



FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

**GRADO EN MEDICINA**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**PAPEL DE LOS miRNAs EN LA  
ATHEROSCLEROSIS**

**(THE ROLE OF miRNAs IN ATHEROSCLEROSIS)**

**Autor:** D. Sergio Sánchez Sánchez

**Director:** D. José Carlos Rodríguez Rey

**Santander, Septiembre 2017**

# Índice

<b>Índice</b>	1
<b>Resumen</b>	3
<b>Abstract</b>	3
<b>Objetivos</b>	4
<b>Introducción</b>	5
Importancia de los lípidos en la aterosclerosis	5
Metabolismo del colesterol: vía exógena, vía endógena y transporte reverso HDL	5
<b>Regulación genética del transporte de colesterol</b>	9
Factores de transcripción en el metabolismo de lípidos (SREBPS)	9
Insulina y los SREBPS	12
<b>El mundo creciente de los RNAs no codificantes</b>	14
RNAs pequeños no codificantes	15
Concepto miRNAs	16
Mecanismos de silenciamiento génico mediado por miRNAs	17
Papel de los miRNAs en la regulación del metabolismo de lipoproteínas	19
Reguladores del metabolismo de LDL: miR-122, miR-148	22
Reguladores del metabolismo de HDL: miR-33	23
<b>Tratamiento: Presente y futuro de la utilización de miRNAs en clínica</b>	25
La utilización de los miRNAs como biomarcadores	25
La terapia con miRNAs	25
Tipos de efectos	26
Problemas técnicos	27
miRNAs utilizados en tratamiento de las dislipemias	28

<b>Abreviaturas</b>	<b>30</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>32</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>33</b>

## RESUMEN

La enfermedad cardiovascular constituye uno de los mayores problemas de salud global. En la mayoría de los casos, la causa es la formación de una lesión específica, denominada placa de ateroma, en la pared de los vasos, lo que produce aterosclerosis. La formación y progresión de la placa depende en gran medida del equilibrio entre los transportes directo y reverso de colesterol (representado por la relación entre los niveles de lipoproteínas LDL y HDL). El transporte de lipoproteínas es un proceso complejo cuya regulación a largo plazo depende de la expresión de los genes que codifican las numerosas proteínas que intervienen en el proceso. En la regulación transcripcional de los genes que participan en el metabolismo de las lipoproteínas destacan los factores de transcripción pertenecientes a la familia SREBPs, que se coordinan con la señalización por insulina vía mTOR. Recientemente se ha puesto de manifiesto la importancia de la regulación pos-transcripcional llevada a cabo por los miRNAs. Ya se han descrito varios miRNAs que, mediante la unión a RNAs mensajeros específicos, silencian genes que sintetizan las proteínas involucradas en el metabolismo de colesterol. El conocimiento de estos miRNAs está permitiendo el diseño de nuevas terapias para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares.

Palabras clave: “Enfermedad cardiovascular”; “Lipoproteínas (HDL, LDL)”; “Aterosclerosis”; “SREBPs”; “Vía mTOR”; “miRNAs”; “imitadores de miRNAs”; “Antagonistas de miRNAs”.

## ABSTRACT

Cardiovascular disease (CVD) is a major health problems. In most cases CVD starts with the formation of atheromas in the intima of blood vessels which causes atherosclerosis. Plaque formation depends on the balance between direct and reverse cholesterol transport (represented by the LDL/HDL ratio). Lipoprotein transport is a complex process whose long term regulation depends on the regulation of the expression of genes coding for proteins involved in lipid transport. Transcriptional regulation of this expression is mostly done by transcription factors belonging to the SREBP family which are connected with insulin signaling via mTOR phosphorylation. Recently the importance of miRNAs in the regulatory process has been demonstrated. Several miRNAs able to silence genes coding for proteins involved in cholesterol transport have been described. The knowledge of these miRNAs has raised the exciting possibility of adding them to the so-far very limited therapeutic arsenal for treating cholesterol metabolism disturbances.

Keywords: “Cardiovascular disease”; “ Lipoprotein (HDL, LDL)”; “(Atherosclerosis)”; “SREBPs”; “mTOR signaling”; “miRNAs”; “miRNAs mimics”; “miRNAs antagonists”.

## OBJETIVOS

Los miRNAs, pequeños RNAs que participan en la regulación postranscripcional de la expresión genética, constituyen una de las formas más importantes en que los organismos responden a los cambios ambientales. Se ha podido establecer que en la mayoría de los procesos patológicos existe una alteración de los niveles de miRNA. El conocimiento de estos cambios y la consiguiente restauración de los niveles a su valor normal es una de las estrategias con más futuro en el tratamiento de las enfermedades.

La existencia de cambios en los niveles de miRNAs se ha puesto de manifiesto en muchas enfermedades, entre ellas en la enfermedad cardiovascular. En este trabajo hemos querido revisar cuál es la base metabólica de la formación de la placa de ateroma, en particular el metabolismo de las lipoproteínas que transportan colesterol.

La regulación a largo plazo del transporte lipídico se lleva a cabo regulando los genes que codifican las principales proteínas implicadas. Se discute la principal familia de factores de transcripción que interviene en esta regulación (SREBP), cuyos niveles están a su vez regulados por la presencia de miRNAs. También se discuten los mecanismos generales por los que se forman y actúan los miRNAs, así como cuáles son los principales miRNAs cuya relación con el metabolismo lipídico ha sido establecida.

Por último se comenta brevemente la posibilidad de utilizar los miRNAs al tratamiento de la enfermedad cardiovascular incluyendo los posibles métodos y los ensayos clínicos que están actualmente en marcha.

# INTRODUCCIÓN

## IMPORTANCIA DE LOS LÍPIDOS EN LA ATEROSCLEROSIS

La enfermedad vascular y sus principales manifestaciones (angina de pecho, infarto agudo de miocardio e ictus cerebrales) constituyen la principal causa de mortalidad y morbilidad en todo el mundo. A causa del gran número de personas que la padecen, da lugar a un importante gasto sanitario. La principal causa de enfermedad vascular es la formación de estructuras ricas en lípidos en la pared de los vasos denominadas placas de ateroma, caracterizadas por la presencia de colesterol y derivados. La presencia de colesterol en las placas sugirió que las alteraciones del metabolismo de este compuesto podrían estar relacionadas con el desarrollo de las mismas. La circulación de colesterol es el factor de riesgo más importante en la enfermedad aterosclerótica (1).

El colesterol es una molécula compleja. La mayoría de las células del organismo poseen la capacidad de sintetizarlo, aunque la mayoría de la síntesis tiene lugar en el hígado y se transporta a las células en forma de lipoproteínas de baja densidad (LDL). El hecho de que la molécula no pueda ser degradada por ningún enzima del organismo tiene como consecuencia que la única forma de deshacerse del exceso de colesterol sea su transporte al hígado en forma de lipoproteínas de alta densidad (HDL, transporte reverso de colesterol) y su posterior transformación y eliminación en forma de sales biliares. Consistente con esta doble dirección en el transporte, existe una asociación directa entre los niveles elevados de LDL y el riesgo vascular y una disminución del mismo cuando son los niveles de HDL los que están elevados (1).

## METABOLISMO DEL COLESTEROL

Las lipoproteínas son complejos de lípidos y proteínas específicas que tienen como función el transporte de lípidos en un medio acuoso como es la sangre. En las lipoproteínas se suelen distinguir dos partes: núcleo y corteza. En el núcleo se encuentran los lípidos más hidrófobos como son los ésteres de colesterol y los triglicéridos, mientras que en la corteza se encuentran los dominios fosfolípidos y el colesterol no esterificado, además de los dominios más polares de las apolipoproteínas. Las lipoproteínas se clasifican en función de su densidad, con lo que las lipoproteínas de mayor tamaño son las menos densas y las de mayor contenido de lípidos (1).

Vía exógena: la ingesta de lípidos. La principal función de los quilomicrones es aportar a los tejidos los lípidos obtenidos de la ingesta, principalmente los triglicéridos. Se incorporan los triglicéridos y los ésteres de colesterol a los quilomicrones. La actuación de la Lipoproteína lipasa (LPL) que cataboliza la hidrólisis de triglicéridos. Los quilomicrones se hacen más pequeños y se forman los remanentes de quilomicrones que contienen más colesterol. Los remanentes de colesterol son retirados por el hígado por medio de unos receptores para LDL (r-LDL). Figura 1, referencia (2).

Vía endógena: la captación y el catabolismo, por parte del hígado, de quilomicrones es el principal motor de la síntesis de VLDL. Contienen triglicéridos y colesterol. Su función es transportar triglicéridos a los músculos y al tejido adiposo para su uso o almacenamiento. El mecanismo usado es igual que en la vía exógena con la LPL. Se forman así las IDL, presentan mayor cantidad de colesterol que de triglicéridos en su interior. En torno a un 50% de las IDL se captan en el hígado por receptores que reconocen apo-E. El otro 50% son convertidas a LDL por la intervención de la lipasa hepática (LH). El componente lipídico que más se encuentra en las LDL son los ésteres de colesterol. A medida que las lipoproteínas han ido perdiendo triglicéridos, han ido teniendo cada vez mayor concentración de colesterol. Las LDL se encargan de transportar el colesterol a las células de tejidos periféricos y al hígado. En el hígado las LDL son reconocidas por el receptor de LDL (r-LDL o LDLR). Las células pueden también sintetizar de novo colesterol a través de una larga vía de síntesis (endógena) que tiene como punto crítico de regulación el paso de hidroximetilglutarilCoA (HMGCoA) a mevalonato, paso catalizado por la HMGCoA reductasa (2).

Cuando se produce una elevación de los niveles sanguíneos de LDL se produce una interacción con especies reactivas del oxígeno (ROS), lo que produce una oxidación del LDL (oxLDL). Las LDL así modificadas solo pueden ser retiradas de la circulación por los macrófagos. Estos macrófagos saturados de colesterol y sus derivados (células espumosas) pueden acumularse en la íntima de la pared arterial y constituir el núcleo de la denominada estría grasa, estructura precursora de la placa de ateroma (3).

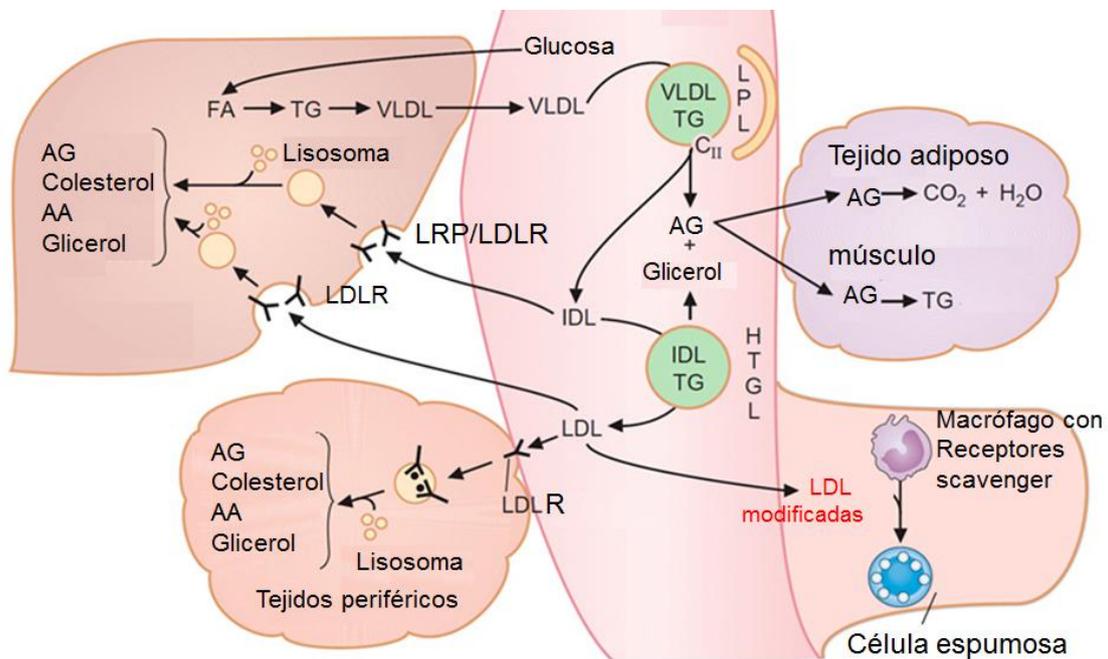


FIGURA 1: Metabolismo lipídico, vía endógena. Figura modificada de la referencia (3).

El efecto protector del HDL, por su parte, consiste en evitar la acumulación de colesterol y se produce gracias al transporte reverso de colesterol. Esto permite que moléculas transportadoras de colesterol tales como: ABCG1 y ABCG1, permitan captar colesterol que se encuentra en tejidos periféricos o lípidos de las células espumosas facilitando su transferencia hacia la circulación del HDL. También existe eflujo de colesterol de células periféricas a través del receptor scavenger receptor de clase B tipo I (SR-BI). Lo que permite el HDL es que todo ese colesterol se aclare en el hígado a través de la bilis debido a la ABCG5/ABCG8 que son transportadores encargados de la excreción de colesterol y así ser expulsado en las heces (2).

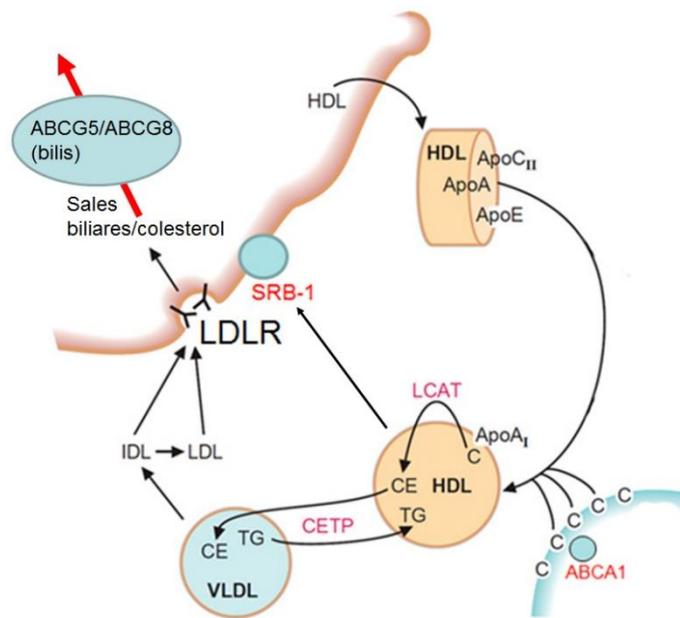


FIGURA 2: Transporte de colesterol reverso. Figura modificada de la referencia (3).

Transporte de colesterol reverso (Figura 2): se lleva a cabo por medio de la HDL (que se caracteriza por su contenido en ApoA-I, ApoA-II y Apo-E). Las HDL nacientes se producen en el intestino y en el hígado, únicos órganos capaces de eliminar el colesterol del organismo de manera directa, el resto de tejidos deben transferir el colesterol hasta estos tejidos para ser eliminado. Esta apolipoproteína permite la salida al exterior de la célula de fosfolípidos y colesterol que se encuentran en exceso. La salida es dependiente de energía y depende de su interacción con unos transportadores de tipo ATP-binding cassette A1 y G1 (ABCA1 y ABCG1). También existe, en menor grado, eflujo de colesterol de células periféricas a través del receptor scavenger receptor clase B tipo I (SR-BI). El colesterol que se obtiene de este proceso es esterificado por la enzima plasmática lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT) dentro de las HDL (Figura 2).

Este colesterol esterificado en las partículas HDL se transfieren hacia las VLDL y LDL mediante una proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP). Se forma un ciclo en el que las LDL transportan el colesterol a las células extrahepáticas, y este regresa de nuevo a las LDL a través de las HDL.

Existe otra vía mediante la que las HDL son aclaradas directamente por el hígado gracias a los receptores scavenger clase B tipo 1 (SR-B1). Esto permite que aumente el colesterol esterificado en el núcleo de las HDL y permitiendo que se libere en el hígado, pudiendo ser eliminado en la bilis y en las heces. El resto del colesterol que no realice el transporte inverso será captado por los macrófagos (células espumosas) que formarán las placas de ateroma y aumentarán el riesgo cardiovascular. Durante el transporte reverso del colesterol, las HDL intercambian triglicéridos y ésteres de colesterol con las VLDL. Por otra parte, los niveles elevados de triglicéridos aumentan el catabolismo de las HDL dando lugar a un transporte reverso menos eficiente (4).

La terapia con estatinas es la más frecuente en pacientes con factores de riesgo cardiovascular. Actúa inhibiendo la síntesis de un enzima necesario para la síntesis de colesterol, el enzima HMGCR. Aunque es efectiva en la reducción de los niveles de LDL y consecuentemente de la formación de aterosclerosis, no es una opción válida para pacientes que muestran resistencia o intolerancia a dicha terapia. Además de que a pesar de los tratamientos con estatinas, la incidencia de enfermedad cardiovascular aún es elevada y preocupante.

Todo esto lleva a pensar en buscar nuevas vías centradas en la modulación de los niveles de colesterol circulante porque a pesar de que hay medicamentos son necesarios nuevos medicamentos centrados en nuevas vías. Recientemente, se ha descubierto que los microRNAs tienen un importante papel en este sentido (1).

# REGULACION GENÉTICA DEL TRANSPORTE DE COLESTEROL

La expresión de los genes que codifican las proteínas que participan en la síntesis y transporte de los lípidos es uno de los principales puntos de regulación de su metabolismo. De hecho, hay numerosas evidencias de asociación de las dislipemias con numerosas variantes génicas en las regiones reguladoras de los genes que codifican las proteínas del metabolismo de los lípidos (5).

## FACTORES DE TRANSCRIPCION EN EL METABOLISMO DE LIPIDOS (SREBPs) (5)

El principal punto de regulación de la expresión genética es la iniciación de la transcripción. Este es un proceso en el que proteínas específicas (factores de transcripción, TFs) se unen a secuencias dianas de las regiones reguladoras.

Los TFs se organizan de forma jerárquica, de manera que existen algunos que regulan a la mayoría de los genes involucrados en un determinado proceso. En el caso del metabolismo de los lípidos estos factores son los SREBPs (sterol-response elements binding protein).

Los SREBPs activan directamente la expresión de más de 30 genes que se dedican a la síntesis y a la captación de colesterol, ácidos grasos, triglicéridos y fosfolípidos, así como también el cofactor NADPH que se encarga de la síntesis de éstas moléculas. Los SREBPs pertenecen a la familia básica de factores de transcripción con hélices alfa conectadas por un bucle, hélice-bucle-hélice-cremallera de leucina (bHLH-Zip). A diferencia de otras proteínas de la familia, se sintetizan como precursores inactivos unidos al retículo endoplasmático, de donde han de liberarse para llegar al núcleo y llevar a cabo su función.

Cada precursor de SREBP se organiza en tres dominios, con un tamaño aproximado de 1150 aminoácidos (5):

- a) Un dominio amino terminal de aproximadamente 480 aminoácidos que contiene la región bHLH-Zip que permite su unión al DNA.
- b) Dos segmentos hidrofóbicos que atraviesan la membrana del retículo y que están separados por un bucle corto de 30 aminoácidos que se proyecta hacia el lumen del retículo.
- c) Un dominio carboxilo terminal de unos 590 aminoácidos que es esencial para la interacción con la proteína SCAP y el transporte de los SREBPs al núcleo.

El genoma humano codifica tres isoformas de SREBP, denominadas SREBP-1a, SREBP1-c y SREBP-2. Las dos primeras derivan de un solo gen localizado en el cromosoma 17p11.2 mediante la utilización de sitios alternativos de iniciación de la transcripción que dan lugar a diferencias en el primer exón. El exón 1c es más largo que el 1a y es el encargado de la activación transcripcional de los genes que codifican las proteínas necesarias para la síntesis de ácidos grasos.

Por su parte SREBP-2 está codificado por un gen del cromosoma 22q13. Al igual que SREBP-1a, SREBP-2 tiene un dominio de activación transcripcional largo, pero activa preferentemente la transcripción de los genes que codifican proteínas importantes para la síntesis de colesterol. La expresión de las isoformas de SREBP muestra un patrón específico de tejido, siendo SREBP-1c y SREBP-2 las formas predominantes en hígado (5).

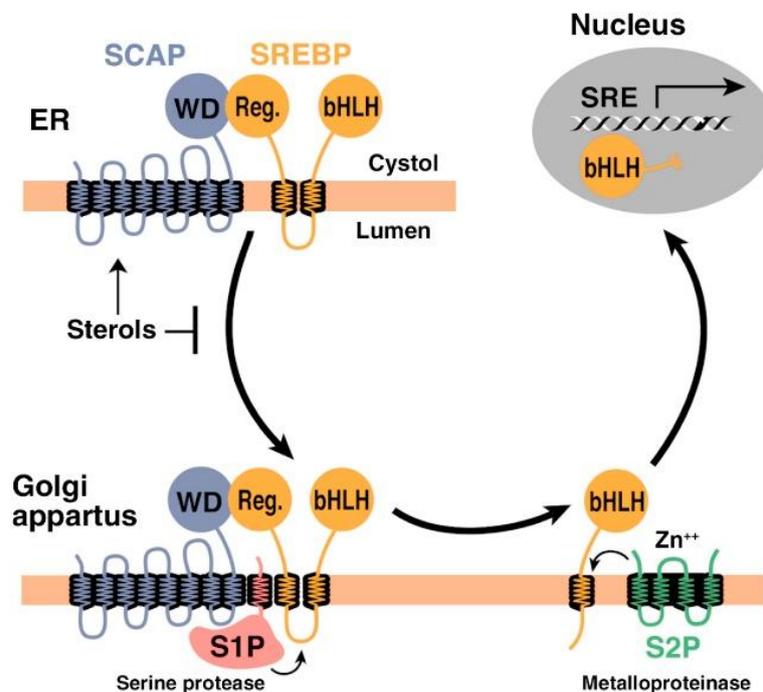


FIGURA 3: Liberación proteolítica de SREBPs. Figura tomada de la referencia (5).

En la figura 3 se muestra que para poder actuar como factores de transcripción, el dominio bHLH-Zip NH<sub>2</sub>-terminal de cada SREBP debe ser transportado al núcleo. Este es un proceso complejo en el que, además de los SREBPs participan otras tres proteínas de membrana: SCAP (SREBP cleavage-activating protein) una proteína de membrana del retículo y dos proteasas localizadas en la membrana del aparato de Golgi denominadas S1P y S2P (site-1- y site-2- protease respectivamente).

Cuando los niveles de colesterol celular son bajos, el dominio regulador de SREBP anclado a la membrana del retículo entra en contacto con la proteína SCAP. El complejo proteico formado se transfiere a la membrana del aparato de Golgi. Allí, mediante la acción de la S1P (una serina- proteasa) sufre la rotura de la cadena a nivel del bucle situado entre los dos dominios de membrana. Este corte deja el dominio bHLH separado del resto de la proteína, pero todavía anclado a la membrana. Para la liberación total del factor de transcripción se requiere la proteasa S2P (una metaloproteasa dependiente de zinc) que libera el SREBP maduro que se dirige al núcleo. El dominio bHLH-Zip entra en el núcleo y se une a un elemento de respuesta de esterol (SRE) en la región promotora de genes diana, en donde activa la transcripción de los genes que codifican proteínas que participan en el metabolismo del colesterol. De forma similar, aunque en respuesta a diferentes estímulos, se produce el traslado de SREBP-1c al núcleo en donde activará los genes de las síntesis de ácidos grasos y triglicéridos. (Figura 3). SREBP-1a es un potente activador de todos los genes sensibles a SREBP, lo que incluye el colesterol, triglicéridos y ácidos grasos.

La importancia de la regulación de los SREBPs en el metabolismo lipídico ha sido puesta de manifiesto mediante estudios llevados a cabo con ratones transgénicos. Así, la sobreexpresión de SREBP-1c en el hígado de ratones transgénicos produce un hígado graso enriquecido con triglicéridos sin aumento del colesterol. Los RNAs mensajeros de las enzimas sintéticas de ácidos grasos y los índices de síntesis de ácidos grasos se multiplican por cuatro en este tejido, mientras que los RNAs mensajeros de las enzimas sintéticas de colesterol y la tasa de síntesis de colesterol no aumentan. Por el contrario, la sobreexpresión de nSREBP-2 en el hígado de ratones transgénicos aumentó los RNAm que codifican todas las enzimas biosintéticas del colesterol. Los ARNm para enzimas de síntesis de ácidos grasos se aumentan en menor grado, lo que es consistente con la observación in vivo de que la velocidad de síntesis de colesterol aumenta 28 veces en estos hígados nSREBP-2 de ratones transgénicos, mientras que la síntesis de ácidos grasos sólo aumenta cuatro veces (5).

También se ha estudiado las consecuencias de la sobreexpresión de SREBP-1a. Los ratones transgénicos nSREBP-1a desarrollan un hígado graso masivo tanto con colesterol como con triglicéridos, con una mayor expresión de los genes que controlan la biosíntesis del colesterol y, aún más dramáticamente, la síntesis de ácidos grasos. La activación preferencial de la síntesis de ácidos grasos (aumento de 26 veces) en relación con la síntesis de colesterol (cinco veces mayor) explica la mayor acumulación de triglicéridos en sus hígados (5).

Un resumen de los genes inducidos por SREBP-1c y SREBP-2 puede verse en la figura 4 obtenida de la referencia (5) . Los genes cuya expresión aumenta consecuencia de la sobreexpresión y liberación de SREBP-1c incluyen la citrato liasa (que libera en el citoplasma el acetil-CoA necesario para la síntesis de ácidos grasos), la acetil-CoA carboxilasa (principal enzima regulador de la síntesis de ácidos grasos), la ácido graso sintasa (que sintetiza palmitato [C16: 0]).

Al igual que SREBP-2, SREBP-1c activa tres genes necesarios para la síntesis de NADPH, coenzima esencial en múltiples etapas en estas vías biosintéticas de lípidos. Por su parte SREBP-2, además de la síntesis de NADPH, favorece la expresión de genes que codifican las enzimas HMG-CoA sintasa, HMG-CoA reductasa, farnesil difosfato sintasa (también conocido como FPP sintasa) y escualeno sintasa, todas ellas participantes en la síntesis de colesterol.

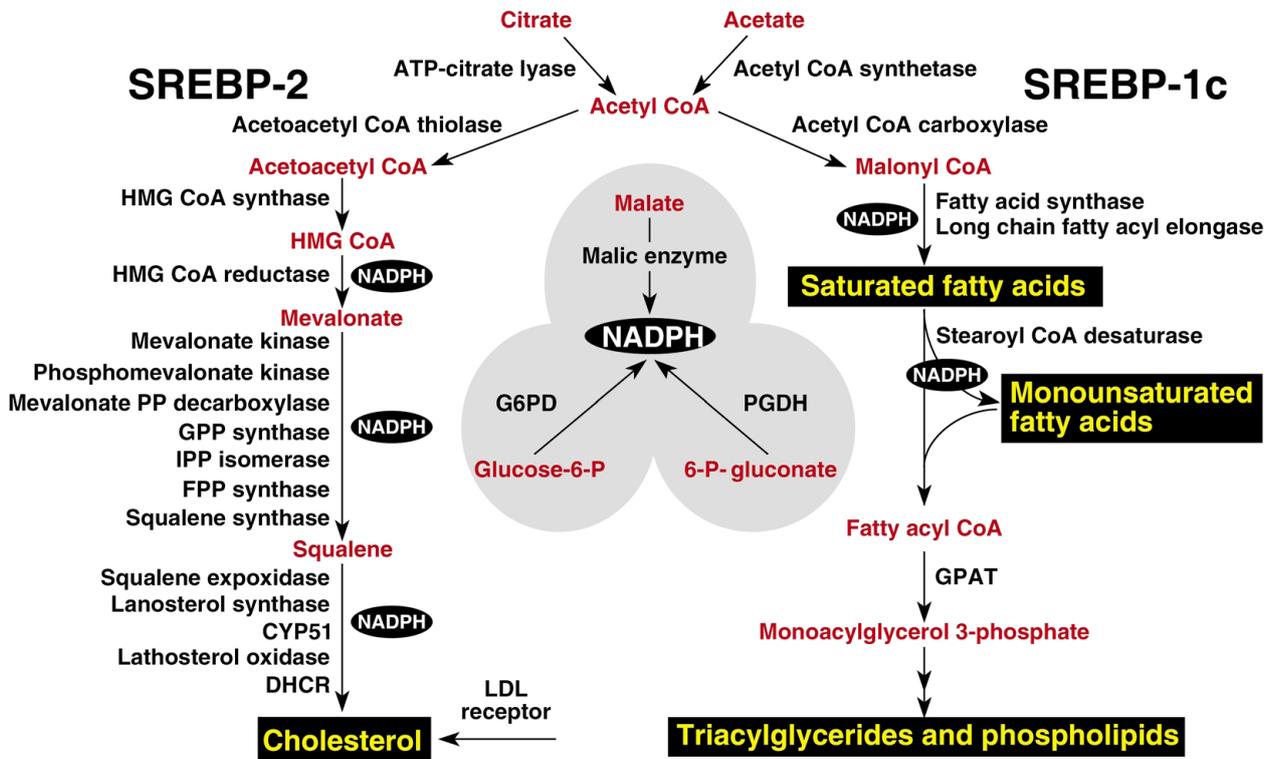


FIGURA 4: In vivo, el SREBP-2 activa preferentemente los genes del metabolismo del colesterol, mientras que el SREBP-1c activa preferentemente los genes del metabolismo de los ácidos grasos y los triglicéridos. Figura tomada de la referencia (5)

## INSULINA Y RELACIÓN CON LOS SREBPs: VÍA mTOR

Aparte de su papel como regulador de la glucemia, la insulina desempeña un papel importantísimo en el metabolismo lipídico. En el hígado activa la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos. El efecto anabólico a largo plazo de la insulina se debe a un aumento de la expresión de varios genes del metabolismo lipídico mediado por SREBP-1c. En la figura 5 puede verse un esquema del mecanismo, que tiene lugar vía mTOR (mammalian Target of Rapamycin), una quinasa cuya activación produce un aumento de la transcripción de SREBP. Además la fosforilación de CRTC2 llevada a cabo por mTOR facilita la interacción entre Sec31 y Sec23 y aumenta la translocación de SREBP desde la membrana del retículo a la del aparato de Golgi y su posterior procesamiento. Ambos efectos contribuyen al aumento de la lipogénesis mediado por insulina.

Es interesante resaltar que las vías de señalización utilizadas por la insulina para estimular la proteína de unión a los elementos reguladores del estero (SREBP), en éste caso de SREBP -1c, permanecen intactas en la obesidad y en la diabetes tipo 2, incluso a medida que las vías que regulan el metabolismo de la glucosa se vuelven resistentes. El estado diabético se caracteriza por la combinación de hiperglucemia e hipertrigliceridemia que es justo lo que se produce en el estado de resistencia a la insulina (6).

En la obesidad, la fosforilación aumentada de CRTC2 por mTOR contribuye parcialmente a aumentar la activación de SREBP-1 y la lipogénesis hepática. Las vías mTOR también son capaces de aumentar el RNA de SREBP-1c, activar el procesamiento de SREBP-1c y máxima expresión genes lipogénicos. (Figura 5).

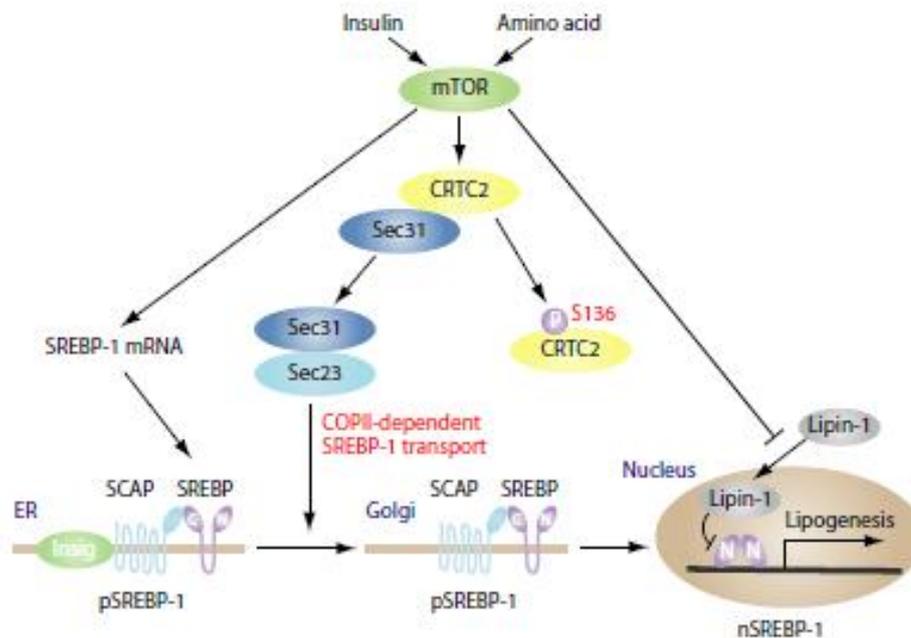


FIGURA 5: Regulación de SREBP-1 por la vía mTOR y la insulina. La vía mTOR se encuentra involucrada en la regulación de SREBP-1. Tomada de la referencia (6).

La relación entre la insulina y el SREBP2 está todavía sujeta a controversia aunque la vía CRTC2 podría estar también involucrada en la inducción por insulina de la síntesis de colesterol (7) .

# EL MUNDO CRECIENTE DE LOS RNAs NO CODIFICANTES: UNA NUEVA FORMA DE REGULACION.

Nombre	Tamaño	Función
<b>NcRNAs cortos</b>		
Micro RNAs (miRNAs)	19-24 pares de bases(pb)	Degradación del RNAm, inhibición de la traducción
RNAs que interactúan con PIWI (piRNAs)	26-31 pb	Represión del transposón, modificación epigenética
RNAs de iniciación de la transcripción (tiRNAs)	17-18 pb	Retroceso de RNAPII , regulación transcripcional
<b>NcRNAs medios</b>		
Promotores ascendentes de dianas (PROMPTs)	<200 pb	Activación de la transcripción
Pequeños RNAs nucleolares (snoRNAs)	60-300 pb	Modificación del RNA, procesamiento del RNA
RNAs asociados a TSS (TSSa-RNAs)	20-90 pb	Mantenimiento de la transcripción
<b>NcRNAs largos</b>		
RNAs no codificantes intergénicos largos (lincRNAs)	>200 pb	Transcripción de reguladores epigenéticos
Transcritos naturales antisentido (NATs)	>200 pb	Estabilidad del RNAm, regulación transcripcional
RNA no codificante similar al potenciador (eRNAs)	50-2000 pb	Activación de genes transcripcionales
Regiones ultraconservadas transcritas (T-UCRs)	>200 pb	Regulación de los niveles de miRNA y RNAm
Otros ncRNAs largos	>200 pb	Varias funciones

TABLA 1: Clasificación de los RNAs no codificantes en función de su tamaño. Tomada de la referencia (8) .

La familia de los RNAs (clásicamente mRNAs, rRNAs y tRNAs) ha ido incorporando nuevos miembros a medida que se han ido describiendo más tipos de RNAs no codificantes (ncRNAs). La tabla 1 tomada de la referencia (8) muestra una clasificación de los mismos basada en el tamaño. Se distinguen de esta forma: 1) ncRNAs pequeños, en general menores de 30 nucleótidos, 2) de tamaño medio, típicamente de 20-300 nucleótidos y 3) largos, de tamaño mayor a 200 nucleótidos. Como puede verse en la tabla, la principal función de estos ncRNAs está relacionada con la regulación de la expresión de genes. Es particularmente importante la función reguladora de los miRNAs. Se estima que participan en la regulación de al menos un 60% de los genes que codifican proteínas. En general actúan debido a su complementariedad con la región 3' no traducida de los transcritos de RNAm (3'UTR) en donde se localizan los genes diana (8).

## **RNAS PEQUEÑOS NO CODIFICANTES**

La figura 6 tomada de la referencia (9) resume los principales tipos de RNAs no codificantes pequeños, su formación y su mecanismo de acción. Los principales tipos son:

- 1- siRNAs (RNAs pequeños de interferencia): Son importantes para regular la actividad de los transposones, combatir la infección viral y regular los genes que codifican las proteínas. Se originan de un RNA de doble cadena (dsRNAs). La enzima Dicer se encarga de escindir ese RNA y formar los siRNA con una longitud de unos 20-25 nucleótidos, por lo tanto esto tiene lugar en el citoplasma celular. Una de las cadenas de éste siRNA se une al RISC (complejo silenciador inducido por RNA) lo que permite al RISC usar el siRNA como guía ya que el siRNA se unirá a un RNA mensajero que contenga una secuencia complementaria al siRNA. De ésta manera, una vez se produzca la unión entre el siRNA y el RNA mensajero, el RNAm se escinde por la mitad gracias al complejo RISC. El principal componente del complejo RISC son proteínas de la familia argonauta y son las que se encargan de reprimir la traducción del RNAm o de la escisión del RNAm. Como resultado se produce la degradación por enzimas celulares de los fragmentos resultantes. No siempre actúan de esta manera, a veces y bajo algunas circunstancias pueden realizar una silenciamiento de la transcripción de genes llevándose a cabo en el núcleo celular.
- 2- miRNAs (microRNAs): Los ncRNAs mejor caracterizados son los microRNAs (miRNAs). Su función es similar a las siRNA, se encargan de reprimir la traducción de RNA mensajero o en degradar el RNAm tanto en plantas como en animales. Al igual que el anterior proviene de un RNA de doble cadena que se pliega en horquillas. Para su formación se requiere la participación de dos enzimas: Drosha y Dicer. La enzima Drosha se encarga del primer paso actuando en el núcleo celular y la enzima Dicer actúa en el citoplasma. Una hebra del dúplex de miARN resultante se incorpora en un complejo miRNA-ribonucleoproteína (miRNP) similar al RISC. Dependiendo del nivel de complementariedad, los miRNAs inducen la degradación del mRNA o reprimen su traducción. A diferencia de la vía siRNA, la degradación mediada por miRNA se inicia por la eliminación enzimática de la cola poli (A) de RNAm.

- 3- piRNAs (RNAs asociados a piwi): a diferencia de las dos anteriores las piRNAs vienen de una única cadena de RNA siendo además un proceso en el que no actúan ni la enzima Drosha ni la enzima Dicer. Estos piRNAs se unen a las proteínas piwi. Estas proteínas son una subfamilia de las proteínas Argonauta. Su función es el desarrollo de las células germinales.

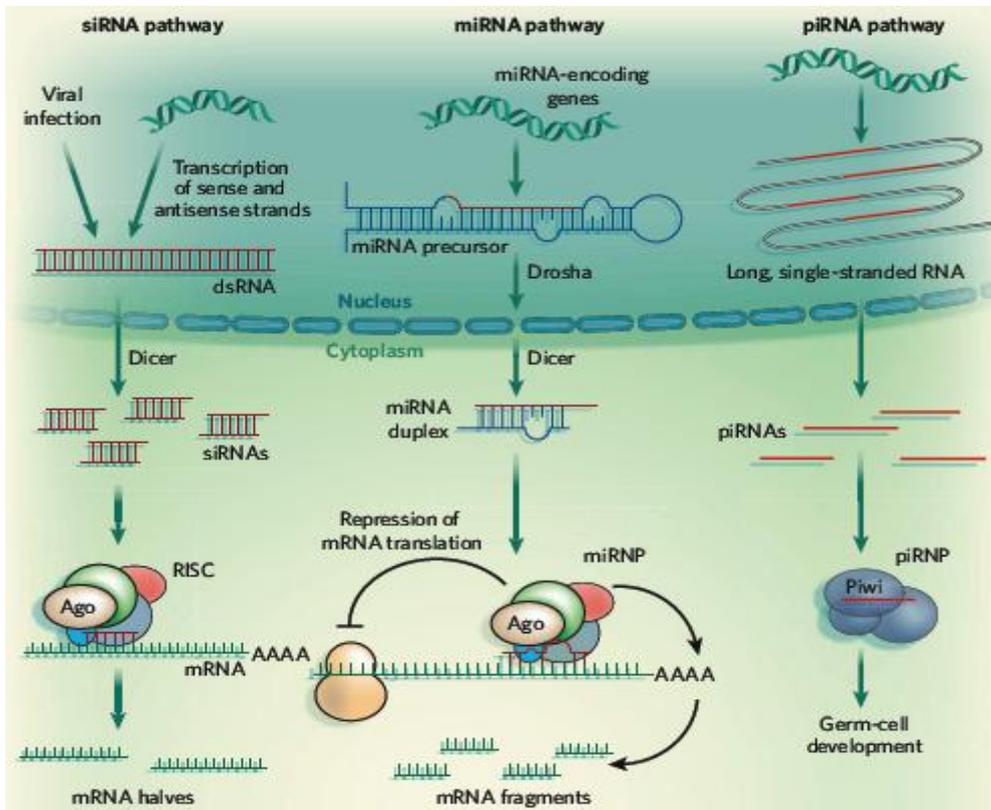


FIGURA 6: Formación y función de los RNAs pequeños. Imagen tomada de la referencia (9) .

### CONCEPTO miRNAs

Los microRNAs (miRNAs) son una forma de regulación muy reactiva a los cambios ambientales, realizando una regulación fina de la expresión genética, se estima que los miRNAs regulan aproximadamente un 60% de los genes humanos. Además juegan un papel tanto en el inicio como en el desarrollo de la aterosclerosis. Los microRNAs son RNAs no codificantes, cortos, con una longitud de entre 19 y 24 pares de bases y cuya función es la de regular la expresión de genes. Los transcritos de miRNA se codifican en regiones intergénicas y dentro de los intrones de los genes (1).

El miRNA primario (pri-miRNA), se trata de un RNA de larga longitud, es el precursor de los miRNAs. Éste miRNA primario se transcribe por la RNA polimerasa II, el miRNA primario es procesado por la enzima denominada enzima Drosha RNasa III y una proteína de unión a RNA de doble cadena denominada DGCG8, complejo Drosha/DGCG8, lo que da lugar a un precursor denominado precursor miRNA (pre-miRNA), teniendo este precursor un tamaño de unos 70-100 nucleótidos (1).

Los pre-miRNAs son transportados por medio de la exportina 5 al citoplasma de la célula donde es procesada por la enzima Dicer RNasa III en un RNA de doble cadena (miRNA de doble cadena maduro), con una longitud de unos 20-23 nucleótidos. Las proteínas Argonautas separan esta doble cadena de miRNA e incorpora el complejo RISC a la hebra guía. El complejo RISC se trata de un complejo de silenciamiento inducido de RNA. El miRNA se une parcialmente a sitios diana complementarios principalmente con regiones 3' UTR de un RNAm, lo que regula a expresión de proteínas a través de la degradación o la inhibición de la traducción (1).

Los miRNAs tienen la capacidad de regular en torno a 100 dianas de RNAm. Se ha encontrado que los grupos circulantes de numerosos miRNAs están desregulados en una amplia variedad de estados de enfermedad diferentes que incluyen enfermedades cardiovasculares tales como hipertensión, enfermedad de la arteria coronaria, infarto de miocardio. La otra hebra es rápidamente degradada. Con el fin de reprimir la transcripción, es crucial que los nucleótidos en la posición 2-8 del miRNA, denominada la secuencia semilla, sea casi perfectamente complementarias a las regiones en el 3'UTR de sus genes diana (1) .

Los RNAs no siempre silencian genes, en algunas ocasiones pueden activar la expresión de genes. Un ejemplo de esto mismo ocurre con miR-122, es completamente necesario para que se pueda replicar el virus de la hepatitis C (9).

## **MECANISMOS DE SILENCIAMIENTO GÉNICO MEDIADO POR MIRNAS**

En los animales el silenciamiento diana puede ocurrir por degradación del RNA mensajero o por represión de la traducción. La represión de la traducción puede producirse de 4 maneras diferentes (10):

- 1- Inhibición de la iniciación traduccional
- 2- Inhibición de la elongación traduccional
- 3- Degradación de la proteína co-traduccional
- 4- Terminación prematura de la traducción

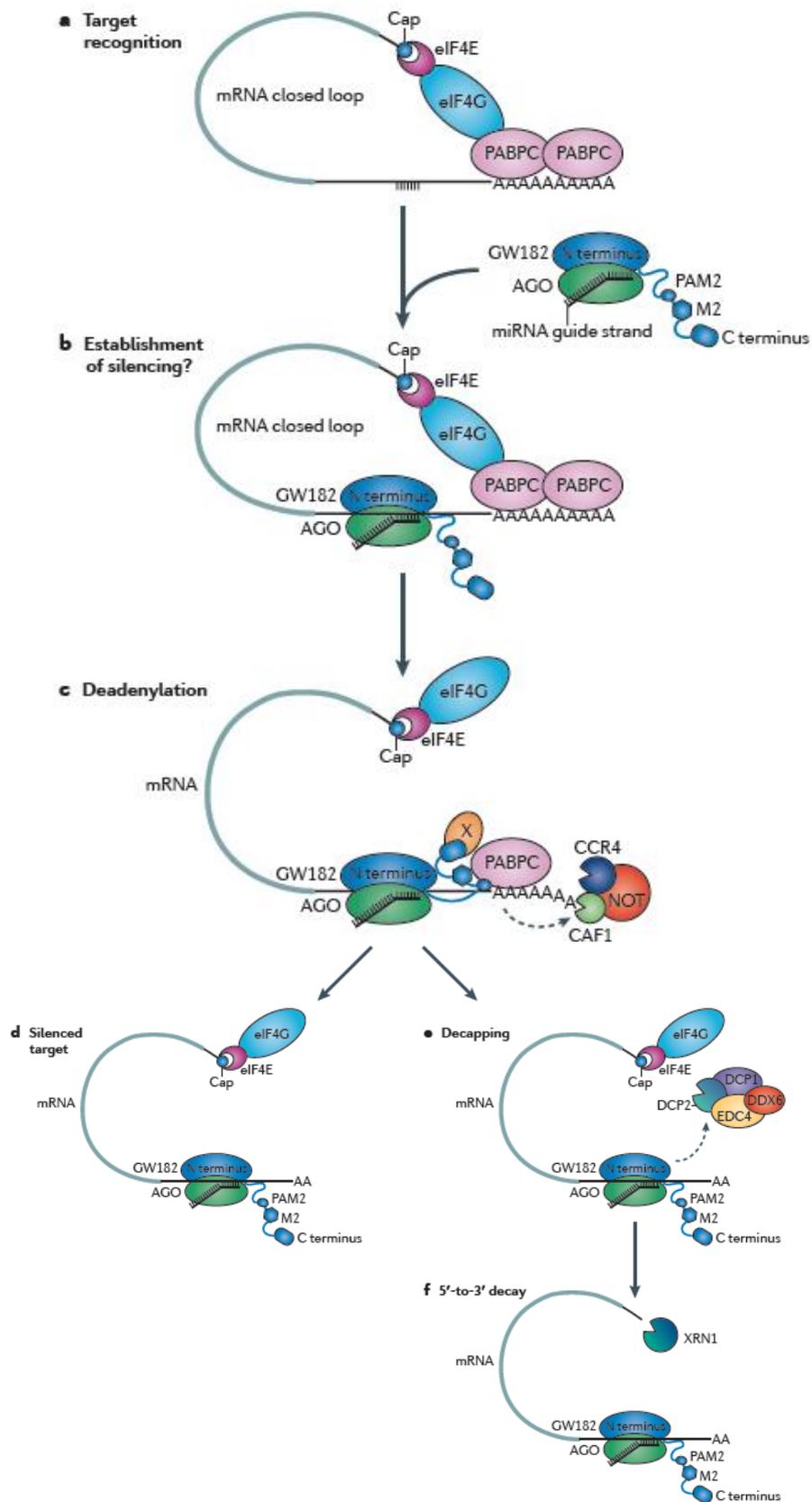


FIGURA 7: Mecanismo de la silenciación génica mediada por miRNA en los animales. Imagen tomada de la referencia (10).

La degradación de la diana proporciona una importante contribución al silenciamiento por los miARN. En la figura 7a se representa un mRNA adoptando una configuración de bucle cerrado. Esta configuración se logra a través de interacciones entre varias proteínas que reconocen partes del RNA mensajero modificado. La proteína de unión a la cola de poli (A) (PABPC) que se une a la cola de poli (A), es capaz de unirse también al factor de iniciación de la traducción eucariótica 4G (eIF4G), que a su vez actúa de puente con el factor de iniciación eIF4E capaz de unirse a la caperuza (Cap) (figura 7a). La configuración cerrada del mRNA aumenta la estabilidad del mensajero protegiéndolo de las exonucleasas.

Las secuencias diana de los miRNAs se encuentran generalmente en la región 3'UTR. Los miRNAs unidos a la proteína Argonauta (AGO) reconocen sus dianas de mRNA por la complementariedad de sus bases. Las proteínas GW182 son fundamentales para que se pueda producir el silenciamiento génico mediado por miRNA en las células animales. GW182 necesita unirse a la proteína AGO para que pueda iniciar el silenciamiento génico, sigue siendo confuso si la traducción se inhibe antes de la desadenilación (figura 7 b), para ello se requiere el dominio amino-terminal que contiene múltiples repeticiones de glicina-triptófano (GW). En el resto de la proteína GW182 se puede definir un dominio de silenciamiento que contienen dos sitios de unión de PABPC: el motivo PAM2, que se une directamente a un dominio de PABPC y una secuencia menos definida que comprende las regiones M2 y carboxi-terminal, que interactúa de forma indirecta con el PABPC. El resultado de la unión de la proteína GW182 a PABPC es la exposición de la cola de poli(A) al complejo de desadenilación formado por las proteínas CAF1, CCR4 y NOT con la consiguiente degradación de la misma (figura 7c). La desadenilación del mensajero por sí misma daría lugar a un mensajero que puede ser almacenado en un estado de represión transcripcional (figura 7d). También se puede producir la pérdida de la caperuza mediado por la enzima DCP2 ayudada por los cofactores DCP1, EDC4 (también se le conoce como GE1), PAT y la proteína DEAD-box RCK (también conocida como Me31B) (figura 7e). Por último los mensajeros que se encuentran desadenilados se degradan por la exonucleasa citoplasmática XRN1 de 5' a 3' (figura 7f) (10).

## **PAPEL DE LOS miRNAs EN LA REGULACIÓN DEL METABOLISMO DE LIPOPROTEÍNAS**

En las siguientes tablas: tabla 2, 3 y 4 se muestra de forma resumida las funciones de algunos miRNAs, así como las dianas. La tabla 2 muestra los miRNAs que regulan el metabolismo del HDL, la tabla 3 los miRNAs que regulan el metabolismo del LDL y en la tabla 4 tanto el HDL como el LDL. Tablas 2, 3 y 4 modificadas de las referencias (1, 8, 11).

<b>miRNA</b>	<b>DIANA DEL miRNA</b>	<b>VÍA INVOLUCRADA</b>
<b>miR-33</b>	ABCA1,ABCG1,NCP1  ABCB11, ATP8B1, CYP7A1  CROT, CPT1a, HADHB  IRS2, G6PC  PCK1	Biosíntesis de HDL y eflujo de colesterol  Síntesis y secreción de ácidos biliares  Biosíntesis de ácidos grasos  Señalización de la insulina  Metabolismo de la glucosa
<b>miR-148a</b>	ABCA1	Aumenta los niveles de LDL-c en plasma
<b>miR-185, miR-96</b>	SR-BI	Metabolismo de colesterol
<b>miR-10b</b>	ABCA1,ABCG1	Eflujo de colesterol

TABLA 2: miRNAs reguladores del metabolismo de HDL.

<b>miRNA</b>	<b>DIANA DEL miRNA</b>	<b>VÍA INVOLUCRADA</b>
<b>miR-122</b>	MTP	Síntesis y secreción de VLDL
<b>miR-30c</b>	MTP	Síntesis y secreción de colesterol
<b>miR-185</b>	SREBP-2	Captación y síntesis de colesterol
<b>miR-96/182/183</b>	SREBP-2, INSIG,FBXW7	Síntesis de colesterol
<b>miR-148a</b>	LDLR	Actividad LDLR

TABLA 3: miRNAs reguladores del metabolismo del LDL.

VÍA INVOLUCRADA	DIANA DEL miRNA
Biogénesis del HDL y eflujo de colesterol	ABAC1, ABCG1, NCP1
Niveles plasmáticos de HDL	ABAC1
Biosíntesis de ácidos grasos	CROT, CPT1a, HADHB
Secreción y síntesis de ácidos biliares	CYP7A1, ABCB11, ATP8B1
Señalización de insulina	IRS2, G6PC
Metabolismo de la glucosa	PCK1, SIRTUIN-6
Biogénesis mitocondrial	PDK4, SLC25A25, PGC-1 alfa
Polarización de macrófagos	AMPK
Esteroidogénesis y metabolismo de colesterol, captación de HDL-C	SR-BI
Eflujo de colesterol a través de LXR	ABCA1, ARL7
Síntesis de colesterol	MTP, SREBP-2, LDLR, INSIG, FBXW7, HMGCoA-R, 7DHCR, MVK, HMGCoAS1, FDPS, SQLE
Actividad LDLR	LDLR, LDLRAP1
Beta-oxidación	Cpt1A
Síntesis de triglicéridos	SREBP-1c
Regulación de la síntesis y almacenamiento de triglicéridos	FABP-4, FASN, SCD-1, KLF15, Resistin

TABLA 4: vías envueltas y dianas miRNA en el metabolismo del HDL y LDL.

## **REGULACIÓN DEL METABOLISMO DE LDL**

### **1.miR-122**

miR-122 fue el primer miRNA que se relacionó con la regulación del colesterol y de la función hepática. Es el más abundante en el hígado, rondando el 75% de la expresión total de miRNA. Los efectos de miR-122 consisten en: un aumento de la síntesis de colesterol, un aumento de la secreción de VLDL y un aumento de la Fosfatasa alcalina en el hígado (1,11).

Se ha demostrado que miR-122 regula la síntesis y oxidación de ácidos grasos. La inhibición farmacológica de miR-122 tanto en ratones como en primates no humanos y también la eliminación de miR-122 en ratones ha permitido comprobar que se traduce en una reducción de los niveles plasmáticos de colesterol. También se ha comprobado que la eliminación de miR-122 en ratones aumentan las posibilidades de acumulo de colesterol en el hígado produciendo una esteatosis hepática (la cual tiene una gran importancia en la salud de las personas) (1,11).

El hígado juega un papel fundamental en cuanto al control de los niveles plasmáticos del colesterol LDL. Tiene 2 funciones: la primera es la de secreción de VLDL y la segunda es el aclaramiento del LDL. Las VLDL son moléculas que permiten transportar los triglicéridos endógenos a los tejidos extrahepáticos. Con la acción de la enzima Lipoproteín lipasa se liberan ácidos grasos de las VLDLs hacia el tejido adiposo y el músculo, convirtiéndose en lipoproteínas de densidad intermedia denominadas IDLs. La pérdida adicional de triglicéridos convierte las IDLs en LDLs, lo que permite que se pueda formar la placa de ateroma y desarrollar la enfermedad cardiovascular. Para la secreción de VLDL debe ser regulado, la regulación la lleva a cabo la MTP (se trata de una proteína de transferencia microsomal) que a su vez es controlada por dos miRNAs: el citado miR-122 y miR-30c. Ambos miRNAs tienen efectos totalmente opuestos, mientras que miR-122 activa a la MTP y promueve la biogénesis de VLDL, miR-30c ha mostrado que disminuye los niveles de lípidos en plasma debiéndose en parte a la inhibición que produce sobre la MTP (proteína de transferencia microsomal). Se ha demostrado en los estudios que la sobreexpresión de miR-30c reduce la formación de las placas ateroscleróticas. miR-122 puede producir carcinoma hepatocelular, esto ha llevado a desarrollar terapias anti-miR-122 y así poder tratar los desórdenes lipídicos (1, 11).

### **2.miR-148**

miR-148 se trata de un microRNA que regula también el metabolismo del LDL. Los genes miR-148a están codificados dentro de una región intergénica del cromosoma 7 humano. MiR-148a inhibe la expresión del receptor de LDL y regula la actividad del receptor de LDL en líneas celulares hepáticas humanas y de ratón. La actividad hepática defectuosa del receptor de LDL se traduce en niveles elevados de LDL-C en la sangre y se asocia con un riesgo aumentado de aterosclerosis y enfermedad cardiovascular. SREBP1c regula miR-148a a nivel transcripcional, mediado por el receptor X del hígado (LXR) que se encarga de activar la expresión de SREBP1c.

miR-148a juega un papel inverso en la regulación de la expresión de receptores de LDL lo que hace que el aumento de los niveles de miR-148 aumente los niveles de LDL-C, aumentando el riesgo de enfermedad cardiovascular. Esto se refleja con estudios en los que se ha visto que al usar oligonucleótidos antisentido que contienen mezcla de DNA / LNA contra miR-148a. El tratamiento con LNA anti-miR-148a (LNA 148a) disminuyó marcadamente los niveles hepáticos de miR-148a hepático, lo que se traduce en una importante disminución de LDL-C lo que sugiere un papel fisiológico para miR-148a en el control de la actividad del receptor de LDL in vivo y destacándola como un nuevo objetivo terapéutico para reducir los niveles de C-LDL circulantes. Curiosamente, la inhibición de miR-148a también aumentó los niveles de HDL-C, mientras que no se observaron cambios en VLDL-C. Por lo tanto, el antagonismo a miR-148a aumenta significativamente la circulación de HDL-C y disminuye la de LDL-C. miR-148a se dirige directamente al 3'UTR de ABCA1. La inhibición de miR-148a endógena aumenta los niveles de ARNm de ABCA1 y da como resultado un elevado flujo de colesterol a ApoA1 (12).

## **REGULACIÓN DEL METABOLISMO HDL**

### **MiR-33a y miR-33b**

Son miRNAs intrónicos codificados dentro de los genes de la proteína de unión al elemento de respuesta al esteroles, SREBPs. miR-33a se codifica con el SREBP1 y miR-33b con el SREBP2. Ambos regulan genes que se encargan de funciones metabólicas incluyendo la oxidación de ácidos grasos. Un ejemplo de esto sería la Glucosa 6 fosfatasa (G6PC). Ambos miRNAs reprimen la expresión de genes que se encargan del transporte reverso del colesterol. Como se explicará más adelante, miR-33a y miR-33b son reguladores de ABCA1 que se trata de un gen que permite la biogénesis de HDL y permite el eflujo de colesterol (1, 11).

El gen ABCA1 pertenece a un grupo de genes que proporciona instrucciones para la fabricación de proteínas que transportan moléculas a través de las membranas celulares. La proteína ABCA1 se produce en muchos tejidos, estando elevadas en el hígado y en las células del sistema inmune llamadas macrófagos. Esta proteína mueve el colesterol y ciertas grasas llamadas fosfolípidos a través de la membrana celular al exterior de la célula. Estas sustancias se recogen luego por una proteína llamada apolipoproteína A-I (apoA-I), que se produce a partir del gen APOA1. La ApoA-I, el colesterol y los fosfolípidos se combinan para producir lipoproteínas de alta densidad (HDL) que como ya se mencionó protege frente a las enfermedades cardiovasculares y la formación de la placa de ateroma. Hay otros genes que también se encargan del eflujo de colesterol como son: ABCG1 y NPC1 (1, 11).

Los efectos del miR-33 son: disminución del eflujo de colesterol, disminución de la secreción de bilis, disminuye la betaoxidación, regulación del metabolismo de la glucosa y aumenta la HMGCoA-R y la actividad de la Acetil-CoA-Carboxilasa (ACC). No sólo regula la vía lipídica, también se encarga de regular otras vías (1, 11).

Una de las principales dianas de miR-33 es el gen ABCA1 cuya función se basa en el transporte del colesterol acumulado, en los macrófagos de las paredes arteriales, produciendo un transporte desde los tejidos hacia el hígado (eflujo de colesterol) permitiendo que el exceso de colesterol de las células pueda ser eliminado por la bilis debido a la colesterol 7 alfa hidroxilasa (CYP7A1) tras su llegada al hígado. La CYP7A1 convierte el colesterol en bilis (1, 11).

Los lípidos biliares se excretan a través de la membrana del hepatocito de diferentes transportadores de membrana: ABCB11, ABCG5/ABCG8, ABCB4 y ATP8B1, como demuestra la colestasis que se produce como consecuencia de su inactivación por mutación (1, 11).

Hay una relación inversa entre miR-33 con respecto a los niveles de colesterol y de la expresión de ABCA1. La inhibición de miR-33 permite aumentar la expresión de ABCA1 a nivel hepático y también un aumento de los niveles de HDL en el plasma. Las terapias anti-miR-33 tienen como resultado un aumento de los niveles de HDL. Es importante dado que el HDL tiene como función un transporte reverso del colesterol, desde la célula hasta el hígado que permite ser excretado en la bilis debido a la colesterol 7 alfa hidroxilasa (CYP7A1) y de ahí poder expulsarse con las heces. Esto evita que los macrófagos se carguen de lípidos produciendo un efecto protector. También la terapia anti-miR-33 se puede emplear para tratar la colestasis recurrente porque también tiene como dianas a ABCB11 y a ATP8B1 que son dos transportes canaliculares que se encargan de la secreción biliar, reduciendo el efecto hepatotóxico de la dieta y reduciendo la esteatosis hepática (1, 11).

miR-33 también controla la expresión de SIRTUIN-6 y de AMP-proteína activadora de kinasa (Ampk $\alpha$ 1). Ambos regulan el metabolismo tanto lipídico como el metabolismo de la glucosa. La deficiencia de SIRT-6 ha demostrado en ratones que se produce una hipoglucemia letal que se produce tempranamente en el comienzo de la vida. La regulación de miR-33 del metabolismo lipídico y de la glucosa es diferente entre especies dado que SIRT-6 es regulado por miR-33 en humanos y en no primates humanos pero no en otras especies. Una diana muy importante de miR-33 es AMPK $\alpha$ 1. AMPK  $\alpha$ 1 fosforilados y la inhibición de enzimas lipogénicos tales como HMGCR y ACC, por lo tanto, la inhibición de AMPK $\alpha$ 1 por miR-33 incrementa la actividad de HMGCR y ACC lo que se traduce en un aumento de los niveles de colesterol y ácidos grasos a nivel intracelular. miR-33a y miR-33b con sus genes hospedadores, Serbp1 y Srebp2, aumentan los niveles intracelulares de colesterol y ácidos grasos (1, 11).

miR-33 también regula el substrato receptor de insulina 2 (IRS2) y que es una proteína que se encarga de regular la señal controladora de insulina en el hígado. Si se produce un aumento de miR-33 en células hepáticas humanas se produce una reducción de la expresión de IRS2, la fosforilación de la proteína kinasa B (PKB) y FOXO1. Esto se traduce en una inhibición de la señal insulínica (1, 11).

# TRATAMIENTO: PRESENTE Y FUTURO DE LA UTILIZACIÓN DE MIRNAS EN CLÍNICA

## La utilización de los miRNAs como biomarcadores

Como se ha comentado, los miRNAs desempeñan un papel regulador en numerosos procesos metabólicos. Además poseen una estabilidad elevada en los fluidos biológicos. Si a todo esto unimos la posibilidad de medir sus niveles por PCR cuantitativa, se comprende que los miRNA circulantes podrían ser útiles como marcadores de enfermedad. A diferencia de los marcadores proteicos, no se necesitaría un daño previo al tejido por lo que su detección sería posible en fases más tempranas de la enfermedad.

La principal limitación para su uso es la pequeña cantidad de miRNAs en fluidos biológicos fácilmente accesibles lo que hace muy complicada la reproducibilidad. Además algunos miRNAs están implicados en más de una patología lo que disminuiría su especificidad. A pesar de estas dificultades se están llevando a cabo estudios de patrones de expresión de miRNAs en diferentes enfermedades (13).

A pesar de estas dificultades varios estudios han investigado la posible utilidad de los diagnósticos basados en las diferencias en los patrones de miRNAs en diferentes enfermedades, principalmente en cánceres y enfermedad cardiovascular. Específicamente en enfermedad cardiovascular, los niveles de miRNAs han podido compararse con ventaja a marcadores utilizados en la actualidad como la troponina y el sistema de puntuación de Framingham. En las hiperlipidemias hasta el momento solamente el miR33a parece un buen candidato para establecer un sistema diagnóstico (14).

## La terapia con miRNAs

Ya se ha mencionado que hoy en día las estatinas, solas o en combinación, constituyen la principal alternativa para el tratamiento de las dislipemias y la prevención de la enfermedad cardiovascular. La aplicación de otros medicamentos destinados a reducir los niveles de lípidos (fibratos, niacina, ezetimiba) ha tenido un papel bastante limitado. Por otra parte, las sustancias desarrolladas para aumentar los niveles de HDL no han dado los resultados esperados lo que indica que las partículas HDL podrían ser mucho más complejas que lo pensado inicialmente (14).

## Tipos de efectos

Los miRNAs son importantes reguladores del metabolismo lipídico y pueden dirigirse a varios RNAm implicados en una vía determinada. El desarrollo de un fármaco basado en miRNA es un desafiante proceso de múltiples etapas. La etapa inicial consiste en la identificación de los miRNAs que actúan a favor de la enfermedad. En la figura 8 se muestra un miRNA que contiene una secuencia señal complementaria a un RNAm determinado, lo que permite la regulación final del RNAm y la síntesis de proteínas.

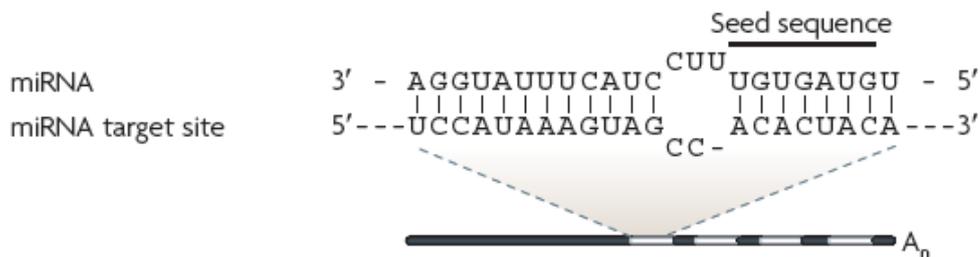


FIGURA 8: Secuencia de reconocimiento de un RNAm por un miRNA. Se señala la secuencia. Tomada de la referencia (15).

La terapia con miRNAs puede realizarse de dos maneras (14):

- 1- Aumentando los niveles: se realiza por los imitadores de miRNA (miRNA mimics). Son oligonucleótios sintéticos de doble cadena que imitan la función del miRNA que reemplazan. Estos miRNAs imitadores al ser introducidos en la célula funcionará de la misma manera que un miRNA endógeno, se unirá al complejo RISC y se unirá a su RNAm, impidiendo la función de dicho RNAm. Está claro que la administración específica de la molécula a un sitio particular de acción sigue siendo un desafío, pero que es necesario abordar con el fin de limitar los efectos secundarios indeseables del tratamiento.
- 2- Disminuyendo los niveles: se realiza a través de los antagonistas de miRNA (también conocidos como antagomiR o anti-miR). Son oligonucleótidos antisentido que se unen complementariamente a una diana de un miRNA maduro impidiendo que esa diana del miRNA se una al RNAm, produciendo la inhibición de la traducción que tiene como resultado final la pérdida de la función. Otra estrategia que disminuye la función de un miRNA es el uso de esponjas (15). Las esponjas tienen múltiples sitios complementarios para el miRNA diana. Alternativamente se podrían usar vectores que contienen sitios diana para miRNA pudiendo saturar miRNAs endógenos y de esta manera inhibirlos.

## **Problemas técnicos (14)**

El primer problema de los miRNAs sintéticos y exógenos es su estabilidad: sufren una rápida degradación en los fluidos biológicos por lo que necesitan estar estructuralmente estabilizados para poder aumentar su vida media y su captación celular. Esta estabilización se consigue con la incorporación de oligonucleótidos modificados de 2'-O-metil así como nucleótidos modificados con ácido nucleico bloqueado (LNA) o modificando los enlaces entre nucleótidos. Impiden de esta manera su degradación por nucleasas.

El segundo problema es la liberación en el tejido. Se puede producir de tres maneras:

- La primera es liberando el miRNA directamente en la tejido celular deseado.
- La segunda forma es por medio de virus. El virus contiene la secuencia diana de miRNA, gracias a un promotor de la RNA-polimerasa II o III permite la replicación de la secuencia de miRNA, como consecuencia se expresan múltiples sitios diana. Los transcritos tienen los sitios diana del RNA afín y de ésta manera saturan el miRNA por exceso de concentración de sitios diana. Esto limita la disponibilidad de los miRNA, e inhibe la regulación de su diana natural de miRNA.
- La tercera forma de liberación es por medio de HDLs, se trata de una vía de señalización endocrina que aún necesita ser validada in vivo. Se demostró que las HDLs podían transportar un conjunto de miRNAs funcionales para después entregarlos a células receptoras in vitro, planteando la interesante hipótesis de una comunicación intercelular endocrina mediada por HDLs siendo posible la participación de otras lipoproteínas. Esto puede contribuir a mediar las funciones cardioprotectoras de HDL. Es un gran descubrimiento porque permite la posibilidad de poder utilizar partículas de HDL en terapias de miRNA específicas. La infusión de HDL sintético es similar al HDL naciente y está compuesto por ApoA1 y fosfolípidos. Actualmente esto está en ensayos de fase II.

El tercer problema es que los tratamientos antagomiR y los imitadores de miRNAs pueden inducir toxicidad relacionada con la estructura química de la molécula y también toxicidad relacionada con el potencial de hibridación de la molécula con otros RNAm diana (14).

## miRNAs utilizados en tratamiento de las dislipemias

Sólo unos pocos miRNAs están en desarrollo para usarse como tratamiento basado en miRNA, no obstante hay un gran número de miRNAs que podrían convertirse en posibles tratamientos basados en miRNAs, tabla 5 tomada de la referencia (14, 16).

PROCESO	miRNA	TIPO	FASE
<b>Tumores sólidos</b>	miR-34 y let-7	Imitadores del miRNA	Pre-clínico
<b>Enfermedades cardiovasculares</b>	miR-195, miR-208, miR-499	Antagonistas miRNA	Pre-clínico
	miR-122	Antagonista miRNA	Pre-clínico
	miR-33a	Antagonismo miRNA	Pre-clínico
<b>Infección por Virus de la hepatitis C</b>	miR-122	Antagonista	II

TABLA 5: miRNAs en desarrollo para tratamiento.

- Dos imitadores de miRNA: miR-34 y let-7. Se dirigen a dianas oncogénicas implicadas en el desarrollo de tumores sólidos. Actualmente están en desarrollo pre-clínico.
- Los antagonistas de miRNA: miR-195, miR-208 y miR-499. En desarrollo pre-clínico de dianas cardiovasculares.
- miRNA: miR-122: en la fase II de ensayos clínicos dirigidos a la infección por el virus de la hepatitis C.
- Antagonistas de miR-33a: interviene en las dislipemias y por lo tanto en la enfermedad cardiovascular. Se encuentra en fase de desarrollo pre-clínico. En los ratones produce elevación del colesterol HDL y en primates alteración de los índices de HDL y VLDL.

PROCESO	miRNA	TIPO
Enfermedades cardiovasculares	miR-30c-5p miR-148a-3p	Imitador miRNA Antagonista miRNA

TABLA 6: miRNAs candidatos a tratamiento. Tomada de la referencia (14, 16)

En lo referente a las dislipemias otros miRNAs también son buenos candidatos para el tratamiento, tabla 6, incluyendo miR-30c-5p y miR-148a-3p. La sobreexpresión de miR-30c-5p ha demostrado reducir la formación de placa en un modelo de ratón aterosclerótico y, alternativamente, su inhibición ha inducido hiperlipidemia y aumento de la formación de la placa aterosclerótica. La acción de miR-30c-5p se produce por la inhibición de MTP, que regula la secreción de VLDL por el hígado. MiR-148a-3p disminuye dos genes importantes en el metabolismo lipídico de las lipoproteínas: LDLR y ABCA1, por lo tanto es una interesante diana para los tratamientos basados en miRNA. Su inhibición en los modelos de células huh7 y ratones aumentó significativamente la expresión hepática LDLR y ABCA1, concomitante con HDL -C y la disminución de los niveles de LDL-C en la circulación. Además, un meta-análisis de gran asociación genómica (GWAS) identificó dos polimorfismos dentro de la región promotora MIR148a que se asociaron con los niveles plasmáticos de colesterol total, LDL-C y triglicéridos, lo que sugiere que este miRNA está involucrado en la homeostasis lipídica. Por lo tanto son muy prometedores como dianas terapéuticas (14).

Se necesitan más estudios para dilucidar el mecanismo molecular por el cual los miRNA se intercambian entre lipoproteínas y células, así como su impacto funcional en la comunicación intercelular in vivo. Por lo que el transporte de lipoproteínas de miRNAs es un apasionante campo de investigación para explorar en lo que respecta a la funcionalidad de las lipoproteínas y las posibles aplicaciones clínicas basadas en miRNA para la prevención y el tratamiento de enfermedades cardiometabólicas.

## ABREVIATURAS

LDLR: receptor de LDL

ABAC1: ATP-binding cassette A1 → Casete de unión a ATP A1

ABCG1: ATP-binding cassette G1 → Casete de unión a ATP G1

NCP1: Nieman-Pick disease C1 (proteína de transporte endolisosomal)

ABCB11: ATP-binding cassette, sub-family B, member 11 → Casete de unión a ATP, subfamilia B, miembro 11

ATP8B1: aminophospholipid transporter, class 1, type 8B, member 1 → Transportador de aminofosfolípido, clase 1, tipo 8B, miembro 1

CYP7A1: 7 alpha-hydroxylase → 7 alfa-hidroxilasa

CROT: carnitine O-octanyl transferase → Carnitina O-octanil transferasa

HADHB: hydroxyacyl-CoA dehydrogenase-3-ketoacyl-CoA → Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa-3-cetoacilo-CoA

IRS2: insulin receptor substrate 2 → Substrato del receptor de insulina-2

G6PC: glucose-6-phosphatase → Glucosa-6- fosfatasa

PCK1: phosphoenolpyruvate carboxykinase → fosfoenolpiruvato carboxikinasa

SR-BI: scavenger receptor class B type 1 → receptor de barrido clase B tipo 1

CPT1a: carnitine palmitoyltransferase 1A → Carnitina palmitoiltransferasa 1A

MTP: microsomal triglyceride transfer protein → proteína microsomal de transferencia de triglicéridos

SREBP-1c y SREBP-2: sterol response element binding proteins 1c and 2 → Proteínas de unión al elemento de respuesta de esteroles 1c y 2

INSIG: insulin induced gene → gen inducido por insulina

FBXW7: F-box and WD repeat domain containing 7 → proteína que contiene la repetición de F-box / WD 7

AMPK: AMP-activated protein kinase → proteína quinasa activadora de AMP

LDLRAP1: LDLR adapter protein 1

FABP-4: fatty acid binding protein 4 → Proteína de unión a ácidos grasos-4

## Sergio Sánchez Sánchez

PGC-1 alfa: proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha → coactivador del la proliferación-activación receptor gamma-1 alfa

HMGCoA-R: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase → 3 - hidroxil - 3 - metilglutaril - coenzima A reductasa

7DHCR: 7-dehydrocholesterol reductase → 7-dehidrocolesterol reductasa

MVK: mevalonate kinase → mevalonato kinasa

HMGCoAS1: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase → 3 - hidroxil - 3 - metilglutaril - coenzima A sintetasa

FDPS: farnesyl diphosphate synthase → Farnesil difosfato sintasa

SQLE: squalene epoxide → epóxido de escualeno

FASN: Fatty Acid Synthase → Síntesis de ácidos grasos

SCD-1: Stearoyl-CoA desaturase-1 → estearoil- CoA desaturasa-1

KLF15: kruppel-like factor 15 → factor de tipo kruppel 15

Resistin: resistina

Cpt1A: carnitine palmitoyltransferase 1A → Carnitina palmitoiltransferasa 1A

SLC25A25: Solute Carrier Family 25, Member 25 → transportador del soluto de la familia 25, miembro 25

ARL7: ADP-ribosylation factor-like 7 → factor de ribosilación-ADP-tipo 7

PK4: pyruvate dehydrogenase kinase 4 → Piruvato deshidrogenasa quinasa 4

SIRTUIN-6: Silent Mating Type Information Regulation 6

## Agradecimientos

A mi tutor, José Carlos Rodríguez Rey, por su gran ayuda en la realización del trabajo. Agradecerle encarecidamente no sólo los conocimientos aportados, orientación, obtención de bibliografía, entre otras muchas aportaciones más, sino también su excelente trato personal.

Estas últimas líneas se las dedico a mi abuela, hermano y en especial a mi madre, Purificación Sánchez Tejero, siempre ha sido, es y será una referente para mí. Un ejemplo de superación personal, coraje, determinación y humildad. Su apoyo ha sido fundamental.

## **Bibliografía**

1. Rotllan N, Price N, Pati P, Goedeke L, Fernandez-Hernando C. microRNAs in lipoprotein metabolism and cardiometabolic disorders. *Atherosclerosis*. Jan:2016;246:352-60. Epub 2016/02/02.
2. Errico TL, Chena X, Camposa JMM, Julvea J, Escolà-Gila JC, Blanco-Vaca F. Mecanismos básicos: estructura, función y metabolismo de las lipoproteínas plasm. *Clin Invest Arterioscl*. 2013;25(2):98-103.
3. Lieberman M, Marks AD, Peet A. Marks' basic medical biochemistry : a clinical approach. Fourth edition. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2013. ix, 1014 pages p.
4. Rashid S, Watanabe T, Sakaue T, Lewis GF. Mechanisms of HDL lowering in insulin resistant, hypertriglyceridemic states: the combined effect of HDL triglyceride enrichment and elevated hepatic lipase activity. *Clinical biochemistry*. Sep:2003;36(6):421-9. Epub 2003/09/03.
5. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *Journal of Clinical Investigation*. May:2002;109(9):1125-31.
6. Matsuzaka, Shimano. Novel role for the CRTC2 in lipid homeostasis. *J Diabetes Investig*. Sep:2016;7(5):677-9.
7. Li Y, Song Y, Zhao M, Guo Y, Yu C, Chen W, et al. A novel role for CRTC2 in hepatic cholesterol synthesis through SREBP-2. *Hepatology*. Aug:2017;66(2):481-97. Epub 2017/04/11.
8. Aryal B, Rotllan N, Fernandez-Hernando C. Noncoding RNAs and atherosclerosis. *Current atherosclerosis reports*. May:2014;16(5):407. Epub 2014/03/14.
9. Großhans H, Filipowicz W. The expanding world of small RNAs. *Nature*. Jan:2008;451:414-6.
10. Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet*. Feb:2011;12(2):99-110. Epub 2011/01/20.
11. Norata GD, Sala F, Catapano AL, Fernandez-Hernando C. MicroRNAs and lipoproteins: a connection beyond atherosclerosis? *Atherosclerosis*. Apr:2013;227(2):209-15. Epub 2012/12/25.
12. Goedeke L, Rotllan N, et al. Identification of miR-148a as a novel regulator of cholesterol metabolism. *Nat Med*. 2015;21(11):1280-9.

13. Moldovan L, Batte KE, Trgovcich J, Wisler J, Marsh CB, Piper M. Methodological challenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers. *Journal of cellular and molecular medicine*. Mar:2014;18(3):371-90. Epub 2014/02/19.
14. Desgagne V, Bouchard L, Guerin R. microRNAs in lipoprotein and lipid metabolism: from biological function to clinical application. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. May:2017;55(5):667-86. Epub 2016/12/18.
15. Brown BD, Naldini L. Exploiting and antagonizing microRNA regulation for therapeutic and experimental applications. *Nat Rev Genet*. Aug:2009;10(8):578-85.
16. Schulte C, Karakas M, Zeller T. microRNAs in cardiovascular disease - clinical application. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. May:2017;55(5):687-704. Epub 2016/12/04.