2043.
- Choi I. "SLC4A transporters". *Curr Top Membr.* 2012; 70: 77-103.

- Choi SY, Sung R, Lee SJ, Lee TG, Kim N, Yoon SM, Lee EJ, Chae HB, Youn SJ, Park SM. "Podoplanin, α -Smooth Muscle Actin or S100A4 Expressing Cancer-Associated Fibroblasts Are Associated with Different Prognosis in Colorectal Cancers". *J Korean Med Sci.* 2013; 28(9):1293-1301.
- Crespo C, Morales V, Alonso H, Alonso B, Molero R. "Hipertensión pulmonar primaria y su tratamiento". *Farm Hosp.* 2004; 28(1):48-55.
- D'Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring RM, Groves BM, Kernis JT, et al. "Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry". *Ann Intern Med.* 1991; 115 (5):343-349.
- Des Tombe A.L. , Van Beek-Harmsen B.J. , Lee-De Groot M.B.E., Van Der Laarse W.J. "Calibrated histochemistry applied to oxygen supply and demand in hypertrophied rat myocardium" *Microsc. Res. Tech.* 2002; 58:412–420.
- Díez M, Musri MM, Ferrer E, Barberà JA, Peinado VI. "Endothelial progenitor cells undergo an endothelial-to-mesenchymal transition-like process mediated by TGFbetaRI". *Cardiovasc Res.* 2010; 88(3):502-511.
- Drake KM, Zygmunt D, Mavrakis L, Harbor P, Wang L, Comhair SA, Erzurum SC, Aldred MA. "Altered microRNA processing in heritable pulmonary arterial hypertension: An important role for Smad-8". *Am J Respir Crit Care Med.* 2011; 184(12):1400-1408.
- Eichler EE, Hoffman SM, Adamson AA, Gordon LA, McCready P, Lamerdin JE, Mhrenweiser HW. "Complex beta-satellite repeat structures and the expansion of the zinc finger gene cluster in 19p12". *Genome Res.* 1998; 8(8):791-808.
- Elmedal B, de Dam MY, Mulvany MJ, Simonsen U. "The superoxide dismutase mimetic, tempol, blunts right ventricular hypertrophy in chronic hypoxic rats". *Br J Pharmacol.* 2004; 141(1):105-113.
- Fabregat-Andrés Ó, Tierrez A, Mata M, Estornell-Erill J, Ridocci-Soriano F, Monsalve M. "Induction of PGC-1 α expression can be detected in blood samples of patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction". *PLoS One.* 2011; 6(11):e26913.
- Feige JN, Gelman L, Michalik L, Desvergne B, Wahli W. "From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions". *Prog Lipid Res.* 2006; 45(2):120-159.

- Felton VM, Borok Z, Willis BC. "N-acetylcysteine inhibits alveolar epithelial-mesenchymal transition". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009; 297(5):L805-812.
- Feng W, Xu X, Zhao G, Li G, Liu T, Zhao J, Dong R, Wang DW, Tu L. "EETs and CYP2J2 inhibit TNF- α -induced apoptosis in pulmonary artery endothelial cells and TGF- β 1-induced migration in pulmonary artery smooth muscle cells". *Int J Mol Med*. 2013; 32(3):685-693.
- Ferré P. "The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity". *Diabetes*. 2004; 53 Suppl 1:S43-50.
- Finck BN, Kelly DP. "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) regulatory cascade in cardiac physiology and disease". *Circulation*. 2007;115(19):2540-2548.
- Fluge Ø, Bruland O, Akslen LA, Varhaug JE, Lillehaug JR. "NATH, a novel gene overexpressed in papillary thyroid carcinomas". *Oncogene*. 2002; 21(33):5056-5068.
- Galié N, Manes A, Branzi A. The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc Res*. 2004; 61: 227–237.
- Galié N, Hoeper MM, Humbert M, Torbicki A, Vachiery JL, Barbera JA, Beghetti M, Corris P, Gaine S, Gibbs JS, Gomez-Sanchez MA, Jondeau G, Klepetko W, Opitz C, Peacock A, Rubin L, Zellweger M, Simonneau G; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). "Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT)". *Eur Heart J*. 2009; 30(20):2493-2537.
- Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP, Stewart DJ. "Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension". *N Engl J Med*. 1993; 328(24):1732-1739.
- Giaid A, Saleh D. "Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension". *N Engl J Med*. 1995; 333(4):214-221.

- Grant JS, White K, Maclean MR, Baker AH. "MicroRNAs in pulmonary arterial remodeling". *Cell Mol Life Sci.* 2013 ;70(23):4479-4494.
- Guo L, Qiu Z, Wei L, Yu X, Gao X, Jiang S, Tian H, Jiang C, Zhu D. "The microRNA-328 regulates hypoxic pulmonary hypertension by targeting at insulin growth factor 1 receptor and L-type calcium channel- α 1C". *Hypertension.* 2012; 59(5):1006-1013.
- Han M, Toli J, Abdellatif M. "MicroRNAs in the cardiovascular system". *Curr Opin Cardiol.* 2011; 26(3):181-189.
- Harris CA, Andryuk PJ, Cline SW, Mathew S, Siekierka JJ, Goldstein G. "Structure and mapping of the human thymopoietin (TMPO) gene and relationship of human TMPO beta to rat lamin-associated polypeptide 2". *Genomics.* 1995; 28(2): 198-205.
- Harrison DG. "Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction". *J Clin Invest.* 1997;100 (9):2153-2157.
- Hoshikawa Y, Ono S, Suzuki S, Tanita T, Chida M, Song C, Noda M, Tabata T, Voelkel NF, Fujimura S. "Generation of oxidative stress contributes to the development of pulmonary hypertension induced by hypoxia". *J Appl Physiol.* 2001; 90(4):1299-1306.
- Huang V, Place RF, Portnoy V, Wang J, Qi Z, Jia Z, Yu A, Shuman M, Yu J, Li LC. "Upregulation of Cyclin B1 by miRNA and its implications in cancer". *Nucleic Acids Res.* 2012; 40(4):1695-1707.
- Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, Bertocchi M, Habib G, Gressin V, Yaici A, Weitzenblum E, Cordier JF, Chabot F, Dromer C, Pison C, Reynaud-Gaubert M, Haloun A, Laurent M, Hachulla E, Simonneau G. "Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry". *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 173(9):1023-1030.
- Iglarz M, Clozel M. "At the heart of tissue: endothelin system and end-organ damage". *Clin Sci (Lond).* 2010; 119(11):453-463.
- Ingle JN, Liu M, Wickerham DL, Schaid DJ, Wang L, Mushiroda T, Kubo M, Costantino JP, Vogel VG, Paik S, Goetz MP, Ames MM, Jenkins GD, Batzler A, Carlson EE, Flockhart DA, Wolmark N, Nakamura Y, Weinshilboum RM. "Selective Estrogen Receptor Modulators and Pharmacogenomic Variation in ZNF423 Regulation of BRCA1 Expression: Individualized Breast Cancer Prevention". *Cancer Discov.* 2013; 3(7):812-825.

- Ishikawa K, Nagase T, Nakajima D, Seki N, Ohira M, Miyajima N, Tanaka A, Kotani H, Nomura N, Ohara O. "Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. VIII. 78 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro". *DNA Res.* 1997; 4(5):307-313.
- Jakymiw A, Lian S, Eystathio Andrew Jakymiw, Shangli Lian, Theophany Eystathioy, Songqing Li, Minoru Satoh, John C. Hamel, Marvin J. Fritzler & Edward K.L. Chan. "Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference". *Nature Cell Biology* 2005; 7(12):1267-1274.
- Jandrig B, Seitz S, Hinzmann B, Arnold W, Micheel B, Koelble K, Siebert R, Schwartz A, Ruecker K, Schlag PM, Scherneck S, Rosenthal A. "ST18 is a breast cancer tumor suppressor gene at human chromosome 8q11.2". *Oncogene.* 2004; 23(57):9295-9302.
- Kanehira M, Harada Y, Takata R, Shuin T, Miki T, Fujioka T, Nakamura Y, Katagiri T. "Involvement of upregulation of DEPDC1 (DEP domain containing 1) in bladder carcinogenesis". *Oncogene.* 2007; 26(44):6448-6455.
- Kang BY, Kleinhenz JM, Murphy TC, Hart CM. "The PPAR γ ligand rosiglitazone attenuates hypoxia-induced endothelin signaling in vitro and in vivo". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2011; 301 (6):L881-891.
- Kim HN, Roh SJ, Sung YA, Chung HW, Lee JY, Cho J, Shin H, Kim HL. "Genome-wide association study of the five-factor model of personality in young Korean women". *J Hum Genet.* 2013; 58(10):667-674.
- Kimberly R. Cordes, Deepak Srivastava, Kathryn N. Ivey. "MicroRNAs in Cardiac Development". *Pediatr Cardiol.* 2010; 31:349–356
- Kuhlmann CR, Most AK, Li F, Münz BM, Schaefer CA, Walther S, Raedle-Hurst T, Waldecker B, Piper HM, Tillmanns H, Wiecha J. "Endothelin-1-induced proliferation of human endothelial cells depends on activation of K⁺ channels and Ca⁺ influx". *Acta Physiol Scand.* 2005; 183(2):161-169.
- Lakshminrusimha S, Russell JA, Wedgwood S, Gugino SF, Kazzaz JA, Davis JM, Steinhorn RH. "Superoxide Dismutase Improves Oxygenation and Reduces Oxidation in Neonatal Pulmonary Hypertension". *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 174(12):1370-1377
- Lee KS, Kim SR, Park SJ, Park HS, Min KH, Jin SM, Lee MK, Kim UH, Lee YC. "Peroxisome proliferator activated receptor-gamma modulates reactive oxygen species generation and activation of nuclear factor-kappaB and hypoxia-inducible factor 1alpha in allergic airway disease of mice". *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 118(1):120-127.

- Leick L, Fentz J, Biensø RS, Knudsen JG, Jeppesen J, Kiens B, Wojtaszewski JF, Pilegaard H. "PGC-1 α is required for AICAR-induced expression of GLUT4 and mitochondrial proteins in mouse skeletal muscle". *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010; 299(3):E456-465.
- Leopold JA. "Redox Pioneer: Professor Joseph Loscalzo". *Antioxid Redox Signal.* 2010; 13(7):1125-1132.
- Li C, Hung Wong W. "Model-based analysis of oligonucleotide arrays: model validation, design issues and standard error application". *Genome Biol.* 2001; 2(8): RESEARCH0032.
- Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, Michael LF, Puigserver P, Isotani E, Olson EN, Lowell BB, Bassel-Duby R, Spiegelman BM. "Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres". *Nature* 2002; 418: 797-801.
- Lin Z, Iram Murtaza, Kun Wang, Jianqin Jiao, Jie Gao, and Pei-Feng Li^a. "miR-23a functions downstream of NFATc3 to regulate cardiac hypertrophy". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106(29):12103-12108.
- Liu G, Li X, Li Y, Tang X, Xu J, Li R, Hao P, Sun Y. "PPAR δ agonist GW501516 inhibits PDGF-stimulated pulmonary arterial smooth muscle cell function related to pathological vascular remodeling". *Biomed Res Int.* 2013; 2013:903947
- Liu JQ, Zelko IN, Erbynn EM, Sham JS, Folz RJ. "Hypoxic pulmonary hypertension: role of superoxide and NADPH oxidase (gp91phox)". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006; 290(1):L2-10.
- Liu Y1, Dai B, Xu C, Fu L, Hua Z, Mei C. "Rosiglitazone inhibits transforming growth factor- β 1 mediated fibrogenesis in ADPKD cyst-lining epithelial cells". *PLoS One.* 2011; 6(12):e28915.
- Lüscher TF, Barton M. "Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs". *Circulation.* 2000; 102(19):2434-2440.
- Lux A, Salway F, Dressman H, Kröner-Lux G, Hafner M, DÍa P, Marchuk D, Garland J. "ALK1 señalización análisis identifica los genes relacionados con la angiogénesis y pone de manifiesto la disparidad entre el TGF- β y constitutivamente activa los receptores de la expresión génica inducida" *BMC Cardiovascular Disorders,* 2006; 6: 13-13.

- MacLean MR. "La Serotonina está Involucrada en la Fisiopatología de la Hipertensión Pulmonar". *Int J Clin Pract*. 61. 2007; (Supl. 156):27-31.
- Mata M, Sarrion I, Milian L, Juan G, Ramon M, Naufal D, Gil J, Ridocci F, Fabregat O and Cortijo J. "PGC-1alpha induction in pulmonary arterial hypertension". *Oxid Med Cell Longev*. 2012; 2012:236572.
- McDonald RA, Hata A, MacLean MR, Morrell NW, Baker AH. "MicroRNA and vascular remodelling in acute vascular injury and pulmonary vascular remodeling". *Cardiovasc Res*. 2012; 93(4):594-604.
- McLaughlin VV, Archer SL, Badesch DB, Barst RJ, Farber HW, Lindner JR, Mathier MA, McGoon MD, Park MH, Rosenson RS, Rubin LJ, Tapson VF, Varga J; "ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association developed in collaboration with the American College of Chest Physicians; American Thoracic Society, Inc.; and the Pulmonary Hypertension Association". *Circulation*. 2009; 119(16):2250-2294.
- Medici D, Hay ED, Olsen BR. "Snail and Slug promote epithelial-mesenchymal transition through beta-catenin-T-cell factor-4-dependent expression of transforming growth factor-beta3". *Mol Biol Cell*. 2008; 19(11):4875-4887.
- Medrano S, Monteagudo MC, Sequeira-Lopez ML, Pentz ES, Gomez RA. "Two microRNAs, miR-330 and miR-125b-5p, mark the juxtaglomerular cell and balance its smooth muscle phenotype". *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012; 302(1):F29-37.
- Michaeli T, Bloom TJ, Martins T, Loughney K, Ferguson K, Riggs M, Rodgers L, Beavo JA, Wigler M. "Isolation and characterization of a previously undetected human cAMP phosphodiesterase by complementation of cAMP phosphodiesterase-deficient *Saccharomyces cerevisiae*". *J Biol Chem*. 1993; 268(17):12925-12932.
- Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, Grimaldi PA, Kadowaki T, Lazar MA, O'Rahilly S, Palmer CN, Plutzky J, Reddy JK, Yu S, Reddy JK. "International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors". *Pharmacol Rev*. 2006; 58:726-741.
- Mishima Y, Stahlhut C, Giraldez AJ. "miR-1-2 gets to the heart of the matter". *Cell*. 2007; 129(2):247-249.
- Moreno L, Baretino D. "Thiazolidinediones, diabetes and adipogenesis". *Med Clin (Barc)*. 1999 ; 112(12):457-458.

- Morrell NW, Adnot S, Archer SL, Dupuis J, Jones PL, MacLean MR, McMurtry IF, Stenmark KR, Thistlethwaite PA, Weissmann N, Yuan JX, Weir EK. "Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension". *J Am Coll Cardiol*. 2009; 54(1 Suppl):S20-31.
- Nagase T, Ishikawa K, Kikuno R, Hirosawa M, Nomura N, Ohara O. "Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XV. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro". *DNA Res*. 1999; 6(5):337-345.
- Naval N. "Clasificación actual de la hipertensión pulmonar" *Insuf card* 2011; 6: 30-38.
- Paccaud JP, Reith W, Carpentier JL, Ravazzola M, Amherdt M, Schekman R, Orci L. "Cloning and functional characterization of mammalian homologues of the COPII component Sec23". *Mol Biol Cell*. 1996; 7(10):1535-1546.
- Parra S, Mejía JL. "Revisión del tema: Implicaciones farmacológicas de los receptores activados por los proliferadores de peroxisomas (PPAR)" *IATREIA/VOL 14/No.1/ MARZO / 2001*
- Persson B, Kallberg Y, Bray JE, Bruford E, Dellaporta SL, Favia AD, Duarte RG, Jörnvall H, Kavanagh KL, Kedishvili N, Kisiela M, Maser E, Mindnich R, Orchard S, Penning TM, Thornton JM, Adamski J, Oppermann U. "The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative". *Chem Biol Interact*. 2009; 178(1-3):94-98.
- Ponce-Coria J, Gagnon KB, Delpire E. "Calcium-binding protein 39 facilitates molecular interaction between Ste20p proline alanine-rich kinase and oxidative stress response 1 monomers". *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012; 303(11):C1198-1205.
- Puigserver P, Spiegelman BM. "Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator". *Endocr Rev*. 2003; 24(1):78-90.
- Pullamsetti SS, Doebele C, Fischer A, Savai R, Kojonazarov B, Dahal BK, Ghofrani HA, Weissmann N, Grimminger F, Bonauer A, Seeger W, Zeiher AM, Dimmeler S, Schermuly RT. "Inhibition of microRNA17 improves lung and heart function in experimental pulmonary hypertension". *Am J Respir Crit Care Med*. 2012; 185(4):409-419.

- Rane S, He M, Sayed D, Vashistha H, Malhotra A, Sadoshima J, Vatner DE, Vatner SF, Abdellatif M. "Downregulation of miR-199a derepresses hypoxia-inducible factor-1alpha and Sirtuin 1 and recapitulates hypoxia preconditioning in cardiac myocytes". *Circ Res*. 2009; 104(7):879-886.
- Rich S, Dantzker DR, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring RM, Groves BM, Koerner SK, et al. "Primary pulmonary hypertension. A national prospective study". *Ann Intern Med*. 1987; 107(2):216-223.
- Rodríguez G, Ferrari A, Pérez R, Martell M, Burgueño M. "Prostaciclina inhalatoria en la hipertensión pulmonar persistente del recién nacido". *Arch Pediatr Urug* 2006; 77(3): 267-272.
- Román JS, Hernández FJ, Palma MJ, Medina CO. "Diagnosis and treatment of pulmonary hypertension". *Rev Clin Esp*. 2008; 208(3):142-155.
- Rondelet B, Van Beneden R, Kerbaul F, Motte S, Fesler P, McEntee K, Brimiouille S, Ketelslegers JM, Naeije R. "Expression of the serotonin 1b receptor in experimental pulmonary hypertension". *Eur Respir J*. 2003; 22(3):408-412.
- Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galie N, Black CM, Keogh A, Pulido T, Frost A, Roux S, Leconte I, Landzberg M, Simonneau G. "Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension". *N Engl J Med*. 2002; 346(12):896-903.
- Rubin LJ. Diagnosis and management of pulmonary arterial hypertension: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2004; 126: 7S-10S.
- Safdar A, Adadi A, Akhtar M, Hettinga B, Tarnopolsky M. "miRNA in the Regulation of Skeletal Muscle Adaptation to Acute Endurance Exercise in C57Bl/6J Male Mice". *PLoS One* 2009; 4(5): e5610.
- Sano M, Minamino T, Toko H, Miyauchi H, Orimo M, Qin Y, Akazawa H, Tateno K, Kayama Y, Harada M, Shimizu I, Asahara T, Hamada H, Tomita S, Molkentin JD, Zou Y, Komuro I. p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. *Nature* 2007; 446(7134):444-448.
- Schroen B, Heymans S. "MicroRNAs and beyond: the heart reveals its treasures". *Hypertension* 2009; 54(6):1189-1194.
- Schröder K, Zhang M, Benkhoff S, Mieth A, Pliquett R, Kosowski J, Kruse C, Luedike P, Michaelis UR, Weissmann N, Dimmeler S, Shah AM, Brandes RP. "Nox4 is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase". *Circ Res*. 2012; 110(9):1217-1225.

Referencias bibliográficas

- Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, Channick RN, Delcroix M, Denton CP, Elliott CG, Gaine SP, Gladwin MT, Jing ZC, Krowka MJ, Langleben D, Nakanishi N, Souza R. "Updated clinical classification of pulmonary hypertension". *J Am Coll Cardiol*. 2009; 54(1 Suppl):S43-54.
- Steiner MK and Preston IR. "Optimizing endothelin receptor antagonist use in the management of pulmonary arterial hypertension". *Vasc Health Risk Manag*. 2008; 4(5):943-952.
- Takahashi H, Shibuya M. "The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions". *Clin Sci (Lond)*. 2005; 109(3):227-241.
- Takahashi H, Goto N, Kojima Y, Tsuda Y, Morio Y, Muramatsu M, Fukuchi Y. "Downregulation of type II bone morphogenetic protein receptor in hypoxic pulmonary hypertension". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006; 290:L450-L458.
- Thomson JR, Machado RD, Pauciulo MW, Morgan NV, Humbert M, Elliott GC, Ward K, Yacoub M, Mikhail G, Rogers P, Newman J, Wheeler L, Higenbottam T, Gibbs JS, Egan J, Crozier A, Peacock A, Allcock R, Corris P, Loyd JE, Trembath RC, Nichols WC. "Sporadic primary pulmonary hypertension is associated with germline mutations of the gene encoding BMPR-II, a receptor member of the TGF- β family". *J Med Genet* 2000; 37:741-745.
- Tian J, Wong WT, Tian XY, Zhang P, Huang Y, Wang N. "Rosiglitazone attenuates endothelin-1-induced vasoconstriction by upregulating endothelial expression of endothelin B receptor". *Hypertension*. 2010; 56(1):129-135.
- Van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, Richardson JA, Olson EN. "A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(48):18255-18260.
- Voelkel NF, Quaife RA, Leinwand LA, Barst RJ, McGoon MD, Meldrum DR, Dupuis J, Long CS, Rubin LJ, Smart FW, Suzuki YJ, Gladwin M, Denholm EM, Gail DB. "Right ventricular function and failure: report of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group on cellular and molecular mechanisms of right heart failure". *Circulation*. 2006;114(17):1883-1891.
- Walker AM, Langleben D, Korelitz JJ et al. "Temporal trends and drug exposures in pulmonary hypertension: an American experience". *Am Heart J*. 2006; 152(3):521-526.

- Waxman AB, Zamanian RT. "Pulmonary arterial hypertension: new insights into the optimal role of current and emerging prostacyclin therapies". *Am J Cardiol*. 2013; 111(5 Suppl):1A-16A; quiz 17A-19A.
- Winkelmann N, Hidalgo-Curtis C, Waghorn K, Score J, Dickinson H, Jack A, Ali S, Cross NC. "Recurrent CEP85L-PDGFRB fusion in patient with t(5;6) and imatinib-responsive myeloproliferative neoplasm with eosinophilia". *Leuk Lymphoma*. 2013; 54(7):1527-1531.
- Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM. "Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1". *Cell*. 1999;98(1):115-124.
- Yamashita K, Discher DJ, Hu J, Bishopric NH, Webster KA. "Molecular regulation of the endothelin-1 gene by hypoxia. Contributions of hypoxia-inducible factor-1, activator protein-1, GATA-2, AND p300/CBP". *J Biol Chem*. 2001 ; 276(16):12645-12653.
- Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T. "The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity". *Nat Med*. 2001; 7(8):941-946.
- Yang Z, Venardos K, Jones E, Morris BJ, Chin-Dusting J, Kaye DM. "Identification of a novel polymorphism in the 3'UTR of the L-arginine transporter gene SLC7A1: contribution to hypertension and endothelial dysfunction". *Circulation*. 2007;115(10):1269-1274.
- Yki-Järvinen H. "Thiazolidinediones". *N Engl J Med*. 2004; 351(11):1106-1118.
- Yokota S, Hirayama T, Hirano K, Kaneko R, Toyoda S, Kawamura Y, Hirabayashi M, Hirabayashi T, Yagi T. "Identification of the cluster control region for the protocadherin-beta genes located beyond the protocadherin-gamma cluster". *J Biol Chem*. 2011; 286(36):31885-31895.
- Zhao Y, Ransom JF, Li A, Vedantham V, von Drehle M, Muth AN, Tsuchihashi T, McManus MT, Schwartz RJ, Srivastava D. "Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2". *Cell*. 2007; 129(2):303-317.

Referencias bibliográficas

Zhu HC, Wang LM, Wang M, Song B, Tan S, Teng JF, Duan DX. "MicroRNA-195 downregulates Alzheimer's disease amyloid- β production by targeting BACE1". *Brain Res Bull.* 2012; 88(6):596-601.

Zong P, Tune JD, Downey HF. "Mechanisms of oxygen demand/supply balance in the right ventricle". *Exp Biol Med (Maywood).* 2005; 230(8):507-519.

7. ABREVIATURAS

ABTS: 2, 2 '-azino-di-[3-etilbenzotiazolin sulfonato]).

ACE: Angiotensina.

ACP: Análisis de componentes principales.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

ADNc: Ácido Desoxirribonucleico complementario.

ALK1: Activina kinasa de tipo 1 (activin receptor-like kinase 1).

AMPc: Adenosina monofosfato cíclico.

ARE: Antagonistas de los receptores de endotelina (endothelin receptor antagonist)

ARN: Ácido Ribonucleico.

ARNasas: Ribonucleasas.

ARNm: ARN mensajero.

ATP: Adenosín trifosfato.

BMPR2: Receptor de proteína morfogénica del hueso 2 (bone morphogenetic protein receptor type II).

BSA: Albúmina de suero bovino (bovine serum albumin).

CA: California.

CAB39: Proteína de unión a calcio 39 (calcium Binding Protein 39).

Cadherina: Adhesión dependiente de calcio (calcium-dependent adhesion).

CCNA2: Ciclina A2.

CCNE2: Ciclina E2.

CCNH: Ciclina H.

Cdk: Quinasas dependientes de ciclinas (cyclin-dependent kinase).

CDKN2: Ciclina dependiente de kinasa 2a/p16 (cyclin dependent kinase 2a / p16).

CD31: Cluster de diferenciación 31.

CEIC: Comité Ético de Investigación Clínica.

CEP85L: Proteína centrosomal 85 kDa-Like (centrosomal Protein 85kDa-Like)

CREB: Proteína de unión al elemento respuesta cAMP (cAMP response element-binding protein).

Ct: Ciclo umbral (threshold cycle).

Cit C: Citocromo C.

DEPC: Dietil pirocarbonato.

DEPDC1: Dominio que contiene DEP (DEP Domain Containing).

DMEM: Medio Basal de Eagle modificado por Dulbeco (Dulbecco's Modified Eagle Medium).

DMSO: Dimetilsulfóxido.

dNTP: Desoxirribonucleótidos trifosfato.

EBM2: Medio basal endotelial-2 (endothelial Cell Growth Media).

EBM2 MV: Medio basal endotelial-2 para microvasculatura.

E-CADHERINA: Cadherina epitelial.

Ec-SOD: Superóxido dismutasa extracelular (también superóxido dismutasa 3).

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

EEUU: Estados Unidos.

EGF: Factor de crecimiento epidérmico (epidermal growth factor)

EGM2 MV: Alícuotas complementarias para medio basal endotelial-2.

ELA: Esclerosis lateral amiotrófica.

EMT: Transición epitelio-mesénquima.

EnMT: Transición celular endotelio-mesénquima.

ESM: Error estandar de la media.

ET: Endotelina.

ETA: Receptor de endotelina A.

ETB: Receptor de endotelina B.

FBS: Suero bobino fetal (fetal bovine serum).

FC: Fold Change.

FDA: Agencia de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (US Food and drug administration).

FDR: False Discovery Rate.

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos (fibroblast growth factors).

FSP-1: Proteína 1 marcadora específica de fibroblastos (fibroblast-specific protein 1).

G1: Fase G1 del ciclo celular (growth o Gap1).

GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase).

GFP: Plásmido codificante de la proteína verde fluorescente (expressing plasmid DNA).

GMP: Guanosín monofosfato (guanosine monophosphate).

GPX: Glutation peroxidasa (glutathione peroxidase).

GR: Glutation reductasa (glutathione reductase).

GSH: Glutation.

GSSH: Glutation oxidado.

GTP: Guanosín trifosfato.

hEGF: Factor de crecimiento epidérmico humano (human Epidermal Growth Factor).

hFGF: Factor de crecimiento fibroblástico humano (human Basic Fibroblast Growth Factor).

HIF: Efecto inducible por hipoxia (hypoxia-inducible factors).

HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos (hepatocyte growth factor).

HGUV: Consorcio Hospital General Universitario de Valencia.

HPA: Hipertensión pulmonar arterial.

HPAF: Hipertensión pulmonar arterial familiar.

HPAI: Hipertensión pulmonar arterial idiopática.

HPGD: Hidroxiprostaglandina Deshidrogenasa 15 - (NAD)
(hydroxyprostaglandin Dehydrogenase 15-(NAD)).

HO1: Hemo oxigenasa 1.

HP: Hipertensión pulmonar.

IC: Índice cardiaco.

IL6: Interleucina 6 (Interleukin 6 (interferon, Beta 2)).

IVT: Transcripción in vitro.

MBNL1: Proteína reguladora de explicing (muscleblind-Like Splicing Regulator 1).

miARN: microARN.

MMP: Metaloproteínasa de matriz (matrix metalloproteinase).

Mn-SOD: Superóxido dismutasa forma con manganeso (también superóxido dismutasa 2).

MWT: Minutos marcha.

NAA15: N (alfa)-acetiltransferasa (N(Alpha)-Acetyltransferase).

NAC: N-Acetilcisteína.

NADPH: Dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato (forma reducida).

NF-κB: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells.

NKAIN2: Na⁺ / K⁺ ATPasa transmembrana 2 (Na⁺/K⁺ transporting ATPase interacting 2)

NO: Óxido nítrico.

NOS: Óxido nítrico sintentasa.

NOX4: NADPH Oxidasa 4 (NADPH Oxidase 4).

ODF2L: Fibra densa exterior de cola de espermatozoides (Outer Dense Fiber Of Sperm Tails 2-Like)

OMS: Organización mundial de la salud.

PAI: Trombospondatina.

PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (plasminogen activator inhibitor-1).

PaO2: Presión parcial de oxígeno en sangre arterial.

PAP: Presión arterial pulmonar.

PCA: Análisis de componentes principales.

PCDH18: Protocadherina 18 (protocadherin 18).

PDE: Fosfodiesterasa (phosphodiesterase).

PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (platelet-derived growth factor receptors).

PGC-1 α : Coactivador 1 de receptor activado por proliferador de peroxisoma α (peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 alpha).

PGI: Prostaciclina.

PPAR: Receptores activados por proliferadores de peroxisomas (peroxisome proliferator-activated receptors).

PPARGC1A: Coactivador 1 de receptor activado por proliferador de peroxisoma α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha).

PPERs: Elementos de respuesta específicos dentro de los promotores.

PVR: Resistencia vascular pulmonar.

Ran-GTP: Guanosina trifosfatasa Ran (GTP-binding nuclear protein Ran)

RE: Expresión relativa.

rhEGF: Factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (recombinant Human Epidermal Growth Factor).

rhFGF: Factor de crecimiento fibroblástico humano recombinante (recombinant human basic fibroblast growth factor).

RISC: Complejo multiproteico inductor de silenciamiento de ARN (RNA-induced silencing complex).

RMA: Robust Multichip Average.

ROS: Especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species).

RPMI: Solucion de neutralizacion Roswell Park Memorial Institute (Roswell Park Memorial Institute medium).

RT: Retrotranscripción.

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (reverse transcription polymerase chain reaction).

RXR: Receptor de retinoide X.

S (Fase): Fase de Síntesis en el ciclo celular.

SBF: Suero bobino fetal.

SEC23A: Codificadora de la proteína homóloga a Sec23p de *S.Cerevisiae* (Sec23 Homolog A (*S. Cerevisiae*)).

SERT: Transportador de serotonina (serotonin transporter).

siARN: Ácido ribonucleico de interferencia o de silenciamiento.

SLC4A4: Cotransportador Bicarbonato de Sodio electrónico (electrogenic Sodium Bicarbonate Cotransporter).

SmBM: Medio basal para células musculares lisas (smooth Muscle Growth basal Medium-2).

SmGM: Alícuotas y factores de crecimiento de células musculares (SingleQuot Kit Suppl. & Growth Factors smooth muscle cells).

SnoARNs: ARN nucleolar pequeño (small nucleolar RNAs).

SNPi: Polimorfismos en un único nucleótido.

SOD: Superóxido dismutasa (superoxide dismutase.).

SQ: Alícuotas (Single quotes).

ST18: Supresor de la tumorigenicidad 18(Suppression Of Tumorigenicity 18)

STAT3: Transductor de señal y activador de la transcripción 3 (signal transducer and activator of transcription 3).

TAS: Estado antioxidante total (total antioxidant status).

TMPO: Timopoyetina (thymopoietin).

TGF: Factor de crecimiento transformante (transforming growth factor).

TGF β 1: Factor de crecimiento transformante β 1 (transforming growth factor beta 1).

TNF: Factor de necrosis tumoral.

TNKS2: Tanquirasa, TRF1-Interacción relacionada con Ankyrin ADP-ribosa polimerasa (Tankyrase, TRF1-Interacting Ankyrin-Related ADP-Ribose Polymerase).

Tris: Tris (hidroximetil) aminometano (tris (hydroxymethyl)aminomethane).

TRPV: Canal ionico vanilloide de tipo I (Transient Receptor Potential Vanilloid).

TZD: Tiazolidinedionas (thiazolidinediones).

UNG: Uracil-N-glucosidasa.

USA: Estados Unidos de América.

UTR: Región no traducida.

VE-cadherina: Cadherina endotelial vascular (vascular endothelial cadherin).

VD: Ventrículo derecho.

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular (vascular endothelial growth factor).

VEGFR: Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor).

VR: Vasoreactividad

ZEB2: Dedo de zinc de la caja E de unión homebox 2 (Zinc finger E-box-binding homeobox 2).

ZNF117: Proteína dedos de zinc 117 (Zinc Finger Protein 117).

ZNF423: Proteína dedos de zinc 423 (Zinc Finger Protein 423).

ZNFS208: La proteína de dedo de cinc 208 (Zinc Finger Protein 208).

Zn-SOD: Superóxido dismutasa forma con cinc (también superóxido dismutasa 1).

ZO: Unión adherente (Zonula occludens).

α SMA: Apha actina de músculo liso.