



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN DE miRNAS  
COMO CAUSANTES DE ENFERMEDADES HUMANAS**

**Autor: Pérez Isla, Patricia**

**Tutor: Escribano Illanes, Óscar**

**Convocatoria: Junio 2018**

## ÍNDICE

1. RESUMEN .....	3
2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES .....	3
3. OBJETIVOS .....	5
4. METODOLOGÍA .....	5
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	5
Ruta biosintética de miRNA en humanos.....	5
Funciones de miRNA en humanos. Insuficiencia cardiaca e infarto.....	8
Biomarcadores en insuficiencia cardiaca e ictus.....	10
Terapia miRNA en ictus y fallo cardiaco .....	15
6. CONCLUSIONES .....	18
7. BIBLIOGRAFÍA .....	18

## **1. RESUMEN**

Los microRNA (miRNA) maduros se definen como una clase de pequeñas moléculas de RNA pequeño no codificante, de 18 a 22 nucleótidos de longitud y juegan un papel regulador clave en la expresión génica en el nivel postranscripcional tanto en animales como en plantas. Uno de los mecanismos a través del cual los miRNAs regulan la expresión génica implica la interacción y modificación postranscripcional de los RNA mensajeros intracelulares complementarios pudiendo inducir silenciamiento de los mismos. Debido a la gran importancia que presentan los miRNA en numerosos procesos celulares, es preciso estudiar los componentes de las rutas biosintéticas de la biogénesis de los miRNA y su desregulación, con el fin de identificar moléculas novedosas que podrían servir como dianas potenciales en intervenciones terapéuticas. En esta revisión se muestra la compleja regulación multinivel de la expresión de miRNA y detalla algunos esfuerzos actuales para encauzar estos mecanismos como una herramienta en la investigación y como posible terapia de diversas enfermedades, concretamente, sobre el posible diagnóstico y tratamiento del infarto y fallo cardiaco (FC) mediante la utilización de miRNA.

## **2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES**

Los RNA pequeños se definen por su longitud (20-30 nucleótidos) y su asociación con proteínas de la familia Argonaute (proteínas de la familia AGO), y se clasifican en tres clases en animales: microRNA<sup>1</sup> (miRNA), RNAip y RNA que interacciona PIWI (piRNA). Los miRNAs constituyen una clase dominante de pequeños RNAs en la mayoría de los tejidos somáticos. Tienen aproximadamente 22 nucleótidos de longitud y están producidos por dos proteínas RNasa III, llamadas Drosha y Dicer. Los miRNA se generan de manera general cuando Dicer procesa estructuras de horquilla compuestas de regiones no codificantes, en genomas de plantas y animales<sup>2</sup>. Los miRNA se incorporan a un complejo similar a RISC o ‘Complejo de silenciamiento inducido por ARN’ (Un complejo de ribonucleoproteína que consiste en una pequeña cadena de guía de ARN unida a una proteína de Argonaute. RISC media todas las vías de silenciamiento de ARN, y también puede incluir proteínas auxiliares que extienden o modifican su función) y, dependiendo de su grado de complementariedad con el mRNA diana, pueden realizar una represión traduccional o bien degradar el mRNA.

Su función principal es regular negativamente la expresión génica en una variedad de maneras, entre las que se incluyen la represión traduccional, la escisión del RNAm y la desadenilación<sup>3</sup>.

Fueron descritos por primera vez en 1993 por Lee y colaboradores en *Caenorhabditis elegans* como fragmentos de RNA nativos que modulan una amplia gama de vías de regulación genética durante el desarrollo embrionario, y ahora se reconocen como pequeños silenciadores de genes transcritos de las regiones no codificadoras de un genoma. El término microRNA se dictaminó en 2001<sup>4</sup> y desde entonces, miles de miRNA han sido identificados en diversos organismos mediante clonaje aleatorio y secuenciación. Actualmente existen bases de datos de miRNA como son miRBase que proveen información sobre secuencias y anotaciones de miRNA publicadas hasta el momento<sup>5</sup>.

El silenciamiento de la expresión génica mediado por miRNA es esencial para el desarrollo de plantas y animales<sup>6</sup>. Los genes miRNA constituyen una de las familias de genes más abundantes y están ampliamente distribuidos en animales, plantas, procariotas y virus.

A medida que proliferó el descubrimiento de miRNAs también lo hizo gradualmente el enfoque hacia una caracterización funcional de los miRNA, particularmente en el contexto de enfermedades humanas. La conexión parecía obvia, debido a que los patrones de expresión eran específicos de tejido y en muchos casos definen la naturaleza fisiológica de la célula<sup>7</sup>. La evidencia definitiva vino de un informe que demuestra que el perfil de expresión génica de una célula no neuronal se asemejaba más al de una neurona cuando el miR-124 neuronal específico se sobreexpresaba artificialmente dentro de la misma<sup>8</sup>. Más específicamente, se encontraron muchos miRNAs que juegan funciones clave en numerosos procesos fisiológicos, como la división y la muerte celular<sup>8</sup>, la señalización intracelular<sup>9</sup>, inmunidad<sup>10</sup> o el movimiento celular<sup>11</sup>. Por lo tanto, la expresión aberrante de miRNA debería afectar proporcionalmente esos procesos críticos, y como resultado, conducir a varios resultados patológicos y ocasionalmente malignos, como, por ejemplo, en el cáncer<sup>12</sup>.

Este trabajo se presentan los estudios relacionados con los genes miRNA centrados en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca y su diagnóstico utilizando miRNA.

### **3. OBJETIVOS**

En este trabajo se realiza una revisión de los procesos a nivel molecular que se producen tanto en el proceso de silenciamiento de genes como una regulación de los mismos, haciendo hincapié en la utilización de miRNA como herramienta de diagnóstico y tratamiento de enfermedades.

### **4. METODOLOGÍA**

Para poder desarrollar este objetivo, se ha realizado una revisión bibliográfica de diversos artículos obtenidos en PubMed, Scielo, Medscape, Science Direct y Google Académico entre otras, los cuales presentan una antigüedad no superior a los 8 años desde 2018. Algunas de las palabras clave utilizadas para ello fueron; miRNA, stroke, heart failure, miRNA treatment, miRNA synthesis, biomarkers miRNA, RNA gene therapy.

### **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **Ruta biosintética de miRNA en humanos.**

En animales, los miRNA se sintetizan empezando por miRNA primarios (pri-miRNA) en dos etapas por la acción de dos proteínas tipo RNasa III, llamadas Drosha, presente en el núcleo y Dicer en el citoplasma. Los miRNA maduros son ligados por proteínas de la familia Argonaute (Ago). Estos miRNA identifican mRNA y funcionan como reguladores postranscripcionales.

La mayoría de los organismos multicelulares codifican cientos de genes de miRNA. Las ubicaciones genómicas de los miRNA son muy variadas; pueden encontrarse tanto en regiones intergénicas y no están sujetas a splicing, la mayoría, mientras que algunos investigadores sugieren también en regiones intrónicas. Aproximadamente la mitad de todos los miRNAs conocidos se encuentran muy cerca de otros miRNAs<sup>13</sup>.

La biogénesis de miRNA comienza en el núcleo con la transcripción del gen que contiene el miRNA, habitualmente mediante RNA polimerasa II <sup>14,15</sup> (Figura 1) asociadas a factores de transcripción y reguladores epigenéticos, también, un pequeño grupo asociado con repeticiones de Alu puede ser transcrito por la RNA polimerasa III (Pol III). Las enzimas RNAsa de tipo III son una familia de ribonucleasas que reconocen específicamente al RNAdc y que se cree que están presentes en todas las células vivas<sup>16</sup>. El producto de la acción de estas polimerasas se conoce como miRNA primario o pri-miRNA, generalmente tienen varias kilobases de longitud y presentan estructuras de tipo horquilla locales<sup>17</sup>.

Numerosas proteínas están implicadas en el procesamiento de miRNA en el núcleo, proceso que ocurre antes que en el citoplasma. El pri miRNA producido por Pol II se escinde en el tallo de la estructura en horquilla, liberando 60-70 nucleótidos, conocido como el miRNA precursor (pre-miRNA). Este paso de procesamiento es realizado por Drosha, que requiere la región crítica del síndrome de DiGeorge en el gen 8 (por ello es llamado DGCR8) en humanos y Pasha en *C. elegans* como cofactor.

Drosha, junto con DGCR8 o Pasha, forma un gran complejo conocido como el complejo de microprocesador. Los pri-miRNAs metazoarios están compuestos por aproximadamente 33 pares de bases (pb), un segmento terminal y segmentos flanqueantes de RNA monocatenario (ssRNA). DGCR8 interactúa con el segmento de ssRNA y guía a Drosha para cortar el pri-miRNA. Drosha escinde los dúplex de RNA a unos 11 pb de la unión del bucle y, por lo tanto, procesa el pri-miRNA para dar como resultado pre-miRNA con un grupo 5'-fosfato y un saliente de aproximadamente 2 nt.

Los pre-miRNAs deben transportarse al citoplasma para su posterior procesamiento y se convierten en miRNAs maduros. El transporte del pre miRNA se produce a través de complejos de poro del núcleo, que son grandes canales proteínicos incrustados en la membrana nuclear. El transporte del pre-miRNA está mediado por el receptor de transporte nuclear dependiente de RanGTP exportin-5 (EXP5). Se ha propuesto un modelo de transporte en el que postula que EXP5 reconoce el saliente del RNA de doble cadena N14-bp (ds-RNA) con un saliente 3' seguido de unión cooperativa a ambos, además, es necesario un cofactor unido a GTP. El EXP5 y pre-miRNA se une a las exportaciones del núcleo, donde la hidrólisis del GTP da como resultado la liberación del pre-miRNA al citosol<sup>18</sup>.

El pre-miRNA se libera en el citoplasma gracias a la EXP5 y seguidamente es procesado por una endonucleasa citoplasmática tipo RNasa III llamada Dicer, para crear un miRNA maduro. Dicer es un enzima altamente específica y conservada en animales, mide alrededor de 22 nt del extremo preexistente del pre-miRNA y escinde la cadena de miRNA. Dicer trabaja en estrecha proximidad con otras proteínas incluyendo las proteínas de la familia Argonauta (proteína de la familia AGO) en diversos organismos<sup>19</sup>, no parecen ser necesarias para ninguna actividad de procesamiento en si mismas, sino que contribuyen a la formación del complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC).

Por último, después de la generación del dúplex de miRNA de aproximadamente 22nt tras la escisión por Dicer, el dúplex de miRNA se incorpora al complejo proteico llamado AGO. En su mayoría, una cadena del miRNA (miRNA\*) se degrada, mientras que la otra cadena permanece ligada a AGO como miRNA maduro (cadena guía o miRNA). Sin embargo, en algunos casos, miRNA\* forma un complejo con RISC. Como parte del RISC, los miRNA regulan negativamente la expresión génica a través de dos mecanismos principales, la represión de la traducción y la degradación del RNAm.

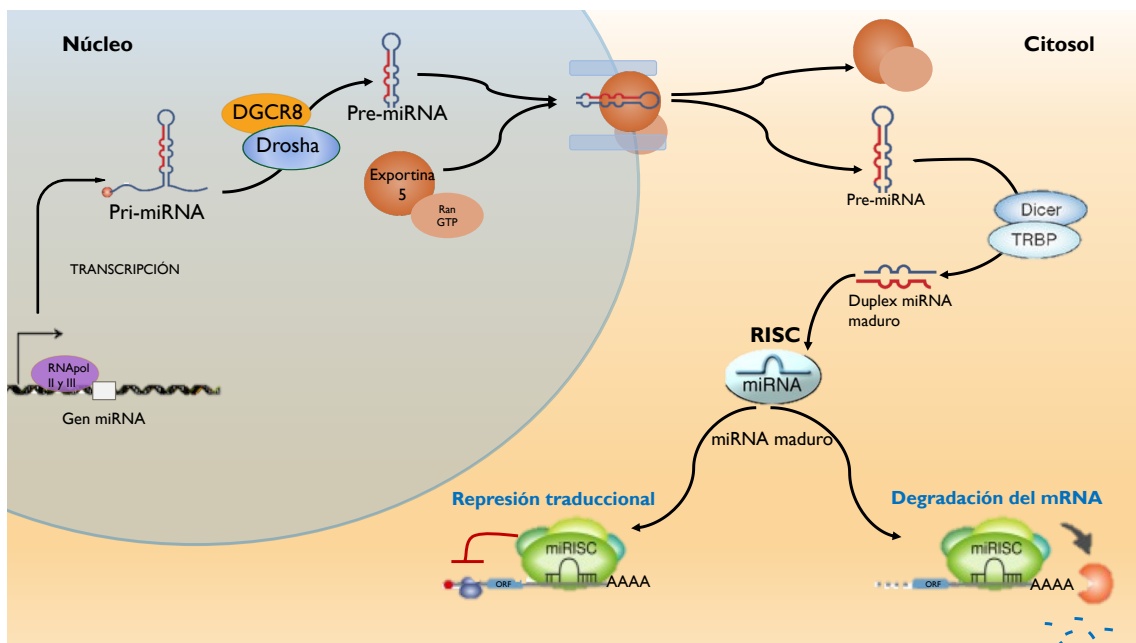


Figura 1. Ruta biosintética general de miRNA

## **Funciones de miRNA en humanos. Insuficiencia cardiaca e infarto.**

Se ha demostrado que los microRNA desempeñan un papel importante en una amplia gama de procesos de desarrollo que incluyen el metabolismo, la proliferación celular, la apoptosis, desarrollo y incluyendo aquellos que acontecen en el sistema cardiovascular.

Los miRNA proporcionan una herramienta clave y poderosa en la regulación de genes y, por lo tanto, una potencial diana con objetivos terapéuticos. Los miRNA desempeñan un papel conservado evolutivamente y diversas funciones fisiológicas en animales<sup>20</sup>. Por ejemplo, entre otras muchas, se ha sugerido que repriman el paso de iniciación del proceso de traducción, que puede ser seguido por la degradación del RNAm<sup>21</sup>. El miRNA muscular específico, miR-1, se dirige al corazón y a la proteína 2 expresada en derivados de la cresta neural (HAND2), lo que produce degeneración y diferenciación prematura de cardiomiocitos<sup>22</sup>.

Los miRNA no solo son esenciales para el desarrollo cardíaco y el funcionamiento normal del corazón, sino que también influyen en la remodelación cardíaca en la enfermedad cardiovascular<sup>23</sup>. En respuesta a daño y estrés (como la hipertensión, isquemia, estenosis aortica o desordenes hormonales), el corazón adulto se somete a un remodelamiento para poder compensar la salida de sangre del corazón y la función cardiaca alterada<sup>24</sup>. La hipertrofia cardiaca, la cual se caracteriza por un incremento en el tamaño de los cardiomiocitos y/o miofibrilar sin producirse un cambio en el numero de cardiomiocitos, normalmente lleva a un fallo cardiaco al activar vías de señalización intracelular y mediadores transcripcionales en los cardiomiocitos. La hipertrofia cardiaca suele acompañarse por la reactivación de genes cardiacos ‘fetales’ normalmente expresados antes del nacimiento<sup>25</sup>. Se han encontrado perfiles de expresión para miRNA durante el crecimiento hipertrófico también en corazones humanos (véase biomarcadores).

La insuficiencia cardíaca es una enfermedad crónica y progresiva en la cual el músculo cardíaco no puede bombear suficiente sangre para satisfacer las necesidades de sangre y oxígeno del cuerpo<sup>26</sup>. El infarto de miocardio aparece por un riego sanguíneo insuficiente debido a la obstrucción de una arteria<sup>27</sup>.



No hay un test estandarizado para la detección de fallo cardiaco. Primero se diagnostica clínicamente por su síndrome clínico y otros síntomas y signos en corroboración con imágenes obtenidas con ecocardiograma para su confirmación.

Los fármacos que bloquean SRA (Sistema renina angiotensina) y SNC (Sistema nervioso central) son la estrategia basada en evidencia de terapias para el fallo cardiaco. En los casos con fallo cardiaco definido como puede ser una enfermedad valvular, o de arteria coronaria, o riesgos de muerte repentina asociados con grado de deterioro ventricular, la realización de intervenciones quirúrgicas o un implante suelen ser recomendados además de la terapia farmacológica.

Los fármacos usados para el tratamiento de la IC pueden clasificarse según sus dianas farmacológicas: (1) Los fármacos que se oponen al SRA incluyen los bloqueadores del receptor de la angiotensina 2 tipo 1 (ARA II), los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (IECA) y los antagonistas de los mineralocorticoides (ARM). (2) los bloqueadores del receptor  $\beta$ -adrenérgico bloquean la unión de catecolaminas a los adrenoreceptores; (3) Los fármacos que se usan para cambiar el tono del vaso o la presión/volumen sanguíneo incluyen una serie de vasodilatadores o diuréticos; (4) los medicamentos que mejoran la contracción ventricular, es decir, los inotrópicos positivos incluyen digoxina y otros agentes.

Aunque se han propuesto varias terapias celulares para la regeneración cardíaca o el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, varios ensayos clínicos han indicado una eficacia limitada en tales estrategias. Las vías que pueden aprovecharse para promover la proliferación de cardiomiocitos serían objetivos ideales para nuevos enfoques terapéuticos para la regeneración cardíaca en humanos. Los miRNAs se han convertido en importantes reguladores y posibles dianas terapéuticas en enfermedades cardiovasculares.

La delección cardíaca específica de Dicer conduce a una alteración en la biogénesis de los miRNA, por lo que es de gran importancia en el desarrollo embrionario y causa anomalías en la formación del miocardio ventricular y el tracto de salida del corazón junto con la deficiente septación de la cámara, sin embargo, la delección en el estadio post-mitótico no afectó la septación de la cámara, pero dio lugar a una

disminución significativa de la contractilidad cardíaca, miocardiopatía dilatada grave, insuficiencia cardíaca y muerte dentro de los cuatro días posteriores al nacimiento<sup>28</sup>.

### **Biomarcadores en insuficiencia cardíaca e ictus**

Un biomarcador - como una proteína, ácido nucleico o metabolito- es una cuantificación de un estado biológico definido, normalmente un uso relevante para el riesgo, la ocurrencia, la gravedad, el pronóstico o la respuesta terapéutica de la enfermedad<sup>29</sup>. Los biomarcadores pueden ser útiles para identificar diferentes enfermedades, como ictus, enfermedad de Alzheimer, cáncer y diabetes, y la gravedad de la enfermedad. La identificación de biomarcadores puede contribuir a una mejor comprensión de las etiologías y mecanismos subyacentes a enfermedades particulares, como el accidente cerebrovascular.

Los miRNA tienen potencial como biomarcadores de diagnóstico, pronóstico y diagnóstico, además de constituir objetivos terapéuticos factibles<sup>30</sup>. El descubrimiento y la comprensión de miRNAs ha aumentado la posibilidad de utilizar miRNA circulantes como biomarcadores en enfermedades cardiovasculares. Aunque el péptido natriurético cerebral (BNP) y el pro-BNP N-terminal (NT-proBNP) se utilizan actualmente como el biomarcador estándar de oro en el diagnóstico de IC, sin embargo, han aumentado los estudios sobre miRNAs circulantes como posibles biomarcadores diagnósticos. De hecho, se han encontrado más del 80% de miRNA inducidos y reprimidos siendo regulados en la misma dirección en tejidos de corazón fetal y fallo cardíaco, comparado con corazón sano control<sup>31</sup>.

Se han identificado numerosos miRNA en muestras de distinta naturaleza como son muestras de sangre, suero, plasma y en biopsias. De los estudios consultados se informaron grupos de miRNAs que podrían distinguir de sujetos no IC (Insuficiencia cardíaca) y/o que podrían proporcionar una mayor diferenciación entre HFPEF (insuficiencia cardíaca con fracción de eyección preservada) de HFREF (insuficiencia cardíaca con fracción de eyección reducida) (Figura 2).

La remodelación cardíaca es un espectro de perfiles anatómicos y hemodinámicos asociados con la sobrecarga de presión y/o volumen. La remodelación ventricular es el mecanismo esencial para su aparición y desarrollo. Esta remodelación ventricular

patológica tiene muchas características, las fundamentales son la angiogénesis, hipertrofia patológica de cardiomiocitos, fibrosis excesiva y apoptosis<sup>32</sup>. El papel que juegan cada uno de los miRNA encontrados en diversos estudios se muestran en la Tabla 1.

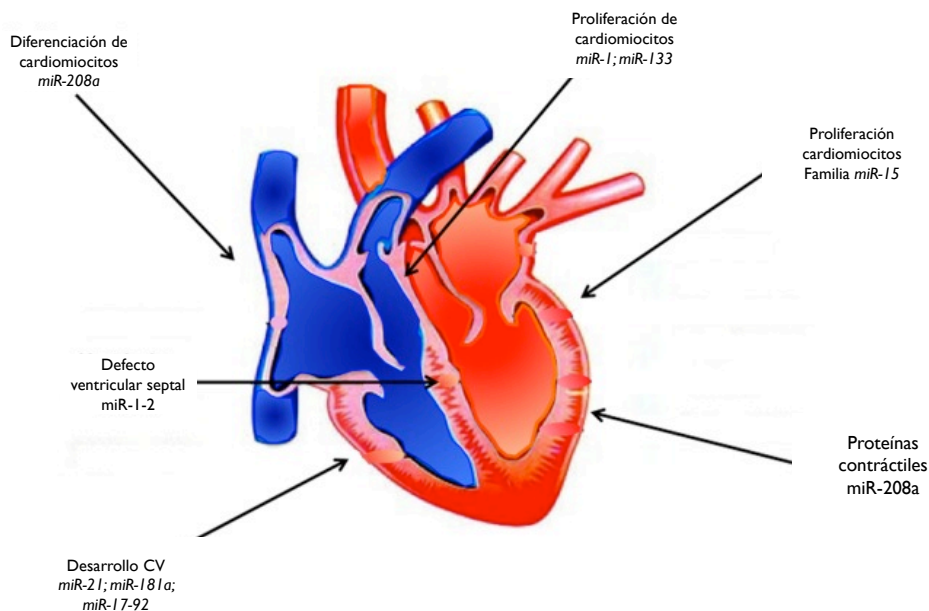


Figura 2. Principales miRNA encontrados en cardiomiocitos durante el desarrollo embrionario cardiaco.

<b>FUNCIONES</b>	<b>miRNA</b>
<b>Función anti-angiogénica</b>	miR-17-92, miR-126, miR-24, miR-214 ,miR-34
<b>Efecto antiangiogénico</b>	miR-210
<b>Efectos anti-hipertroáficos</b>	miR-1, miR-133, miR-378, miR-185 ,miR-155
<b>Pro-hipertrofia cardiaca</b>	Familia miR-208 , miR- 212/132, miR-23 and miR-199
<b>Antifibróticos</b>	miR-29, miR-133, miR-26a, miR-24, miR-19a- 3p/19b-3p, miR-101a
<b>Profibrogénico</b>	miR-21, miR-15 miR-1.
<b>Inductores de apoptosis cardiomiocito</b>	miR-133, miR-21, miR-30 family, miR-138, miR- 499 and miR-181c
<b>Efecto antiapoptótico</b>	miR- 28

Tabla 1.

Los miRNA en la angiogénesis tienen el potencial de regular los factores pro o anti-angiogénicos y la función adecuada de las células endoteliales. Si bien las descubiertas sobre el papel de los miR angiogénicos en el cáncer se han identificado claramente para

promover o inhibir la angiogénesis<sup>32</sup>, su participación y modo de acción durante la remodelación vascular inducida en el proceso patológico cardíaco aún no se ha aclarado. Comprender estos mecanismos en el contexto de los modelos angiogénicos cardíacos podría introducir nuevas terapias basadas en miR, como imitaciones y antagomiR, para controlar y/o curar la insuficiencia cardíaca.

La desregulación de la expresión de miR en modelos animales de hipertrofia cardíaca se muestra tanto miRNA sobre- como infra-regulados. Por ello, pueden tener efectos positivos o negativos sobre la regulación según qué miRNA.

La fibrosis extensa se caracteriza por la acumulación de fibras de colágeno y otras proteínas de matriz extracelulares, lo que dificulta la contractilidad miocárdica e incrementa el riesgo de arritmias. Se han encontrado miRNA que juegan un papel fundamental en el metabolismo del colágeno.

La apoptosis de los miocardiocitos se reconoce como una característica central de la remodelación cardíaca y progresión hacia una IC. Los desencadenantes subyacentes de la muerte celular en pacientes crónicos insuficiencia cardíaca (ICC) no se entienden completamente, pero se han propuesto incluir el estrés oxidativo, la persistencia de la catecolamina y la señalización de la vía Ras, y activación de la vía de señalización de TNF $\alpha$ . Varios miR revisados se encuentran directamente dirigidos a las moléculas clave involucradas en diferentes fases apoptóticas. A través de su influencia moduladora en las vías de señalización apoptótica, los miR pueden ejercer efectos proapoptóticos o antiapoptóticos, lo que puede tener una profunda influencia en la supervivencia de las células cardíacas<sup>33</sup>.

Entre estos miRNAs relacionados con fallo cardíaco, se encontró que cuatro fueron consistentemente desregulados en al menos dos estudios de cohortes, en comparación con los controles correspondientes. Los niveles plasmáticos de miR-1 se encontraron regulados en pacientes con infarto agudo de miocardio. Los niveles de miR-195 se elevaron tanto en los tejidos de ventrículo izquierdo con (FC debido a miocarditis) como en la biopsia de miocardio con insuficiencia cardíaca. Los niveles séricos de miR-30a se regularon positivamente en FC y FC con eyección cardíaca reducida y los

niveles plasmáticos de miR-499 aumentaron en HF aguda y síndrome coronario agudo<sup>34</sup>.

Dos miRNAs específicos de músculo: miR-1 y miR-133a, funcionan coordinadamente para promover la diferenciación de mesodermo en células madre embrionarias mientras que reprimen la diferenciación ectodérmica y endodérmica. miR-1 afecta el crecimiento de los cardiomiocitos regulando negativamente la expresión de la calmodulina y el factor nuclear dependiente de la calmodulina en la señalización de las células T activadas (NFAT). Además de dirigirse a calmodulina, miR-1 también se dirige a las 3'UTR de varios transcritos de genes importantes en el crecimiento de cardiomiocitos<sup>32</sup>.

La sobreexpresión cardíaca específica de miR-208a es suficiente para inducir crecimiento hipertrófico y arritmias en ratones. El agotamiento de miR-208a en un modelo de ratón knockout provoca una conducción cardíaca defectuosa con expresión atenuada de proteínas de único dominio y conexina 40<sup>33</sup>. La sobreexpresión de miR-208a y miR-208b causa la represión postranscripcional de genes que incluyen la proteína 1 asociada a receptor de TNF (Trap1) y la miostatina, así como el factor de transcripción Gata4. Esto sugiere que la familia miR-208 está involucrada en la formación de miosina cardíaca y activación transcripcional de genes que contienen la región promotora dependiente del factor de respuesta sérica. Curiosamente, miR-499 comparte objetivos comunes de RNAm con miR-208, y algunos de estos genes diana también se superponen con los objetivos de miR-1, sugiriendo asociaciones con la diferenciación cardíaca<sup>34,35</sup>.

### **Biomarcadores en Ictus.**

Para identificar biomarcadores periféricos de accidente cerebrovascular, se han desarrollado múltiples estudios, que incluyen miRNA circulatorios, marcadores de proteínas de base sanguínea, biomarcadores de coagulación y trombosis (Figura 3). Los miRNA son discriminadores limitados de enfermedad coronaria, pero se asocian significativamente con el accidente cerebrovascular. Se han realizado estudios que usan las muestras post-ictus y pre-ictus, mediante la recolección de exRNA (miRNAs, piRNAs y snoR-NAs) circulantes en plasma. Los resultados sugieren que las variedades de exRNA, además de miRNAs, pueden caracterizar el accidente cerebrovascular<sup>36</sup>.

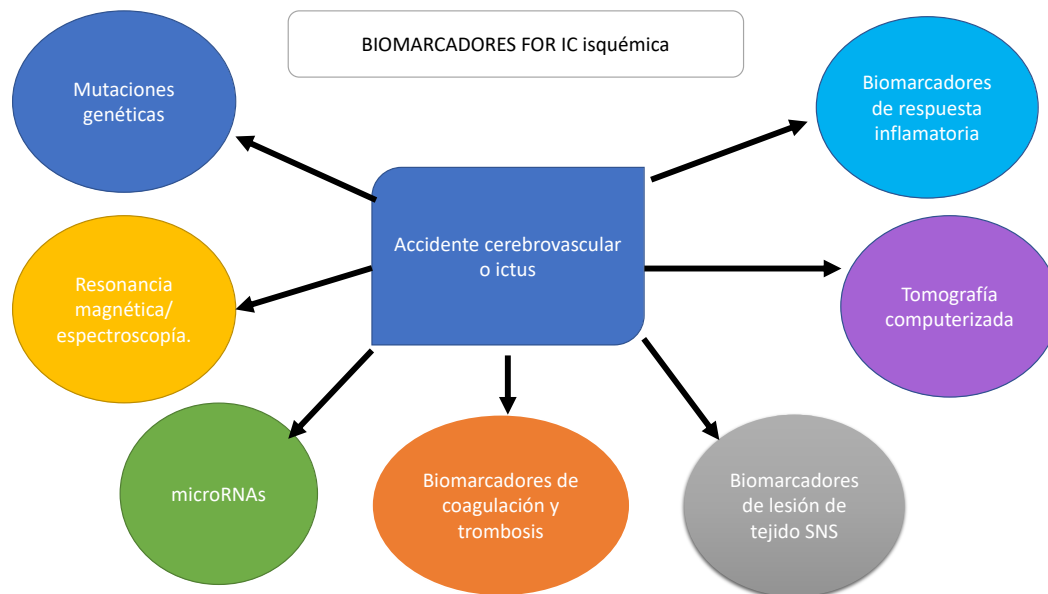


Figura 3. Principales biomarcadores en accidente cerebrovascular o ictus.

La regulación negativa de miR-181b en cerebro de ratón después de un accidente cerebrovascular isquémico induce la neuroprotección contra la lesión isquémica a través de la proteína A5 de choque térmico y la isozima hidrolasa de carboxi-ubiquitina L1<sup>37</sup>. La bioinformática muestra que la DNA metiltransferasa 3a es un objetivo principal de miR-29c. Se ha sugerido que miR-29c es un miRNA pro-supervivencia y su regulación negativa es un promotor del daño cerebral isquémico. Los datos han demostrado que no hay un cambio constante en ninguno de los miRNA probados entre el resveratrol y los grupos tratados con vehículo, lo que indica que los miRNA desempeñan un papel mínimo en la tolerancia isquémica cerebral mediada por resveratrol<sup>38</sup>. Un mecanismo propuesto para la modulación de RNA de pequeño tamaño es miRNA-107 puede contribuir a la angiogénesis después de una apoplejía dirigiéndose a Dicer-1.

En un estudio miR-30a, miR-126 y let-7b circulantes se asociaron con accidente cerebrovascular isquémico. Los niveles elevados de miR-106b-5P y miR-4306 y miR-320e disminuido y miR-320d en plasma se asoció con accidente cerebrovascular agudo<sup>39</sup>.

En otro estudio se muestra que 3 miRNAs (miR-877-5p, miR-124-3p y miR-320d) se asociaron con accidente cerebrovascular prevalente. miR-124-3p está altamente expresado en el cerebro vertebrado en desarrollo y adulto y está involucrado en un amplio espectro de funciones biológicas en el sistema nervioso central. el accidente

cerebrovascular incidente se asoció significativamente con miR-941. miR-941 fue un RNA expresado comúnmente (48%), y se encontró que tanto aquellos con expresión alta como baja tenían un mayor riesgo de accidente cerebrovascular durante 5 años<sup>40</sup>.

### **Terapia miRNA en ictus y fallo cardíaco,**

La importancia demostrada de los miRNAs para la función cardíaca y la disfunción sugiere las oportunidades para explorar terapéuticamente la biología de los miRNAs en los entornos de enfermedades cardiovasculares, especialmente en el ictus y remodelado cardíaco patológico.

El uso de oligonucleótidos modificados químicamente para dirigirse a un miRNA específico o para interrumpir la unión entre un miRNA y su diana de RNAm específico *in vivo* representa un medio potencialmente eficaz de inactivar miRNA patológicos. En esta línea, se han presentado un enfoque prometedor al usar RNA monocatenarios, a lo que los llaman ‘antagomirs’, que inactivan eficazmente miRNA a través del apareamiento de bases complementarias<sup>41</sup>. Se ha demostrado que la modificación química y la conjugación con el colesterol estabilizan y facilitan la administración de antagomirs a los tejidos después de la administración vía i.v., llegando a producir la proliferación de cardiomiocitos después de un infarto de miocardio.

Una buena estrategia de tratamiento tras un infarto sería conseguir recuperar la población de cardiomiocitos a su estado original. Con este objetivo se ha desarrollado un gel inyectable que libera lentamente microRNAs en el tejido dañado tras un ataque al corazón y favorece la proliferación de los cardiomiocitos<sup>42</sup>. Los investigadores muestran que una única inyección de hidrogel con miR-302 en el corazón de ratones inducía la proliferación y regeneración de cardiomiocitos durante dos semanas. La utilización de un gel como medio de administración y liberación de microRNAs destinados a promover la proliferación de los linfocitos presenta varias ventajas. Por ejemplo, puesto que se aplica de forma local y concentrada aumenta la efectividad respecto a las terapias que plantean la utilización de microRNAs de forma sistémica y se evita un efecto no deseado sobre otras células (los microRNAs promueven la proliferación y presentan un riesgo mínimo a inducir tumores). Además, el gel protege los microRNAs de su degradación. Sin embargo, se deben desarrollar métodos para una mejor difusión del gel y el sistema de

liberación, ya que se necesitan siete inyecciones intravenosas para obtener el efecto terapéutico.

Otro desafío a superar en la inhibición dirigida de miRNAs proviene del hecho de que muchos miRNAs pertenecen a las mismas familias de miRNAs o incluso son idénticos, o que también pueden expresarse en múltiples tipos de células. Por lo tanto, deben considerarse las consecuencias de dirigir un miRNA en tejidos distintos del tejido enfermo. Debido a que los miRNA tienen una multitud de dianas de RNAm, también puede ser importante desactivar de forma selectiva los efectos de un miRNA en lugares específicos, sin efectos no deseados al ser miRNA estrechamente relacionados. Un posible medio de eludir esta falta de especificidad génica sería bloquear las acciones de miRNA de una manera específica de genes interrumpiendo específicamente la unión entre un miRNA y su sitio de unión designado. Se han descrito recientemente miméticos de genes específicos y dianas antisentido para enmasacar los miRNA y perturbar las interacciones miRNA-RNAm *in vitro*, aunque la aplicación de estos estudios se tiene que demostrar *in vivo*<sup>43</sup>.

Las posibilidades de manipular miRNAs terapéuticamente no se limitan a la inhibición de miRNAs patógenos. También se puede imaginar la creación de miRNA artificiales con efectos beneficiosos promoviendo la expresión de productos génicos beneficiosos (por ejemplo, proteínas supresoras de tumores).

Muchos de los desafíos que se deben enfrentar en este campo son similares a los que se enfrentan en la terapia génica, como los modos de administración, la especificidad, la toxicidad, la reversibilidad y la regulación. Será importante diseñar estrategias para el suministro de antagomirs o inactivar oligonucleótidos a tejidos específicos, quizás combinándolos con señales de referencia específicas de tejido. También será necesario desarrollar métodos para regular e invertir los efectos de tales anti-miRNAs sintéticos, que es un tema de especial relevancia dada la estabilidad de los antagomirs *in vivo*.

La biología de miRNAs también promete proporcionar nuevos conocimientos sobre la base celular de la enfermedad. El perfil de genes para identificar los RNAm que están regulados positivamente en respuesta a la regulación a la baja de un miRNA específico puede permitir la identificación de reguladores inesperados de procesos de enfermedad y



objetivos terapéuticos potencialmente interesantes. El último problema se vuelve importante cuando se consideran estrategias para inactivar terapéuticamente miRNA específicos en tejidos enfermos sin afectar funciones celulares más generales. Los patrones de firma distintivos de expresión de miRNA asociados con diversos estados de enfermedad también permitirán nuevos diagnósticos<sup>44</sup>. La posible toxicidad de las modificaciones químicas utilizadas para facilitar la captación celular y prevenir la degradación también representa una consideración importante. Claramente, se necesita precaución y estudios futuros dirigidos a la comprensión de las vías reguladas por los miRNAs cardiacos antes de los tratamientos clínicos.

Como últimos enfoques para reducir la cantidad y el efecto de los miRNA implican más o menos específicamente el uso de ‘esponjas’ de miRNA (también denominadas "mimetismo diana"). Las ‘esponjas’ se basan en el mecanismo de bloqueo de la actividad de un miRNA por medio de un inhibidor competitivo que contiene un sitio de unión para una familia de miRNA. Dichos inhibidores pueden ser RNA expresados transitoriamente a partir de plásmidos transfectados o establemente a partir de inserciones cromosómicas. Al unirse a la esponja de miRNA con una complementariedad perfecta o imperfecta, el efecto de los miRNA sobre el RNAm y la expresión génica disminuye porque los miRNA afectados no se pueden unir a sus sitios de unión a RNAm. A diferencia de los antagomirs, las esponjas son específicas solo para la región nucleotídica de un miRNA y, por lo tanto, son capaces de bloquear toda una familia de miRNA.

El corazón, más que la mayoría de los demás órganos, es especialmente sensible a cambios relativamente sutiles en la dosificación génica y a los efectos de la modificación genética de los mismos, particularmente en las vías de desarrollo embrionario. Por lo tanto, poder utilizar miRNA para diversas finalidades terapéuticas y diagnosticas a nivel regulatorio augura su importancia en muchas áreas de la investigación en cardiología.

## 6. CONCLUSIONES

Desde el establecimiento de miRNAs como una nueva clase de RNA regulador hace poco más de 10 años, los factores generales involucrados en la síntesis y procesamiento de miRNA han sido dilucidados. Sin embargo, continúan surgiendo excepciones a la vía de biogénesis de miRNA, que deben ser estudiados para un mejor conocimiento de las vías de señalización celular en distintas enfermedades.

Estudios recientes proveen de evidencia clara de que miRNA modulan funciones cardiacas muy diversas y en otros tipos de células.

La utilización de miRNA en la enfermedad cardiovascular es un campo emergente, se deben seguir identificando dianas genéticas y vías de señalización que dan lugar a la hipertrofia cardiaca. Sin embargo, proveen de nuevas estrategias terapéuticas para numerosas enfermedades cuya investigación es necesaria.

Como obstáculos que pueden presentar los posibles tratamientos con miRNA se encuentra la necesidad de especificidad en la diana y la mejora de los sistemas de liberación.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Aug;15(8):509-24. [PubMed].
- [2] MacFarlane, L-A., R. Murphy, P. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics.* 2010 Nov; 11(7): 537–561.
- [3] L.P. Lim, N.C. Lau, P. Garrett-Engele, A. Grimson, J.M. Schelter, J. Castle, *et al.* Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, 433 (2005), pp. 769-773.
- [4] Lee RC1, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993 Dec 3;75(5):843-54.
- [5] MiRbase [Internet]. Lugar de publicación: University of Manchester, Faculty of Sciences, Ana Kozomara, 2010. Disponible en: <http://www.mirbase.org/>
- [6] Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, 2010;466:835–40.
- [7] Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, *et al.* Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 2005;433: 769–73.
- [8] Quintana, R. Rauhut, A. Yalcin, J. Meyer, W. Lendeckel, T. Tuschl. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol*, 12 (2002), pp. 735-739
- [9] Ng R, Song G, Roll GR, Frandsen NM, Willenbring H. A microRNA-21 surge facilitates rapid cyclin D1 translation and cell cycle progression in

- mouse liver regeneration. *J Clin Invest* 2012;122:1097–108.
- [10] Hang P, Bill K, Liu J, Young E, Peng T, Bolshakov S, et al. MiR-155 is a liposarcoma oncogene that targets casein kinase-1 $\alpha$  and enhances  $\beta$ -catenin signaling. *Cancer Res* 2012;72:1751–62.
- [11] Png KJ, Halberg N, Yoshida M, Tavazoie SF. A microRNA regulon that mediates endothelial recruitment and metastasis by cancer cells. *Nature* 2012;481:190–4.
- [12] Li, Y. V Kowdley, K. MicroRNAs in Common Human Diseases. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2012 Oct; 10(5): 246–253. doi: 10.1016/j.gpb.2012.07.005
- [13] M. Lagos-Quintana, R. Rauhut, W. Lendeckel, T. Tuschl, Identification of novel genes coding for small expressed RNAs, *Science* 294 (2001) 853–858.
- [14] Kim VN, Han J, Siomi MC. 2009. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:126–139.
- [15] Kim YK, Kim VN. Processing of intronic microRNAs. 2007. *EMBO J* 26:775–783.
- [16] Nicholson W, A. Ribonuclease III mechanisms of double-stranded RNA cleavage. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2014 Jan; 5(1): 31–48.
- [17] Wahid F1, Shehzad A, Khan T, Kim YY. MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Nov;1803(11):1231–43
- [18] Finnegan EF, Pasquinelli AE. MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2013;48:51–68.
- [19] M.A. Carmell, Z. Xuan, M.Q. Zhang, G.J. Hannon, The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis, *Genes Dev*. 16 (2002) 2733–2742.
- [20] Ha, TY1. MicroRNAs in Human Diseases: From Cancer to Cardiovascular Disease. *Immune Netw*. 2011 Jun;11(3):135–54.
- [21] M. Kato, F.J. Dlacj, MicroRNAs: small molecules with big roles—C. elegans to human cancer, *Biol. Cell* 100 (2008) 71–81.
- [22] Y. Zhao, E. Samal, D. Srivastava, Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis, *Nature* 436 (2005) 214–220.
- [23] Hongjiang, W. Jun, C. The role of microRNAs in heart failure. *Biochimica et biophysica acta*, 1863 (8) 2019–2030
- [24] Wong LL, Wang, J. Oi Wah, Liew. Mark Richards, A. Yei-Tsung, C. MicroRNA and Heart Failure. *Int J Mol Sci*. 2016 Apr; 17(4): 502.
- [25] Wang, Z., Luo, X., Lu, Y., and Yang, B. (2008) miRNAs at the heart of the matter. *J. Mol. Med.* 86, 771–783.
- [26] American Heart Association. What is heart failure? [internet]. May 2017. Disponible en: <https://goo.gl/XYJyPB>
- [27] Fundación Española del Corazón. [Internet]. Fácila Rubio, L. Febrero 2015. Disponible en: <https://goo.gl/MGN9W7>
- [28] miRNA-processing enzyme Dicer is necessary for cardiac outflow tract alignment and chamber septation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(1):87–91.
- [29] Vijayan, M. Hemachandra, R. Peripheral Biomarkers of Stroke: Focus on Circulatory MicroRNAs. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Oct; 1862(10): 1984–1993.
- [30] Hata, A. Functions of microRNAs in cardiovascular biology and disease. *Annu. Rev. Physiol.* 2013, 75, 69–93. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

- [31] Thum, T., Galuppo, P., Wolf, C., Fiedler, J., Kneitz, S., van Laake, L. W., *et al.* Micro- RNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation* 17, 258–267.
- [32] Tian J, An X, Niu L. Role of microRNAs in cardiac development and disease. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2017;13(1):3-8. doi:10.3892/etm.2016.3932.
- [33] Wang, S. and E.N. Olson, Angiomirs--key regulators of angiogenesis. *Curr Opin Genet Dev*, 2009. 19(3): p. 205-11.
- [34] Chen J, Wang D-Z. microRNAs in cardiovascular development. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2012;52(5):949-957.
- [35] Callis, T.E. Pandya, K. Seok, H.Y. Tang, R.H. Tatsuguchi, M. Huang, Z.P. *et al.* MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J. Clin. Investig.* 2009, 119, 2772–2786.
- [36] Mick E, Shah R., Tanriverdi K., Murthy V., Gerstein M., Rozowsky J. *et al.* Stroke and Circulating Extracellular RNAs. *Stroke*. 2017 Apr;48(4):828-834
- [37] Peng Z, Li J, Li Y, Yang X, Feng S, Han S, *et al.* Downregulation of miR-181b in mouse brain following ischemic stroke induces neuroprotection against ischemic injury through targeting heat shock protein A5 and ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1. *J Neurosci Res*. 2013;91:1349–1362.
- [38] Lopez MS, Dempsey RJ, Vemuganti R. Resveratrol preconditioning induces cerebral ischemic tolerance but has minimal effect on cerebral microRNA profiles. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2016;36:1644–1650. doi: 10.1177/0271678X16656202.
- [39] Long G, Wang F, Li H, Yin Z, Sandip C, Lou Y, *et al.* Circulating miR-30a, miR-126 and let-7b as biomarker for ischemic stroke in humans. *BMC Neurol*. 2013;13:178.
- [40] Krutzfeldt, J. Specificity, duplex degradation and subcellular localization of antagomirs. *Nucleic Acids Res*. 35:2885-2892.
- [41] Krutzfeldt, J., *et al.* 2005. Silencing of microRNAs in vivo with ‘antagomirs’. *Nature*. 438:685-689.
- [42] Leo L. Wang, Ying Liu, Jennifer J. Chung, Tao Wang, Ann C. Gaffey, Minmin Lu, *et al.* Sustained miRNA delivery from an injectable hydrogel promotes cardiomyocyte proliferation and functional regeneration after ischaemic injury. *Nature Biomedical Engineering*. 1, 983-992
- [43] Nan, W., Zhen Z., Xinghua L. Tongcun, Z. Role of MicroRNAs in Cardiac Hypertrophy and Heart Failure. Key Laboratory of Industrial Microbiology, Ministry of Education. *IUBMB Life*, 61(6): 566–571.
- [44] van Rooij, E. N. Olson, E. MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. *Clin Invest*. 2007;117(9):236