



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

**El papel de los long non-coding RNAs en enfermedades
cardiovasculares.**

**Role of long non-coding RNAs in cardiovascular
diseases.**

Autor/a: Lucía González Piquín

Director/es: Dra. María Amor Hurlé González

Dra. Raquel García López

Santander, Septiembre 2018

ÍNDICE

1. RESUMEN/ ABSTRACT

2. INTRODUCCIÓN

1. Long non-coding RNAs

- I. Concepto
 - A. RNAs no codificantes
 - B. Long non-coding RNAs
- II. Técnicas de detección. Búsqueda de RNAs no codificantes de interés clínico
- III. Papel de los lncRNAs en enfermedades cardiovasculares

2. Aneurismas

- I. Concepto. Clasificación
- II. Epidemiología
- III. Factores de riesgo
- IV. Etiopatogenia. Mecanismos celulares y vías de señalización implicados en la formación y progresión de los aneurismas
 - A. Etiopatogenia del aneurisma aórtico torácico (AAT)
 - B. Etiopatogenia del aneurisma aórtico abdominal (AAA)
- V. Presentación clínica
- VI. Diagnóstico
- VII. Tratamiento
- VIII. Principales lncRNAs descritos en la formación de aneurismas
 - A. HIF1A-AS1
 - B. SENCR
 - C. ANRIL
 - D. MYOSLID

3. Estudio de cuatro lncRNAs específicos en un modelo animal de aneurisma abdominal

- I. HOTAIR
 - A. Papel en enfermedades cardiovasculares
 - B. Papel en aneurismas
- II. RNCR3
 - A. Papel en enfermedades cardiovasculares
 - B. Papel en aneurismas

III. MALAT1

- A. Papel en enfermedades cardiovasculares
- B. Papel en aneurismas

IV. XIST

- A. Papel en enfermedades cardiovasculares
- B. Papel en aneurismas

3. OBJETIVOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Equipo disponible

2. Diseño experimental y métodos

- I. Estudio del aneurisma aórtico abdominal en un modelo murino de Angiotensina II
 - A. Animales
 - B. Modelo experimental de aneurisma aórtico abdominal
 - C. Monitorización ecográfica
 - D. Obtención de muestras
- II. Mediciones ecográficas
 - A. Preparación previa a la obtención de imágenes
 - B. Obtención de imágenes mediante ecografía transabdominal
- III. Extracción del RNA de aorta de ratón. Método de extracción con Trizol
- IV. Transcripción inversa de RNA en Cdna
- V. Realización de PCR cuantitativa (qPCR)
 - A. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Fundamentos.
 - B. PCR cuantitativa
 - C. Realización de qPCRs con sondas TaqMan.
- VI. Estadística

5. RESULTADOS

1. Mediciones ecográficas de aorta abdominal de ratón

2. Cuantificación de la expresión de los lncRNAs de interés

6. DISCUSIÓN

7. CONCLUSIONES

8. BIBLIOGRAFÍA

1. RESUMEN / ABSTRACT

Los long non-coding RNAs (lncRNAs) son RNAs no codificantes que no son traducidos a proteínas y que presentan una longitud superior a 200 nucleótidos. Previamente considerados como la “materia oscura” de la transcripción génica, se ha descubierto que los lncRNAs modulan la expresión génica mediante diferentes mecanismos y desempeñan un papel destacado en enfermedades cardiovasculares (ECDVs). Se han identificado numerosos lncRNAs en ECDV específicas existiendo, sin embargo, pocos estudios sobre el papel de los lncRNAs en aneurismas en la literatura científica actual. Los aneurismas aórticos (AAs) son dilataciones asimétricas de la pared de la aorta con diámetros >1,5 veces el diámetro basal, clasificables en torácicos (AATs) o abdominales (AAAs). Constituyen una de las ECDV con mayores dificultades de tratamiento, dado que actualmente el único tratamiento eficaz es el quirúrgico, no existiendo un enfoque farmacológico que pueda ralentizar la progresión del mismo. Este hecho impulsa la búsqueda de posibles marcadores diagnósticos y dianas terapéuticas como puede ser el caso de los lncRNAs. Se han descrito varios lncRNAs en la patogenia del AAT, pero actualmente no existen publicaciones disponibles sobre su papel en AAAs. En nuestro estudio, seleccionamos cuatro lncRNAs descritos en diferentes enfermedades vasculares y que presentaran regiones homólogas en ratón (HOTAIR, RNCR3, MALAT1 y XIST) y cuantificamos su expresión en un modelo murino de aneurisma abdominal, tratado con angiotensina II, para determinar su posible papel en la patogenia del AAA.

Palabras clave: Long non-coding RNAs, enfermedades cardiovasculares, aneurisma aórtico torácico, aneurisma aórtico abdominal.

Long non-coding RNAs (lncRNAs) are transcribed RNA molecules with no protein-coding potential, which are more than 200 nucleotides in length. They were previously considered to be the “noise” of gene transcription, but currently it is becoming evident that lncRNAs may act as modulators of gene expression network and are also involved in the development of cardiovascular disorders. Numerous lncRNAs have been identified in specific cardiovascular diseases (CVDs). However, there are few studies about the role of lncRNAs in aneurysms in the current scientific literature. Aortic aneurysms (AAs) are asymmetrical dilations of the aorta with diameters >1.5 times the normal size, which can be classified into thoracic (AAT) and abdominal aneurysms (AAA). Within the spectrum of CDV, AAs are the most challenging to treat. Currently, the only available treatment is surgical intervention and no effective pharmacological approaches have been approved to limit the progression of aneurysm rupture in humans, which has driven the search for lncRNAs as potential diagnostic and therapeutic targets. Several lncRNAs have been identified in AATs, but there is a lack of studies about the specific role of lncRNAs in AAAs at the present time. In our study, we selected four lncRNAs described in both cardiovascular and aneurysmal disease that presented a mouse counterpart (HOTAIR, RNCR3, MALAT1 and XIST) and quantified their expression in an abdominal aneurysm murine model, in order to establish their potential role in AAAs.

Keywords: Long non-coding RNAs, cardiovascular diseases, aortic aneurysm, thoracic aortic aneurysm, abdominal aortic aneurysm.

2. INTRODUCCIÓN

1. LONG NON-CODING RNAs

I. CONCEPTO

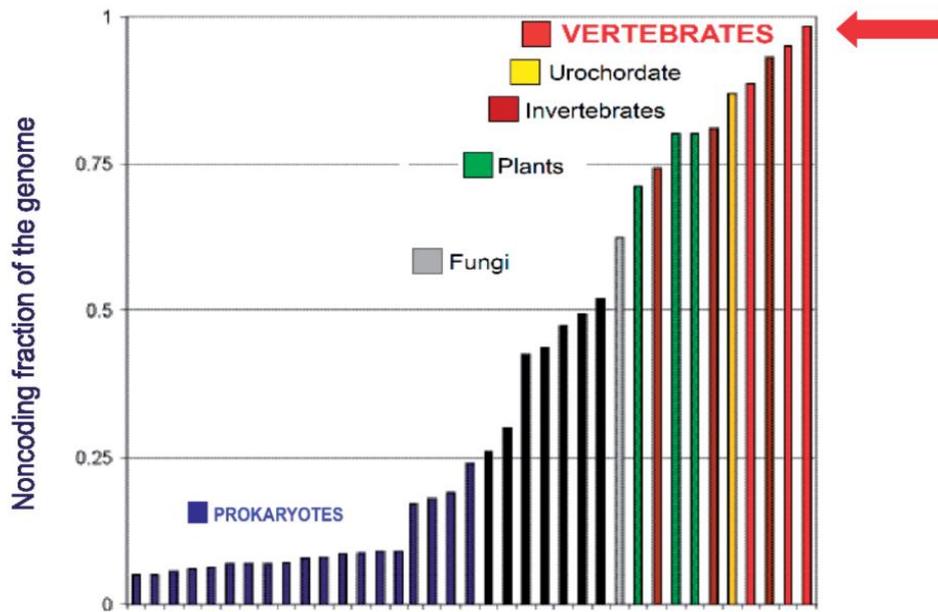
A) RNAs no codificantes

Se denomina "*long non-coding RNA*" a todo aquel RNA no codificante cuya longitud es superior a 200 nucleótidos. Los RNAs (ácidos ribonucleicos, siglas en inglés) no codificantes se definen como aquellas moléculas de RNA que son transcritas desde regiones del DNA (ácido desoxirribonucleico, siglas en inglés), pero que no son traducidos a proteínas. Los recientes avances en las tecnologías de secuenciación han demostrado que una parte mucho más extensa del genoma de la que inicialmente se pensaba es transcrita a RNA, lo que ha permitido a la comunidad científica apreciar la gran complejidad del denominado transcriptoma. Previamente considerados como el "ruido" o la "materia oscura" de la transcripción génica, dado que se pensaba que no poseían ninguna función biológica, se ha descubierto que algunos de estos RNAs no codificantes, como es el caso de los *long-non-coding RNAs*, son capaces de modular la expresión génica mediante diferentes mecanismos, y desempeñar un papel destacado en enfermedades cardiovasculares.^{1, 2, 3, 4}

Se han descrito miles de RNAs no codificantes, que generalmente se clasifican en dos grupos según su longitud, utilizando como referencia un umbral arbitrario de 200 nucleótidos. Por una parte se encuentran los *short ncRNAs*, que son aquellos cuya longitud es inferior a 200 nucleótidos, y por otra los *long ncRNAs*, que poseen una longitud superior a 200 nucleótidos. Dentro de los *short ncRNAs* se incluyen los relativamente bien conocidos micro RNAs (miRNAs) así como los *small interfering RNAs* (siRNAs) y los piRNAs (*P-element-induced wimpy testis-interacting RNAs*). La cantidad de RNAs no codificantes es directamente proporcional a la complejidad de las especies, lo que podría explicar por qué los seres humanos poseen fenotipos más complejos que otras especies, a pesar de tener similar cantidad de genes codificantes para proteínas.^{1, 3, 4}

Se ha observado una menor conservación de lncRNAs entre las diferentes especies de vertebrados, en comparación con la de los microRNAs, que podría producirse como consecuencia de la selección natural. Resulta por tanto más difícil establecer las acciones biológicas de cada lncRNA que investigar los microRNAs, debido por un lado a la menor conservación entre especies y por otro a las múltiples modalidades de acción de los primeros.^{1,4}

A Noncoding genome evolution has reached $\approx 99\%$ of entire genome in humans



B Noncoding genome generates vast number of ncRNAs with diverse structures
Three classes are under investigation for diagnostic and therapeutic purposes

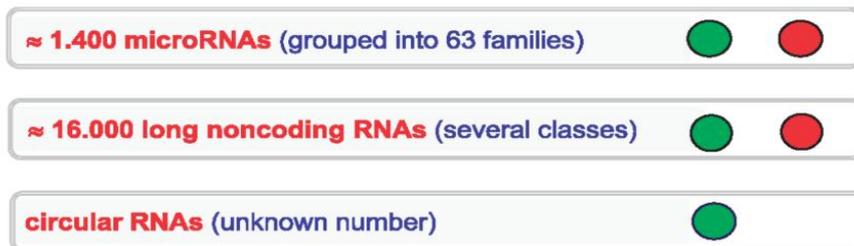


Figura 1. Evolución del genoma humano no codificante (A). Mientras que el número de genes codificantes de proteínas se mantiene sorprendentemente similar desde las especies simples a las complejas, es la parte no codificante del genoma la que se incrementa dramáticamente con la complejidad morfológica, alcanzado aproximadamente el 99% del total del genoma en la especie humana. Múltiples evidencias sugieren el importante papel del genoma no codificante tanto en la salud como en las enfermedades en seres humanos. (B) **El genoma no codificante genera un vasto número de RNAs no codificantes con diversas estructuras**. Un vasto número de RNAs no codificantes con estructuras sumamente diferentes han sido identificados (p.ej. lncRNAs, miRs, cirRNAs). Sin embargo, en la mayoría de estas moléculas, sus funciones son desconocidas.⁴

Figura 1. Poller, W. et al. (2017). Non-coding RNAs in cardiovascular diseases: diagnostic and therapeutic perspectives. *European Heart Journal*, 0, 1-20.

B) Long non-coding RNAs

Los lncRNAs son un grupo heterogéneo de transcritos (RNAs no codificantes) que ejercen un papel fundamental en la expresión génica y cuya importancia en las enfermedades cardiovasculares ha sido demostrada.²

Mecanismos de regulación de la expresión génica

Hasta ahora, se ha demostrado que los lncRNAs pueden regular la expresión génica a nivel transcripcional, post-transcripcional o a nivel epigenético.^{1, 2}

Se encuentran implicados en multitud de procesos tanto biológicos como patológicos como la diferenciación y proliferación celular, la modificación de la cromatina, la apoptosis celular, etc. De esta forma, pueden facilitar o suprimir el desarrollo de enfermedades como la demencia tipo Alzheimer o determinados tipos de cánceres, además de desempeñar un papel importante en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.¹

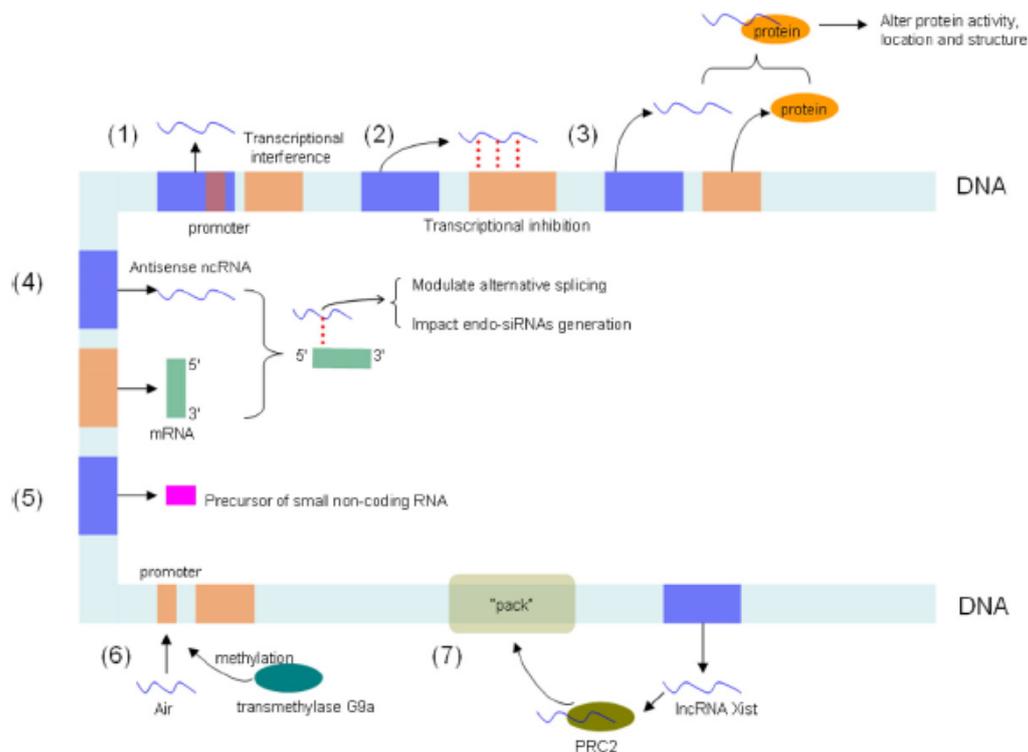
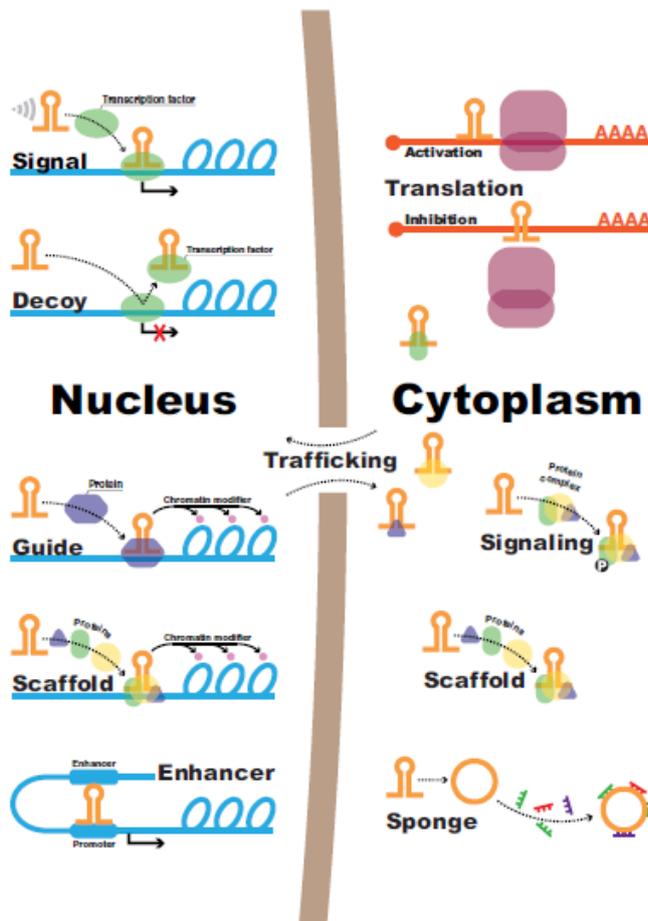


Figura 2. Regulación de la expresión génica. Los lncRNAs regulan la expresión génica a nivel transcripcional, post-transcripcional y epigenético. (1) Reprimen la expresión del gen mediante la acción sobre su promotor. (2) Regulan la expresión génica mediante la inhibición transcripcional de las secuencias codificantes de los genes. (3) Actúan mediante la unión a proteínas, alterando la función, estructura o localización de éstas. (4) Modulan el splicing de mRNA y la generación de endo-siRNAs. (5) Actúan como precursores de *small non-coding* RNAs. (6) Participan en la impresión genómica. (7) Juegan un papel importante en el efecto de "compensación de dosis"¹

Figura 2. Ma, Y. et al. (2015). Long-non-coding RNAs, a new important regulator of cardiovascular physiology and pathology. *International Journal of Cardiology*, 188, 105-110

Mecanismos de acción. Tipos de long non-coding RNAs



Una forma de clasificar los long non-coding RNAs es a través de su mecanismo de acción. Pueden actuar a nivel del núcleo mediante diferentes mecanismos: *signal* (lncRNAs señaladores), *decoy* (actúan como “señuelo”), *scaffold* (su función es la de formar un “andamiaje”), *enhancer* (potenciadores) o, por el contrario, ejercer sus acciones a nivel del citoplasma. En este último, pueden activar o inhibir la traducción de proteínas (*translation*) o regular el tráfico y la señalización proteica mediante fosforilación.^{2,5}

Los *sponge* (lncRNAs “esponja”) entre los que se incluyen los lncRNAs circulares (circRNAs) son otro tipo de lncRNAs que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional.²

Figura 3. Clasificación de los lncRNAs mediante su mecanismo de acción. Los lncRNAs señaladores (*signal*) responden a estímulos específicos y por consiguiente muestran una expresión específica para un tipo celular. *Decoy* (lncRNAs “señuelo”) se unen a factores de transcripción y otras proteínas reprimiendo la transcripción génica. *Guide* (señaladores) interaccionan con proteínas reguladoras, formando complejos ribonucleicos y dirigen a éstos con sus localizaciones diana en localizaciones subcelulares. *Scaffolds* (lncRNAs de “andamiaje”) sirven como plataformas para unir diferentes proteínas, a nivel tanto del citoplasma como del núcleo, activando o reprimiendo la transcripción. *Enhancers* (potenciadores) son secuencias reguladoras a las cuales se unen los factores de transcripción para iniciar la misma.²

Figura 3. Gomes, C. et al. (2017). The function and therapeutic potential of long non-coding RNAs in Cardiovascular development and disease. *Molecular Therapy: Nucleic Acids*, 8, 494-507.

II. TÉCNICAS DE DETECCIÓN. BÚSQUEDA DE RNA NO CODIFICANTES DE INTERÉS CLÍNICO

Debido a la complejidad del genoma no codificante, es necesario adoptar un enfoque dirigido a la identificación de dianas terapéuticas no codificantes en enfermedades cardiovasculares. Los conocimientos de los estudios filogenéticos en todo el genoma, el trabajo exhaustivo de secuenciación y los modelos animales de enfermedades cardiovasculares constituyen un primer paso indispensable para la identificación de estas dianas terapéuticas.⁴

Es importante tener en cuenta que las funciones de un mismo RNA no codificante pueden variar entre las distintas especies, de tal forma que la mayoría de los modelos animales de enfermedad difieren significativamente de la enfermedad en humanos. Algunos RNAs no codificantes ni siquiera existen en humanos, o solo tienen ortólogos distantes, por lo que no es posible estudiar su posible relevancia patogénica en humanos mediante modelos animales.^{2, 4}

Es por lo tanto necesario llevar a cabo estudios de cribado de RNA no codificantes también directamente en humanos, en particular en cohortes de pacientes bien definidos que padecen una enfermedad cardiovascular de interés cuidadosamente estudiada. En primer lugar, los RNAs no codificantes relevantes pueden identificarse mediante estudios de asociación de genoma completo (GWAS) que identifican loci genómicos que confieren riesgo de enfermedades a través de mutaciones heredadas.⁴

Un segundo enfoque es el mapeo exhaustivo del transcriptoma en órganos enfermos, que se desarrollan durante la patogénesis pero que no presentan mutaciones a nivel de DNA. Ambos enfoques ya han identificado RNAs no codificantes implicados en la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares. Las tecnologías analíticas de última generación permiten llevar a cabo tanto los estudios de GWAS como el mapeo transcripcional integral con una alta eficacia.⁴

Sin embargo, se deben considerar las limitaciones fundamentales de estas estrategias de búsqueda. Los estudios GWAS generalmente abordan los procesos iniciales en la patogénesis de la enfermedad, mediante el análisis del genoma a nivel de DNA de las mutaciones heredadas que actúan desde la infancia. Por el contrario, los procesos tardíos durante la enfermedad son más bien revelados por el mapeo del transcriptoma de los órganos previamente lesionados. Además, algunos de los principales problemas que aparecen en estos procesos de detección son la dificultad de la selección de pacientes con fenotipo adecuado, la presencia de un tamaño de cohortes suficientes, así como de grupos de control adecuados.⁴

Un tercer enfoque es el cribado funcional de alto rendimiento de RNAs no codificantes relevantes en tipos celulares, como por ejemplo los cardiomiocitos, las células vasculares, los fibroblastos cardíacos o los hepatocitos. Esta técnica se ha utilizado con éxito para identificar nuevos RNAs no codificantes con potencial diagnóstico y terapéutico.⁴

Los RNAs no codificantes identificados asociados a enfermedad pueden ser utilizados como biomarcadores de patologías, siendo útiles para evaluar el riesgo de progresión de la enfermedad (lo que facilita las decisiones de tratamiento) o para predecir la respuesta a la terapia. Además, pueden servir para desarrollar y evaluar nuevas estrategias terapéuticas que mejoren los resultados de las terapias actuales.⁴

Actualmente, existen numerosos long-non coding RNAs identificados y recogidos en bases de datos de los cuales aún se desconoce su actividad funcional así como sus posibles implicaciones en situaciones tanto fisiológicas como patológicas.²

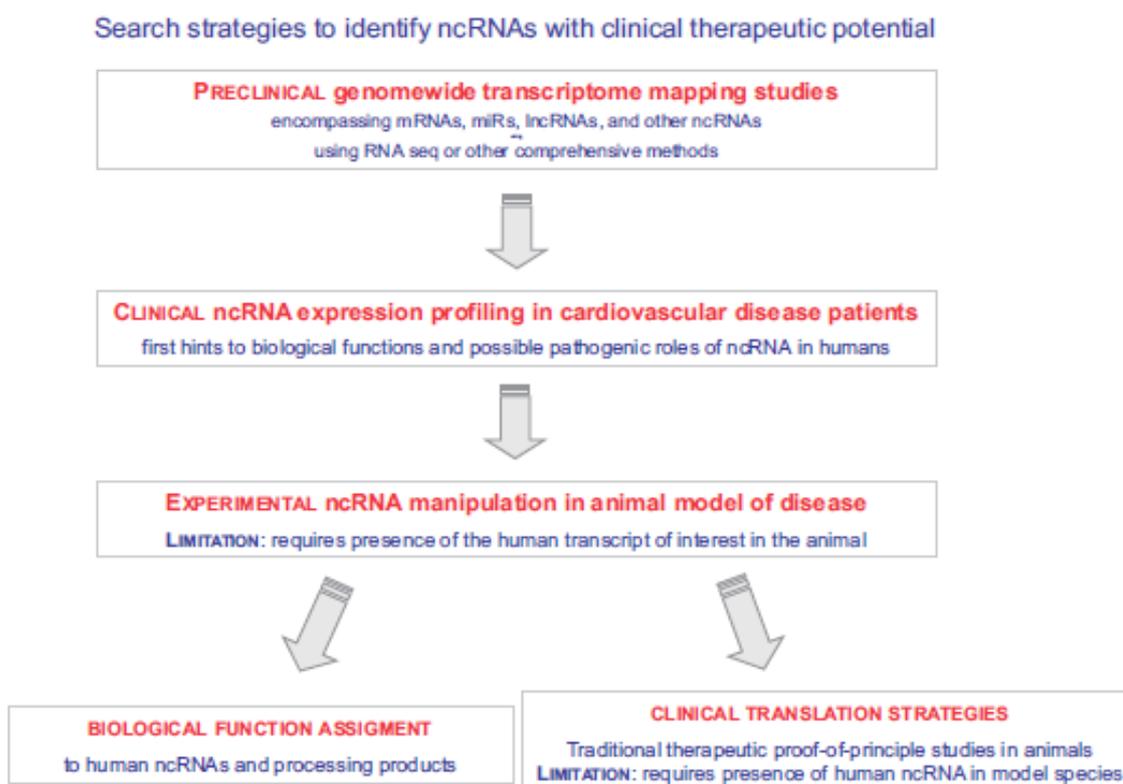


Figura 4. Estrategias de búsqueda de RNAs no codificantes de interés. Los estudios GWAS y el mapeo del transcriptoma han revelado un número inmenso de nuevos RNAs no codificantes y ha proporcionado información estructural acerca de sus loci pero, para la gran mayoría de estos, aún no ha sido determinada su función biológica.

Figura 4. Poller, W. et al. (2017). Non-coding RNAs in cardiovascular diseases: diagnostic and therapeutic perspectives. *European Heart Journal*, 0, 1-20

III. PAPEL DE LOS lncRNAs EN ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

El descubrimiento de varios tipos de RNAs no codificantes y sus diferentes funciones en la regulación de procesos patológicos está aumentando el conocimiento sobre posibles opciones terapéuticas para muchos pacientes, incluyendo aquellos que sufren de una enfermedad cardiovascular.²

En particular, la expresión dinámica y los perfiles específicos de determinados lncRNAs en diferentes estados fisiopatológicos sugieren que este tipo de RNAs no codificantes podrían utilizarse como marcadores no invasivos de enfermedad o como dianas terapéuticas.²

A) Papel de los lncRNAs en biología cardiovascular

Diferenciación y desarrollo cardíaco

Los perfiles transcriptómicos (mapeos exhaustivos del transcriptoma) y los estudios de pérdida de función en células progenitoras y embrionarias han demostrado la importancia de los lncRNAs en el desarrollo cardíaco y la diferenciación celular. Mediante estos estudios se observó que más de 1.000 lncRNAs se encontraban dinámicamente regulados durante la diferenciación celular. Asimismo, otros análisis del transcriptoma de corazones embrionarios murinos y en fase adulta identificaron varios lncRNAs específicos para el tejido y el estadio de desarrollo.²

Existen varios lncRNAs biológicamente validados que han sido asociados con el desarrollo cardíaco. Por ejemplo, **Braveheart** (*Bvht*) juega un papel importante en el desarrollo cardíaco murino, dado que está abundantemente expresado en las células madre embrionarias y regula la transición de las células mesodérmicas hacia progenitores cardíacos.^{1,2}

Por otro lado, **Fendrr** (*Fetal-lethal non-coding developmental regulatory RNA*) controla la diferenciación mesodérmica, así como el desarrollo cardíaco mediante la unión al complejo PRC2 y TrxG/MLL modulando de esta forma la cromatina.^{1,2}

Otro de los lncRNAs implicados en la diferenciación cardíaca es **CARMEN** (*Cardiac mesoderm enhancer-associated non-coding RNA*). CARMEN interactúa con SUZ12 y EZH2, dos componentes del complejo PRC2 (*Polycomb repressive complex*), interviniendo de esta manera en la diferenciación de las células precursoras cardíacas hacia cardiomiocitos.^{2,4}

Desarrollo y biología vascular

Existe una evidencia creciente del papel clave que desempeñan los lncRNAs en la biología de las células vasculares y endoteliales.²

El primer lncRNA identificado en las células de músculo liso vascular (VSMCs *Vascular smooth muscle cells*, siglas en inglés) en humanos fue **SENCR** (*Smooth muscle and EC-enriched migration/differentiation-associated lncRNA*). SENCR se expresa tanto en VSMCs como en las células endoteliales (ECs, siglas en inglés) y está implicado en la diferenciación de las mismas.^{2,5,7}

Por otra parte, el lncRNA **SMILR** (*Smooth muscle-induced lncRNA*) promueve la diferenciación de las VSMCs mediante la regulación de la expresión de transcritos adyacentes, en concreto de la HAS2 (*Hyaluronan synthase 2*).^{28, 29}

El lncRNA **PUNISHER** es expresado en células endoteliales. Aunque su mecanismo de acción o su papel en la patología vascular aún no ha sido dilucidado, parece que compromete la función e identidad de las células endoteliales, afectando por tanto al desarrollo vascular.²

lncRNA	Expression	Biological Context	Action	Genomic Localization	Organism	Reference
Differentiation and Cardiac Development						
<i>Bvht</i>	embryonic stem cells	cardiomyocyte differentiation	signal	intergenic	mouse	24,25
<i>Fendrr</i>	lateral plate mesoderm	development of heart and body wall	signal	intergenic	human, mouse, rat	26
<i>Novbnc6</i>	embryonic stem cells (particularly left ventricle), cardiomyocytes	cardiac differentiation and maturation	decoy		human, mouse	27
<i>CARMEN</i>	cardiac precursor cell	cardiomyocyte differentiation of cardiac precursor cells	enhancer	intergenic	human, mouse, rat	28
<i>n411949</i>	embryonic heart	cardiac development	unknown	antisense	mouse	22
<i>n413445</i>	embryonic heart	cardiac development	unknown	intronic	mouse	22
Contractile Function						
<i>KCNQ10T1</i>		cardiac development	signal	antisense	human, mouse	30
<i>β-RNA</i>	adult ventricles	contractile phenotype, pressure overload	unknown	antisense	rat	33
Vascular Development						
<i>SENCR</i>	smooth muscle cells	maintenance of smooth muscle cells' differentiated state	decoy	antisense	human	37,38
<i>SMILR</i>	VSMCs	proliferation of smooth muscle cells	proposed scaffold or enhancer	intergenic	human	39
<i>MALAT1</i>	ECs	proliferation of ECs and vascularization	decoy	intergenic	human, mouse	17
<i>PUNISHER</i>	ECs	identity of ECs	guide	antisense	human, mouse, zebrafish	42

Tabla 1. Long non-coding RNAs relacionados con biología cardiovascular.

Tabla 1. Gomes, C. et al. (2017). The function and therapeutic potential of long non-coding RNAs in Cardiovascular development and disease. *Molecular Therapy: Nucleic Acids*, 8, 494-507

B) Papel de los lncRNAs en enfermedades cardiovasculares específicas

La asociación entre lncRNAs y enfermedad cardiovascular está saliendo a relucir con la aparición de diferentes estudios que ponen de manifiesto su expresión específica en diferentes enfermedades cardíacas. La diferente regulación (positiva o negativa) de ciertos lncRNAs ha sido observada en modelos murinos y en humanos. Algunos estudios ofrecen resultados esperanzadores para el pronóstico y tratamiento de la enfermedad. Aun así, por su pobre conservación entre las especies, la extrapolación de los resultados observados en animales a una posible aplicación en humanos debe ser abordada con precaución.²

Algunos lncRNAs están involucrados en más de una enfermedad cardiovascular, como es el caso de **H19**, que se encuentra implicado en cada una de las enfermedades que describimos a continuación, o **SENCR**, implicado en la enfermedad coronaria y el infarto/isquemia miocárdica.²

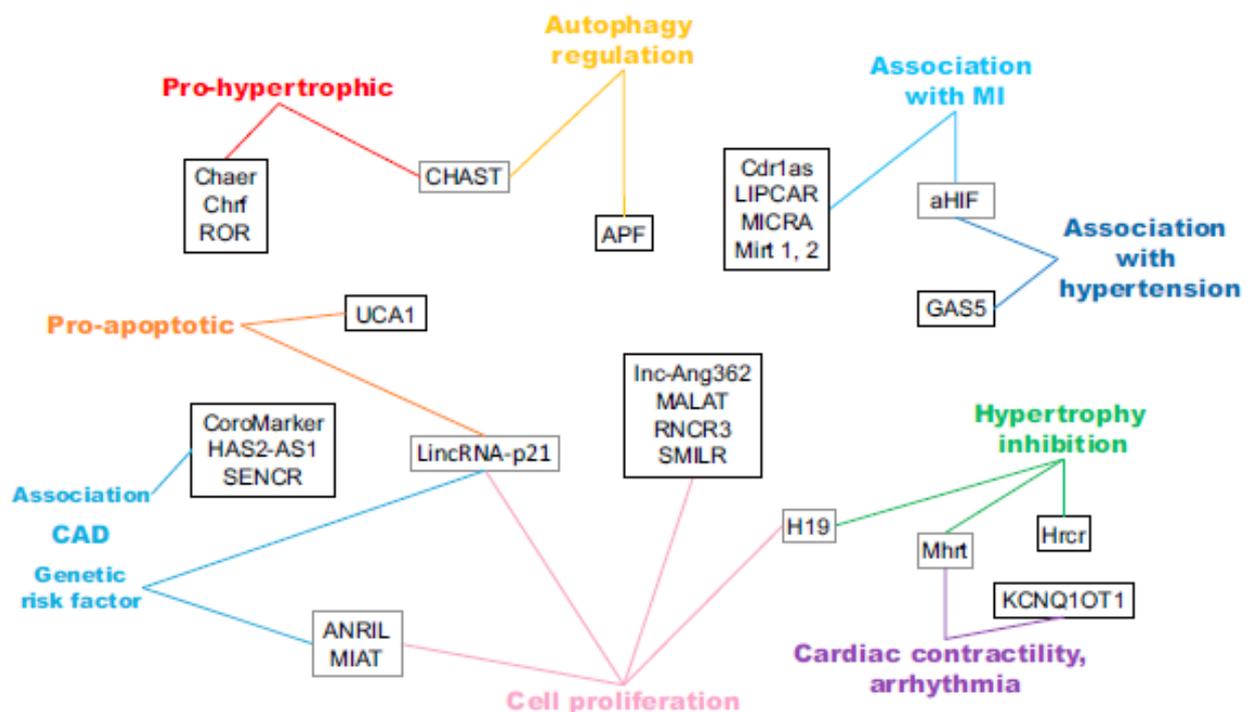


Figura 5. Long non-coding RNAs asociados con enfermedad cardiovascular y su mecanismo de acción.

Figura 5. Gomes, C. et al. (2017). The function and therapeutic potential of long non-coding RNAs in Cardiovascular development and disease. *Molecular Therapy: Nucleic Acids*, 8, 494-507

Hipertensión arterial

La hipertensión arterial posee una etiología compleja que incluye una mezcla de factores genéticos y ambientales, siendo un factor de riesgo para otras enfermedades cardiovasculares.²

Aunque se ha demostrado que muchos microRNAs (short non-coding RNAs) se encuentran involucrados en la patogenia de la hipertensión arterial, la evidencia sobre lncRNAs implicados en la misma es, a día de hoy, escasa, aunque están emergiendo los estudios basados en modelos animales y humanos en este área.²

Uno de los lncRNAs involucrados en hipertensión y remodelado vascular es **GAS5** (*Growth arrest-specific 5*). La expresión del mismo se encontró disminuida en el plasma de pacientes hipertensos, así como en las arterias y retina de un modelo murino.^{2, 6, 8}

Otros lncRNAs cuya expresión se asocia significativamente con la hipertensión son **ANRIL** (*Antisense non-coding RNA in the INK4 locus*) y **α HIF** (*Hipoxia-inducible factor 1A antisense RNA 2*). Aunque sus mecanismos de acción en la hipertensión no se encuentran aún descritos, se cree que ANRIL afecta a la adhesión, apoptosis y proliferación celular. Como en el caso del GAS5, la expresión de ANRIL en los pacientes con hipertensión se encuentra disminuida, mientras que el lncRNA α HIF se encuentra regulado positivamente, es decir, su expresión se encuentra aumentada en este tipo de pacientes.^{2, 5, 8}

Enfermedad coronaria y aterosclerosis

La aterosclerosis se define por la formación de una placa fibro-grasa en la pared del vaso arterial e implica la alteración molecular y funcional de ECs, VSMCs, macrófagos y otros leucocitos y plaquetas. Cuando la aterosclerosis tiene lugar en los vasos epicárdicos del corazón, se conoce como enfermedad coronaria, siendo esta entidad una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Se han asociado variaciones en la expresión de lncRNAs específicos con la enfermedad coronaria.^{2, 6}

Algunos de los lncRNAs implicados en la enfermedad coronaria son p21, CoroMArker y HAS2-AS1. Los dos primeros se encuentran negativamente regulados, es decir, se ha observado que su expresión se encuentra disminuida en los pacientes con enfermedad coronaria, mientras que HAS2-AS1 se encuentra positivamente regulado en estos pacientes.²

El lncRNA **p21** fue identificado como una diana transcripcional de p53. En las VSMCs, este lncRNA interrumpe la unión entre p53 y su inhibidor, produciendo consecuentemente efectos en la diferenciación celular y la apoptosis. Se encontró negativamente regulado en placas ateroscleróticas y tejido de arterias coronarias procedentes de pacientes con enfermedad coronaria. Además, algunos polimorfismos de lncRNA-p21 han sido asociados con un aumento de riesgo de padecer enfermedad coronaria.^{2, 5, 7, 8}

Algunos de los procesos que también poseen un papel fundamental en la patogenia de la enfermedad coronaria son el remodelado de la matriz extracelular y la formación de la túnica íntima, el endotelio que recubre el lumen del vaso sanguíneo. El depósito de ácido hialurónico, sintetizado por la enzima H2A (*Hyaluronan synthase 2*) contribuye a estos dos procesos. Así, el lncRNA **H2A-AS1** (*H2A antisense RNA 1*) juega un papel importante en la patogenia de la enfermedad dado que regula la enzima H2A, promoviendo su transcripción en las células de músculo liso vascular. La expresión de este lncRNA se encontró aumentada en placas de ateroma de arterias carótidas de pacientes con grado severo de ateromatosis.^{2, 6, 8}

CoroMArker, por otro lado, es un ejemplo destacado de lncRNA como biomarcador de enfermedad coronaria, dado que se identificó correctamente, con elevada sensibilidad,² en la mayoría de pacientes con enfermedad coronaria de una cohorte extensa.²

Infarto/Isquemia miocárdica

Además de asociarse significativamente con la hipertensión arterial, la expresión de **ANRIL** y de **αHIF** se asocia también con el infarto agudo de miocardio, encontrándose aumentada la expresión del primero en estos pacientes, mientras que la del segundo se encuentra disminuida.^{2, 8}

Otro lncRNA relacionado con la isquemia miocárdica es **SENCR** implicado, como ya se ha comentado, tanto en la enfermedad coronaria como en el infarto/isquemia miocárdica. En ambas entidades, se ha observado una disminución en la expresión de este long non-coding RNA.^{2, 8}

Insuficiencia cardíaca

La hipertrofia cardíaca es un tipo de reacción adaptativa a un estímulo fisiopatológico. El miocardio hipertrófico que se desarrolla en respuesta a este estímulo es capaz de aumentar y mantener el gasto cardíaco necesario para satisfacer las necesidades del organismo. Sin embargo, estos mecanismos de compensación pueden dar lugar, a largo plazo, a una alteración de la relajación miocárdica, produciendo en última instancia una insuficiencia cardíaca.¹

CHRF (*Cardiac hypertrophy-related factor*) fue el primer lncRNA descrito con implicaciones en la Insuficiencia Cardíaca. Se encuentra conservado entre especies, estando presente tanto en ratones como en humanos, y estimula la hipertrofia cardíaca. Fue observado en cardiomiocitos de ratones en los que se indujo una hipertrofia cardíaca mediante sobrecarga de presión. Los autores del estudio observaron asimismo que existe una sobreexpresión natural del CHRF en tejido humano cardíaco, enfatizando de esta manera que este lncRNA podría desempeñar una función similar en humanos.^{1, 2}

Otro lncRNA involucrado en la patogenia de la Insuficiencia Cardíaca es **Chaer** (*Cardiac hypertrophy-associated epigenetic regulator*). Es necesario para el desarrollo de hipertrofia cardíaca y se encuentra conservado, al igual que CHRF entre ratones y humanos. Mediante la interacción con PCR2, Chaer activa la transcripción de genes pro-hipertroficados, aumentando por tanto su expresión.²

Asimismo, se ha descubierto que el lncRNA **ROR** (*Regulator of reprogramming*) también juega un papel en la hipertrofia cardíaca. ROR aumenta la hipertrofia cardíaca mediante la interacción con miR-133, un micro RNA que juega de igual forma un papel importante en la hipertrofia cardíaca.²

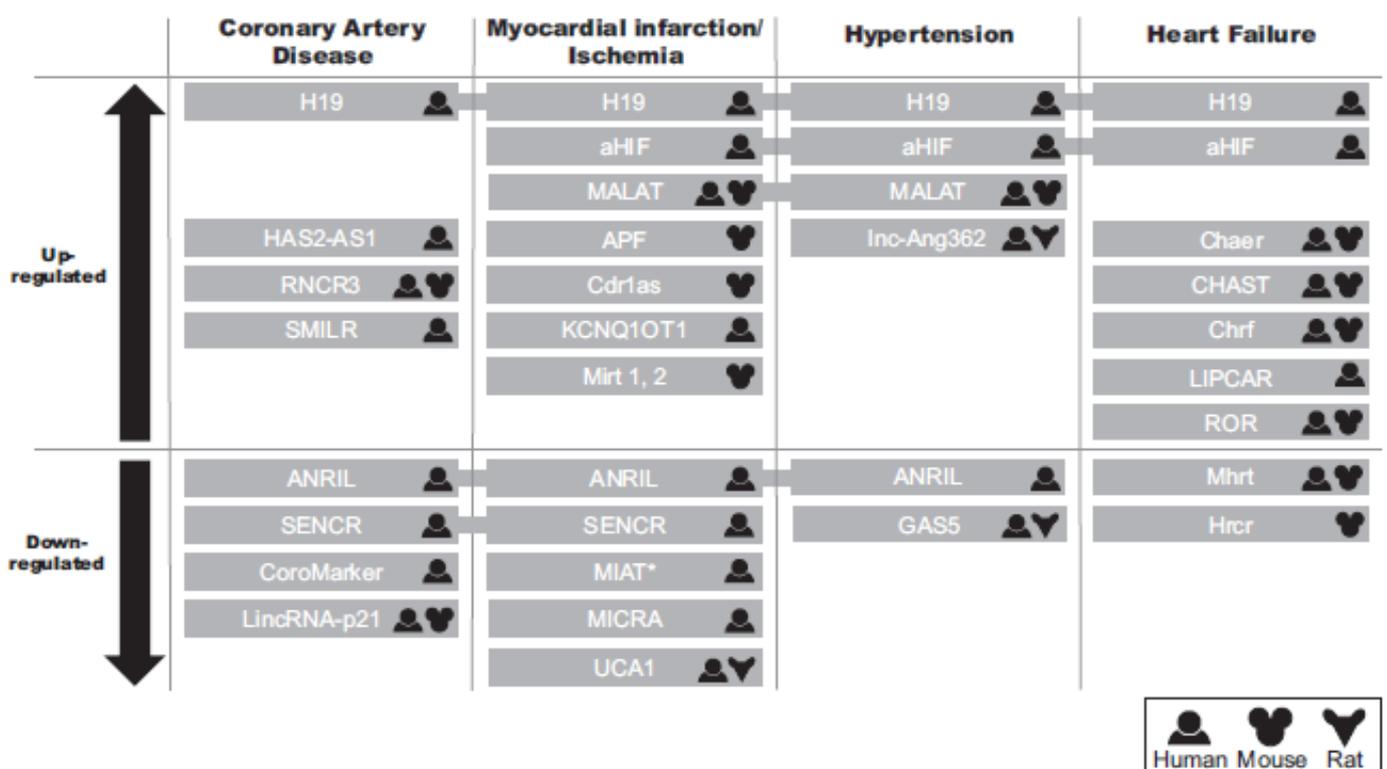


Figura 6. Long non-coding RNAs que se encuentran regulados positiva o negativamente en enfermedades cardiovasculares. Los símbolos de humano, ratón o rata indican en qué organismo ha sido descrito cada lncRNA. *MIAT está regulado negativamente en pacientes con SCACEST (Síndrome coronario agudo con elevación del ST) en comparación con pacientes con SCASEST (Síndrome coronario agudo sin elevación del ST). Se correlaciona con la hipertensión, pero no existe ninguna variación en su expresión en esta enfermedad.

Figura 6. Gomes, C. et al. (2017). The function and therapeutic potential of long non-coding RNAs in Cardiovascular development and disease. *Molecular Therapy: Nucleic Acids*, 8, 494-507

2. ANEURISMAS

I. CONCEPTO. CLASIFICACIÓN

Los aneurismas se definen como dilataciones asimétricas locales de la pared de un vaso sanguíneo, alcanzándose a ese nivel un diámetro mayor del 50% del diámetro original del vaso. Son dilataciones permanentes que se desarrollan cuando, a nivel de una debilidad localizada de la pared del vaso sanguíneo, la presión intraluminal excede la capacidad de la pared arterial para contener el aumento de presión. Esta dilatación predispone a la consecuencia fatal de una ruptura del aneurisma, lo que se asocia a una elevada mortalidad (cifras superiores al 80%).^{13, 14}

El aneurisma verdadero es aquel que abarca a las tres capas de la pared vascular y se diferencia del pseudoaneurisma en que en el último solo se encuentran alteradas la capa íntima y media, y en que el segmento dilatado del vaso está cubierto tan solo por la capa adventicia y, en ocasiones, por un coágulo perivascular.¹⁹

La localización más frecuente de los aneurismas arteriales es la arteria aorta, aunque también pueden afectar a otros territorios arteriales del organismo, como por ejemplo a las arterias cerebrales que conforman el sistema de anastomosis arterial cerebral, denominado Polígono de Willis.

Los aneurismas aórticos (AAs) se clasifican en función del segmento afectado por la dilatación. Distinguimos entre aneurismas torácicos y abdominales y, dentro de los aneurismas torácicos, se diferencia a su vez entre ascendentes y descendentes.^{13, 19}

Esta clasificación anatómica es de vital importancia puesto que, tanto la etiología como la historia natural y el tratamiento, difieren en función de la localización del aneurisma. Los aneurismas de la aorta torácica ascendente, por un lado, y los de la aorta torácica descendente y abdominal por otro, poseen distinto origen embriológico, lo que condiciona que tanto sus características patológicas como su evolución vayan a ser diferentes.¹³

La localización a nivel abdominal es mucho más común que la torácica, ubicándose la mayor parte de los mismos a nivel de la aorta infra-renal. Sin embargo, la localización torácica representa el emplazamiento más letal para una dilatación, dado que una rotura o disección aguda puede ser fatal si no recibe tratamiento adecuado.^{13, 14}

Los aneurismas también se clasifican de acuerdo a su aspecto microscópico. El aneurisma fusiforme comprende toda la circunferencia de un segmento del vaso, con lo cual hay una dilatación difusa de la arteria. A diferencia de este, el aneurisma sacciforme solo afecta a una parte de la circunferencia que resulta en una evaginación de la pared vascular.¹⁹

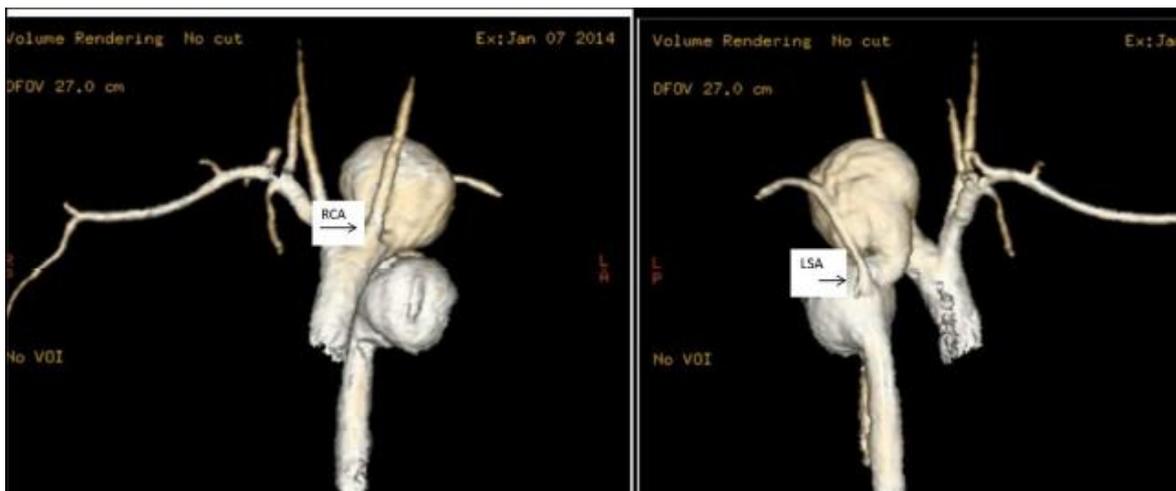


Figura 7. Aneurismas aórticos torácicos. Imágenes de resonancia magnética de la aorta torácica de una mujer de 17 años, con múltiples aneurismas aórticos torácicos. En la imagen de la izquierda, es claramente visible un gran saco aneurismático a nivel del arco aórtico (aorta torácica ascendente) localizado distalmente a la salida de la arteria carótida derecha (RCA, siglas en inglés), y un segundo aneurisma en la aorta torácica descendente. En la imagen de la derecha, se observan los segmentos ascendente y descendente con sus respectivas dilataciones aneurismáticas. La arteria subclavia izquierda (LSA, siglas en inglés) nace en la aorta descendente, entre los sacos aneurismáticos.



Figura 8. Tomografía axial computarizada con contraste que muestra un aneurisma aórtico abdominal. Este aneurisma era asintomático, y fue hallado en un estudio de imagen rutinario realizado a un varón sano de 67 años de edad. Se observan una placa arteriosclerótica calcificada en la pared del aneurisma, a nivel de la aorta abdominal distal, justo antes de la bifurcación en las arterias ilíacas comunes.

Figuras 7 y 8. Duggirala, A. et al. (2015). Non coding RNAs in aortic aneurysmal disease. *Frontiers in Genetics*, 6, 1-10.

II. EPIDEMIOLOGÍA

La prevalencia global de aneurismas aórticos abdominales es del 6% en hombres y del 1,6 % en mujeres (Li et al., 2013), mientras que la incidencia de aneurismas torácicos es de 10/10.000 (Elefteriades et al., 2015)¹³

Con respecto a la mortalidad, se estima que las roturas aneurismáticas son responsables de cerca de 15.000 muertes al año en Estados Unidos (Lloyd-Jones et al., 2009). La mayoría de ellas son debidas a aneurismas abdominales, constituyendo los aneurismas torácicos y toraco-abdominales entre el 1 y el 4% de todas las muertes relacionadas con aneurismas (Lindsay & Dietz, 2011). Los aneurismas abdominales constituyen aproximadamente entre el 2-4% de todas las muertes acontecidas en varones mayores de 65 años de edad, según varios estudios realizados por Clouse et al en 1998 y por Eagle en 2011.^{13, 14}

III. FACTORES DE RIESGO

Los aneurismas aórticos abdominales (AAAs) se asocian principalmente con factores de riesgo cardiovascular que predisponen al desarrollo de aterosclerosis. Entre los factores de riesgo más frecuentemente asociados con este tipo de aneurismas se incluyen el hábito tabáquico, la edad avanzada, la hipertensión arterial y la hiperlipidemia.^{13, 14}

Sin embargo, a pesar de las manifestaciones fenotípicas comunes con los AAAs, los aneurismas aórticos torácicos (AATs) muestran un marcado patrón hereditario, asociándose con factores de riesgo sustancialmente diferentes a los relacionados con los AAAs. Al contrario que en los AAAs, la aterosclerosis no se encuentra frecuentemente implicada en el desarrollo de los aneurismas aórticos torácicos. Los factores de riesgo descritos en AATs son principalmente la hipertensión arterial, las enfermedades del tejido conectivo, la existencia de una válvula aórtica bicúspide y los síndromes familiares de aneurismas torácicos.^{13, 14}

IV. ETIOPATOGENIA. Mecanismos celulares y vías de señalización implicados en la formación y progresión de los aneurismas

En la actualidad, las estrategias farmacológicas disponibles resultan ineficaces para prevenir la progresión de los aneurismas. A pesar de que la administración de antagonistas del receptor de Angiotensina II en pacientes con Síndrome de Marfan ha demostrado cierto éxito, este enfoque terapéutico no ha demostrado ser lo suficientemente efectivo como para sustituir la necesidad de terapia quirúrgica. Esta falta de terapias efectivas para limitar la progresión y la ruptura de aneurismas exige una mejor comprensión de la patogénesis y los mecanismos celulares implicados en el desarrollo de aneurismas. La descripción de estos mecanismos podría identificar potenciales dianas terapéuticas y mejorar las estrategias terapéuticas farmacológicas actuales.^{13, 14}

A) Etiopatogenia del aneurisma aórtico torácico (AAT)

En relación con la patogenia del AAT, se han descrito varios procesos que desempeñan un papel importante en la misma. Algunos de ellos son la alteración de la homeostasis de la matriz extracelular, la plasticidad y supervivencia de las VSMCs y la vía de señalización del TGF- β (*transforming growth factor- β*). Recientemente, se ha identificado una predisposición genética de desarrollar AAT (Isselbacher et al., 2016). En el citado estudio, se destaca el papel de las mutaciones genéticas en la vía de señalización del TGF- β así como las mutaciones en el aparato contráctil de las VSMCs.^{13, 14}

Inicialmente, la investigación en aneurismas experimentales reveló una hiperestimulación de la vía TGF- β en los AATs, debido probablemente a mutaciones genéticas (Neptune et al., 2003, Habashi et al., 2006). Posteriormente, se propuso que las mutaciones en las moléculas que forman parte de la vía de señalización de TGF- β regulan positivamente (es decir, producen la activación) de vías contrarreguladoras, como las que implican a la MAPK (*mitogen-activated protein kinase*). Se postuló que la activación de estas vías puede conducir directamente al desarrollo del aneurisma. (Holm et al 2011).¹³

Sorprendentemente, mientras que TGF- β se encuentra sobreexpresado en AATs, se encuentra pobremente expresado en AAAs y parece que desempeña un papel protector en su desarrollo. Se constató que la modulación de la vía de señalización de TGF- β previene la formación de AAAs al administrar una perfusión tanto de elastasa como de Angiotensina II en modelos animales con AAA (Wang et al, 2010, 2013).¹³

Por otro lado, se ha observado que las mutaciones en el aparato contráctil de las VSMCs producen una pérdida de su estructura contráctil, la cual es esencial para el mantenimiento del complejo de adhesión focal así como de la integridad de la matriz extracelular (Milewicz et al., 2008) Asimismo, se observó que TGF- β puede inducir un cambio fenotípico en las VSMCs, así como estimular la secreción de enzimas que degradan la matriz extracelular (metaloproteinasas) por este tipo de células (Renard et al., 2013).¹³

Actualmente, no está del todo claro si la pérdida de la estructura contráctil por mutaciones en el aparato contráctil de las VSMCs y las alteraciones en vía de señalización de TGF- β simplemente guardan una relación no causal con los AATs o por el contrario constituyen una causa precipitante de los mismos (Isselbacher et al., 2016).¹³

B) Etiopatogenia del aneurisma aórtico abdominal (AAA)

Los aneurismas aórticos abdominales se relacionan con la aterosclerosis, por lo que la fisiopatología de este tipo de aneurismas ha sido ampliamente estudiada (Guo et al., 2006; Shimizu et al., 2006). A pesar de ello, aún no se conocen perfectamente los mecanismos que subyacen en la formación de este tipo de aneurismas. Se cree que la formación de AAAs es un proceso complejo que incluye a todos los tipos celulares de la vasculatura (Maegdefessel et al., 2013)^{13, 14}

Las principales características patológicas de los AAAs son la disfunción endotelial, la infiltración crónica de las capas adventicia y media por células inflamatorias, la degradación de la matriz extracelular, así como la alteración fenotípica de las VSMCs en estadios iniciales y la apoptosis de las mismas en estadios tardíos (Shimizu et al., 2006).¹³

Los estudios llevados a cabo tanto en modelos animales como humanos han indicado que se produce una respuesta inflamatoria local, que lleva a la infiltración de macrófagos, neutrófilos, mastocitos y linfocitos T y B en la *tunica media* y *adventitia* de la pared vascular (Sun et al., 2007). Las células inflamatorias predominantes en las citadas capas son los macrófagos. Se cree que la infiltración por macrófagos es crítica en el desarrollo de los AAAs, aunque su contribución aún no está del todo definida.^{13, 14}

Estas células inflamatorias secretan varias citocinas inflamatorias y quimiocinas, como las interleucinas 1 β , 6, 17 y 23 (IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-23), el factor de necrosis tumoral α (TNF α) y el factor de crecimiento transformante β (TGF β). Las citadas interleucinas se encontraron aumentadas en tejidos humanos de aneurisma abdominal, en comparación con tejidos sanos (Szekanecz et al., 1994). La concentración plasmática de ciertas citocinas, como es el caso de TNF α , se encuentra incrementada en pacientes con aneurisma abdominal. Sin embargo, la deficiencia del receptor de TNF α no tiene un efecto significativo sobre la formación de aneurisma inducida por Angiotensina II en ratones ateroscleróticos con receptores LDL deficientes.^{13, 14}

Otra citocina que desempeña un papel crítico en el desarrollo de los AAAs es TGF β . Al contrario que el anterior, se observó que el bloqueo sistémico de la actividad de TGF β incrementaba el aneurisma inducido por Angiotensina II (Wang et al., 2010). Además, se constató que el fármaco ciclosporina inducía la expresión de TGF β , por lo que su administración detiene la formación del aneurisma en modelos murinos de AAA (Dai et al., 2011). La formación y progresión del AAA está asimismo mediada por varias proteasas, las cuales producen una degradación del colágeno y la elastina presente en la pared aórtica, es decir, producen en última instancia una degradación de la matriz extracelular.^{13, 14}

Se ha observado que la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) induce la activación de MMPs (*Matrix metalloproteinases*) en concreto, la activación de MMP-2 y MMP-9. La metaloproteinasa-9 es una endopeptidasa que contribuye al desarrollo de aneurismas inducidos por cloruro de calcio en ratones (Tanaka et al., 2009). La activación de estas metaloproteasas contribuye a la degradación de la matriz extracelular y a la disminución de VSMCs, lo que favorece la progresión del aneurisma y la ruptura del mismo.^{13, 14}

V. PRESENTACIÓN CLÍNICA

La enfermedad aneurismática es una patología indolente y virulenta, es decir, produce poca o ninguna sintomatología, encontrándose la mayoría de los pacientes asintomáticos, pero es una patología grave que puede complicarse en un corto espacio de tiempo, por ejemplo con una rotura aórtica, poniendo en peligro la vida del paciente.¹⁹

En relación a los AATs, hasta en el 95% de los casos se produce la aparición de síntomas de forma aguda en un paciente previamente asintomático (Clouse et al., 1998). Algunos de estos síntomas de presentación son la aparición de dolor torácico, disfagia, tos, ronquera, disnea o síntomas ateroembólicos por la formación de trombos en la zona del aneurisma.^{14, 19}

Como consecuencia de la compresión que ejerce el saco aneurismático sobre las estructuras vecinas, pueden aparecer los denominados “síntomas compresivos”. Entre estos se encuentra la aparición de disfagia por compresión esofágica, la ronquera o disfonía por afectación laríngea. La compresión de la vena cava superior puede ocasionar congestión de la cabeza, cuello, así como de las extremidades inferiores.

El dolor torácico constituye también un síntoma compresivo, pero puede presagiar la rotura del aneurisma, por lo que la aparición de dolor torácico ante la presencia de un aneurisma constituye una urgencia médica siendo indicación de tratamiento quirúrgico. La aparición de disnea en el contexto de un aneurisma torácico es debida a la insuficiencia valvular aórtica que se produce como consecuencia de la dilatación de la aorta ascendente. Esta disfunción de la válvula aórtica da lugar, finalmente, a una insuficiencia cardíaca congestiva, es decir a una imposibilidad del corazón para mantener un gasto cardíaco acorde con las necesidades del organismo. Se produce un paso retrógrado de sangre hacia la aurícula izquierda, que a su vez discurre hacia la circulación pulmonar a través de las arterias pulmonares, produciéndose congestión pulmonar, y por tanto disnea.¹⁹

Con respecto a los AAAs, se estima que un 75% de los pacientes se encuentran asintomáticos en el momento del diagnóstico, siendo este en muchos casos incidental, detectándose en las radiografías o ecografías abdominales realizadas al paciente por otras causas. Al igual que en el caso de los AATs, los AAAs no producen síntomas por norma general. A menos que se expandan de tamaño, produciendo dolor a nivel abdominal o lumbar, o se produzca la formación de trombos y su embolización a la circulación sistémica, se comportan como una enfermedad silenciosa, lo que hace difícil su diagnóstico.^{13, 19}

Algunos de los síntomas de presentación de los AAAs pueden ser el dolor crónico de espalda, la aparición de síntomas isquémicos en extremidades inferiores o los síntomas urológicos. Puede detectarse en la exploración física en forma de una masa palpable, pulsátil, expansiva y no dolorosa al tacto en la zona abdominal, que el paciente puede percibir como palpitations intensas en el abdomen.¹⁹

El dolor crónico a nivel lumbar es un síntoma anodino e inespecífico, que puede aparecer en los pacientes con AAA. Existe una gran variedad de patologías que causan dolor a nivel lumbar, pero es recomendable incluir al aneurisma abdominal en el diagnóstico diferencial del mismo, dado que en algunos pacientes es la única manifestación de la presencia de un aneurisma. La aparición de síntomas isquémicos en extremidades inferiores ocurre hasta en el 25% de los pacientes con AAA. Estos pacientes poseen un elevado riesgo cardiovascular, dado que suelen tener varios factores de riesgo (FRCDV) asociados. Por esto mismo, es frecuente la aparición de enfermedad vascular en otros territorios, y es de vital importancia controlar el resto de alteraciones cardiovasculares en estos pacientes.¹⁹

En el caso de que se produzca la rotura aneurismática, la tríada característica se compone de dolor súbito centro-abdominal o en flancos, la presencia de una masa pulsátil abdominal (en el caso de los AAAs), y signos y síntomas de shock hipovolémico (hipotensión, signos de mala perfusión visceral y distal). Muy a menudo la rotura aguda se produce sin la aparición previa de signos o síntomas prodrómicos. En pocas ocasiones se advierte la fuga del aneurisma con dolor espontáneo intenso y a la palpación.¹⁹

La rapidez promedio con que los AATs aumentan de tamaño es de 0,1- 0,2 cm al año. El riesgo de rotura depende del tamaño del aneurisma y de la presencia de síntomas, y varía de 2 a 3% por año en el caso de los aneurismas menores de 4 cm de diámetro, a 7% al año para los que tienen más de 6 cm de diámetro. En el caso de los AAAs, el riesgo de rotura a 5 años de aneurismas menores de 5 cm de diámetro es de 1 a 2%, en tanto que es de 20 a 40% si el aneurisma tiene más de 5 cm de diámetro.¹⁹

VI. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de aneurisma se produce muchas veces de manera incidental, como consecuencia de la realización de una prueba de imagen rutinaria en individuos asintomáticos. En otras ocasiones, ante la aparición de síntomas sugestivos (comentados previamente) o de una ruptura aneurismática, es necesaria la realización de pruebas de imagen para efectuar un diagnóstico de forma urgente.^{13, 14, 19}

En los AATs, el primer estudio que sugiere la presencia del mismo es la radiografía de tórax. Los datos que se observan son ensanchamiento del mediastino y desplazamiento de la tráquea o el bronquio izquierdo. Asimismo, puede utilizarse la ecocardiografía, tanto transtorácica como transesofágica. En particular, la ecografía transesofágica resulta de gran utilidad para valorar la zona proximal de la aorta ascendente y la aorta torácica descendente. Otros métodos con mayor sensibilidad y especificidad para valorar los aneurismas torácicos, así como la afectación de sus ramas, son la tomografía axial computarizada (TAC) con contraste, la resonancia magnética (RM) y la aortografía. En sujetos asintomáticos con aneurismas muy pequeños como para justificar una intervención quirúrgica, se deben realizar estudios sin penetración corporal, como el TAC con contraste o la RM al menos cada 6-12 meses, para vigilar la expansión del aneurisma.^{12, 19}

En el caso de los AAAs, puede demostrarse el contorno calcificado del mismo mediante la realización de una radiografía abdominal. Sin embargo, un 25% de los mismos no se encuentran calcificados, por lo que no es posible su visualización en una radiografía. La ecografía abdominal resulta útil para definir las dimensiones transversal y longitudinal del aneurisma, así como para la detección de un trombo mural. Asimismo, mediante la ecografía es posible realizar una determinación seriada del tamaño del aneurisma, y se puede utilizar para identificar los pacientes en riesgo de desarrollar un AAA. El TAC con contraste y la RM son métodos precisos sin penetración corporal de gran utilidad para identificar tanto la localización como el tamaño de los AAAs y para la planificación de las intervenciones quirúrgicas, abiertas o endovasculares. La aortografía con medio de contraste es útil para estudiar a sujetos con aneurismas, pero conlleva un riesgo pequeño de complicaciones como hemorragia, reacciones alérgicas y ateroembolia. La presencia de trombos murales reduce el diámetro interno, razón por la cual con la aortografía el diámetro del aneurisma es menor del real.¹⁹

VII. TRATAMIENTO

Actualmente, el único tratamiento definitivo disponible para los AAs es la intervención quirúrgica. Existen varias opciones de tratamiento quirúrgico, entre las que se encuentran el reemplazo protésico mediante cirugía abierta o la colocación de una endoprótesis aórtica mediante cirugía endovascular (Golledge et al., 2006). La reparación endovascular se ha convertido en la opción terapéutica de elección en la última década, representando aproximadamente el 70% de los procedimientos de AAs realizados en Europa y América del Norte (Schanzer et al., 2017; Williams and Brooke, 2017).¹³

Aun así, el tratamiento quirúrgico solo está indicado cuando existe riesgo de rotura aneurismática, ya que ambos procedimientos quirúrgicos conllevan importantes riesgos (Kent., 2014). Desafortunadamente, no se han aprobado enfoques farmacológicos efectivos para limitar la progresión o el riesgo de ruptura de aneurisma en humanos (Golledge et al., 2006). El objetivo final de la cirugía es la exclusión de la circulación del segmento dilatado, sustituyendo el fragmento afectado por una prótesis aórtica. Puede realizarse mediante cirugía abierta o mediante injertos endovasculares. Esta última opción suele ser de elección en pacientes de edad avanzada con elevado riesgo quirúrgico y presencia de comorbilidades, por ser una técnica menos agresiva.^{13, 19}

En los AATs, la reparación quirúrgica con colocación de una prótesis como injerto está indicada en una serie de situaciones:¹⁹

-Individuos con AATs sintomáticos.

-Individuos con un diámetro de la aorta ascendente superior a 5,5-6 cm o con un diámetro de aorta descendente superior a 6,5-7 cm.

-Individuos con un aneurisma que ha aumentado de diámetro más de 1 cm al año.

-Se considera también la cirugía en pacientes con Síndrome de Marfan o válvula aórtica bicúspide en caso de aneurismas de la aorta torácica ascendente con un diámetro superior a 5 cm.

La reparación endovascular es otro tratamiento posible en algunos pacientes con AATs. Dentro de la afectación de la aorta torácica ascendente, en los casos en los que se encuentre afectada la raíz aórtica, puede ser necesaria la sustitución de la válvula aórtica en el mismo acto quirúrgico. Para ello puede utilizarse un tubo valvulado para sustituir la raíz aórtica dilatada y la propia válvula aórtica. En los casos en que se encuentre afectado el arco aórtico, será asimismo necesaria la sustitución de los troncos supraaórticos. En el caso de que sea la aorta torácica descendente la afectada, en ocasiones es necesaria la sustitución de las arterias intercostales, encargadas de la irrigación de la médula espinal, para evitar una paraplejia.¹⁹

Con respecto al tratamiento de los AAAs, está indicada la reparación quirúrgica con colocación de una prótesis o la inserción de un injerto endovascular en la aorta en:¹⁹

-Aneurismas de aorta abdominal de cualquier tamaño que se expanden con rapidez o que generan síntomas. Es decir, en pacientes sintomáticos.

-En aneurismas asintomáticos con un diámetro mayor de 5,5 cm.

En estudios con asignación al azar de individuos con AAAs menores de 5,5 cm, no hubo diferencia en la cifra de mortalidad a largo plazo (5 a 8 años) entre los pacientes vigilados con ecografía y aquellos pacientes sometidos a una reparación quirúrgica programada. Así, una alternativa a la reparación inmediata es la vigilancia mediante técnicas de imagen no invasivas de los pacientes con aneurismas menores de 5 cm.¹⁹

La decisión de practicar una cirugía abierta o una reparación endovascular se basa en parte a la anatomía vascular y a la presencia de comorbilidades en el paciente. La reparación endovascular de los AAAs tiene una menor cifra de morbilidad a corto plazo, pero las cifras de mortalidad a largo plazo son similares a las de la reconstrucción quirúrgica abierta. La reparación endovascular es una estrategia emergente, que tiene en la actualidad una tasa de mortalidad de aproximadamente el 40%.¹⁹

En sujetos elegibles para cirugía, son esenciales las valoraciones preoperatorias y médicas generales, seguidas de un tratamiento adecuado de las complicaciones asociadas a la intervención quirúrgica. El riesgo de cirugía se agrava por factores como la enfermedad coronaria preexistente en el paciente, insuficiencia cardíaca, diabetes mellitus, neumopatías o edad avanzada. Con la valoración cardíaca preoperatoria y los cuidados postoperatorios la cifra de mortalidad por cirugía se encuentra entre el 1 y el 2%. Después de una rotura aneurismática aguda, la mortalidad quirúrgica es sin embargo de entre el 45 y el 50%.¹⁹

VIII. PRINCIPALES lncRNAs DESCRITOS EN LA FORMACIÓN DE ANEURISMAS

Dentro de las enfermedades cardiovasculares, los aneurismas constituyen una de las enfermedades con mayores dificultades para su tratamiento, dado que actualmente no existe un enfoque farmacológico conservador que pueda ralentizar la progresión del aneurisma y proteger al paciente del riesgo de una ruptura aguda. Esto ha impulsado la búsqueda de métodos alternativos para identificar, controlar y tratar el aneurisma aórtico utilizando enfoques menos invasivos.^{13, 14}

Los microRNAs abrieron el campo de los non-coding RNA, captando la atención de la comunidad científica por su potencial para convertirse en nuevas dianas terapéuticas y marcadores diagnósticos para el AAT. Se han descrito varios microRNAs involucrados en la progresión de aneurismas en diferentes localizaciones aórticas (tanto torácicos como abdominales). Más recientemente, se ha comenzado a investigar activamente sobre los long non-coding RNAs, dando lugar a los primeros resultados interesantes que sugieren, aún más si cabe, la importante y todavía no bien conocida contribución a la fisiología y enfermedad vascular de estas moléculas.^{13, 14}

A) HIF1A-AS1

HIF1A-AS1 (*HIF alpha antisense RNA 1*) fue el primer lncRNA descrito en AATs, desempeñando un papel importante en la patogenia de los mismos. En el estudio realizado por Wang et al (2014) se describió la interacción entre BRG1 y HIF1A-AS1, sosteniendo que dicha interacción desempeña un papel en la proliferación y apoptosis de las VSMCs *in vitro*, lo que podría contribuir a la patogénesis de los AATs. En el citado estudio se observó que la expresión de HIF1A-AS1 se encuentra regulada positivamente por BRG1 (*Brahma-related gene 1*), cuyos niveles se encuentran elevados en AATs. Los niveles de BRG1 se encontraron significativamente aumentados en la *tunica media* de pacientes con AATs, en comparación con controles normales.^{13, 15}

Asimismo, se vio que la sobreexpresión de BRG1 en las VSMCs aórticas humanas favorecía la apoptosis de las mismas, reduciendo su proliferación. La expresión de HIF1A-AS1 disminuía significativamente con la supresión (*knockdown*) de BRG1 en las VSMCs (*down-regulation*). De igual manera, se producía un aumento de la expresión (*up-regulation*) de HIF1A-AS1 cuando existía una sobreexpresión de BRG1.^{13, 14, 15}

De igual manera, se demostró que la supresión de HIF1A-AS1 mediante siRNA en las VSMCs reducía la apoptosis y favorecía la proliferación de las mismas. Esta supresión de HIF1A-AS1 disminuye la expresión de las caspasas 3 y 8, aumenta la expresión de BCL2 y atenúa la apoptosis inducida por ácido palmítico (*PA-induced cell apoptosis*) en las VSMCs.^{13, 15}

Posteriormente, otro estudio realizado por He et al (2015) mostró que la expresión de HIF1A-AS1 se encontraba significativamente aumentada en el plasma de pacientes con AATs, apoyando estos resultados la hipótesis inicial desarrollada por Wang et al.¹³

B) SENCR

Se ha demostrado que la supresión de SENCR da lugar a la disminución de la expresión de la miocardina y numerosos genes contráctiles del músculo liso, así como la expresión incrementada de varios genes promigratorios. Los resultados obtenidos en estudios de pérdida de función (*loss-of-function studies*) respaldan el papel del SENCR como un inhibidor de la migración de VSMCs. Para determinar si esta propiedad de regulación del fenotipo de las VSMCs desempeña o no un papel en el desarrollo de los aneurismas aórticos será necesaria una investigación adicional, mediante la realización de nuevos estudios.^{13, 14}

C) ANRIL

Dos estudios independientes realizados por Congrains et al. (2012) y Motterle et al. (2012) demostraron que los alelos asociados con fenotipos relacionados con aterosclerosis y con riesgo de estenosis carotídea se correlacionaban significativamente con niveles de expresión de ANRIL disminuidos. La supresión (*knock-down*) de ANRIL en VSMCs provoca variaciones significativas en la expresión de CDKN2A/B y reduce el crecimiento celular, sugiriendo que ANRIL podría tener efectos pro-proliferativos en este tipo de células. Lepper et al. (2013) constataron que la pérdida de CDKN2B es crucial para el desarrollo de aneurismas, dado que favorece la apoptosis mediada por p53 en las VSMCs. El papel en sí mismo de ANRIL en el desarrollo de aneurismas aórticos necesita ser investigado mediante futuros estudios al respecto.^{13, 14}

D) MYOSLID

Recientemente, Zhao et al. (2016) describieron un nuevo lncRNA, denominado *Myocardin-induced smooth muscle lncRNA* (MYOSLID), relacionado con la regulación del fenotipo de las VSMCs. MYOSLID promueve la diferenciación e inhibe la proliferación de este tipo celular actuando a nivel de la vía de señalización TGF β /SMAD y el *MYOCD/serum response factor* (SRF).¹³

Se observó que la inhibición de MYOSLID en células de músculo liso vascular no solo interrumpía la formación de fibras de actina y bloqueaba la translocación nuclear de MKL1 (MYCD-related transcription factor A) sino que también anulaba la fosforilación de SMAD2 inducida por la vía de señalización de TGF β . Todos estos datos sugieren que MYOSLID podría desempeñar un papel en el desarrollo de aneurismas aórticos mediante la regulación del fenotipo de las VSMCs y la vía de señalización de TGF β .¹³

LncRNAs	Sample studied	Regulation	Related genes	Related Functions	References
ANRIL	human blood, mouse atherosclerotic plaque, HAoSMCs	↓	CDKN2A, CDKN2B, DAB2IP, LRP1, LRP2, CNTN3	Influences CDKN2A/B expression and promotes proliferation of VSMC	Congrains et al., 2012; Motterle et al., 2012
RNCR3	Human blood, mouse atherosclerotic plaque, HAoSMCs, ECs	↑	KLF-2, miR-185-5p	Acts as a ceRNAs, decreases EC and VSMC proliferation	Shan et al., 2016
H19	Balloon-injured artery, HAoSMCs	↑	miR-675	Generates miRNA, Promotes VSMC proliferation	Lv et al., 2017
Lnc-Ang362	mVSMCs	↑	miR-221/222	Produces miRs and promotes VSMC proliferation	Leung et al., 2016
SENCR	HAoSMCs	-	FLI1	Inhibits migration of VSMC	Bell et al., 2014
Lnc-GAS5	mouse ocular vessels, SHR rat artery, HUVECs, HAoSMCs	↓	β-Catenin	Regulates ECs activation and proliferation, VSMC phenotypic conversion, and EC-VSMC communication	Wang et al., 2016
Lnc-MEG3	HAoSMCs	-	p53, MMP-2	Promotes proliferation and migration and decrease apoptosis of VSMC	Liu et al., 2017
MYOSLID	HCASMC	-	MYOCD/serum response factor and TGF-β/SMAD	Regulates VSMC phenotype	Zhao et al., 2016
HIF1A-AS1	Human TAAs serum, HAoSMCs	-	BRG1, Casp3/8, BCL2	Inhibits proliferation and induced apoptosis of VSMC	He et al., 2015; Wang et al., 2015c

ANRIL, antisense non-coding RNA in the INK4 locus; SENCER, smooth muscle and endothelial cell-enriched migration/differentiation-associated lncRNA; GAS5, long noncoding RNA-growth arrest-specific 5; Lnc-MEG3, long noncoding RNA-Maternally expressed gene 3; MYOSLID, MYOcardin-induced smooth muscle lncRNA; HIF1A-AS1, antisense hypoxia inducible factor 1 alpha anti sense RNA; mVSMC, mouse vascular smooth muscle cells; HAoSMCs, human aorta smooth muscle cells; HUVEs, human umbilical vein endothelial cells; HCASMC, human coronary smooth muscle cells; LRP1, low density lipoprotein receptor-related protein 1; LRP2, low density lipoprotein receptor; CDKN, cyclin-dependent kinase inhibitors; DAB2IP, DAB2 interacting protein; CNTN3, contactin-3; KLF-2, Kruppel-like factor 2; FLI1, friend leukemia integration 1 transcription factor; ceRNAs, competing endogenous RNAs; BCL2, B-cell lymphoma 2; BRG1, Brahma-related gene 1; TGF-β, transforming growth factor-β; SMAD, mothers against decapentaplegic homolog.

Tabla 2. Long non-coding RNAs involucrados en la homeostasis de células vasculares de músculo liso y en aneurismas aórticos.

Tabla 2. Li, Y., et al (2017). Non-coding RNA contribution to thoracic and abdominal aortic aneurysm disease development and progression. *Frontiers in Physiology*, 8, 1-14

En la actualidad, no existen publicaciones exhaustivas disponibles sobre el papel específico de los lncRNAs en aneurismas aórticos abdominales. Un estudio realizado por Falak et al. (2014) sugiere que un supuesto lncRNA localizado en la región de unión del inhibidor de la proteasa 15 (Pi15), posible marcador génico para el riesgo de rotura de la lámina elástica interna aórtica en ratas, puede estar involucrado en la regulación de la expresión del mismo. Estos datos proporcionan alguna pista acerca del posible papel de los lncRNAs en el desarrollo de aneurismas aórticos abdominales en humanos.¹³

3. ESTUDIO DE CUATRO lncRNAs ESPECÍFICOS EN UN MODELO ANIMAL DE ANEURISMA ABDOMINAL

En la parte experimental de este trabajo, seleccionamos cuatro long non-coding RNAs descritos en diferentes enfermedades vasculares y que presentarían homología en ratón para posteriormente cuantificarlo en nuestro modelo murino de aneurisma abdominal. Fueron los siguientes: HOTAIR, RNCR3, MALAT1 y XIST.

I. HOTAIR

A) Papel en enfermedades cardiovasculares

Biología cardiovascular. Disfunción endotelial e inflamación.

La función endotelial alterada (o disfunción endotelial) ha sido vinculada con una gran variedad de estados inflamatorios tanto agudos como crónicos. En respuesta tanto a estímulos bioquímicos (IL-1 β , LDL modificada) como biomecánicos (flujo sanguíneo turbulento) la activación endotelial es uno de los primeros procesos implicados en la iniciación de la lesión aterosclerótica. La expresión de moléculas de adhesión (VCAM-1, E-Selectina) y la secreción de quimiocinas facilita el reclutamiento de leucocitos en la pared del vaso sanguíneo. La disfunción endotelial crónica puede dar lugar a una pérdida de la integridad del endotelio, lo que predispone a inflamación vascular y aterosclerosis.⁸

Aunque las moléculas y mecanismos que controlan la inflamación no se encuentran aún perfectamente descritos, los resultados obtenidos en estudios recientes destacan el papel emergente de los lncRNAs en la regulación de la disfunción endotelial, insistiendo en que los lncRNAs desempeñan un papel importante en el control de la inflamación. En concreto, parece intervenir en el proceso inflamatorio mediante diversas acciones moleculares. Por lo general, se cree que participan en la correcta selección y localización de controladores de proteínas en núcleo y en el citoplasma.^{7,8}

La función de los lncRNAs sobre el sistema inmune, y por consiguiente sobre los procesos inflamatorios, fue estudiada por Heward y Lindsay, los cuales identificaron numerosos lncRNAs que se encuentran altamente expresados en células endoteliales. Entre los lncRNAs descritos en células endoteliales se encuentra HOTAIR (*HOX transcript antisense RNA*) el cual se encuentra disminuido en células endoteliales de placas ateroscleróticas. HOTAIR regula la proliferación y la migración de las mismas, activándose su transcripción mediante TSLP, a través de la vía PI3K/AKT-IRF1.^{7,8}

Calcificación valvular

Se ha relacionado la disminución de la expresión de HOTAIR en las células de válvula aórtica humanas con el aumento de expresión de genes asociados con la calcificación valvular. En un estudio encaminado a determinar la función de los lncRNAs sobre la válvula aórtica en humanos, junto con la identificación de lncRNAs que podrían regular la calcificación valvular, se observó que HOTAIR

se encuentra modulado, *in vitro*, por el estrés cíclico sobre las células intersticiales de válvula aórtica humana. Las células intersticiales de válvula aórtica humana expuestas durante 24 horas a una elongación mecánica cíclica del 16% exhibieron menores niveles de expresión de HOTAIR.^{7, 10}

Se objetivó que la inhibición de HOTAIR mediante siRNA incrementaba la expresión de genes relacionados con la calcificación. La sobreexpresión de estos genes involucrados en la calcificación da lugar, en última instancia, a la síntesis de proteínas tales como Fosfatasa alcalina, ALPL (*Tissue non-specific isozyme*) y BMP2 (*Bone morphogenetic protein 2*) favoreciéndose la calcificación de la válvula aórtica y aumentando por tanto el riesgo cardiovascular. Es preciso, sin embargo, profundizar acerca de la causa subyacente de la vía de señalización propuesta mediante nuevos estudios al respecto.^{7, 10}

Además, el papel que los lncRNAs desempeñan en la respuesta al estrés de las VSMCs de la arteria aórtica (no ya de las células de la válvula aórtica) aún no se encuentra del todo definido. Parece que HOTAIR, además de encontrarse modulado por el estrés cíclico sobre las células de válvula aórtica también podría estarlo también en las VSMCs aórticas (de la arteria aorta), pudiendo estar implicado por tanto en la patogenia de la hipertensión arterial.¹⁰

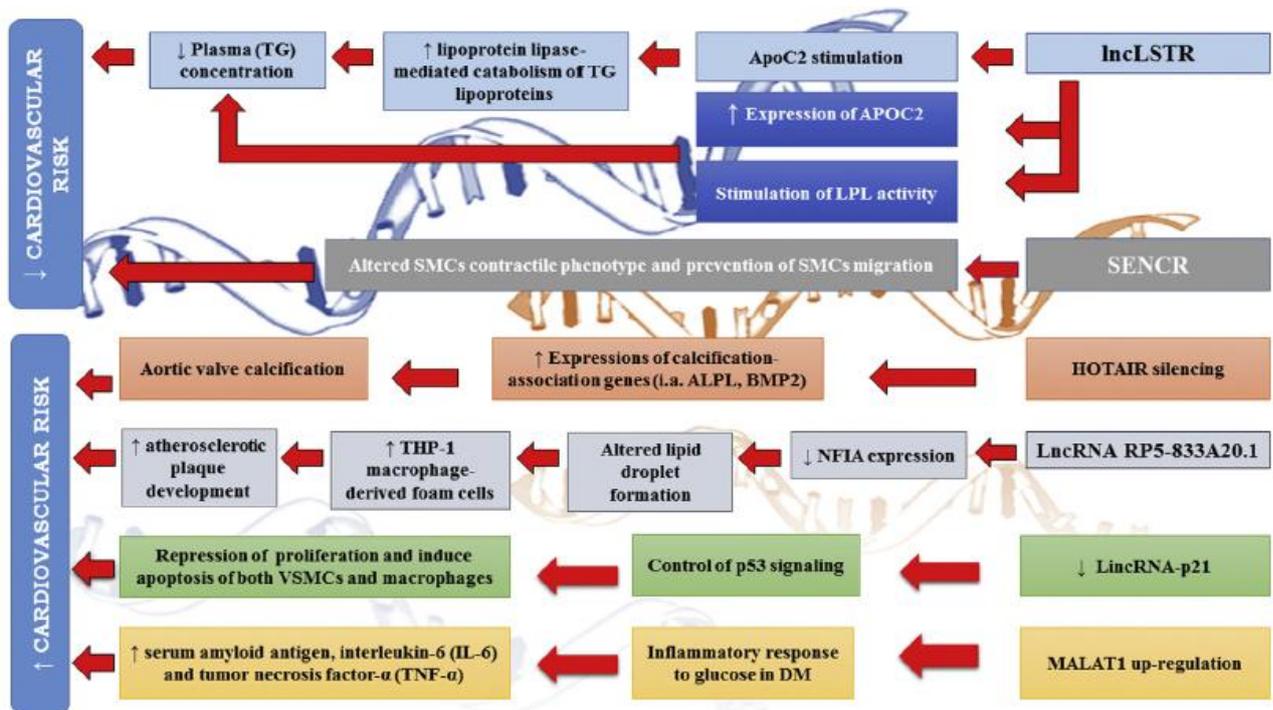


Figura 9. Esquema de las vías de señalización sugeridas mediante las que los long non-coding RNAs podrían asociarse con el riesgo de enfermedad cardiovascular. En concreto, esquema sobre la asociación de la inhibición de HOTAIR con el aumento de la expresión de genes relacionados con la calcificación.

Figura 9. Mazidi, M. et al. (Marzo 2017). Relationship between long noncoding RNAs and physiological risk factors of cardiovascular disease. *Journal of Clinical Lipidology*, 11, 617-623.

B) Papel en aneurismas

Los long non-coding RNAs se encuentran involucrados en numerosas enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, el papel que desempeñan en el aneurisma aórtico torácico espontáneo (AATE) se encuentra aún por determinar. Así, en el estudio realizado por Guo et al en 2017, se realizó un perfil transcriptómico tanto de lncRNAs como micro RNAs (mRNAs) y se llevó a cabo un estudio de correlación entre lncRNAs y mRNAs en AATE. El objetivo del estudio era identificar los lncRNAs que podrían contribuir a la patogénesis de esta entidad.¹⁶

El citado trabajo pone de manifiesto el papel de HOTAIR en la patogénesis del AATE, mediante su acción sobre la apoptosis celular y el remodelado de la matriz extracelular, por lo que se concluye que podría constituir una potencial diana terapéutica en el tratamiento del AATE. La expresión de HOTAIR se encuentra disminuida (*down-regulated*) en los especímenes con AATE, y se correlaciona negativamente con el diámetro aórtico. Los resultados de los estudios de hibridación *in situ* indicaron que HOTAIR se encuentra principalmente distribuido en el núcleo de las células endoteliales y de músculo liso vascular aórticas. Se realizó una RT-PCR cuantitativa para la detección de los niveles de HOTAIR en 24 especímenes con AATE y 24 controles, observándose que la expresión de HOTAIR estaba significativamente disminuida en los AATEs en comparación con los controles.¹⁶

Asimismo, para investigar el papel de HOTAIR en la patogénesis del AATE, se utilizaron siRNAs para inhibir a HOTAIR (*knockdown*) en células de músculo liso vascular. Los experimentos *in vitro* confirmaron que HOTAIR regula tanto la proliferación como la apoptosis en las mismas. En concreto, la inhibición de HOTAIR induce la apoptosis celular, tanto en fases iniciales como tardías, y reduce la proliferación celular.¹⁶

Además, el estudio reveló que HOTAIR se asocia con genes involucrados en la organización de la matriz extracelular. Tanto el colágeno tipo 1 como el tipo 3 constituyen los principales componentes de la matriz extracelular, por lo que uno de los objetivos del estudio era investigar el impacto de HOTAIR en la expresión de los niveles de colágeno de estos tipos. Los resultados mostraron que, 24 horas después de producir una inhibición de HOTAIR (mediante siRNAs), la expresión de colágeno de tipo 1 y 3 en las VSMCs se reducía en un 40%. Se concluyó, por tanto, que el *knockdown* de HOTAIR suprime la expresión de colágeno de tipo 1 y 3 en las VSMCs aórticas humanas.¹⁶

II. RNCR 3

A) Papel en enfermedades cardiovasculares

Biología cardiovascular. Disfunción endotelial

El lncRNA RNCR3 (*Retinal non-coding RNA3*) se ha implicado recientemente en la patogenia tanto de la aterosclerosis como de la diabetes mellitus, ya que se ha observado que induce la proliferación y la migración de las células endoteliales, desempeñando un papel ateroprotector. El mecanismo de acción de RNCR3 en las ECs tiene como resultado final la “des-represión”, es decir la activación, del KLF2 (*Kruppel-like factor 2*), un factor de transcripción que confiere un fenotipo endotelial vasoprotector. Se ha sugerido que RNCR3 podría actuar como un RNA competitivo endógeno, (ceRNA), que disminuye la concentración del micro RNA miR-185-5p. Este micro RNA tiene como diana el factor de transcripción KLF2, lo que da lugar finalmente a una activación del mismo. Como consecuencia de esto, se produce una proliferación y migración de las células endoteliales, y se disminuye la apoptosis de las mismas. Todos estos datos van a favor del papel protector del RNCR3 en la aterosclerosis y en la enfermedad coronaria.^{2, 6, 8}

Este mecanismo de regulación fue observado por el mismo grupo de investigadores en dos estudios diferentes sobre la disfunción vascular de la retina en la diabetes mellitus (retinopatía diabética). Sin embargo, debido a que cuatro isoformas de RNCR3 tienen superposición exónica con los microRNAs miR-3078 y miR-124a, todavía no está del todo claro si los fenotipos que se observan tras la inhibición de RNCR3 pueden ser atribuidos a estos micro RNAs o únicamente a RNCR3. Serán necesarios nuevos estudios para determinar definitivamente si los fenotipos descritos son efectivamente independientes de miR-3078 y miR-124.⁸

Enfermedad coronaria y aterosclerosis

La expresión de RNCR3 se modifica durante la aterosclerosis, estando sobreexpresado en las células de músculo liso vascular y células endoteliales arterioscleróticas, en comparación con tejidos no arterioscleróticos de humano y ratón. Es decir, se observan niveles elevados de RNCR3 en lesiones arterioscleróticas aórticas tanto en tejidos humanos como murinos.^{2, 8}

Figura 6 (*vide supra*, página 15). Sobreexpresión de RNCR3 en enfermedad coronaria/ aterosclerosis.

Diferentes estudios, realizados tanto en humanos como en ratones, han aportado datos convincentes acerca del papel protector de RNCR3 en la aterosclerosis. Por una parte, se observó que la inhibición de RNCR3 en ratones ApoE *-/-* aceleraba el desarrollo de aterosclerosis, aumentando los niveles de LDL en plasma. Por otra, en un estudio realizado sobre un modelo murino, se constató que, en comparación con el grupo de ratones control, la represión (*downregulation*) de RNCR3 agravaba la aterosclerosis en la aorta torácica y producía un incremento de factores inflamatorios a nivel del plasma sanguíneo. Además, se objetivó que el tratamiento *in vitro* con LDL (*low density*

lipoprotein) oxidada, incrementa los niveles de RNCR3 en células endoteliales y de músculo liso vascular. Todos estos estudios coinciden en que la inhibición (*knockdown*) de RNCR3 reduce la proliferación y la migración, además de acelerar la apoptosis en las células endoteliales vasculares y células endoteliales in vitro, lo que sugiere por tanto que la inhibición de RNCR3 puede perjudicar la regeneración de las células endoteliales en las arterias lesionadas. Por tanto, los resultados obtenidos sugieren que la inducción de la expresión de RNCR3 (regulación positiva, *upregulation*) puede constituir una estrategia prometedora para el tratamiento de la disfunción endotelial en la aterosclerosis, dada su función ateroprotectora.^{2, 6, 8}

B) Papel en aneurismas

Numerosos estudios insisten en el papel que el lncRNA RNCR3 desempeña en la disfunción vascular relacionada con la aterosclerosis, incidiendo en el papel ateroprotector del mismo, lo que podría constituir una estrategia prometedora para el tratamiento de esta entidad. (Shan et al. 2016).¹⁷ Sin embargo, en la literatura científica actual no existen en este momento estudios que describan el posible papel de RNCR3 en la patogenia de la enfermedad aneurismática, siendo necesaria la realización de otros estudios que arrojen nuevos datos al respecto.

Como ya se ha comentado previamente, los AAs se encuentran frecuentemente asociados con factores de riesgo cardiovascular que predisponen al desarrollo de aterosclerosis. Este no es el caso de los AATs, en los cuales la aterosclerosis no se encuentra frecuentemente implicada en su desarrollo. Dado este papel ateroprotector de RNCR3 descrito en varios estudios, sería de interés estudiar el papel de este lncRNA en la patogenia de IAAA, teniendo en cuenta la frecuente asociación con la aterosclerosis descrita en este tipo de aneurismas.

III. MALAT1

A) Papel en enfermedades cardiovasculares

Biología cardiovascular y remodelado vascular

En relación con la biología cardiovascular y, en concreto, con el remodelado vascular, existe una creciente evidencia de que los lncRNAs cumplen un papel fundamental en este último, mediante la interacción con las células endoteliales. Se han descrito cinco lncRNAs abundantemente expresados en las células endoteliales humanas, siendo *MALAT1* (*Metastasis-associated lung adenocarcinoma*) uno de los de mayor importancia entre ellos.⁶

En diferentes estudios, se ha visto que los niveles de MALAT1 se encuentran aumentados en la respuesta de las células endoteliales a la hipoxia. Se ha propuesto, por tanto, como un factor importante implicado en los procesos de vascularización.

Asimismo, otros estudios han demostrado que MALAT1 modula la migración y proliferación de las células endoteliales, dado que la inhibición de MALAT1

inhibe la proliferación de las mismas, observándose además que la ablación genética de MALAT 1 retrasa la vascularización de la retina neonatal.^{2, 5, 6, 7, 8}

Hipertensión arterial

MALAT1 es uno de los lncRNAs descritos implicado en la patogenia de la hipertensión arterial. En una cohorte de pacientes con infarto agudo de miocardio, la expresión de cuatro lncRNAs, entre ellos, MALAT 1, se asoció significativamente con esta entidad. Aunque los mecanismos de acción aún no se encuentran bien definidos, los estudios coinciden en que MALAT, mediante la modulación de la proliferación y migración de las células endoteliales, como ya se ha comentado anteriormente, ejerce un papel importante en el desarrollo de hipertensión arterial.²

Infarto de miocardio e Isquemia

Aunque los avances en el diagnóstico y en el tratamiento del infarto de miocardio han aumentado la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes, esta entidad continúa constituyendo una causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Se han descrito varios lncRNAs implicados en las lesiones isquémicas cardíacas y en los procesos de angiogénesis patológica, siendo MALAT1 uno de ellos. La expresión aumentada de MALAT1 en la circulación sanguínea se asocia con disfunción del ventrículo izquierdo, y por tanto con el infarto de miocardio.²

Figura 6 (*vide supra*, p. 15). Regulación positiva (*up-regulation*) de MALAT1 en infarto de miocardio/isquemia. Sobreexpresión en la circulación sanguínea.

Con respecto a la isquemia, varios estudios han identificado lncRNAs involucrados en la isquemia de extremidades, siendo el que nos ocupa uno de los descritos, junto con otros lncRNAs como SENCER, y H19. Se han realizado experimentos *in vivo*, los cuales establecieron que la omisión genética de MALAT1 o la inhibición farmacológica de MALAT1 produce un deterioro de la vascularización de la extremidad isquémica. Se observó que esta inhibición de MALAT1, mediante cualquiera de las dos formas expuestas, daba lugar a peores resultados después de la isquemia experimental en miembros inferiores. Estos resultados han sugerido, por tanto la posibilidad de que MALAT1 desempeñe un papel tanto reparador como pro-angiogénico.^{2, 4, 7}

B) Papel en aneurismas

Los AATs se han asociado con múltiples mutaciones que afectan tanto a los componentes de la vía de señalización de TGF- β como a componentes o reguladores del citoesqueleto de las VSMCs. Aunque ambos grupos presentan fenotipos similares, sigue sin estar clara la existencia de mecanismos de patogénesis comunes.⁹

El estudio llevado a cabo por Cardenas et al, pone de manifiesto que tanto las mutaciones que afectan a la vía de señalización de TGF- β como aquellas que afectan al citoesqueleto de las VSMCs llevan a la formación de un complejo

formado por tres componentes específicos: la histona deacetilasa HDAC9, a la enzima remodeladora de cromatina BRG1 y al long non-coding RNA MALAT1.

El complejo se denomina, de tal forma, complejo HDAC9-MALAT1-BRG1. Se une a la cromatina y reprime la expresión de genes de proteínas contráctiles, en asociación con la ganancia de de metilaciones en la lisina 27 de la histona 3, mediada por el complejo PRC2. La ruptura de MALAT1 o de HDAC9 en el complejo restaura la expresión de genes de proteínas contráctiles en las VSMCs y mejora la arquitectura de la pared aórtica.⁹

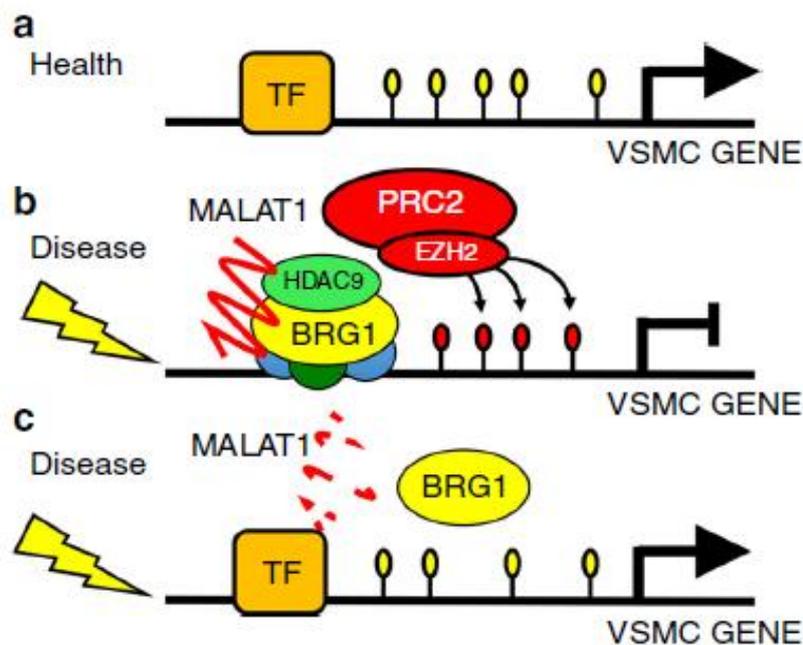


Figura 10. El complejo HDAC9-MALAT1-BRG1 induce enfermedad aórtica mediante la represión transcripcional de genes. **A)** En la aorta sana, los genes responsables de la homeostasis aórtica normal son transcritos mediante múltiples factores de transcripción (TF) como MEF2, Miocardina y factores de transcripción relacionados con la miocardina (MRTFs). **B)** Los procesos de enfermedad activan el ensamblaje del complejo HDAC9-MALAT1-BRG1. Los promotores de los genes diana son silenciados mediante la acción del complejo y la adquisición de metilaciones en la lisina 27 de la histona H3 a través del PRC2 (*Polycomb repressive complex*). **C)** La disminución de MALAT1 y/o HDAC9 produce desestabilización del complejo y permite la expresión de los loci genéticos silenciados y la vuelta a la normalidad de los fenotipos alterados.

Figura 10. Cardenas, C. et al. (2018). An HDAC9-MALAT1-BRG1 complex mediates smooth muscle dysfunction in thoracic aortic aneurysm. *Nature communications*, 9, 1-14.

IV. XIST

A) Papel en enfermedades cardiovasculares

Infarto de miocardio

Las enfermedades cardiovasculares constituyen la principal causa de muerte en todo el mundo. Entre ellas se encuentra la enfermedad coronaria, que incluye la angina estable e inestable, el infarto de miocardio y la muerte súbita cardíaca. La patogénesis del infarto de miocardio, que representa la enfermedad coronaria más mortal, radica en la pérdida de células miocárdicas debido a la apoptosis regulada por genes. Para dilucidar las formas más eficientes de prevenir el infarto de miocardio, se han estudiado muchos genes involucrados en la apoptosis de los cardiomiocitos.¹¹

En 2017, Cheng et al sugirieron que la alteración de la regulación de micro RNAs angiogénicos, como es el caso de **miR-130a**, podría dar lugar a la disfunción de las células progenitoras endoteliales en los pacientes con enfermedad coronaria. Asimismo se objetivó que miR-130a poseía un efecto positivo sobre la actividad angiogénica en las células madre mesenquimatosas tras un infarto de miocardio. Ya había sido demostrado en 2012 por Jakob et al que miR-130a podría mejorar la neovascularización y la función cardíaca en células angiogénicas de crecimiento temprano.¹¹

El lncRNA XIST (*X-inactive specific transcript*) actúa sobre la inactivación del cromosoma X, lo que permite a los mamíferos adquirir la equivalencia de dosificación génica entre la hembra XX y el macho XY. Hasta la fecha, XIST se ha descrito como oncogen, implicado en el control de la diferenciación de la infiltración e invasión tumoral, en muchos cánceres, como el carcinoma broncogénico no microcítico (Wang et al., 2017)³⁰, el cáncer colorrectal (Song et al., 2017)³¹ y el cáncer de páncreas (Wei et al., 2017)³² mediante la unión a micro RNAs específicos.^{11, 12}

Se describió, asimismo, la asociación entre XIST y miR-130a en la leucemia linfoblástica aguda de células B. Sin embargo, tanto la función de XIST en el infarto de miocardio, como la correlación entre miR-130a y XIST aún estaban por determinar. En 2017, Zhou et al llevan a cabo un estudio encaminado a la detección de la expresión y la influencia del lncRNA XIST en pacientes post-infartados y a la confirmación de la correlación específica entre XIST y miR-130a. En este estudio se constató que tanto XIST como PDE4D (Fosfodiesterasa 4, una enzima reguladora de los niveles de AMP cíclico en las células miocárdicas) se encontraban sobreexpresados en tejidos post-infartados, mientras que la expresión de miR-130a se encontraba disminuida en los mismos. Asimismo, se comprobó que la inhibición (*knockdown*) de XIST mejoraba la supervivencia de las células cardíacas tras un infarto de miocardio y suprimía la apoptosis celular. Por otra parte, se confirmó la correlación específica entre XIST y miR-130a en el infarto de miocardio, afirmándose que XIST se une a miR-130a en las células miocárdicas post-infarto, correlacionándose negativamente con la expresión del mismo. Es decir, la inhibición de XIST produce un aumento de los niveles de miR-130a en las células miocárdicas post-infarto.¹¹

B) Papel en aneurismas

Dentro de la literatura científica actual, no existen aún estudios en relación al papel de XIST en el desarrollo de aneurismas aórticos. Sin embargo, si se ha descrito el posible papel de XIST en el desarrollo de la disección de aorta torácica. La disección aórtica es una entidad perteneciente a las patologías de la arteria aorta, como también es el caso de los aneurismas.

En el estudio realizado por Sun et al. (2018) se expone que el lncRNA XIST puede regular la expresión de p21 mediante la unión a has-miR-17-5p, afectando consecuentemente a la proliferación de las células vasculares de músculo liso *in vitro*. Estudios previos habían demostrado que miR-17-5p se encontraba involucrado en la expresión de varios genes, como p21, PKD2 y SOD2, que se asocian con enfermedades aórticas. El gen p21 desempeña un papel importante en la regulación de la transcripción tras la apoptosis o daño en el ADN. En conclusión, el estudio sugiere que XIST podría tener funciones reguladoras en la disección de aorta torácica actuando como un *sponge* lncRNA (lncRNA “esponja”) sobre el miR-17-5p, incrementando de esta forma la expresión del gen p21¹⁸

Dada esta función de XIST como regulador de la expresión del gen p21, asociado con varias patologías aórticas, parece interesante estudiar el papel de XIST en otro tipo de enfermedades de la aorta como son los aneurismas.

3. OBJETIVOS

1. Revisión bibliográfica de long-non-coding RNAs en enfermedades cardiovasculares.
2. Estudio de long-non-coding RNAs en relación con la etiopatogenia del aneurisma aórtico abdominal.
3. Cuantificación de cuatro long- non-coding RNAs: HOTAIR, RNCR3, MALAT1 y XIST en un modelo murino de aneurisma aórtico abdominal por Angiotensina II.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

1. EQUIPO DISPONIBLE

-Animalario de la Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria.

-Laboratorio de Ecocardiografía: microscopía ultrasónica y escáneres RMV (VisualSonics Vevo 770), detectores de función cardíaca (ECG), sistemas respiratorios y de microinyección.

-Sistema de inhalación de anestésico (Isoflurano) para ratas y ratones.

-Sala de operaciones experimental para animales pequeños: equipo de microcirugía, microscopio estéreo Zeiss Stemi 2000 Cs, fuente de luz fría KL 1500 LCD Zeiss.

-Laboratorio de Biología Molecular: centrifugadores ultrarrápidos, termocicladores para cuantificar en tiempo real, congelador a -80 °C.

2. DISEÑO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS

I. ESTUDIO DEL ANEURISMA AÓRTICO ABDOMINAL EN UN MODELO MURINO DE ANGIOTENSINA II

A) Animales

Para nuestro estudio, contamos con 10 especímenes de ratón APOE *knock out*, (APOE K.O) con un background genético C57BL/6. Todos los ejemplares fueron ratones adultos machos, con una edad comprendida entre las 20 y las 27 semanas. Los animales fueron alojados en el Animalario de la Facultad de Medicina, enjaulados individualmente y con acceso a demanda a comida y agua mediante un sistema de suministro estándar para roedores, manteniéndose las siguientes condiciones: temperatura de la sala constante a 22°C y ciclos alternantes de luz/oscuridad de 12 horas de duración.

El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la UC (Consejo de Gobierno 8/XI/2006), y por el responsable del Servicio de Estabulación y Experimentación Animal (SEEA), miembro de dicho comité, y llevado a cabo de acuerdo con la “Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.” Se veló por el cumplimiento de las buenas prácticas relacionadas con el uso de animales, realizando todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento animal.

B) Modelo experimental de aneurisma aórtico abdominal

Se realizó la colocación de una bomba osmótica subcutánea de Angiotensina II a 5 de los ratones APOE K.O, que producían una liberación crónica del fármaco durante un tiempo máximo de 2 semanas, infundiéndose un total de 0,1 ml de Angiotensina II a una velocidad de infusión de 1,2 µg/kg/min durante 14 días.

Las bombas osmóticas subcutáneas de infusión de Angiotensina II constituyen un método de rutina para la inducción de aneurismas de aorta en ratones. Existen hallazgos consistentes de que se trata de un método fiable y reproducible para estudiar tanto AAAs^{21, 22} como AATs^{23, 24} en ratones. El mecanismo de inducción de aneurisma se basa en el efecto estimulador de la Angiotensina II sobre la síntesis de Aldosterona en la capa glomerular de la corteza suprarrenal, la cual favorece la reabsorción de sodio y agua, aumentando de esta manera el volumen de líquido extracelular y la presión arterial. La elevación de la presión arterial sistólica de forma mantenida induce el desarrollo de aneurismas en los ratones APOE K.O.²⁰

C) Monitorización ecográfica

Se realizó una monitorización ecográfica del diámetro de la aorta abdominal en los 5 animales APOE K.O tratados con Angiotensina II, para observar el desarrollo de aneurisma durante un período de dos semanas. La realización de ecografías seriadas en modelos de AAAs murinos inducidos por Angiotensina II constituye una técnica muy útil para observar el desarrollo de aneurisma a lo largo del tiempo sobre el mismo ejemplar, dado que se trata de una técnica no invasiva y de fácil ejecución, que requiere unos mínimos conocimientos técnicos para su correcta realización.²⁰

Se llevaron a cabo un total de tres mediciones del diámetro aórtico abdominal para cada uno de los 5 ejemplares, mediante el equipo de ecografía VisualSonics Vevo 770. La primera medición permitió establecer un diámetro aórtico abdominal basal, llevándose a cabo posteriormente una 2^o y 3^o medición, a la semana y las dos semanas respectivamente después de haber implantado la bomba subcutánea de Angiotensina II. Las imágenes ecográficas obtenidas mediante este seguimiento semanal, permitieron observar un aumento progresivo del diámetro aórtico abdominal en estos animales. En 4 de los 5 ejemplares se produjo un incremento del 50% o más del diámetro original del vaso, cumpliéndose por tanto los criterios necesarios para la definición de aneurisma.

D) Obtención de muestras

El sacrificio de los 5 ejemplares de ratón APOE K.O tratados con Angiotensina II se realizó una vez transcurridas dos semanas de la implantación de la bomba subcutánea del fármaco, coincidiendo con el momento de máxima dilatación a nivel aórtico. Asimismo, se llevo a cabo el sacrificio de los ejemplares control, realizándose la extracción de aorta torácica y abdominal en ambos grupos al mismo tiempo.

Tras la medición del peso del animal, se administró una inyección de 100 mg/kg de Ketamina y 5mg/kg de Xilacina a cada uno de los ejemplares para su sacrificio. Posteriormente, se colocó al ejemplar en la mesa de disección en posición de decúbito supino, con fijación de cada una de las 4 extremidades, realizándose su apertura mediante una incisión toracoabdominal anterior. Seguidamente, mediante el equipo de microcirugía, se extrajeron los órganos de la cavidades torácica y abdominal (pulmones, corazón, intestinos delgado y grueso) permitiendo identificar en el plano profundo la aorta torácica y su paso

a través del diafragma (también extraído) para convertirse en la aorta abdominal. En los ratones tratados con Angiotensina II fue posible la visualización mediante microscopio estéreo Zeiss Stemi 2000 Cs de los aneurismas a nivel abdominal. Finalmente, se llevo a cabo la extracción tanto de la aorta torácica y abdominal de todos los ejemplares, y su congelación a -80°C para la realización de posteriores estudios de biología molecular.

II. MEDICIONES ECOGRÁFICAS

A) Preparación previa a la obtención de imágenes

Los ejemplares fueron previamente afeitados con crema depilatoria en la zona abdominal para favorecer el contacto con la sonda ecográfica. Cada ejemplar fue transportado desde su jaula individual hasta el sistema de inhalación de anestésico para roedores mediante Isoflurano, donde permanecía unos minutos. Tras constatar la sedación del animal, era trasladado a la mesa de medición, donde se colocaba en decúbito supino inmovilizando las cuatro extremidades y acomodando el hocico del ratón en el interior del sistema de inhalación de Isoflurano, para mantener la anestesia del animal durante todo el procedimiento. Posteriormente, se distribuía abundante gel en el abdomen de los ejemplares para facilitar el movimiento de la sonda manual por la superficie abdominal del ratón y permitir la transmisión de las ondas de ultrasonidos.

B) Obtención de imágenes mediante ecografía transabdominal

Una vez realizada la preparación comentada, se dispuso la inclinación de la mesa de mediciones a 0 grados de manera que el abdomen del animal se encontrara lo más perpendicularmente posible a la superficie del transductor, y se posicionó el transductor, mediante los mandos del equipo, en contacto con la zona abdominal del ratón, sin ejercer una excesiva presión sobre el mismo. Se procedió seguidamente a la realización de ecografía transabdominal mediante la utilización de un transductor de alta resolución centrado a 30 MHz, ajustándose la profundidad de la imagen a 2-3 cm cuando se aplicaba el zoom, con una velocidad de fotogramas de aproximadamente 50 fotogramas/segundo.

El desplazamiento del transductor a lo largo del abdomen del animal permitió examinar tanto el segmento suprarrenal como infrarrenal de la aorta abdominal. Las mediciones del diámetro aórtico se realizaron en la aorta infrarrenal, a una distancia de aproximadamente 1-3 mm por debajo del nacimiento de las arterias renales capturando imágenes mediante cortes transversales utilizando el modo ecográfico B (*B mode*). Como se ha comentado previamente, se realizaron un total de 3 mediciones por cada ejemplar, para constatar el aumento progresivo de diámetro aórtico abdominal a lo largo del tiempo.

Asimismo, para facilitar la identificación de la aorta abdominal entre otros vasos y estructuras abdominales se activó el modo doppler PW, el cual permitía visualizar y escuchar el flujo sanguíneo en el interior del vaso, o la ausencia de flujo, si se trataba de otra estructura abdominal no vascular. Cuando existía un flujo de elevada velocidad y potencia podíamos afirmar que se trataba de la aorta abdominal, y proceder a la medición de su diámetro mediante el modo B.

III. EXTRACCIÓN DEL RNA DE AORTA DE RATÓN. MÉTODO DE EXTRACCIÓN CON TRIZOL

Una vez realizada la extracción de la aorta torácica y abdominal de los ejemplares de ratón y su congelación a -80°C , se llevó a cabo el procesamiento de las muestras de aorta abdominal, obteniéndose el RNA total de las mismas mediante el método de extracción con Trizol (Invitrogen).

En líneas generales, este método permite la extracción de RNA manteniendo la integridad del mismo, a pesar de producirse la rotura celular y la disolución de los componentes celulares de las muestras, procesos que resultan necesarios para la obtención del RNA total. De manera resumida, el método consta de una serie de fases bien diferenciadas. En la fase inicial, se produce la rotura mecánica de las muestras de aorta abdominal en presencia de Trizol. Posteriormente, la adición de cloroformo, seguido de un proceso de centrifugación, permite la separación de la solución en dos fases, acuosa y orgánica, permaneciendo el RNA exclusivamente en la fase acuosa. Tras transferir la fase acuosa, el RNA es recuperado mediante precipitación con alcohol isopropílico.

IV. TRANSCRIPCIÓN INVERSA DE RNA EN cDNA

A) Kit comercial *Thermo Scientific*. Componentes.

En nuestro estudio, la transcripción reversa se realizó mediante el kit *RevertAid H Minus First Strand cDNA synthesis kit (Thermo Scientific)*, un sistema eficaz para la síntesis de un cDNA (DNA complementario, siglas en inglés) de cadena única a partir del mRNA (RNA mensajero, siglas en inglés) o RNA total de interés. Los componentes del kit son los que siguen:

-Transcriptasa inversa *RevertAid H Minus M-MuLV* (200 U/ μl , 25 μl). Este kit utiliza un tipo especial de transcriptasa inversa, la cual posee una mutación puntual que elimina completamente la actividad RNasa, por lo que no se produce la degradación de RNA durante la síntesis de cDNA, lo que da lugar a mayores rendimientos en la producción de cDNA. La enzima mantiene la actividad en un amplio rango de temperatura ($42-54^{\circ}\text{C}$).

-Inhibidor de RNasa *Ribolock* (20 U/ μl , 25 μl). Inhibidor recombinante de RNasa que protege eficazmente el RNA de la degradación a temperaturas de hasta 55°C .

-Buffer de reacción x5 (150 μl)

-Mix de Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) 10 mM (50 μl). Los dNTPs son necesarios para que la transcriptasa los use como sustrato y se pueda llevar a cabo la síntesis de DNA a partir de RNA. Se añaden los cuatro tipos de dNTPs que componen el ADN en una mezcla equimolar.

-Random Hexamer Primer (25 μl). Mezcla de cebadores de 6 nucleótidos con secuencias generadas al azar. Debido a su unión aleatoria (es decir, sin especificidad de plantilla) con el RNA, estos cebadores pueden hibridar con cualquier tipo de RNA presente en la muestra, iniciando la síntesis de cDNA

tanto a partir de RNA ribosómico (rRNA) como mensajero (mRNA), a diferencia del cebador Oligo (dT)₁₈ que inicia la síntesis de cDNA a partir de la cola de poliA presente en el extremo 3' del mRNA, siendo un cebador específico para iniciar la síntesis de cDNA a partir de RNA mensajero. El uso de cebadores aleatorios da como resultado una mayor complejidad del cDNA generado en comparación con el cebador Oligo (dT)₁₈ pero puede reducirse, como consecuencia, la sensibilidad y especificidad de las reacciones de PCR posteriores. Sin embargo, hay varias aplicaciones en las que es beneficioso utilizar cebadores aleatorios, tales como la síntesis de cDNA usando mRNA sin una cola de poliA.

-Agua (libre de nucleasas) 2 x 1.25 ml

B) Transcripción reversa. Mecanismo.

Para la realización de una transcripción inversa el RNA de nuestra muestra puede ser o bien RNA total (rRNA y mRNA) o RNA mensajero, según lo cual será necesaria la utilización de diferentes tipos de cebadores (*primers*).^{25, 26}

En el caso de que contemos con mRNA, caracterizado por presentar una cola final de poliadeninas, utilizaremos un cebador Oligo dT, es decir, un cebador compuesto por una sucesión de timinas, que se unirá a nuestra hebra de mRNA mediante la complementariedad de bases nitrogenadas (A-T). El cebador permitirá a la enzima transcriptasa reversa iniciar la síntesis de una cadena de cDNA acoplando progresivamente dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfato).^{25, 26}

En el caso de una muestra de RNA total, como es el caso de nuestro estudio, es necesario el uso de cebadores aleatorios (Random Primers) para iniciar la síntesis de la cadena de cDNA por parte de la transcriptasa inversa.^{25, 26}

El producto final de la transcripción reversa será un cDNA monocatenario (una única hebra de cDNA). Posteriormente, se añadirán cebadores de PCR y DNA polimerasa. Uno de los oligonucleótidos ceba la síntesis de la segunda cadena de cDNA que, en su forma de doble cadena, sirve como diana para la amplificación con PCR.²⁵

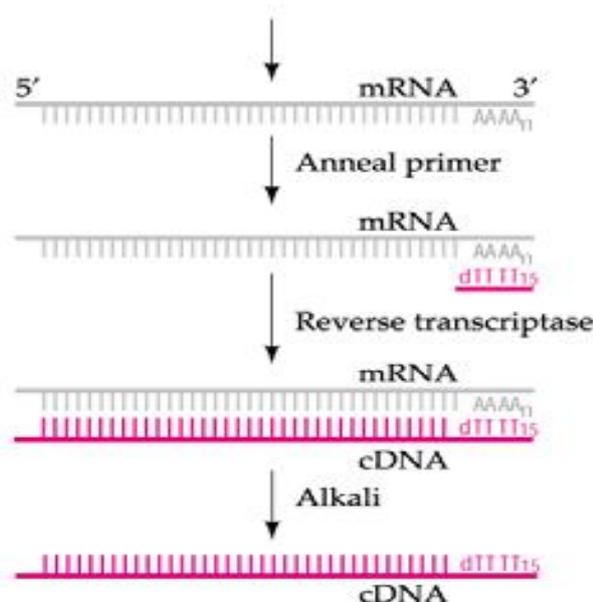


Figura 11. Mecanismo de retrotranscripción de RNA. El producto final de la reacción es la formación de una única hebra de cDNA a partir de RNA total o, como en el caso de la figura, de mRNA, mediante la acción de la transcriptasa inversa.

Figura 11. Rodriguez-Tarduchy, Gemma. (2014). *Retrotranscripción de RNA.* En Manual del Servicio de Genómica (SPQ) del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (p. 11) Madrid.

V. REALIZACIÓN DE PCR CUANTITATIVA (qPCR)

A) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Fundamentos.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consiste en una amplificación enzimática de un fragmento de DNA (la diana) localizado entre dos oligonucleótidos “cebadores”. Estos cebadores están diseñados de forma que uno de ellos es complementario a una cadena de la molécula de DNA en uno de los lados de la secuencia diana, y el otro es complementario a la otra cadena de la molécula de DNA en el lugar opuesto de la secuencia diana. Por tanto, los oligonucleótidos cebadores flanquean la secuencia diana y sus extremos 3´ están dirigidos hacia la secuencia diana a amplificar.²⁵

Posteriormente, se utiliza la enzima DNA polimerasa para sintetizar dos nuevas cadenas de de DNA usando como plantilla la secuencia que se localiza entre los cebadores. Las cadenas recién sintetizadas de DNA son en sí mismas complementarias y pueden formar una segunda copia de la secuencia diana original. Repetidos ciclos de desnaturalización con calor, hibridación de los cebadores y síntesis enzimática de DNA dan como resultado una amplificación exponencial de la secuencia diana de DNA.²⁵

B) PCR cuantitativa

Fundamentos

La PCR cuantitativa, también denominada PCR en tiempo real, es una técnica utilizada para determinar la cantidad de una secuencia de DNA concreta existente en una muestra. A diferencia de la PCR convencional, en la cual los resultados se recogen después de completar la reacción, lo que hace imposible determinar la cantidad inicial de ácido nucleico, la qPCR mide la cantidad de producto después de cada ciclo de PCR, por lo que es sí es posible determinar la cantidad inicial de ácido nucleico.²⁵

En las fases iniciales de una reacción PCR, el número de moléculas de la región de DNA que está siendo amplificada se duplica con cada ciclo de desnaturalización, hibridación de los cebadores y síntesis del DNA. Si realizamos un seguimiento de la cantidad de material sintetizado en las fases iniciales de la reacción PCR, se obtiene una línea recta en una gráfica semilogarítmica cuando la cantidad de producto se duplica en cada ciclo. El número de ciclos necesarios para alcanzar un umbral arbitrario es una medida de la cantidad de partida que existía inicialmente al comienzo de la reacción PCR. Cuantos menos ciclos son necesarios para alcanzar un umbral dado, más material de partida tiene que haber existido desde el comienzo.²⁵

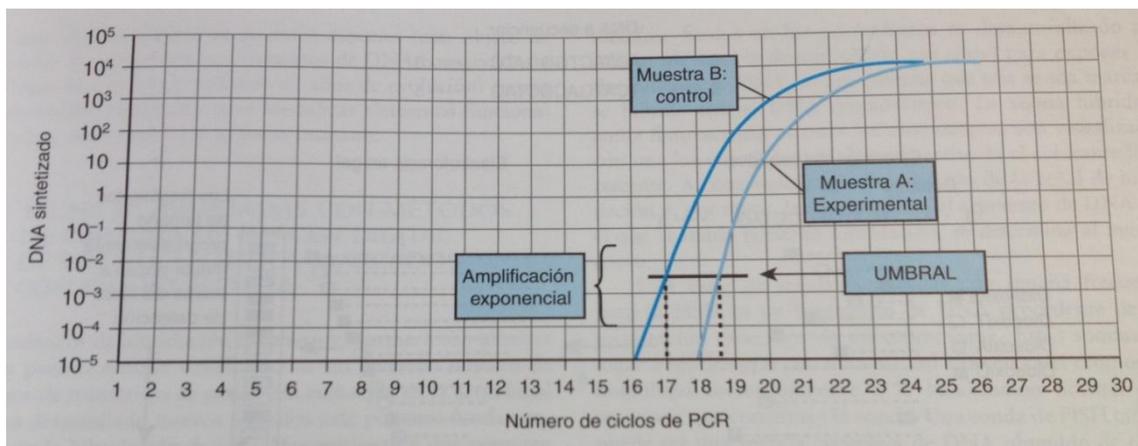


Figura 12. PCR cuantitativa. El número de ciclos de PCR necesarios para alcanzar un umbral arbitrario seleccionado en la porción exponencial de la amplificación PCR es una medida de la cantidad de plantilla presente inicialmente cuando se inicia la reacción PCR. En este ejemplo, la muestra experimental alcanza el umbral 1,5 ciclos después que la muestra control, lo que significa que al comienzo de la reacción de PCR hay una cantidad $1/(2^{1,5})$ (29%) mayor de la muestra experimental que de la muestra control.

Figura 12. Nussabaum, R., McInnes, R., & Willard, H. (2008) *Herramientas utilizadas por la genética molecular humana*. En Thompson & Thompson *Genética en Medicina* 7^o Edición (p 53). Barcelona: Elsevier

qPCR con Sondas TaqMan

Los sistemas de qPCR fueron mejorados con la introducción de sondas fluorogénicas (Sondas TaqMan) para controlar la acumulación del producto de PCR. La disponibilidad de estas sondas permitió el desarrollo de un método en tiempo real para detectar productos de amplificación específicos, aumentando la especificidad de las qPCRs.²⁶

Las sondas Taqman son compuestos fluorescentes que hibridan con el DNA de doble cadena. Su mecanismo de acción se basa en la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq DNA polimerasa para escindir una sonda hibridada a la secuencia diana. Esta escisión de la sonda permite la emisión de fluorescencia que, al igual que en otros métodos de qPCR, permite obtener una medida cuantitativa de la acumulación del producto durante los ciclos de PCR. Por lo tanto, la fluorescencia detectada en el termociclador de la qPCR es directamente proporcional a la cantidad de una secuencia de DNA concreta presente en la muestra.²⁷

Componentes de las sondas TaqMan²⁷

-*Reporter dye* (FAM, Vic). Fluoróforo que se encuentra unido covalentemente al extremo 5' de la sonda.

-*Quencher* (Q) Desactivador de fluorescencia, unido al extremo 3' de la sonda.

-*Minor Groove binder* (MGB) Molécula unida al *Quencher*, que permite incrementar la temperatura de fusión (*melting temperature, Tm*) sin necesidad de aumentar el tamaño de la sonda. Permite el diseño de sondas de menor longitud.

-Ampli Taq Gold DNA polimerase. DNA polimerasa de la bacteria *Thermus aquaticus*, es la polimerasa más frecuente y más barata utilizada de manera general en los laboratorios de Biología Molecular para la realización de PCRs.

Mecanismo de acción

Durante la primera fase de la reacción de PCR (desnaturalización) se eleva la temperatura para producir la separación de las dos hebras de DNA. Durante este paso, el *Quencher* está ejerciendo su actividad inhibitoria sobre el fluoróforo, dado que se encuentran próximos el uno al otro, por lo que no habrá señal fluorescente. En el siguiente paso de la reacción, la temperatura disminuye para permitir la hibridación de los *primers* y de la sonda TaqMan con sus secuencias específicas de DNA. Cada sonda TaqMan está diseñada de tal manera que hibride con una región específica de DNA que va a ser amplificada por un par de oligonucleótidos específicos (cebadores).²⁷

La hibridación de los *primers* específicos permite iniciar la síntesis de la cadena de DNA por la Taq DNA polimerasa, en sentido 3'-5'. Cuando la Taq DNA polimerasa alcanza la sonda TaqMan, se produce la degradación de la sonda por medio de la actividad exonucleasa de la enzima. La degradación de la sonda separa el fluoróforo, rompiendo así la proximidad entre este y el *Quencher*, permitiendo así la emisión de fluorescencia.

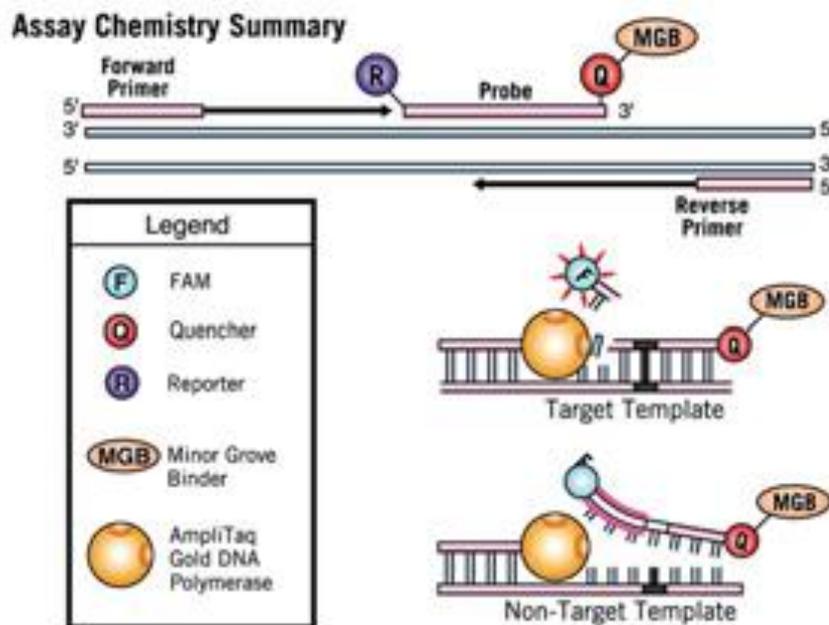


Figura 13. PCR cuantitativa mediante sondas Taqman.

Figura 13. Rodríguez-Tarduchy, Gemma. (2014). *PCR en tiempo real para transcripción génica*. En Manual del Servicio de Genómica (SPQ) del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (p. 12) Madrid.

C) Realización de qPCRs con sondas TaqMan.

En nuestro estudio, los productos de cDNA, obtenidos mediante transcripción inversa a partir de RNA total de aorta abdominal de ratón, fueron amplificados mediante qPCR con sondas TaqMan en un termociclador MX-3000P Stratagene (*Thermo Scientific*).

Se utilizaron 4 sondas TaqMan específicas (HOTAIR, RNCR3, MALAT1, y XIST) que hibridaron con las secuencias de cDNA flanqueadas por las parejas de cebadores para amplificar las secuencias de cDNA correspondientes a nuestros 4 lncRNA a estudio: XIST, MALAT1, RNCR3 y HOTAIR. La hibridación de las parejas de cebadores específicos con las secuencias de cDNA de interés permite iniciar la síntesis de la cadena de cDNA bicatenaria por la Taq DNA polimerasa. Las sondas TaqMan específicas emiten fluorescencia cuando son degradadas por la Taq DNA polimerasa, obteniéndose un nivel de fluorescencia detectado en el termociclador de la qPCR.

Se realizaron, por tanto, 4 qPCRs utilizando en cada una de ellas un par de cebadores y una sonda TaqMan específica, amplificándose en cada reacción una de nuestras cuatro secuencias de cDNA de interés. En cada qPCR, se detecta un nivel de fluorescencia que es directamente proporcional a la cantidad de cDNA amplificado, pudiendo por tanto cuantificar la cantidad de cada uno de nuestros 4 lncRNAs de interés. La cuantificación de la expresión se expresó como expresión relativa, utilizando el gen 18s como nuestro *house keeping*. Los niveles de expresión estudiados se normalizaron frente al gen ribosomal 18s, cuyos niveles de expresión son siempre estables.

Para la realización de las qPCRs, se distribuyó en cada pocillo de la placa de PCR un volumen de 0,5µl de cDNA, al que se añadieron 10µl de TaqMan Universal PCR Master mix. Cada una de las muestras de cDNA de nuestro estudio, 5 procedentes de ratones control y 5 de ratones tratados con Angiotensina II, se distribuyó por triplicado en los pocillos de la placa, añadiendo posteriormente los cebadores y las sondas TaqMan específicas para cada lncRNA de estudio y el mix de reacción (*TaqMan Universal PCR Master mix*).

Tras esto, las muestras fueron transportadas al termociclador, donde fueron amplificadas mediante 1 ciclo de 50°C durante 2 minutos y 95° durante 10 minutos) seguido de 40 ciclos utilizando las condiciones universales de la PCR (95°C durante 15 segundos, 60°C durante un minuto).

VI. ESTADÍSTICA

El tamaño muestral de nuestro estudio fue de un total de 10 ejemplares de ratón APOE K.O, distribuidos en dos grupos de 5 individuos (5 ratones control y 5 ratones tratados con Angiotensina II). El test estadístico utilizado para la comparación de medias entre los dos grupos fue la prueba de T de Student de dos colas, para datos independientes (no emparejados), considerándose estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. Los valores se representan como medias +/- error estándar de la media.

5. RESULTADOS

1. MEDICIONES ECOGRÁFICAS DE AORTA ABDOMINAL DE RATÓN

En nuestro estudio, se realizó una monitorización ecográfica de los 5 ejemplares APOE K.O tratados con Angiotensina II que permitió observar el aumento progresivo de del diámetro aórtico abdominal en estos ejemplares y constatar la formación de un aneurisma.

En la figura 14, la columna basal representa la media relativa del diámetro aórtico abdominal, antes de la implantación de la bomba subcutánea de Angiotensina II. La columna adyacente corresponde con la media del diámetro aórtico abdominal en estos mismos ejemplares, tras dos semanas de tratamiento con el fármaco. Para la comparación de medias entre dos grupos independientes se utilizó el test estadístico de t de Student de dos colas, obteniéndose un valor de $p < 0,05$. Con estos datos, podemos inferir que la probabilidad de que las diferencias entre los dos grupos estudiados sean debidas al azar es menor del 5%, siendo por tanto un resultado estadísticamente significativo.

Se observa que, tras dos semanas de tratamiento con Angiotensina II, se ha producido un incremento relativo del diámetro aórtico superior al 1,5 del diámetro original, cumpliéndose los criterios para la definición de aneurisma.

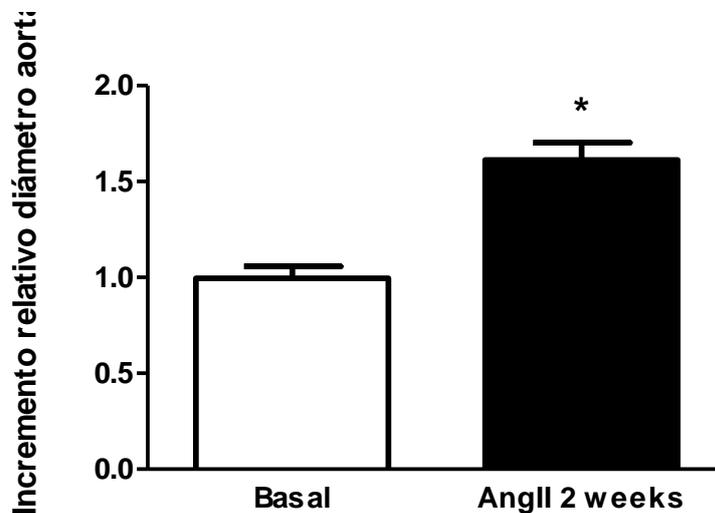


Figura 14. Incremento relativo del diámetro de la aorta abdominal tras dos semanas de tratamiento con Angiotensina II. Los valores se representan como media +/- error estándar de la media.* $p < 0,05$ diámetro aorta abdominal basal relativo vs. incremento del diámetro tras dos semanas de tratamiento con Angiotensina II.

2. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS lncRNAs DE INTERÉS

Dos de los lncRNAs estudiados, (HOTAIR y MALAT1) presentaron diferencias significativas en su expresión, $p < 0,05$. De los dos lncRNAs restantes, RNCR3 no presentó diferencias significativas ($p > 0,05$), mientras que no se pudo cuantificar la expresión del último de ellos (XIST) en los tejidos.

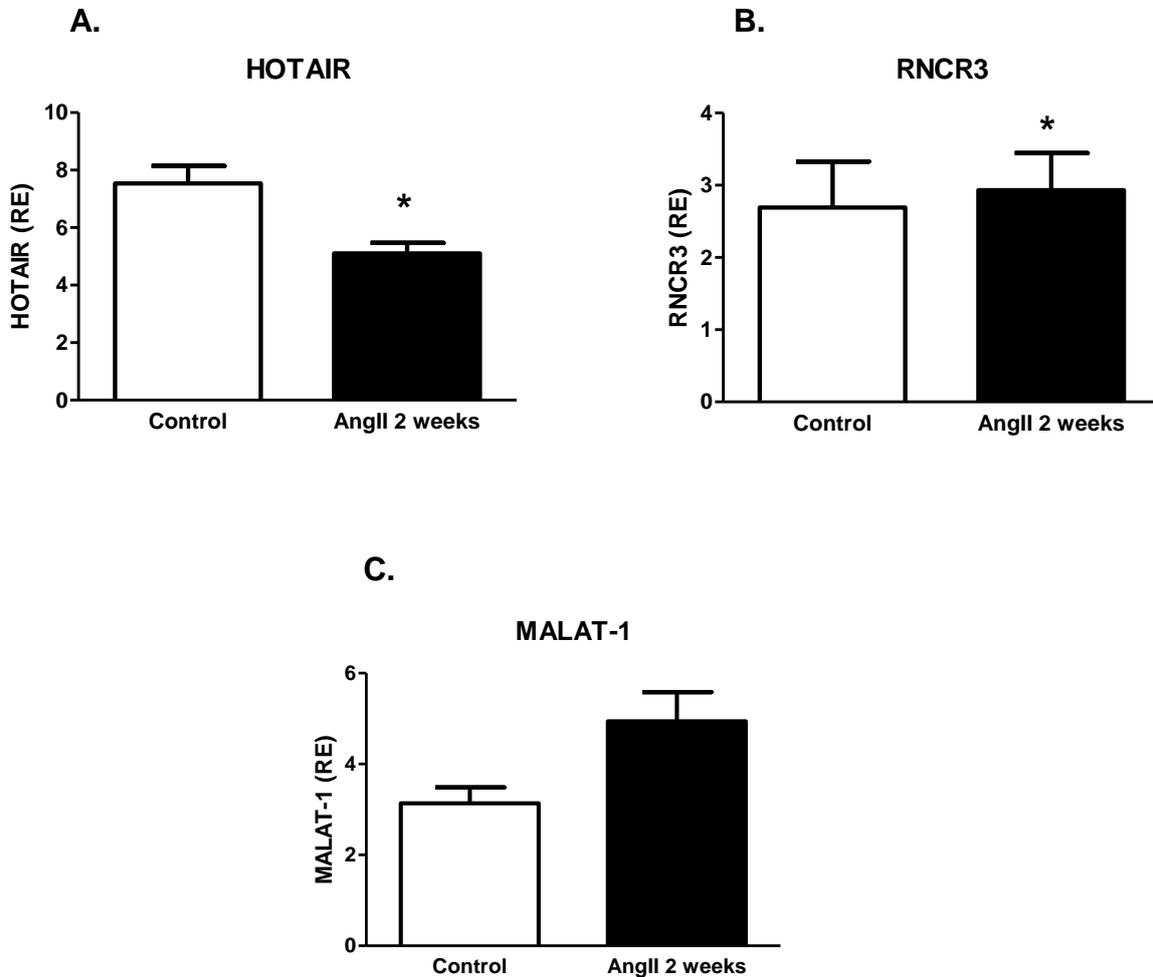


Figura 15. Expresión relativa de 3 lncRNAs en la aorta abdominal en un modelo murino de aneurisma abdominal tratado con Angiotensina II frente al grupo de animales control. **A.** Expresión relativa de HOTAIR. **B.** Expresión relativa de RNCR3. **C.** Expresión relativa de MALAT-1. Los niveles de expresión estudiados se normalizaron frente a la expresión del gen ribosomal 18s. Los valores se representan como media \pm error estándar de la media, * $p < 0,05$.

6. DISCUSIÓN

En nuestro estudio, dos de los cuatro lncRNAs analizados (HOTAIR y MALAT1) se encontraron desregulados tras la formación del aneurisma aórtico abdominal, encontrándose diferencias significativas en su expresión entre el grupo de animales tratados con Angiotensina II y el grupo control. Ambos lncRNAs se encuentran implicados en la patogenia del AAT, siendo descritos por Guo et al. (2017)¹⁶ y Cardenas et al. (2016)⁹ respectivamente. Sin embargo, dentro de la literatura científica actual, no existen estudios sobre el papel específico de estos dos lncRNAs en los AAAs.

El primero de ellos, HOTAIR, está involucrado en la patogenia de un tipo específico de AAT, el aneurisma aórtico torácico espontáneo (AATE). En el estudio llevado a cabo por Guo et al. (2017) se observó que la expresión de HOTAIR se encontraba significativamente disminuida en los pacientes con AATE en comparación con los controles.¹⁶ En nuestro estudio, se observó que la expresión de HOTAIR se encontraba disminuida en la aorta abdominal tras la formación de aneurismas (en el grupo tratado con Angiotensina II) con respecto al grupo de animales control. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en AATs, concluyendo por tanto que en ambos tipos de AA, tanto torácico como abdominal, existe una regulación negativa (*downregulation*) de HOTAIR.

De acuerdo con Guo et al, HOTAIR actúa sobre el remodelado de la matriz extracelular y la apoptosis y proliferación de las VSMCs aórticas. La inhibición (*knockdown*) de HOTAIR induce la apoptosis, reduce la proliferación celular y suprime la expresión de colágeno de tipo 1 y 3 en este tipo celular, favoreciendo el desarrollo del AAT.¹⁶ Dado que HOTAIR se encuentra distribuido principalmente en el núcleo de las ECs y VSMCs aórticas, cabe pensar que no solo está implicado en el desarrollo del AAT, sino que también podría estarlo en el del AAA, así como en otro tipo de enfermedades aórticas (por ejemplo, la disección aórtica). Los resultados de nuestro estudio sugieren que la regulación negativa (*downregulación*) de HOTAIR en las VSMCs aórticas podría favorecer el desarrollo de AAA, mediante los mismos mecanismos descritos por Guo et al en AATs, es decir actuando sobre la apoptosis/ proliferación y sobre el remodelado de la matriz extracelular. De esta forma, HOTAIR podría constituir una diana terapéutica para el tratamiento del aneurisma aórtico, tanto torácico como abdominal.

El segundo de ellos, MALAT1, se ha asociado asimismo con el AAT. En el estudio llevado a cabo por Cardenas et al se describió el papel de un complejo ternario, formado entre otros componentes por MALAT1, en la disfunción de las VSMCs en este tipo de aneurismas. Se observó que el complejo HDAC9-MALAT1-BRG1 reprime la expresión de genes de proteínas contráctiles en las VSMCs aórticas, lo que finalmente da lugar a una alteración de la arquitectura de la pared del vaso y favorece la formación del aneurisma torácico. MALAT1 se localiza en el núcleo, y se encuentra *upregulado* en respuesta a la expresión de TGFR2 (Receptor de TGF- β 2) y ACTA2 (gen que codifica para la α actina 2) en VSMCs, así como en tejidos humanos de aneurisma aórtico torácico.⁹

En nuestro estudio, se observó que la expresión de MALAT1 se encuentra aumentada tras la formación del aneurisma abdominal con respecto al tejido normal de aorta de ratón. Estos resultados concuerdan con los de Cardenas et al, donde se observó una sobreexpresión de MALAT1 en tejidos humanos de AAT, pudiendo concluir que el MALAT1 se encuentra upregulado en ambos tipos de aneurisma aórtico, tanto torácico como abdominal. Los mecanismos a partir de los cuales MALAT1 favorece el desarrollo de aneurismas abdominales podrían ser los mismos que los descritos por Cardenas et al, es decir, la disfunción de las VSMCs mediante la represión de genes contráctiles, aunque también sería posible la actuación de MALAT1 sobre otros genes que no sean los genes reguladores del citoesqueleto o mediante vías de señalización distintas a las de TGF- β . Serían necesarios más estudios al respecto para determinar el papel específico de MALAT1 en la patogenia del aneurisma aórtico abdominal.

A diferencia de HOTAIR y MALAT1, el papel de los dos lncRNAs restantes analizados en nuestro estudio (RNCR3 y XIST) aún no ha sido descrito en aneurismas, no existiendo dentro de la literatura científica actual estudios a este respecto. Aun así, sí que han sido descritos tanto en otras enfermedades cardiovasculares, como en otros tipos de enfermedades (tumoraes).

RNCR3 se ha relacionado con la disfunción vascular relacionada con la aterosclerosis. El estudio llevado a cabo por Shan et al. (2016)¹⁷ revela el papel ateroprotector de RNCR3 y propone la intervención sobre este lncRNA como una estrategia terapéutica prometedora para el tratamiento de esta enfermedad. Este lncRNA se encuentra distribuido en las VSMCs y ECs, estando significativamente sobreexpresado en lesiones arterioscleróticas tanto en tejidos humanos como murinos. El estudio sugiere que la sobreexpresión de RNCR3 en las arterias lesionadas (afectadas por la aterosclerosis) constituye un mecanismo protector frente al daño vascular, que favorece la regeneración de las células endoteliales en las arterias afectadas, aumenta la proliferación y migración y disminuye la apoptosis de las mismas.¹⁷

Ya que los aneurismas aórticos abdominales se asocian muy frecuentemente con la presencia de aterosclerosis, parece lógico pensar que esta sobreexpresión de RNCR3 en las lesiones ateroscleróticas, que da lugar a una serie de acciones compensadoras del daño vascular, también tenga lugar tras el desarrollo de aneurismas, pudiendo constituir la intervención sobre RNCR3 una estrategia terapéutica para detener la formación de los mismos. Sin embargo, en nuestro estudio, no existieron diferencias significativas en la expresión de RNCR3 en la aorta abdominal tras la formación de aneurismas con respecto al tejido normal de aorta de ratón. Es decir, la expresión de RNCR3, a diferencia de lo observado por Shan et al en lesiones ateroscleróticas, no se modificó tras la formación del aneurisma abdominal.

Dado el reducido tamaño muestral de nuestro estudio, sería necesario aumentar el número de individuos en los grupos de estudio para determinar si este papel protector de RNCR3 en las lesiones ateroscleróticas tiene lugar también en aneurismas, antes de descartar por completo que este lncRNA pueda desempeñar un papel relevante en la patogenia del AAA. También sería

de interés evaluar si en nuestro modelo aparece la formación de placas de ateroma asociadas a la formación de aneurisma o si, por el contrario, no existe asociación entre ambas entidades.

El lncRNA XIST, el último de nuestros lncRNAs de interés ha sido descrito, mediante estudios realizados en humanos, en otras enfermedades cardiovasculares como el infarto de miocardio (Zhou et al. 2017)¹¹ o la disección de aorta torácica (Sun et al. 2018)¹⁸. También se ha descrito en modelos humanos de múltiples enfermedades tumorales como el carcinoma broncogénico no microcítico (Wang et al., 2017)³⁰, el cáncer colorrectal (Song et al., 2017)³¹ y el cáncer de páncreas (Wei et al., 2017)³². Sin embargo, como ya se ha comentado, no existen actualmente estudios que relacionen a XIST con el desarrollo del aneurisma aórtico, tanto torácico como abdominal. El estudio llevado a cabo por Sun et al puso de manifiesto el papel regulador de XIST sobre el gen p21 en la patogenia de la disección aórtica torácica. Los resultados obtenidos mediante qPCR mostraron que tanto los niveles de expresión de XIST como de p21 se encontraban aumentados en los tejidos de disección de aorta torácica con respecto a los tejidos aórticos normales. Se observó que la sobreexpresión de XIST incrementaba la expresión de p21, afectando finalmente a la proliferación de las células de músculo liso vascular.¹⁸

Dado que XIST interviene sobre la proliferación de las VSMCs, parece factible que este lncRNA también pudiera estar implicado en otro tipo de enfermedades aórticas como son los aneurismas, además de en la disección de aorta torácica. Sin embargo, en nuestro estudio, no fue posible la cuantificación de XIST en los tejidos, tanto en el grupo tratado con Angiotensina II (modelo murino de aneurisma abdominal) como en el grupo control (tejido aórtico normal de ratón). Como se ha comentado previamente, XIST ha sido descrito en modelos humanos de varias enfermedades cardiovasculares y tumorales, pero, hasta la fecha, su expresión en modelos murinos de enfermedad aún no ha sido estudiada. Es posible que este lncRNA no se exprese en ratones, ya que existe una menor conservación de los lncRNAs entre las diferentes especies de vertebrados, en comparación con otros tipos de non-coding RNAs, posiblemente como consecuencia de la selección natural, por lo que podría no existir homología entre especies.

7. CONCLUSIONES

En conclusión, los lncRNA HOTAIR y MALAT1 podrían perfilarse como posibles dianas terapéuticas para la prevención del desarrollo de los aneurismas aórticos abdominales, dada la concordancia de los resultados obtenidos en nuestro estudio con los estudios previos al respecto. Por el contrario, el papel de RNCR3 y XIST en la patogenia del aneurisma abdominal aún no está del todo claro. Ante la falta de estudios al respecto en la literatura científica actual, sería interesante realizar nuevos estudios en modelos murinos de aneurisma con un tamaño muestral más amplio, así como validar los resultados obtenidos en muestras de pacientes, para así determinar la importancia de estos dos lncRNAs en el desarrollo de aneurismas abdominales.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Ma, Y., Ma, W., Huang, L., Feng, D., & Cai, B. (Abril 2015). Long-non-coding RNAs, a new important regulator of cardiovascular physiology and pathology. *International Journal of Cardiology*, 188, pp.105-110.
2. Gomes, C., Spencer, H., Ford, L., Michel, L., Baker, A., Emanuelli, C., Balligand J., & Devaux, Y. (Septiembre 2017). The function and therapeutic potential of long non-coding RNAs in Cardiovascular development and disease. *Molecular Therapy: Nucleic Acids*, 8, pp.494-507.
3. Dykes, I., Emanuelli, C. (Marzo 2017). Transcriptional and post-transcriptional gene regulation by long non-coding RNA. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 15, pp.177-186.
4. Poller, W., Dimmeler, S., Heymans, S., Zeller, T., Haas, J., Karakas, M., Leistner, D., Jakob, P., Nakagawa, S., Blankeberg, S., Engelhardt, S., Thum, T., Weber, C., Meder, B., Hajjar, R., & Landmesser, U. (Marzo 2017). Non-coding RNAs in cardiovascular diseases: diagnostic and therapeutic perspectives. *European Heart Journal*, 0, pp.1-20.
5. Deng, L., Bradshaw, A., & Baker, A. (2016). Role of noncoding RNA in vascular remodelling. *Current opinion Lipidology*, 27, pp.439-448.
6. Sun, H., Hou, B., Wang, X., Zhu, X., Li, K. & Qiu, L. (Noviembre 2016). Endothelial dysfunction and cardiometabolic diseases: Role of long non-coding RNAs. *Life Sciences*, 167, pp.6-11.
7. Mazidi, M., Penson, P., Pharm, M., Gluba-Brzozka, A., Rysz, J. & Banach, M. (Marzo 2017). Relationship between long noncoding RNAs and physiological risk factors of cardiovascular disease. *Journal of Clinical Lipidology*, 11, pp.617-623.
8. Simion, V., Haemmig, S. & Feinberg, M. (Enero 2018). LncRNAs in vascular biology and disease. *Vascular Pharmacology*, 2, pp.1-11.
9. Cardenas, C., Kessinger, C., Cheng, Y., MacDonald, C., MacGillivray, T., Ghoshhara, B., Huleihel, L., Nuri, S., Yeri, A., Jaffer, F., Kaminski, N., Ellinor, P., Weintraub, N., Maholtra, R., Isselbacher, E., & Lindsay, M. (2018). An HDAC9-MALAT1-BRG1 complex mediates smooth muscle dysfunction in thoracic aortic aneurysm. *Nature communications*, 9, pp.1-14.
10. Mantella, L., Singh, K., Sandhu, P., Kantores, C., Ramadan, A., Khyzha, N., Quan, A., Al-Omran, M., Fish, J., Jankov, R., & Verma, S. (2017). Fingerprint of long non-coding RNA regulated by cyclic mechanical stretch in human aortic smooth muscle cells: implications for hypertension. *Molecular Cellular Biochemistry*, 435, pp.163-173.
11. Zhou, T., Qin, G., Yang, L., Xiang, D. & Li, S. (2017). LncRNA XIST regulates myocardial infarction by targeting miR-130a-3p. *Journal of Cellular Physiology*, 3, pp.1-15.

12. El Azzouzi, H., Doevendans, P. & Sluijter, J. (Mayo 2016). Long non-coding RNAs in heart failure: an obvious link. *Annals of Translational Medicine*, 4, pp.1-15.
13. Li, Y., & Maegdefessel, L. (2017). Non-coding RNA contribution to thoracic and abdominal aortic aneurysm disease development and progression. *Frontiers in Physiology*, 8, pp.1-14.
14. Duggirala, A., Delogu, F., Angelini, T., Smith, T., Caputo, M., Rajakaruna, C., & Emanuelli, C. (2015). Non coding RNAs in aortic aneurysmal disease. *Frontiers in Genetics*, 6, pp.1-10.
15. Wang, S., Zhang, X., Yuan, Y., Tan, M., Zhang, L., Xue, X., Yan, Y., Han, L., & Xu, Z. (2015). BRG1 expression is increased in thoracic aortic aneurysms and regulates proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cells through the long non-coding RNA HIF1A-AS1 *in vitro*. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 47, pp.439-446.
16. Guo, X., Chang, Q., Pei, H., Sun, X., Qian, X., Tian, C., Lin, H. (2017). Long non-coding RNA-mRNA correlation analysis reveals the potential role of HOTAIR in pathogenesis of sporadic thoracic aortic aneurysm. *European Journal of vascular and endovascular surgery*, 54, pp.303-314.
17. Shan, K., Jiang, Q., Wang, X., Wang, Y., Yang, H., Yao, M., Liu, C., Li, X., Yao, J., Liu, B., Zhang, Y., Yong J., & Yan, B. (2016). Role of long non-coding RNA-RNCR3 in atherosclerosis-related vascular dysfunction. *Cell Death and Disease*, 7, pp.1-13.
18. Sun, J., Chen, G., Jing, Y., Xiang, H., Dong, J., Zheng, J., Zou, M., Li, H., Wang, S., Sun, Y., Liao, W., Liao, Y., Feng, L., & Bin, J. (2018). LncRNA Expression Profile of Human Thoracic Aortic Dissection by High- Throughput Sequencing. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 46, pp.1027-1041.
19. Longo, D., Kasper, D., Jameson, J., Fauci, A., Hauser, S., & Loscalzo, J. (2012). *Enfermedades vasculares. Enfermedades de la aorta*. En Harrison. Principios de Medicina Interna 18^o edición (pp.2060-2066). México D.F.: McGraw Hill Interamericana.
20. Lu, H., Howatt, D., Balakrishnan, A., Moorleghen, J., Rateri, D., Cassis, L., & Daugherty, A. (2015). Subcutaneous Angiotensin II Infusion using Osmotic Pumps Induces Aortic Aneurysms in Mice. *Journal of Visualized Experiments*, 103, pp.1-10.
21. Daugherty, A. & Cassis, L. (1999). Chronic angiotensin II infusion promotes atherogenesis in low density lipoprotein receptor *-/-* mice. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1, pp.108-118.
22. Daugherty, A., Manning, M. & Cassis, L. (2000). Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. *Journal of Clinical Investigation*, 11, pp.1605-1612

23. Daugherty, A., Rateri, D., Charo, I., Owens, A., Howatt, D. & Cassis, L.A. (2010). Angiotensin II infusion promotes ascending aortic aneurysms: attenuation by CCR2 deficiency in apoE^{-/-} mice. *Clinical Science*, 11, pp.681-689
24. Davis, F, et al. (2015). Smooth muscle cell deletion of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 augments angiotensin II-induced superior mesenteric arterial and ascending aortic aneurysms. *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology*, 1, pp.155-162.
25. Nussabaum, R., McInnes, R., & Willard, H. (2008). *Herramientas utilizadas por la genética molecular humana*. En Thompson & Thompson Genética en Medicina 7^o Edición (pp.50-53). Barcelona: Elsevier.
26. Rodriguez-Tarduchy, Gemma. (2014). *Retrotranscripción de RNA y PCR en tiempo real para transcripción génica*. En Manual del Servicio de Genómica (SPQ) del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (pp.11-14). Madrid.
27. Holland P., Abramson R., Watson R., & Gelfand D. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, pp.7276-7280.
28. Ballantyne, M., Pinel, K., Dakin, R., Vesey, A., Diver, L., Mackenzie, R., Garcia, R., Welsh, P., Sattar, N., & Hamilton, G. (2016). Smooth muscle enriched long noncoding RNA (SMIRL) regulates cell proliferation. *Circulation*, 133, pp.2050-2065.
29. Vigetti, D., Deleonibus, S., Moretto, P., Bowen, T., Fischer, J., Grandoch, M., oberhuber, A., Love, D., Hanover, J., & Cinquetti, R. (2014). Natural antisense transcript for hyaluronan synthase 2 (HAS-AS1) induces transcription of HAS2 via protein O-GlcNAcylation. *Journal of Biological Chemistry*, 289, pp.816-826.
30. Wang, H., Shen, Q., Zhang, X., Yang, C., Cui, S., Sun, Y., Wang, L., Fan, X., Xu, S. (2017). The long non-coding RNA XIST controls non-small cell lung cancer proliferation and invasion by modulating miR-186-5p. *Cellular physiology and biochemistry: International Journal of experimental cellular physiology, biochemistry and pharmacology*, 41, pp.2221-2229.
31. Song H., He, P., Shao, T., Li, Y., Li, J., Zhang, Y. (2017). Long non-coding RNA XIST functions as an oncogene colorectal cancer by targeting miR-132-3p. *Journal of BOUN: Official Journal of the Balkan Union of Oncology*, 22, pp.696-703.
32. Wei, W., Liu, Y., Lu, Y., Yang, B., Tang, L. (2017). LncRNA XIST promotes pancreatic cancer proliferation through miR-133a/EGFR. *Journal of cellular Biochemistry*, 118, pp.3349-3358.

Figuras 1 y 4. Poller, W., et al (2017). Non-coding RNAs in cardiovascular diseases: diagnostic and therapeutic perspectives. *European Hearth Journal*, 0, pp.1-20.

Figura 2. Ma, Y., et al (2015). Long-non-coding RNAs, a new important regulator of cardiovascular physiology and pathology. *International Journal of Cardiology*, 188, pp.105-110

Figuras 3, 5 y 6. Gomes, C., et al (2017). The function and therapeutic potential of long non-coding RNAs in Cardiovascular development and disease. *Molecular Therapy: Nucleic Acids*, 8, pp.494-507

Figuras 7 y 8. Duggirala, A., et al (2015). Non coding RNAs in aortic aneurysmal disease. *Frontiers in Genetics*, 6, pp.1-10

Figura 9. Mazidi, M., et al (Marzo 2017). Relationship between long noncoding RNAs and physiological risk factors of cardiovascular disease. *Journal of Clinical Lipidology*, 11, pp.617-623

Figura 10. Cardenas, C., et al (2018). An HDAC9-MALAT1-BRG1 complex mediates smooth muscle dysfunction in thoracic aortic aneurysm. *Nature communications*, 9, pp.1-14.

Figuras 11 y 13. Rodriguez-Tarduchy, Gemma. (2014). *Retrotranscripción de RNA y PCR en tiempo real para transcripción génica*. En Manual del Servicio de Genómica (SPQ) del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (pp.11-14). Madrid.

Figura 12. Nussbaum, R., McInnes, R., & Willard, H. (2008). *Herramientas utilizadas por la genética molecular humana*. En Thompson & Thompson Genética en Medicina 7^o Edición (p.53). Barcelona: Elsevier.

Tabla 1. Gomes, C., et al. (2017). The function and therapeutic potential of long non-coding RNAs in Cardiovascular development and disease. *Molecular Therapy: Nucleic Acids*, 8, pp.494-507

Tabla 2. Li, Y., et al. (2017). Non-coding RNA contribution to thoracic and abdominal aortic aneurysm disease development and progression. *Frontiers in Physiology*, 8, pp.1-14