



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**ROL DEL ARN NO CODIFICANTE PLAQUETARIO EN ENFERMEDADES  
CARDIOVASCULARES**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN  
TECNOLOGÍA MÉDICA**

**AUTORA: ANGELA DANIELA INZULZA TAPIA  
PROFESOR GUIA: MARCELO ALARCÓN LOZANO TM. PhD.**

**TALCA-CHILE  
Año 2020**

## CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2021

*No hay forma de expresar lo privilegiada que soy al tenerte como madre, eres y serás siempre la mejor. Gracias por todo, esto es para ti...*

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero agradecer al Profesor Marcelo Alarcón Lozano, por su apoyo, voluntad, paciencia, y motivación para sacar adelante esta memoria. A mi familia, especialmente a mi mamá de quien siempre tuve apoyo incondicional y una palabra de aliento cuando sentía que no podía más. A mi pequeña Trini, que me acompañó durante tantas noches de trabajo. A mis tíos, que desde la distancia me enviaban fuerzas para concluir de la mejor forma esta memoria. A mi pololo, con quien compartimos arduas horas de investigación y que me animó cada vez que fue necesario. A ellos y a quienes de alguna forma colaboraron en la realización de esta memoria, me declaro infinitamente agradecida.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. OBJETIVOS .....	3
3. METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA.....	4
4. MARCO TEÓRICO .....	5
1. ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES .....	5
1.1 Generalidades.....	5
1.2 Factores de riesgo .....	7
1.2.2 Factores de Riesgo Modificables .....	8
1.3 Aterosclerosis.....	10
1.4 Tipos de Enfermedades Cardiovasculares .....	12
1.4.1. Infarto Agudo de Miocardio .....	12
1.4.2 Insuficiencia Cardíaca.....	14
1.4.3 Accidente Cerebro Vascular .....	17
2. PLAQUETAS.....	21
2.1 Megacariopoyesis y Trombopoyesis .....	21
2.2 Características de las plaquetas.....	24
2.3 Estructura de las Plaquetas .....	25
2.4 Función Plaquetaria .....	29
2.4.1 Adhesión plaquetaria.....	29
2.4.2 Secreción plaquetaria .....	29
2.4.3 Agregación plaquetaria .....	30
2.5 Micropartículas Plaquetarias.....	32
2.6 Genoma Plaquetario.....	35
3. ARN NO CODIFICANTE PLAQUETARIO .....	39
3.1 Generalidades de los ARNnc.....	39
3.2 MicroARN .....	41
3.2.1 Generalidades .....	41
3.2.2 Biosíntesis .....	41
3.2.3 Función.....	44

3.2.4	Usó como biomarcador .....	45
3.3	ARN largo no codificante .....	46
3.3.1	Generalidades .....	46
3.3.2	Biosíntesis .....	47
3.3.3	Funciones .....	48
3.4	ARN Circular .....	52
3.4.1	Generalidades .....	52
3.4.2	Biosíntesis .....	52
3.4.3	Funciones .....	55
4.	RELACIÓN DE ARNnc CON ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES .....	58
4.1	Relación microARN con ECV .....	58
4.1.2	microARN en Infarto Agudo al Miocardio .....	60
4.1.2.1	miR-223 en IAM .....	60
4.1.2.2	miR-133a en IAM .....	61
4.1.2.3	miR-29a en IAM .....	62
4.1.3	microARN en Insuficiencia Cardíaca .....	63
4.1.3.1	miR-423 .....	63
4.1.3.2	miR-150 .....	63
4.1.3.3	miR-21 .....	64
4.1.4	microARN en Accidente Cerebro Vascular .....	65
4.1.4.1	miR-15a .....	65
4.1.4.2	miR-let-7b .....	65
4.1.4.3	miR-155 .....	66
4.2	Relación ARNlnc con ECV .....	66
4.2.1	ARNlnc en IAM .....	67
4.2.1.1	MIAT en IAM .....	67
4.2.1.2	MALAT1 en IAM .....	68
4.2.1.3	ZFAS1 en IAM .....	69
4.2.2	ARNlnc en IC .....	69
4.2.2.1	ANRIL en IC .....	69
4.2.2.2	HOTAIR en IC .....	70
4.2.3	ARNlnc en ACV .....	70
4.2.3.1	ANRIL en ACV .....	70
4.2.3.2	MALAT1 en ACV .....	71

4.2.3.3 MIAT en ACV .....	71
4.3 ARN circular en ECV .....	71
4.3.1 ARNcirc en IAM.....	72
4.3.1.1 MICRA en IAM .....	72
4.3.2 ARNcirc en IC.....	72
4.3.3 ARNcirc en ACV .....	73
4.3.3.1 circTLK1 en ACV .....	73
4.4 Propuesta.....	74
5. CONCLUSIÓN.....	75
6. REFERENCIAS.....	76

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1: Tasa de mortalidad de distintas causas entre los años 2010-2014..	6
Figura 2: Tipos de lesiones ateroscleróticas.	11
Figura 3: Defunciones y mortalidad por enfermedades isquémicas del corazón en Chile 1997-2015.	13
Figura 4. Tasa de incidencia de ingresos por insuficiencia cardiaca en población general según sexo, Chile 2014.	16
Figura 5. Auto reporte de ACV o trombosis cerebral según grupo de edad, ENS 2009-10 y 2016-17.	18
Figura 6. Esquemización de las enfermedades cardiovasculares más prevalentes en Chile y en el mundo.	20
Figura 7. Etapas de la megacariopoyesis y esquema de la trombopoyesis.	22
Figura 8. MicroARN y megacariocitopoyesis.	24
Tabla 1: Glicoproteínas de la membrana plaquetaria.	26
Figura 9. Proceso de Activación plaquetaria.	30
Figura 10. Formación de vesículas de desprendimiento.	33
Tabla 2: miRs plaquetarios más expresados y su función en las plaquetas.	38
Figura 11. Esquema de tipos de ARN.	40
Figura 12. Vía de biogénesis de microARN canónico (miR).	43
Figura 13. Función de microARN.	44
Figura 14. Ubicación genómica y contexto de ARNlncs.	48
Figura 15. Posibles modos de acción de ARNlncs: competidores, reclutadores y precursores.	49
Figura 16. . Clasificación de los ARNlncs mediante su mecanismo de acción.	51
Figura 17. Biosíntesis del ARN circular.	54
Figura 18. Funciones de los ARNcirc.	56
Figura 19: MicroARNs presentes en plaquetas	59
Tabla 3: MicroRNAs expresados en Plaquetas y ECV	60
Tabla 4: ARNlnc presentes en plaquetas y ECV	67
Figura 20: Resumen de la función de los ARNnc.	74



## RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) corresponden a la primera causa de muerte en Chile y en el mundo, donde dentro de las más prevalentes se encuentra el Infarto Agudo al Miocardio, Insuficiencia Cardíaca y Accidente Cerebrovascular. Considerando la disminución de hábitos saludables, diabetes y obesidad se estima que en 10 años casi 25 millones de personas morirán por esta causa. Existen mecanismos genéticos donde se ha estudiado con detención la transcriptómica con el fin de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas, para lo cual estos últimos años han aumentado las investigaciones de plaquetas, las cuales se relacionaron con procesos patológicos por su capacidad de interacción celular, liberación de moléculas como micropartículas (MP) o exosomas cuando ocurre la activación plaquetaria y regulación de diversas vías. Estas MP contienen una gran cantidad de ARN no codificante como microARN, ARN circular o ARN largo los cuales son heredados desde el megacariocito y se caracterizan por transferir su contenido a otros tipos de células, regulando así su expresión génica. Estos ARN no codificante corresponden al 98% de las transcripciones que no son traducidas a proteínas, por lo que antiguamente eran considerados elementos desecho del genoma. Hoy en día se sabe que tienen un papel crucial, ya que son importantes reguladores en la fisiología y la enfermedad, por lo que su alteración puede desencadenar alguna patología como las ECV. Los microARNs pueden unirse a la secuencia complementaria de su ARN mensajero objetivo, generando bloqueo de la traducción o su degradación. Los ARN largos desarrollan su función mediante distintos mecanismos de señalización, teniendo función reguladora por medio de la unión a factores de transcripción. Finalmente el ARN circular actúa como regulador de los microARN interfiriendo en su acción. Estos cumplen las características para ser un buen biomarcador por lo que se estudian como potencial terapéutico.

Palabras Claves: cardiovascular, microARN, ARNcirc, ARNInc, biomarcador.

# 1. INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud las enfermedades cardiovasculares constituyen un conjunto de entidades que afectan el corazón y los vasos sanguíneos. Cuando afecta los vasos sanguíneos puede comprometer órganos como el cerebro, los miembros inferiores, los riñones y el corazón. Son la principal causa de muerte en Chile y en el mundo, donde entre las más frecuentes se encuentran el Infarto Agudo al Miocardio (IAM) y accidente cerebrovascular.

Con el fin de prevenir estas enfermedades es fundamental reconocer los factores de riesgo que pueden conllevar a padecer alguna de estas patologías, entre los que se encuentran la edad, sexo, la historia familiar, tabaquismo, diabetes, sedentarismo, obesidad, entre otros. Es sabido que la patología de base de las enfermedades cardiovasculares es la aterosclerosis, una enfermedad inflamatoria que se caracteriza por la acumulación de lípidos, células inflamatorias y tejido fibroso en las arterias. La exposición a los factores ya mencionados desencadena mecanismos y procesos celulares y bioquímicos altamente complejos que permiten el crecimiento de la estría grasa mediante la atracción de determinados tipos de células formando el ateroma.

Esto se encuentra estrechamente relacionado a las plaquetas, debido a que una ruptura de dicho ateroma estimulará la agregación plaquetaria conduciendo a una trombosis, donde esta puede generar obstrucción total o parcial del lumen arterial, impidiendo la circulación correcta de la sangre y con ello el aporte necesario de oxígenos a los tejidos, teniendo como consecuencia la muerte celular o necrosis de los tejidos irrigados por la arteria ocluida.

Se ha demostrado que las plaquetas tienen ARNm heredado del proceso de megacariopoyesis, el que a su vez se encuentra regulado por los recientemente estudiados

ARN no codificantes, al cual cada vez más se le ha dado más importancia por sus implicancias y rol de regulador en distintas enfermedades, por ejemplo las cardiovasculares.

Entre los ARN no codificantes a los que se les atribuye este rol de regulador, se encuentran los micro ARN (miR), ARN largo (ARNlnc) y ARN circular (ARNcirc), a los cuales estudios demuestran su importante participación en el desarrollo de patologías cardiovasculares, por lo que en esta memoria se revisarán los aspectos más recientemente descubiertos acerca de la relación de estos “nuevos ARN” con la patogénesis de eventos cardiovasculares.

## 2. OBJETIVOS

**Objetivo General:** Explicar la función en enfermedades cardiovasculares del ARN no codificante plaquetario.

**Objetivos Específicos:**

1. Establecer la relación del ARN no codificante plaquetario con la patogénesis de enfermedades cardiovasculares como Infarto Agudo de Miocardio, Insuficiencia Cardíaca y Accidente Cerebro Vascular.
2. Identificar los últimos avances acerca del mecanismo patológico del ARN no codificante plaquetario que conduce a las enfermedades cardiovasculares como Infarto Agudo de Miocardio, Insuficiencia Cardíaca y Accidente Cerebro Vascular.

### **3. METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA**

En esta revisión bibliográfica se investigó sobre el Rol de ARN no codificante Plaquetario en Enfermedades Cardiovasculares, para lo cual se consultó en diversas revistas con el fin de que la información recopilada sea fidedigna y de calidad, por lo que se ingresó en las siguientes bases de datos: Scopus, Web of Science, Scielo y PubMed, donde se realizaron búsquedas como ARNnc AND platelets, ARNnc AND cardiovascular diseases, microRNA AND platelets, lARNnc AND cardiovascular diseases, circRNA AND cardiovascular, etc. Esto se hizo con el objetivo de revisar las publicaciones e investigaciones relacionadas con el tema anteriormente mencionado, durante los últimos 20 años.

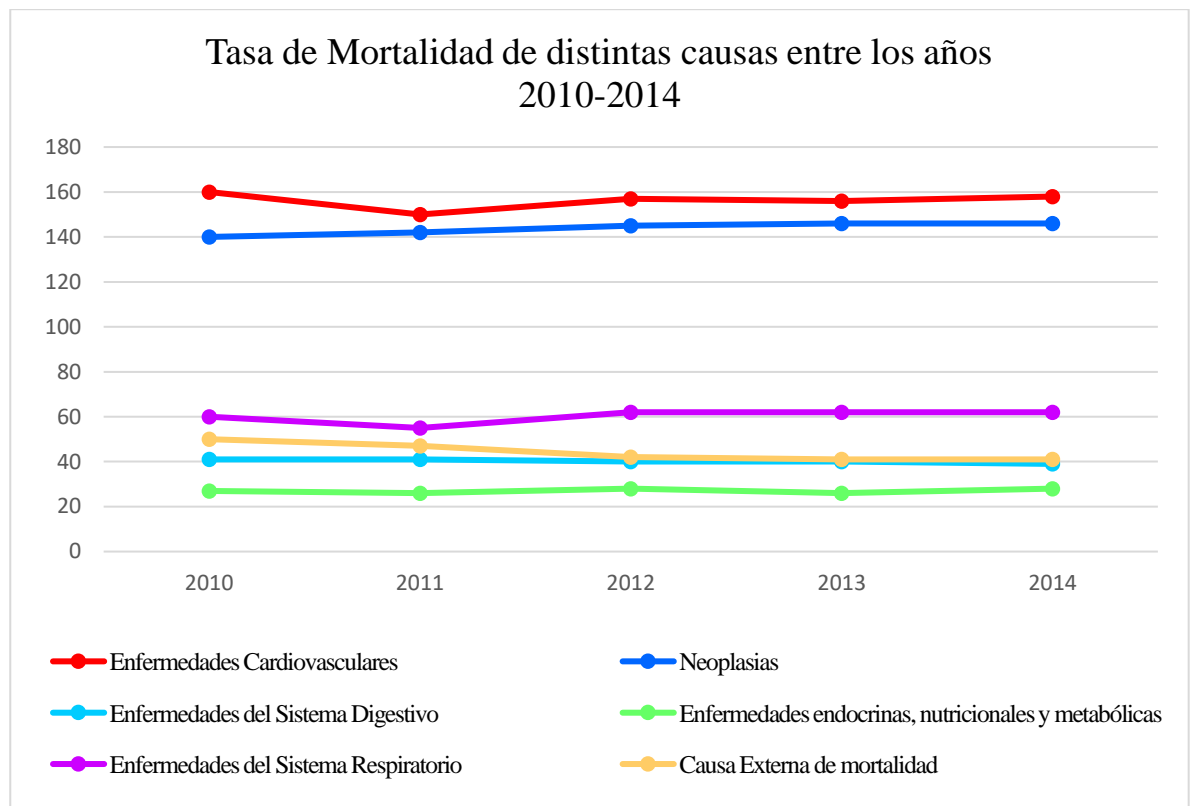
## **4. MARCO TEÓRICO**

### **1. ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES**

#### **1.1 Generalidades**

Actualmente ha quedado en evidencia un considerable aumento en la prevalencia de las enfermedades crónicas no transmisibles, especialmente de las patologías cardiovasculares. La enfermedad cardiovascular es un término amplio para caracterizar problemas en el corazón y los vasos sanguíneos (1).

La Organización Panamericana de la Salud, define que las Enfermedades Cardiovasculares (ECV) son la primera causa de la muerte a nivel mundial, donde se reporta que 17,5 millones de personas murieron de ECV en 2005, representando un 30% de todas las defunciones. De estas defunciones, unos 7,6 millones se debieron a cardiopatía coronaria y 5,7 millones se debieron accidente cerebrovascular. Más del 80% de muertes debidas a ECV tienen lugar en los países de ingresos bajos y medianos y ocurren casi por igual en los hombres y las mujeres (2). En Chile, en el año 2014 correspondieron al 27,53% del total de defunciones (28.064 defunciones, tasa 157,49/100.000), de las cuales 8.603 fueron ocasionadas por ataque cerebrovascular y 8.102 por infarto agudo al miocardio (Figura 1) (3).



**Figura 1: Tasa de mortalidad de distintas causas entre los años 2010-2014.** Se observa que entre distintos tipos de enfermedades, son las ECV las que se asocian a mayor tasa de muerte en Chile. Tomado y adaptado de MINSAL, 2017 (3).

Según la Organización Mundial de Salud (OMS) de aquí a 2030 aproximadamente 23,6 millones de personas morirán por alguna enfermedad cardiovascular, principalmente por cardiopatías y accidentes cerebrovasculares (4). Es por ello que se prevé que éstas continuarán siendo la principal causa de muerte a nivel mundial (2) ya que este tipo de enfermedades se ven incrementadas por el aumento del sedentarismo y otras conductas de riesgo a las que está expuesta la población.

Dentro de los posibles mecanismos que están asociados a ECV, se encuentran los genéticos y no genéticos. En los mecanismos genéticos se ha estudiado la importancia de la transcriptómica, la que se ha analizado como una gran opción para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas y búsqueda de nuevos biomarcadores de la enfermedad (5). Con estos avances se ha descubierto que moléculas de ARN tienen numerosas funciones en procesos

biológicos como el inicio y la progresión de enfermedades cardiovasculares, por lo que mediante tecnología de secuenciación desde inicios de la década del 2000, específicamente los ARN no codificantes (ARNnc) como los microARN (miR), los ARN largos no codificantes (ARNlnc) y los ARN circulares (ARNcirc) se han evaluado como posibles objetivos terapéuticos frente a este tipo de enfermedades (6).

En cuanto a los mecanismos no genéticos, estos corresponden a los factores de riesgo clásicos o más conocidos, los cuales serán desarrollados a continuación.

## **1.2 Factores de riesgo**

El riesgo cardiovascular se define como la probabilidad de padecer un evento cardiovascular en un determinado periodo de tiempo, que habitualmente se establece en entre 5 y 10 años (7). Es por ello que es conveniente para establecer las prioridades en la prevención de éstas evaluar y estimar los factores de riesgo a los que se está expuesto, con el fin de tomar conciencia acerca de los hábitos de la población.

Se describe como factor de riesgo cardiovascular (FRCV) a una característica biológica, hábito o estilo de vida que aumenta la probabilidad de padecer o morir por una enfermedad cardiovascular. Al definirse como probabilidad, la ausencia de factores de riesgo no impide la posibilidad que padecer una ECV en el futuro y la presencia de ellos tampoco hace referencia a su aparición (8).

Los principales FRCV se clasifican en 2 grupos: modificables o no modificables. Los factores de riesgo modificables son aquellos de mayor interés, puesto que en ellos se debe actuar de forma preventiva, ya que pueden ser modificados o eliminados. Estos corresponden a hipertensión arterial, dislipidemias, obesidad, diabetes mellitus, tabaquismo, sedentarismo y el estrés. Por otra parte, los no modificables son la edad, sexo y herencia genética (9). Es



importante que los factores modificables pueden generar la aparición de otros FRCV, especialmente relacionados a los hábitos de vida, como alimentarios, actividad física, etc. Ambos grupos de FRCV serán descritos a continuación.

### **1.2.1 Factores de Riesgo No Modificables**

El riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares aumenta con la edad puesto que a medida que avanza el tiempo las personas presentan más factores de riesgo, afectando principalmente a hombres de 55 y mujeres de 65 años. Además de la edad, se sabe que los hombres presentan mayor riesgo que las mujeres de desarrollar ECV, hasta que ellas llegan a la menopausia, donde se iguala la probabilidad. Finalmente la existencia de antecedentes familiares de ECV incrementa el hecho de desarrollarlas (10, 11).

### **1.2.2 Factores de Riesgo Modificables**

Dentro de los factores de riesgo modificables se encuentra la Hipertensión arterial, la cual es considerada como el principal FRCV en patologías como Infarto agudo al miocardio y en enfermedades cerebrovasculares, asociándose a ellos en aproximadamente en 60 y 77% de los casos respectivamente (12). En este caso, existe una mayor resistencia para el corazón, el cual con el fin de compensar aumenta su masa muscular para sobrellevar ese sobreesfuerzo, generando aumento de la masa muscular, pero no aumento del riesgo sanguíneo (13). Puede ser tener origen primario, es decir de causa desconocida o secundario, donde es condicionada por otros trastornos, donde pueden influir el sobrepeso, tabaquismo, sedentarismo, etc. (12).

Otro importante factor de riesgo implicado en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares es la Diabetes Mellitus o Diabetes tipo II, donde la glucosa se acumula en la sangre, causando hiperglicemia, daña progresivamente los vasos sanguíneos (arterias y venas) y acelera el proceso de arteriosclerosis aumentando el riesgo de padecer una

enfermedad cardiovascular. En este caso, por lo que el 80 % de las personas con diabetes fallecen por enfermedad cardiovascular y también la calidad de vida puede quedar seriamente deteriorada por complicaciones como amputaciones de miembros (14). Está demostrado que el riesgo vascular es más elevado en los pacientes con esta enfermedad que en individuos que no la presentan, teniendo un riesgo de padecer eventos cardiovasculares de 2 a 5 veces mayor que la población general (15).

La suma de factores como hipertensión, diabetes, dislipidemia y obesidad genera el síndrome metabólico (14). Existen diversas investigaciones metabólicas que demuestran que la distribución regional del tejido adiposo es el principal factor que explica la relación entre adiposidad y riesgo cardiometabólico. Las características asociadas con el exceso de grasa incluyen los factores mencionados con anterioridad como diabetes, hipertensión, etc., las que son observadas en pacientes con obesidad (16).

Relacionado a ellos también se encuentra la inactividad física, responsable del 5,5% de las muertes en el mundo y el 10% en Europa, atribuyéndosele un 10% de las causas de enfermedades cardiovasculares (17). Es por ello que se considera uno de los mayores factores de riesgo en el desarrollo de enfermedades cardíacas, donde una persona sedentaria tiene más riesgo de sufrir aterosclerosis e hipertensión.

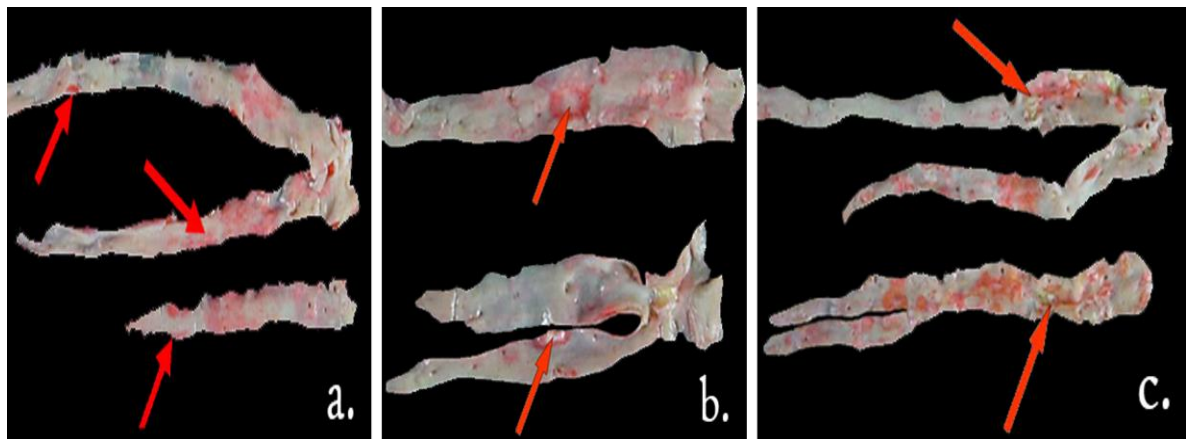
Finalmente, otro de los factores de riesgo altamente relacionados a enfermedades cardiovasculares es el tabaquismo. Los fumadores tienen tres veces más riesgo de sufrir una enfermedad cardiovascular que el resto de la población. Se dice que la posibilidad de padecer una enfermedad de corazón es proporcional a la cantidad de cigarrillos fumados al día y al número de años en los que se mantiene este hábito nocivo. En este caso, hay dos factores por los que el tabaco puede producir una isquemia coronaria, como lo es la nicotina y el monóxido de carbono (18).

La suma de los factores no modificables más los malos hábitos de vida, pueden conducir al proceso de aterosclerosis donde se genera el endurecimiento y estrechamiento de las arterias, teniendo como consecuencia el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

### **1.3 Aterosclerosis**

Se denomina aterosclerosis, al proceso responsable del engrosamiento y la pérdida de elasticidad de las paredes arteriales que afecta a mediano y grandes vasos, siendo causante de enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares (19). Es un proceso inflamatorio crónico que se inicia en la infancia y se desarrolla a lo largo de los años de forma asintomática en la mayoría de los casos. Se caracteriza por la retención, oxidación y modificación de lípidos en formas de estrías en las paredes arteriales que luego de una serie de procesos evolucionan a placas fibrosas, produciendo engrosamiento de la pared de la arteria afectada, disminuyendo así su diámetro. Si estas placas se rompen generan trombosis y oclusión aguda parcial o total de la arteria (20). La lesión que se produce se denomina ateroma, placa ateromatosa o placa fibrograsa, compuesta por colesterol y lípidos que se acumulan en el centro (Figura 2). Esto se encuentra cubierto por una placa fibrosa, por lo que aumenta el volumen y tamaño hacia la luz arterial. En un comienzo estas placas se encuentran en lugares determinados de la arteria, pero a medida que progresa se hace más numerosa ocupando grandes espacios, ocluyendo así la luz arterial (21).

Los mecanismos genéticos y no genéticos se encuentran estrechamente relacionados, donde el estudio de los microARN ha permitido que se les relacionen con muchos de los procesos o mecanismos básicos, implicados en el desarrollo de arteriosclerosis. Así, se ha demostrado que los miR funcionan como controladores clave de la expresión génica, y por lo tanto, de la funcionalidad de los diferentes tipos celulares implicados en la arteriosclerosis. Además, se han implicado en el control de procesos tales como la inflamación, el metabolismo cardíaco y lipoproteico, la biosíntesis y captación de colesterol, el remodelaje cardíaco, la disfunción endotelial, la angiogénesis o en la diferenciación, migración y proliferación celular (22).



**Figura 2: Tipos de lesiones ateroscleróticas.** En la imagen **A.** corresponde a una estría adiposa, compuesta por depósitos planos, blanco-amarillos, pequeños, que, con el paso del tiempo y la evolución de la enfermedad, pueden coincidir, formando estrías alargadas de aproximadamente 1 cm de longitud. La imagen **B.** corresponde a una placa fibrosa una lesión firme debido a la presencia del casco fibroso, de color blanco- amarillento, brillante y traslúcido, que protruye en la superficie intimal, llegando hasta 1,5 cm de diámetro. La **c.** corresponde a una placa complicada, que siempre presenta calcificaciones, por lo que hace a la arteria frágil. Esta lesión puede sufrir diferentes complicaciones como roturas focales, ulceraciones, trombosis, hemorragias, etc. Tanto la placa fibrosa como la placa complicada pueden estar relacionadas con eventos clínicos agudos como el infarto de miocardio, la enfermedad cerebrovascular e isquemia de miembros inferiores. Tomado de Hernández Y., 2016 (21).

La ruptura de la placa aterosclerótica desencadena en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, donde dentro de las más prevalentes y con mayor mortalidad se encuentran el infarto agudo de miocardio, insuficiencia cardiaca y accidentes cerebrovasculares (19). De estas enfermedades, se destacan una gran variedad de miR implicados en este tipo de patologías, dado que estos se expresan en cardiomiocitos, fibroblastos, células endoteliales y células vasculares musculares lisas, donde controlan prácticamente todos los aspectos de la biología del sistema cardiovascular, incluyendo el remodelado y la fibrosis cardiaca, la apoptosis, la inflamación, la proliferación, la angiogénesis y el metabolismo. Respecto a esto, se ha demostrado que diversos miR se sobre expresan o reprimen, por ejemplo miR-1, miR-126, miR-133a o miR-208a (23). En el caso de los ARN largos, algunos de los que participan en estas enfermedades son HOTAIR, MALAT-1, ANRIL, MIAT, entre otros (24). Además, los últimamente estudiados ARN circulares que se han visto involucrados son HRCR, ciRS-7, circ-Foxo3, CANRIL, entre otros (25).

## **1.4 Tipos de Enfermedades Cardiovasculares**

### **1.4.1. Infarto Agudo de Miocardio**

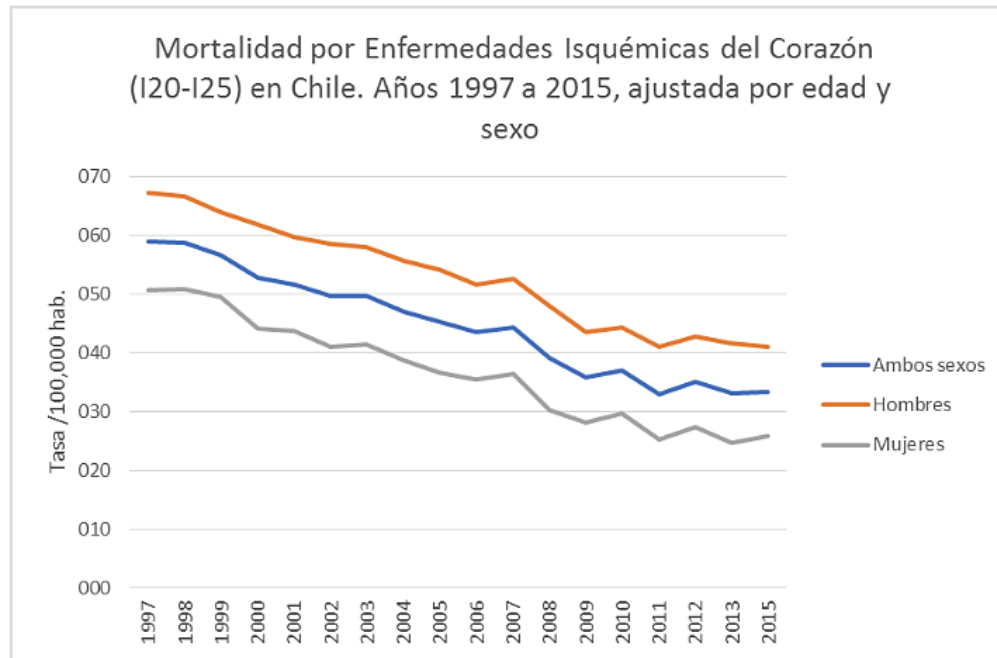
El Infarto Agudo de Miocardio (IAM) es una de las patologías con mayor prevalencia en la actualidad, donde según los datos del año 2015 de la Sociedad Americana del Corazón (AHA), los centros de control y prevención de enfermedades y los Institutos Nacionales de Salud la prevalencia de infarto agudo de miocardio en hombres de Estados Unidos se encuentra entre 11,3% - 17,3% en pacientes mayores de 60 años y entre 4,2% y 8,9% en mujeres del mismo grupo etario (26).

Se estima que en Estados Unidos pueden ocurrir 175.000 casos por IAM silentes cada año, donde la incidencia anual es de 565.000 nuevos eventos y 300.000 ataques recurrentes cada año según datos del NHLBI (Instituto Nacional de Sangre, Corazón y Pulmón). El promedio para el primer IAM es 65,8 años en los hombres y 70,4 años en las mujeres (27). Según las estadísticas de mortalidad, en Estados Unidos este tipo de enfermedad cardiaca constituye el mayor asesino individual de hombres y mujeres, donde cada 29 segundos un norteamericano sufre un evento coronario agudo (28).

Según el estudio “Incidencia y letalidad por infarto agudo de miocardio en Chile: 2001-2007” Chile presentó tasas de incidencia de IAM menores a otros países (Figura 3), siendo mayor en hombres y aumentando progresivamente con la edad debido al progresivo envejecimiento de la población chilena, por lo que también se espera un aumento de casos en las próximas décadas (29).

En Chile corresponde a aproximadamente un 8% de las muertes, afectando principalmente a los hombres a partir de los 45 años y a mujeres desde los 60. De los pacientes que presentan

IAM, un tercio muere antes de poder recibir atención médica y durante la hospitalización 10-15% adicional fallece por disfunción ventricular (30).



**Figura 3: Defunciones y mortalidad por enfermedades isquémicas del corazón en Chile 1997-2015.** Se observa disminución en la tasa de mortalidad causada por enfermedades isquémicas en Chile hasta el año 2015, destacándose la mayor cantidad de pacientes varones que mujeres. Tomado de Ministerio de Salud, 2015 (31).

IAM es un evento de necrosis miocárdica causado por una obstrucción coronaria sostenida que es secundaria a un síndrome isquémico inestable (32). Comúnmente para que se inicie un IAM, es necesaria la ruptura de la placa ateromatosa, la cual expulsa al torrente sanguíneo material lipídico y componentes trombogénicos. Un trombo de oclusión total conduce típicamente a un infarto de miocardio con elevación del segmento ST. La oclusión parcial, o la oclusión en presencia de circulación colateral, resulta en angina inestable o infarto sin elevación del segmento ST (33).

Durante los últimos años, los métodos terapéuticos como intervención coronaria, cirugía de revascularización coronaria y los medicamentos, han mejorado el pronóstico del IAM, pero a pesar de ello su mortalidad sigue siendo alta, por lo que es fundamental comenzar de

forma temprana la identificación y estratificación del riesgo de IAM, acelerando así la intervención temprana. Los avances en el estudio del genoma han permitido el descubrimiento de nuevos biomarcadores clínicos para el IAM, como lo son los ARNnc (34).

Uno de los ARNnc estudiados en enfermedades cardiovasculares son los miRNA circulantes, descritos como marcadores específicos de la enfermedad, por lo tanto útiles para el diagnóstico de IAM (35). Es sabido que miR-34, específicamente miR-34a encuentra aumentado en células cardíacas después de IAM. Este exacerba la progresión de la fibrosis cardíaca, lo que sugiere que la inhibición de miR-34a podría ser una estrategia prometedora para tratar la fibrosis cardíaca (36). También se ha demostrado que miR-1 es un regulador importante de la adaptación cardíaca después de la isquemia o el estrés isquémico y está regulado por aumento en el miocardio remoto de pacientes con infarto de miocardio. Este microARN está regulado negativamente en el tejido con infarto de miocardio en comparación con el tejido cardíaco sano, por lo que los niveles plasmáticos de miR-1 pueden usarse como biomarcadores sensibles para el infarto de miocardio (37).

Estudios demuestran que miR-499 circulante es un nuevo biomarcador temprano para identificar el infarto de miocardio perioperatorio en la cirugía cardíaca, donde el aumento de los niveles de miR-499 enriquecido con cardio refleja el daño miocárdico y se asocia con un mal pronóstico a largo plazo debido a la función sistólica reducida y al riesgo de muerte o insuficiencia cardíaca (38). La importancia de estos biomarcadores radica en que si se detecta de forma temprana se generaría una reducción en la mortalidad y casos nuevos de IAM. Además, este tipo de enfermedad se puede agravar conduciendo a una Insuficiencia cardíaca.

#### **1.4.2 Insuficiencia Cardíaca**

Una de las enfermedades cardiovasculares que presenta mayores tasas de hospitalización en los adultos mayores de 65 años es la Insuficiencia Cardíaca (IC), estando presente en aproximadamente el 10% de los mayores de 70 años. Es una afección que aumenta con la

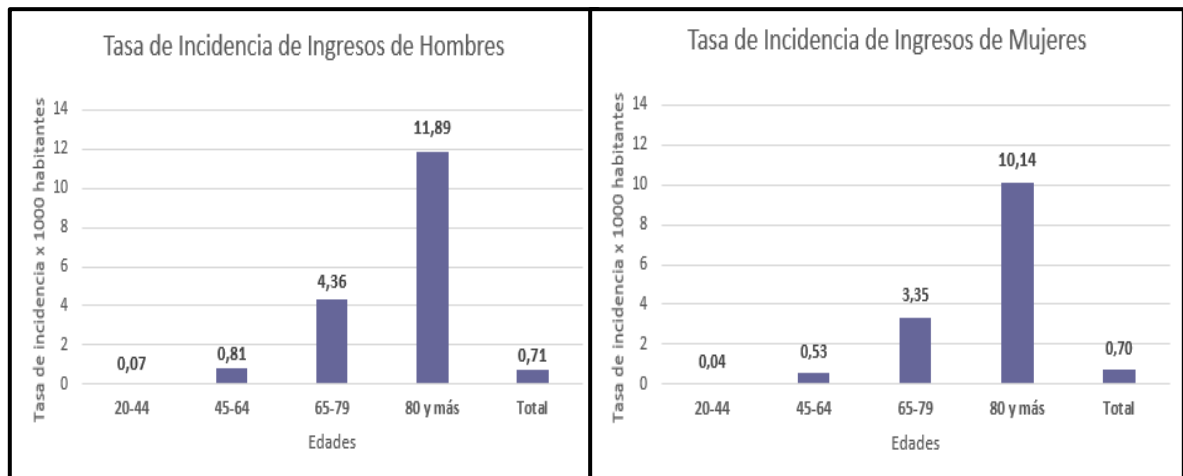
edad, alcanzando el 1% al año en sujetos mayores de 65 años (39). A pesar de los avances terapéuticos logrados, la IC tiene un mal pronóstico alcanzando una mortalidad hospitalaria entre el 4 y 7%, mortalidad a los 60 a 90 días entre 7 y 11% y tasa de re hospitalizaciones a los 60 a 90 días entre 25-30% (40). Tiene supervivencia de alrededor del 50% a los 5 años de su diagnóstico, por lo que es la 3° causa de muerte cardiovascular en países como España. En el año 2000 fue responsable de la muerte del 4% de los hombres y del 10% de todas las muertes cardiovasculares (39). Registros internacionales indican que la prevalencia en la población general es de 3% y se espera que para el año 2030 aumente a 4,5% (41). Por otra parte, esta no es una enfermedad única del adulto mayor, ya que también puede presentarse en pacientes pediátricos, en los cuales si se diagnostica oportunamente se puede lograr una sobrevivencia de 90% a más de 10 años, pero si no se opera un alto porcentaje fallece antes de 1 año, lo que subraya la importancia del diagnóstico de IC de forma temprana (42).

En Chile no se disponen de cifras oficiales de casos asociados a IC, pero basado en cifras internacionales se estima que la prevalencia aumenta a un 3% de la población, siendo también la principal causa de hospitalizaciones en servicios de medicina interna en mayores de 65 años (43). Según el estudio “Incidencia y letalidad intrahospitalaria por insuficiencia cardiaca en Chile: ¿Existen diferencias por sexo?” la incidencia es mayor en hombres, aumentando de forma significativa con la edad, pero la prevalencia de hospitalizaciones es más elevada en mujeres. Si bien muchos estudios han mostrado que esta enfermedad afecta preferentemente a los hombres existe evidencia que la prevalencia e incidencia aumenta en mujeres a medida que estas envejecen (Figura 4) (41).

La insuficiencia cardiaca se define como una patología en la cual el corazón es incapaz de bombear suficiente sangre oxigenada al cuerpo, interfiriendo con el normal funcionamiento sistémico (44), donde una de las causas más frecuentes es el IAM (45). En este caso se encuentra la función sistólica del ventrículo izquierdo disminuida, una función diastólica anormal o una combinación de ambas. La disfunción sistólica puede ser secundaria a necrosis muscular (infarto miocárdico) o a disminución de la función contráctil del miocardio (46). Luego del infarto, el ventrículo se dilata, aumenta de tamaño, por lo que disminuye la fuerza



que realiza en cada latido cardiaco. Es por ello, que la parte viva del ventrículo, tendrá dificultad para realizar su trabajo, y cuando sea incapaz de hacerlo se produce la insuficiencia cardiaca (45). Se puede clasificar según la capacidad funcional y dependiendo del tipo y magnitud del compromiso clínico y hemodinámico (47).



**Figura 4. Tasa de incidencia de ingresos por insuficiencia cardiaca en población general según sexo, Chile 2014.** La tasa de incidencia de ingresos por IC en población general fue de 0,71 x 1.000 habitantes para los hombres y 0,70 x 1.000 habitantes para las mujeres. En ambos grupos la mayor tasa de ingresos se registró en los pacientes de 80 años y más. Tomado y adaptado de Díaz y cols., 2017 (41).

Durante la aparición de la enfermedad se activan una serie de mecanismos compensatorios, los cuales resultan ser contraproducentes para la función cardiaca, como remodelación morfológica, estructural y funcional de los tejidos cardiacos. Esto conlleva una serie de cambios incluyendo alteración en los perfiles de miRNA, los cuales han despertado el interés científico en las áreas de la cardiología y la biomedicina en general por su potencial en la práctica clínica. Por lo que mediante estudios se ha encontrado cambios en la expresión de miR específicos y la re expresión de miR fetales involucrados en muchos de los procesos aberrantes que caracterizan la enfermedad miocárdica en pacientes adultos. Es por ello que se ha investigado el papel de miR-499, miR-208a, miR-30e, miR-133a, entre otros como respuesta a la IC (44).

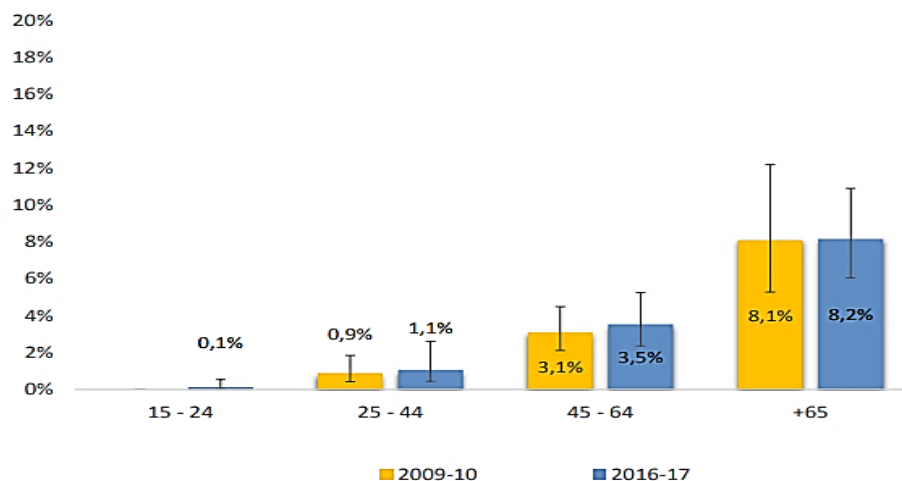
### 1.4.3 Accidente Cerebro Vascular

Una de las principales causas de muerte de discapacidad permanente es el Accidente Cerebro Vascular (ACV) (48). Los nuevos casos de ACV han ido al alza los últimos 20 años y se prevé que aumente aún más con el incremento de la esperanza de vida y la incidencia de factores de riesgo modificables (49). Según el estudio “Epidemiológica del ataque cerebro vascular en un hospital universitario”(50) el factor de riesgo más prevalente es hipertensión arterial junto a la edad, el cual coincide con distintos estudios al que fue comparado, lo que se vinculó con el aumento de cifras de presión arterial hasta dos tercios de los ACV en dicho país.

Se estima que el 25% de los ACV ocurren en personas en edad laboral en personas de altos ingresos y el 10% en personas de 50 años o menos. Además, se observa un aumento de casos en personas de corta edad desde 1980 hasta la actualidad (49). Se estima que el riesgo global de accidente cerebrovascular desde los 25 años es de 24,9% en hombres y 25,1% en mujeres (51). Se proyecta que para el año 2030 ACV seguirá siendo la segunda causa más alta de mortalidad en el mundo y una de las principales causas de carga de enfermedad. Actualmente existen aproximadamente 62 millones de sobrevivientes de ACV en el mundo, de los cuales 30 millones dependen de otros para actividades cotidianas, y otros 20 millones con discapacidad grave o que requieren institucionalización (52).

En Chile, ACV es la principal causa de muerte, con 9.004 fallecidos el año 2013, lo que corresponde a una persona por hora. Se cree que anualmente hay 24.964 casos nuevos, por lo que hoy en día en Chile hay 69 casos cada día. Además, es la segunda causa de mortalidad prematura en Chile y la primera causa específica de años de vida saludables perdidos por discapacidad y muerte prematura (AVISA) en mayores de 74 años (Figura 5), constituyéndose como un problema crítico de Salud Pública (33).

**Autoreporte de ACV o trombosis cerebral según grupo de edad.  
ENS 2009-10 y 2016-17**



**Figura 5. Auto reporte de ACV o trombosis cerebral según grupo de edad, ENS 2009-10 y 2016-17.** Se observa el aumento en el número de casos en personas mayores de 65 años tanto en la Encuesta Nacional de Salud (ENS) 2009-10 y en 2016-17. Tomado de MINSAL, 2017 (53).

Un ataque cerebro vascular es una emergencia médica, que ocurre cuando se interrumpe el suministro de sangre al cerebro, lo que se denomina accidente cerebro vascular isquémico o cuando es originado por una ruptura de un vaso sanguíneo, ocasionando un sangrado en el cerebro (accidente cerebrovascular hemorrágico). Puede ocurrirle a cualquier persona y de un momento a otro, independiente de su edad, sexo o raza. No obstante, existen factores de riesgo que hacen aumentar la probabilidad de padecerlo (54). La mayoría de los accidentes cerebrovasculares son del tipo isquémico, donde las células del cerebro comienzan a morir debido a la falta de oxígeno. A consecuencia de ello, puede sobrevenir la muerte o una discapacidad permanente (55).

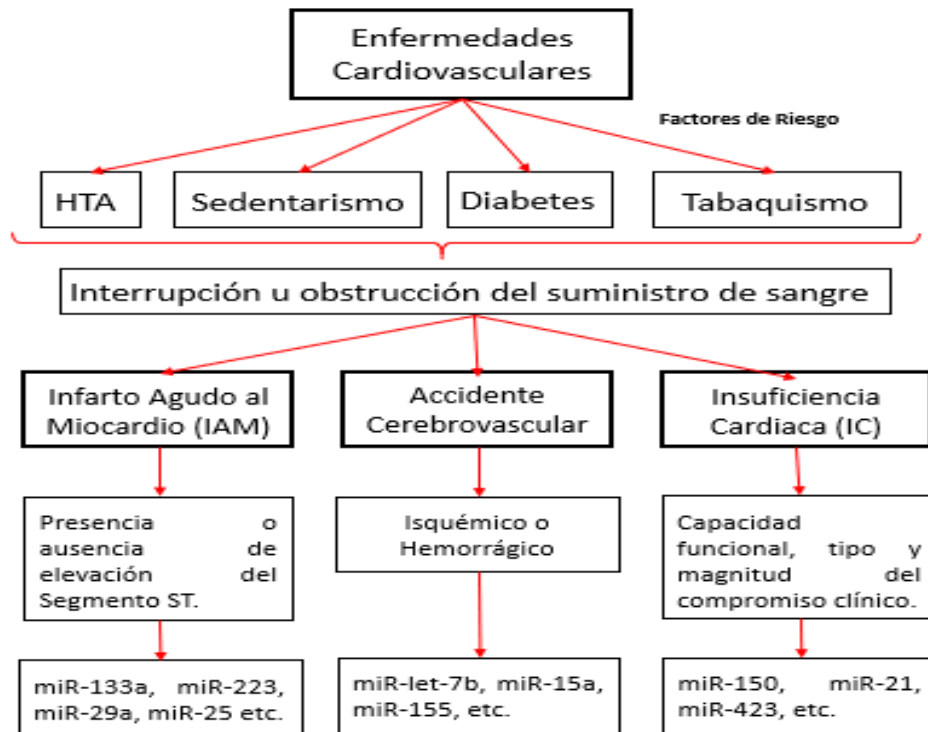
Se señala que la incidencia de ACV isquémico en pacientes que han sufrido un IAM oscila entre 0,84%-1,14%. Los factores de riesgo más relacionados entre ambos eventos son edad avanzada, extensión del infarto y ubicación en pared anterior. Se recomienda que los pacientes que han sufrido de IAM, deberían ser informados sobre el riesgo de presentar un evento cardiovascular posteriormente, con el fin de que adopten un estilo de vida y control

cardiovascular para disminuir la probabilidad de padecer un ACV, además de conocer los síntomas característicos de este, y así acudir de forma oportuna a un servicio de salud (56).

A pesar de las terapias y tratamientos que existen en la actualidad, la necrosis neuronal posterior al ACV prácticamente inevitable, por lo que una cura para esta enfermedad se encuentra limitada hasta la fecha, siendo un gran desafío clínico. Es por ello que se han realizado variadas investigaciones con el fin de lograr la efectividad total de tratamiento, donde se ha reportado que en el cerebro isquémico más del 20% de los genes miR se encuentran alterados, por lo cual se sugiere que podrían ser mediadores de accidente cerebrovascular isquémico (58).

Algunos miR implicados en la patogénesis del ACV son miR-223, miR-125b, miR-101, etc., y otros que aumentan o disminuyen luego de un ACV, como miR-125b-2, miR-27a, miR-422a, miR-488, miR-627 y miR-30a, miR-126 respectivamente (57).

Por lo tanto, como se ha abordado en este capítulo, las enfermedades cardiovasculares representan la principal causa de muerte en todo el mundo, tendiendo al aumento puesto que cada vez los hábitos de vida saludable como alimentación, actividad física, no fumar y beber alcohol, etc., son más ignorados por la sociedad generando así enfermedades como IAM, ACV o IC (Figura 6). A pesar de que en la actualidad existen tratamientos para ellas, no son lo suficientemente efectivos, por lo que se están generando avances en transcriptómica para lograr una detección oportuna y efectiva, mediante la investigación de los ARNnc, donde los más estudiados son los microARN.



**Figura 6. Esquematización de las enfermedades cardiovasculares más prevalentes en Chile y en el mundo.** Principales enfermedades cardiovasculares junto a los factores de riesgo más frecuentes desencadenantes de estas patologías. Además, se indica la clasificación de cada una y algunos microARNs involucrados en el desarrollo de estas enfermedades. Inzulza, A. (2020)

Hace años se comenzó a investigar la relación de las plaquetas en procesos patológicos como ECV debido a su capacidad de establecer interacciones intercelulares y con moléculas de matriz extracelular, liberación de moléculas bioactivas y regulación de diversas vías de señalización (58), además de los avances generados con el transcriptoma plaquetario y los ARN no codificantes involucrados.

## 2. PLAQUETAS

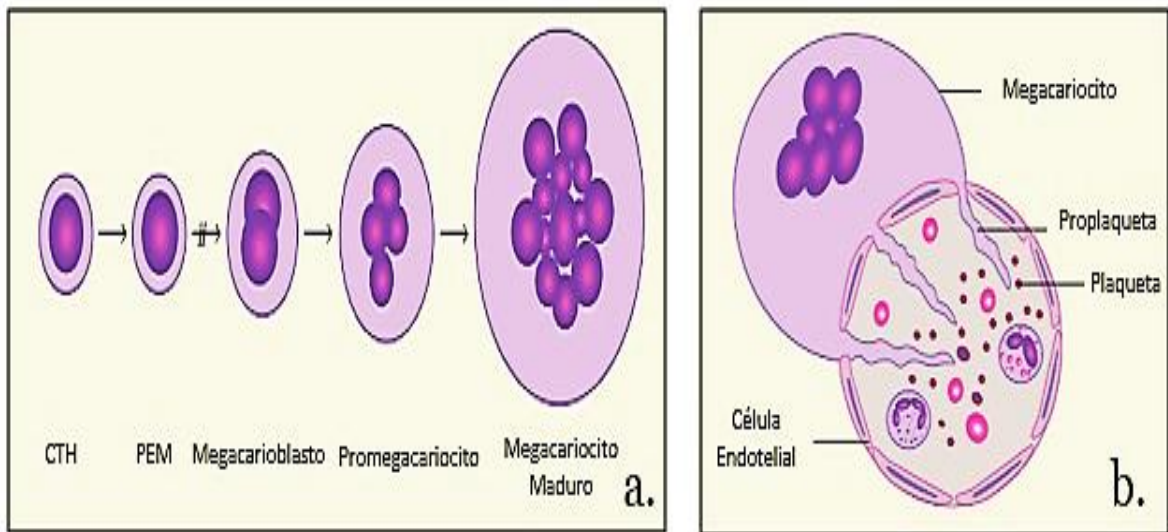
### 2.1 Megacariopoyesis y Trombopoyesis

Se define como megacariopoyesis al proceso de diferenciación de la línea megacariocítica, proceso que se lleva a cabo en médula ósea, y también en el pulmón, durando entre 5 – 7 días (59). Los megacariocitos se derivan de células madre hematopoyéticas CD34+ pluripotentes (HSC) que dan lugar a progenitores mieloides comunes (CMP) y de ellos se diferenciarán en células progenitoras megacariocito-eritroide (MEP), para luego seguir con los Unidades formadoras de colonias de megacariocitos (CFU-MK) y comenzar con la diferenciación de células precursoras (60). Estos progenitores se dividen por endomitosis, proceso mediante el cual las células replican su ADN sin completar la división celular, ya que es sin cariocinesis ni citocinesis, por lo que se forman células de gran tamaño y con núcleo poliploide, proceso necesario para la acumulación de citoplasma y así poder liberar una adecuada cantidad de plaquetas en un futuro (59).

Luego sigue madurando para convertirse en promegacarioblastos que son células diploides (2N), para luego formar megacarioblasto o también llamado megacariocito I, posteriormente promegacariocito (megacariocito II), que madura en megacariocito granular o megacariocito III, para finalmente llegar al megacariocito maduro o IV, la célula más grande de la médula ósea ya que mide 50-80  $\mu\text{m}$ , presenta núcleo multilobulado y poliploide, citoplasma acidófilo y presencia de gránulos citoplasmáticos (Figura 7A) (59, 61).

Luego de la maduración del megacariocito surge la trombopoyesis, un proceso que hace referencia a la liberación de plaquetas al torrente sanguíneo. En esta etapa, se reorganiza el citoesqueleto y se forman largas prolongaciones de citoplasma denominadas proplaquetas, las cuales al fragmentarse desprenden plaquetas maduras (Figura 7B) (62). Este proceso se

completa en pocas horas, donde prácticamente todo el citoplasma se convierte en plaquetas, liberando así entre 1000-5000 plaquetas por megacariocito (63).



**Figura 7. Etapas de la megacariopoyesis y esquema de la trombopoyesis.** **A.** La célula troncal hematopoyética (CTH) da origen al progenitor mieloide común (no ilustrado) y este origina al progenitor eritroide-megacariocítico (PEM), posteriormente hay la formación de unidades formadoras de colonias de megacariocitos (no ilustrado) y empezará la diferenciación de las células precursoras. El megacarioblasto inicia la endomitosis y tiene un núcleo bilobulado, el promegacariocito continúa con la endomitosis y tiene varios lóbulos (4 a 8N) y por último el megacariocito maduro que puede llegar a 64N y tiene gran cantidad de citoplasma. **B.** Se observa un megacariocito extendiendo sus proplaquetas hacia el interior de un sinusoides. El flujo sanguíneo ayuda a desprender a las plaquetas de las proplaquetas y terminar su liberación a la circulación. Tomado y adaptado de González A. y cols., 2019 (59).

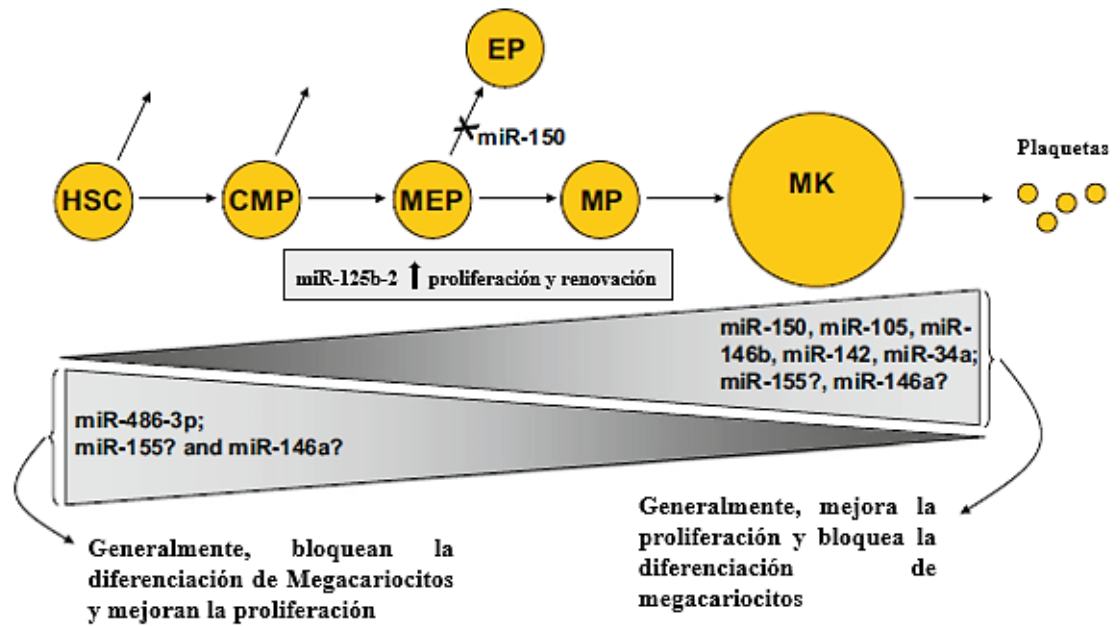
Varias funciones que desempeñan las plaquetas que son determinadas por los elementos de membrana y el contenido granular son originarias de los megacariocitos, como las glicoproteínas de membrana (GP), el Factor von Willebrand (FvW), que son fundamentales para la adhesión y agregación plaquetaria, tienen su origen desde etapas tempranas de la megacariopoyesis (59). Además de los elementos nombrados, es importante destacar que el ARN presente en las plaquetas es heredado del megacariocito, mediante la trombopoyesis, donde se heredan factores que regulan la transcripción de ARN y las moléculas de ARN como tal, que son asignadas a la proplaquetas y posteriormente a las plaquetas (64). Esta herencia no solo incluye ARN mensajero (ARNm), sino también ARNnc como miR y ARNcirc. Se ha descrito que existe abundancia de los miR maduros sobre los pre-miR en las plaquetas, lo que sugiere que las plaquetas heredan la mayoría de sus miRs directamente de

los megacariocitos, observándose una mayor cantidad de estos que de ARNm, por lo que se propone que un ARNm puede ser objetivo de múltiples miR (65). Se sugiere que los miRs plaquetarios son biológica y clínicamente relevantes como reguladores potenciales de la traducción y expresión de proteínas plaquetarias, marcadores de niveles de miR de megacariocitos maduros, biomarcadores para enfermedad hematológica y reactividad plaquetaria, y una herramienta para comprender los mecanismos básicos de expresión de genes de megacariocitos/plaquetas (66). En el caso de los ARNcirc plaquetario, es probable que también sean heredados de los megacariocitos mientras se desarrolla la trombopoyesis, puesto que se han detectado niveles más altos de ARNcirc en plaquetas en comparación con megacariocitos cultivados (64).

En la regulación de estos procesos participan varias citoquinas, siendo la Trombopoyetina (TPO) la más importante, la cual se encuentra en concentraciones inversamente proporcional a la cuenta plaquetaria (62). El proceso de megacariopoyesis también tiene otros reguladores como los microARN, interfiriendo positivamente como miR-34a, miR-105, miR-142, etc. o negativamente como miR-146b, miR-486, entre otros (Figura 8) (67).

Dado que los miR se ven involucrados en los procesos de maduración del megacariocito hasta la liberación de plaquetas a circulación, es importante conocer las características, estructura y función de estos fragmentos citoplasmáticos para así comprender la relación que poseen con los ARN no codificantes mencionados y como intervienen en ECVs.





**Figura 8. MicroARN y megacariocitopoyesis.** Esta imagen resume los miR que se sabe que participan en la megacariocitopoyesis. Los megacariocitos se originan a partir de células madre hematopoyéticas (HSC) de renovación automática, que se diferencian progresivamente en precursores mieloides comunes (CMP), precursores de megacariocitos/eritroides (MEP) y precursores MK (MP). La altura de los triángulos indica el nivel del miRNA, y algunos miRNA disminuyen durante la megacariocitopoyesis, y otros aumentan. Hay evidencia contradictoria sobre el papel de miR-146a y miR-155. Los niveles de miR-125b-2 no cambian durante la progresión de MEP a MP. Tomado y adaptado de Edelstein L. y col. 2017 (67).

## 2.2 Características de las plaquetas

Las plaquetas son pequeños fragmentos citoplasmáticos, que se caracterizan por ser carentes de núcleo e irregulares, tienen forma de disco biconvexo de 2-3  $\mu\text{m}$  de diámetro y una vida media de 7 a 10 días, encontrándose en una cantidad de 150.000 a 350.000/ $\mu\text{l}$  en circulación, donde junto a eritrocitos y leucocitos conforman los elementos formes de la sangre. Se encargan principalmente del proceso de hemostasia, el cual mantiene un equilibrio para impedir procesos hemorrágicos y trombóticos (68).

Circulan en el torrente sanguíneo en estado inactivo o reposo, pero cuando son activadas pueden unirse a las paredes de los vasos sanguíneos se acumulan y forman trombos, previniendo así el sangrado excesivo después de daño endotelial. Dicha activación plaquetaria y la cascada de coagulación son muy importantes en la formación de trombos intravasculares que ocurren en enfermedades como infarto agudo al miocardio o accidente cerebrovascular (69).

Si bien la hemostasia es su principal función, esta no es la única como se creía años atrás, ya que también participan en procesos de inflamación, remodelación tisular, mecanismos de defensa innata e incluso son utilizadas con fines dermatológicos (58).

### **2.3 Estructura de las Plaquetas**

Dentro de los principales componentes de las plaquetas se encuentran la membrana plasmática, los gránulos, el citoesqueleto y el sistema de membrana interno, compuesto por el sistema canicular abierto y el sistema tubular denso. Además, existen también otras estructuras tales como lisosomas, gránulos de glicógeno y mitocondrias, y ocasionalmente inclusiones de lípidos (70).

La membrana plaquetaria tiene un espesor de 20 nm y aparece como una unidad trilaminar de membrana formada por dos hojas densas separadas por un espacio constante. Al igual que otras membranas biológicas, está compuesta por proteínas y lípidos, principalmente fosfolípidos y colesterol. Posee un glicocálix o cubierta plaquetaria que está formado por cadenas de oligosacáridos provenientes de glicolípidos, glicoproteínas de membrana y cadenas de polisacáridos provenientes de proteoglicanos de membrana. Además, proteoglicanos plasmáticos y proteínas tales como la albúmina y el fibrinógeno forman parte del glicocálix y son incorporados por adsorción (71).

Las Glicoproteínas actúan como receptores participando en 3 principales funciones: adhesión, agregación e interacción de plaquetas con otras células (72). Durante la agregación y transformación plaquetaria se caracteriza por ser capaz de proveer de una superficie esencial para la aceleración de la coagulación sanguínea, mediar en las interacciones con el medio externo y contener las estructuras que permiten la transmisión de señales bioquímicas (activantes o inhibitoras) al interior de la célula. En el proceso de secreción, se produce la fusión de las membranas de los gránulos intraplaquetarios con la membrana plasmática mediante el sistema canalicular abierto, permitiendo la exposición de antígenos internos en la superficie de la plaqueta (70).

Por lo que varios procesos en los cuales participan las plaquetas se encuentran mediados por glicoproteínas de membrana, las cuales se presentan en la Tabla 1. Estos funcionan como receptores de los agonistas fisiológicos de las plaquetas como ADP, Tromboxano A2 (TxA2), trombina, etc., como proteínas adhesivas (fibrinógeno, fibronectina, laminina, trombospondina, vitronectina, FvW y para ligandos fibrosos como el colágeno (70, 73).

Tabla 1: Glicoproteínas de la membrana plaquetaria. Tomada de Palomo I., cols., 2005 (70).

<b>Glicoproteína</b>	<b>Designación CD</b>	<b>Integrina</b>	<b>Ligando</b>	<b>Función</b>
<b>GPIIb-IIIa</b>	CD41- CD61	$\alpha$ IIb $\beta$ 3	Fibrinógeno, FvW, fibronectina, vitronectina	Agregación
<b>Receptor de Vitronectina</b>	CD51- CD61	$\alpha$ v $\beta$ 3	Vitronectina, FvW, fibrinógeno, trombospondina	Adhesión
<b>GPIa-IIa</b>	CD49b- CD29	$\alpha$ 2 $\beta$ 1	Colágeno	Adhesión
<b>GPIc-IIa</b>	CD49e-CD29	$\alpha$ 5 $\beta$ 1	Fibronectina	Adhesión
<b>GPIb-IX-V</b>	CD43b,c- CD42a, CD42d		FvW Trombina	Adhesión Agregación
<b>GPIV</b>	CD36		Colágeno, trombospondina	Adhesión, agregación
<b>GPVI</b>			Colágeno	Adhesión

Mediante microscopía electrónica se ha analizado la distribución y la funcionalidad de las GPs en la superficie y a nivel intracelular, de las cuales las más relevantes son: el receptor de adhesión formado por un complejo de tres GPs: GP Ib, GP IX y GP V; denominado GP Ib-IX-V, que es el receptor de unión de la superficie plaquetaria al subendotelio, mediante el FvW y la trombina. Este complejo es considerado el más importante de los receptores implicados en la adhesión. La GP VI es el receptor para colágeno más importante, está comprometido en los eventos tempranos de la función plaquetaria y participa en la activación y la agregación inducida por colágeno. El complejo GP IIb-IIIa es el principal receptor en la agregación plaquetaria. La GP IV está involucrada en las propiedades de adhesión y agregación plaquetaria (71).

En cuanto a los gránulos plaquetarios, estos pueden ser alfa o densos. Dentro de los primeros, estos son los más abundantes dentro de las plaquetas, teniendo un importante rol en el funcionamiento celular, ya que la liberación de su contenido permite la participación en la interacción con otras células (74), además de almacenar un gran número de proteínas de las cuales la mayoría juega un rol importante en la hemostasia primaria como el fibrinógeno (70, 73).

Por su parte, los gránulos densos tienen un elevado contenido de calcio y fósforo inorgánico, lo que les confiere una alta densidad electrónica. También contienen ADP, ATP y serotonina. La liberación de su contenido, particularmente del ADP y 5-HT (complejo macromolecular de calcio y serotonina) juega un papel importante en la amplificación de la respuesta plaquetaria al estímulo y en el crecimiento del trombo (68, 70).

En cuanto al citoesqueleto plaquetario, este se conforma por una red de estructuras filamentosas que le permiten mantener la forma discoide o de esfera cuando se encuentra en reposo. En ellas se incluyen filamentos de actina, anillo marginal de microtúbulos, moléculas de miosina, moléculas de unión como a actina como filamina, espectrina, etc., formando así el esqueleto membranal de la plaqueta (75). Cuando ocurre el cambio de forma, los

microtúbulos se contraen y centralizan los organelos, mientras fragmentos de microtúbulos darán origen a pseudópodos. En cuanto a la actina, es el mayor componente del citoesqueleto y representa el 20% del contenido proteico plaquetario. Se encuentra bajo la membrana plaquetaria o rodeando los microtúbulos, donde su función está relacionada a los cambios de forma de la plaqueta, el reordenamiento de los complejos de GPs Ib-IX-V y cuando se polimeriza se asocia a proteínas como tropomiosina y ABP que determina la organización de filamentos y formación de pseudópodos (71). Estos cambios de forma son resultado de procesos de fosforilación/desfosforilación y ruptura proteolítica por calpaína de proteínas del citoesqueleto (75).

Por lo tanto, sus funciones son relacionadas a la regulación de las propiedades de membrana, como mantener su forma discoide, brindar estabilidad a las modificaciones morfológicas durante la activación plaquetaria. También sirve como punto de unión de moléculas de señalización que se translocan desde el citosol, formando complejos multimoleculares de señalización, donde también media la distribución lateral de las glicoproteínas receptoras en la membrana, permitiendo así la integración de distintos mecanismos bioquímicos que conducen a las respuestas celulares (70, 73).

Finalmente, el Sistema de Membrana Interno se compone del sistema canalicular abierto y el sistema tubular denso. Dentro del sistema canalicular abierto, está formado por invaginaciones de la membrana plasmática al interior de la célula, por lo que se comunica directamente con el exterior. A través de este sistema se transportan las GPIIb-IIIa y la GPIb hacia los gránulos  $\alpha$ , aumenta la superficie total de contacto y permite el intercambio de sustancias en profundidad. El sistema tubular denso, regula la activación plaquetaria mediante el secuestro o liberación de calcio. También posee ATPasas, enzimas del metabolismo del ácido araquidónico y adenilato ciclasa (68, 70).

## **2.4 Función Plaquetaria**

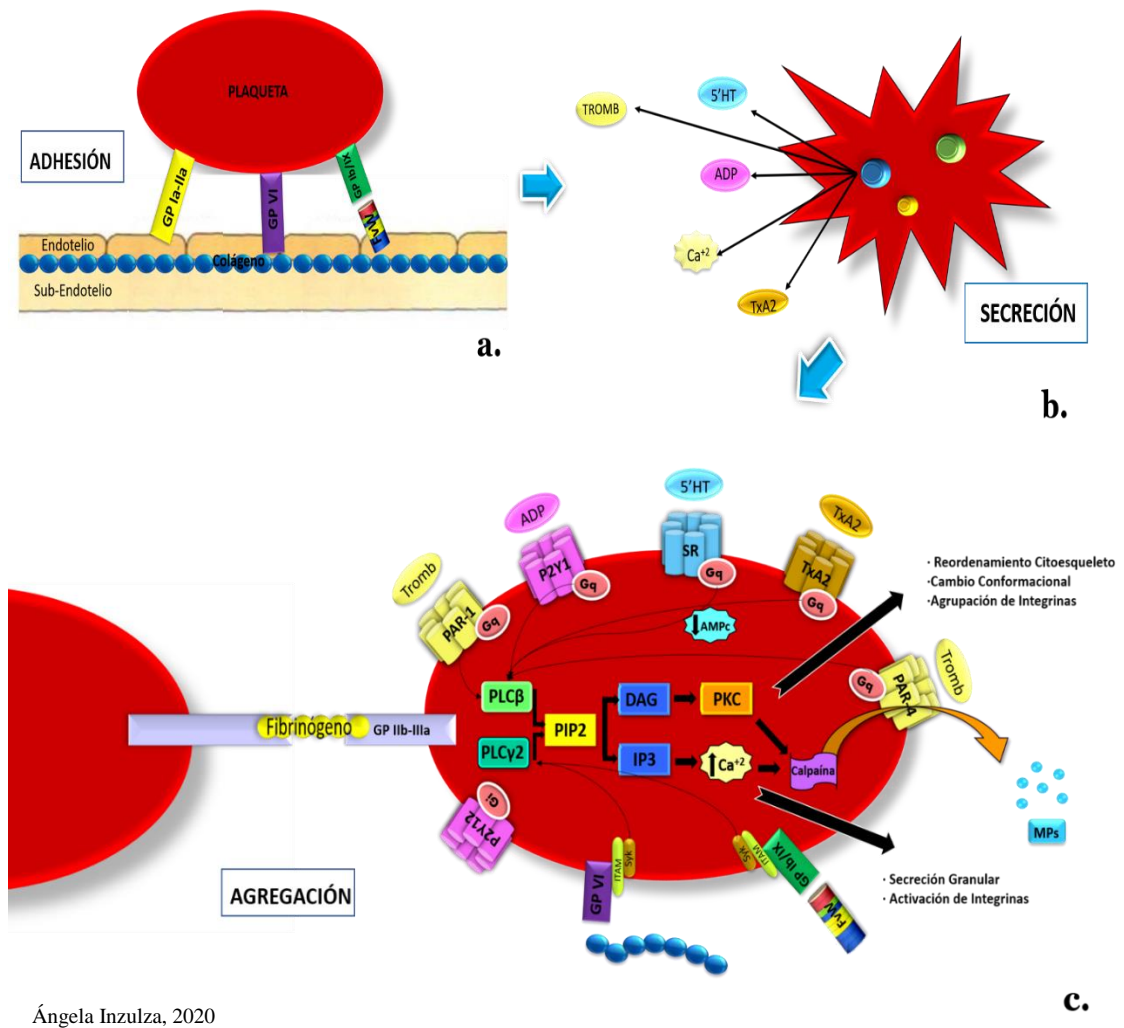
En condiciones fisiológicas o normales, las plaquetas circulan de forma cercana a las paredes vasculares, pero sin interactuar con las células endoteliales que proporcionan una resistencia natural a la trombosis. Cuando esta continuidad es interrumpida, se activan una serie de eventos con el fin de corregir el defecto (76).

### **2.4.1 Adhesión plaquetaria**

Ante una lesión vascular, las plaquetas se exponen a componentes de la matriz extracelular que están presentes en la pared de los vasos sanguíneos, por lo que se unen al subendotelio en un proceso denominado adhesión (Figura 9A), donde pueden interactuar con diversas proteínas, pero la que tiene mayor importancia es el colágeno (77). La unión de plaquetas a dichas proteínas depende de receptores específicos para cada proteína adhesiva en la membrana plaquetaria. El colágeno se une a la plaqueta mediante GPIb-IX y FvW, donde se activa y cambia su conformación, permitiendo que la GPIb-IX se una fijando la plaqueta al colágeno (78).

### **2.4.2 Secreción plaquetaria**

De forma simultánea a la adhesión, ocurre la secreción plaquetaria de sustancias almacenadas en los gránulos como factor plaquetario, calcio, serotonina, TxA2, fibrinógeno, etc. (Figura 9B), donde algunas de ellas aceleran la formación de coágulo y la reparación tisular (78).



Ángela Inzulza, 2020

**Figura 9. Proceso de Activación plaquetaria.** **A.** Se explica el proceso de adhesión al endotelio, mediante las glicoproteínas Ia-IIa, GP VI y la interacción GP Ib/IX con FvW. **B.** la activación plaquetaria se da con cambio conformacional y secreción del contenido granular incluyendo de micropartículas. **C.** se produce agregación plaquetaria mediante la GP IIB-IIIa y Fibrinógeno.

### 2.4.3 Agregación plaquetaria

En este proceso se estimula la unión y reclutamiento de plaquetas para el crecimiento de un débil coágulo, para lo cual se requiere de fibrinógeno junto al receptor GPIIb-IIIa (Figura 9C). La membrana de las plaquetas provee de fosfolípidos necesarios para acelerar la generación de fibrina, lo que ayuda a la formación del coágulo definitivo (78).

De forma simultánea, los agonistas secretados permiten que las plaquetas se unan a receptores específicos presentes en la membrana plaquetaria, conduciendo a una serie de eventos que generan el aumento en la concentración intracitoplasmática de calcio. Los receptores acoplados a proteína G como ADP, TxA2, trombina, etc., generan la activación de fosfolipasa C (PLC) (79).

La activación de fosfolipasa C catalizan el corte del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) para la generación de diacilglicerol (DAG) encargado de la activación de la PKC, y de IP3, donde este último se une a receptores específicos y activa el flujo de Calcio en el citosol, provocando la contracción del citoesqueleto. Esto se debe a la liberación y activación de PKC, crítica para la activación y secreción de integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (80).

Hay dos isoformas de PLC que determinan la activación de las plaquetas, que son PLC $\gamma$ 2 y PLC $\beta$ . Este último es activado mediante receptores acoplados a proteína Gq P2Y1 (receptor ADP), TP (receptor TxA2) y PAR1 y PAR4 (activados por trombina). PLC $\beta$  es mediador importante de la señalización enviada por los mediadores secretados como ADP y TxA2. Esta es la ruta principal para la liberación de Ca<sup>+2</sup> y la activación de PKC (80). PLC $\beta$  hidroliza al fosfolípido de membrana fosfatidilinositol 4,5-bifosfato y forma 2 segundos mensajeros, el IP3 y el DAG. El primero es hidrosoluble y al unirse a su receptor facilita la liberación de calcio. En cuanto al DAG, es de naturaleza lipídica y junto al calcio producen la activación de PKC (81) y de esta forma se comienza a secretar el contenido de los gránulos plaquetarios y el reordenamiento del citoesqueleto (80). Las concentraciones aumentadas de calcio intracelular resultan de la activación de la calpaína, contribuyendo a la reorganización del citoesqueleto requerida para la agregación de las plaquetas. Adicionalmente, las calpaínas participan en la expresión de actividad procoagulante y facilitan la liberación de las micropartículas (MP), relacionado a la disrupción del citoesqueleto de la membrana plaquetaria, donde la calpaína hidroliza la ABP, lo que genera la ruptura de la asociación de filamentos de actina con la superficie de la membrana (72).

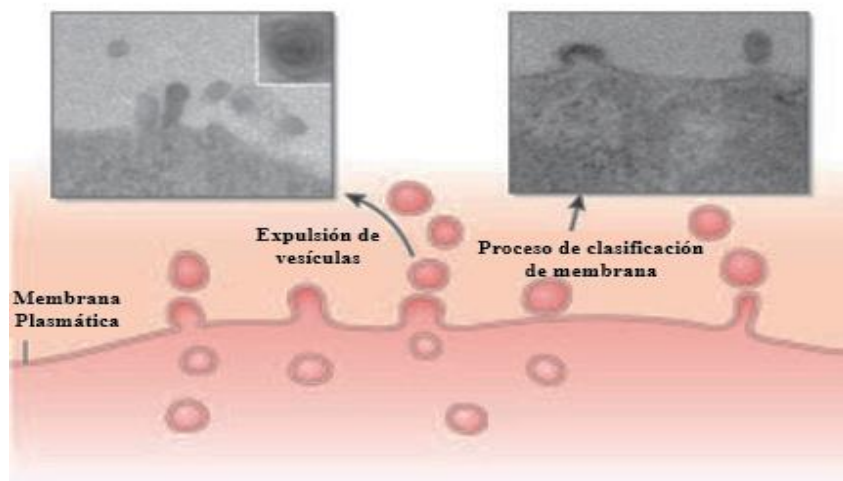


Cuando la célula recibe un estímulo específico, el aumento de calcio citosólico activa un complejo sistema enzimático formado por flipasas, flopasas y escramblasas, que controla la asimetría de membrana. Esta activación conduce a un pasaje de fosfatidilserina (FS) y fosfatidiletanolamina (FE) a la capa externa de la membrana plasmática. En un proceso complejo que implica la participación de enzimas como calpaínas, caspasas, transglutaminasas y quinasas se reorganiza el citoesqueleto con la aparición de protuberancias en la membrana que llevan a la generación de Micropartículas plaquetarias (82).

## **2.5 Micropartículas Plaquetarias**

Las MP son pequeñas estructuras vesiculares de 0,1-1  $\mu\text{m}$  de diámetro, que se forman a partir de la brotación de pequeñas protuberancias, que terminan con el desprendimiento de la membrana plasmática de células (Figura 10) como plaquetas, eritrocitos, leucocitos, células endoteliales y células del músculo liso. Las plaquetas son las principales fuentes de MP en el torrente sanguíneo, componiendo aproximadamente 2/3 de estas (83-85), siendo las más abundantes en sujetos sanos, ya que representan el 70-90% de las que circulan en el torrente sanguíneo, encontrándose aproximadamente entre 100-1000/ $\mu\text{l}$ . Los megacariocitos también pueden liberar MP, pero para ello se requieren de más estudios (86).

Son detectables en personas sanas, pudiendo ser liberadas en mayores cantidades desde las células debido a señales de activación o durante la apoptosis (84), así como en enfermos, lo que sugiere que pueden ser beneficiosos, manteniendo la homeostasis en condiciones fisiológicas normales, o perjudiciales si se producen en exceso o si llevan componentes patógenos en su superficie o en la carga (83). Tienen naturaleza adhesiva y procoagulante, ya que expresan FS y otros antígenos plaquetarios, contribuyendo el estado protrombótico asociado a patologías que muestran niveles aumentados de MP circulantes (87), teniendo incluso una actividad procoagulante de 50 a 100 veces mayor que las plaquetas activadas (88).



**Figura 10. Formación de vesículas de desprendimiento.** Las vesículas de desprendimiento se separan del citoplasma mediante la gemación de la membrana plasmática celular en respuesta a la estimulación celular. En la micrografía izquierda se ve un panel de microscopía electrónica de transmisión que muestra vesículas desprendidas de la superficie de una célula progenitora endotelial. En la micrografía derecha, se muestra un aspecto de la gemación de la membrana celular en una célula progenitora endotelial durante la formación de micropartículas. Tomado y adaptado de Camussi G., y cols., 2010 (85).

La liberación de MP se inicia por un incremento sostenido de calcio intracelular, donde se reorganiza el citoesqueleto, se rompen sus uniones para que se desprendan las partes de la membrana, también se transloca la FS interno hacia la superficie externa y otros fosfolípidos a la cara externa de la membrana (84). Las MP que exponen FS pueden ser liberadas de las células (88). Por lo que este proceso es dependiente del ingreso de calcio, calpaína y reorganización del citoesqueleto (85).

La calpaína es de la familia de cisteína proteasas citosólicas dependientes de calcio. Cuando los niveles de calcio aumentan, este se une y promueve un cambio de forma, permitiendo así la autoescisión y activación de la calpaína. Cuando se activan, pueden interactuar con sustratos proteicos como la proteína G y proteínas del citoesqueleto, contribuyendo en variados procesos. Es sabido que pueden participar en el desprendimiento de MP, pero si se encuentran inhibidas, se reduce la cantidad de MP liberados por las células (89). También es importante para la generación de MP, ya que se ha demostrado que limita

la formación de PIP2 luego de la activación plaquetaria, donde este es un importante determinante en la formación de MP (88).

Las plaquetas en respuesta a diversos estímulos son capaces de liberar mayor cantidad y diferentes micropartículas. Estas llevan receptores o ligandos de la superficie de plaquetas y al ser funcionalmente activas pueden interactuar selectivamente con células diana, por lo que sin tener contacto físico con otras células afectan su estado funcional (90). Puesto a que son de pequeño tamaño, tienen la capacidad de viajar grandes distancias a través de la sangre, pudiendo fusionarse o ser internalizada por otras células, por lo que pueden jugar importantes roles fisiológicos importantes como vesículas de señalización intercelular, teniendo diferentes efectos debido a la transferencia molecular mediante MP (87). También participan en el mantenimiento de la hemostasia, la salud vascular y la inmunidad, donde sin embargo, también están involucrados en trastornos trombóticos e inflamatorios (90), por lo que se observan niveles elevados de MP en enfermedades cardiovasculares, diabetes, VIH, etc. (84).

Las MP transmiten información biológica ya sea por interacción directa con receptores y/o integrinas celulares que inician cascadas de señalización celular o por fusión directa con células efectoras por endocitosis y el posterior vaciado del contenido de MP. Tiene un rol importante en la comunicación célula a célula, ya que presenta proteínas, lípidos, factores de crecimiento y oligonucleótidos de las plaquetas. Además de esas moléculas, se enriquecen de miR los cuales se empaquetan en las MP conformando una unidad considerable del contenido plaquetario para su liberación (87). Por lo que es capaz de transferir proteínas receptoras completas, ARNm, microARN, proteínas e incluso orgánulos celulares a las células receptoras (90).

Debido a que las micropartículas pueden transferir miRNA a otros tipos de células, aumenta la posibilidad de que los miR liberados tras la activación plaquetaria puedan regular la expresión génica en otras células, como las células endoteliales, monocíticas o de músculo liso en los sitios de lesión vascular. Puesto que hay miR que se encuentran libres en plasma

y suero, además de la demostración que los perfiles de miR de plaquetas y suero o plasma exhiben un alto grado de correlación, se sugiere un origen plaquetario para gran parte de los miR circulantes (66).

En este sentido, un estudio en el que se perfilaron miRNAs circulantes para biomarcadores de riesgo de IAM identificó tres miRNAs que estaban altamente expresados en plaquetas, miR- 126, miR - 197 y miR - 223. Para identificar el origen de estos miR, se aislaron las plaquetas y las micropartículas de plaquetas de los voluntarios que se sometieron a un modelo de reperfusión por lesión del manguito del muslo. El análisis de estos perfiles sugirió el origen endotelial y plaquetario de los miR asociados con el riesgo de infarto de miocardio (66). Las MP representan portadores intercelulares de complejos Ago2-miR, como miR-223, que ejercen la regulación de la expresión génica en las células endoteliales. Esta respuesta se considera proinflamatoria y es probable que contribuya al desarrollo de eventos cardiovasculares (90).

Por otra parte, se ha demostrado que los exosomas, vesículas secretadas por la fusión de endosomas multivesiculares (MVE), que se desprenden de la membrana plasmática, están compuestas por diversos factores de crecimiento, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, ARN largos no codificantes y ARN circulares, pudiendo llegar a células receptoras, entregar su contenido y provocar una respuesta (91).

## **2.6 Genoma Plaquetario**

A pesar de su naturaleza anucleada, las plaquetas poseen un diverso y funcional transcriptoma, pudiendo realizar complejos procesos moleculares como empalme y traducción de ARNm (92). El transcriptoma compone por aproximadamente 9500 ARNm diferentes y distintas clases de ARNnc, donde se incluyen los miR, ARNlnc y ARNcirc (93), heredados del megacariocito.

Al analizar el contenido de ARNm plaquetario heredado del megacariocito, se reveló que las plaquetas no expresan específicamente los mismos ARNm que su precursor. Luego de que se descubriera que las plaquetas tienen todos los componentes necesarios para la traducción, se propuso que el ARN de las plaquetas está presente para permitir la producción de proteínas plaquetarias, permitiendo que las plaquetas alteren su función y respondan a su microambiente (94).

Se sabe que las plaquetas contienen una gran cantidad de ARNm, que poseen pre-ARNm que pueden empalmarse en ARNm maduros y funcionales, son capaces de traducir de novo algunos ARNm en proteínas luego de su activación, teniendo la maquinaria necesaria para la traducción y que contienen todas las clases de ARN no codificantes. Es por ello que se sugiere que los ARN juegan un importante rol en la función plaquetaria, donde su alteración puede llevar a cabo la desregulación de esta (92).

La presencia de miR en plaquetas fue informada por primera vez en el año 2008, donde se encontró la expresión de 13 miR en varios tipos de células, donde se incluyen las plaquetas. Luego se informó que contienen una gran cantidad de distintos miRs, los cuales no solamente son heredados de los megacariocitos, sino que tienen maquinaria funcional capaz de procesar miRs, de unirse y atacar a los ARNm (95).

Las plaquetas poseen la maquinaria esencial para procesar miRs, encargados de la regulación de la expresión de proteínas mediante el reconocimiento de la secuencia complementaria, unión y represión postraduccional de las transcripciones de ARNm. La función del miR en las plaquetas ha generado mucho interés en la ciencia, puesto que la expresión de estos ARNnc está relacionada con la activación plaquetaria (96).

También se ha demostrado que miR influye en el desarrollo y función de los megacariocitos y plaquetas, lo que fue demostrado mediante un experimento donde se generaron ratones con delección en megacariocitos de Dicer 1, teniendo como resultado

ratones con trombocitopenia leve, disminución del nivel de miRs maduros en plaquetas y aumento en el nivel de ARNm diana encargados de la regulación de la función plaquetaria, incluidas las integrinas  $\alpha$ Ib  $\beta$ 3. La deficiencia de Dicer 1 también exhibió una mayor unión y absorción de fibrinógeno, activación mejorada de  $\alpha$ Ib $\beta$ 3. Por lo tanto, su eliminación resulta en plaquetas con contenido de ARNm alterado que está asociado con un umbral de activación más bajo y una hemostasia in vivo mejorada y formación de coágulos (97).

En un análisis plaquetario se demostró que éstas expresan aproximadamente 284 miRs diferentes. Al compararlo con ARNm quedó en evidencia que se correlacionan inversamente y que la expresión de proteínas está regulada negativamente. En cuanto a la función plaquetaria, se encontró que 74 miRs se expresan de forma diferencial entre plaquetas de individuos con alta y baja agregación (95). Los más expresados se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2: : miRs plaquetarios más expresados y su función en las plaquetas. Tomado y adaptado de Stojkovic S. y cols., 2019 (95).

<b>miR</b>	<b>Target</b>	<b>Rol en Plaquetas</b>	<b>Muestra de estudio</b>
<b>miR-223</b>	Factor XIII, Receptor P2Y12	Agregación plaquetaria	Ratón y Humano
<b>miR-126</b>	Desintegrina y proteína que contiene el dominio metaloproteínasa 9, Plexin-B2.	Reactividad plaquetaria	Megacariocitos Humanos
<b>miR-21</b>	Proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich	Secreción de TGF-β1	Ratón
<b>miR-30c</b>	PAI-1	Producción PAI- 1	Ratón, Humanos
<b>miR-96</b>	VAMP8	Reactividad plaquetaria	Plaquetas Humanas
<b>miR-148a</b>	Célula T ubiquitina ligando-2	Activación a través del receptor Fc para IgG IIA	Ratón
<b>miR-376c</b>	PC-TP	Reactividad plaquetaria	Humanos

Puesto que los ARN no codificantes se están estudiando como posibles biomarcadores para enfermedades cardiovasculares, es importante estudiar cada uno de los tipos más expresados y que han adquirido mayor relevancia en plaquetas, como los miR, ARNlnc y ARNcirc.

### 3. ARN NO CODIFICANTE PLAQUETARIO

#### 3.1 Generalidades de los ARNnc

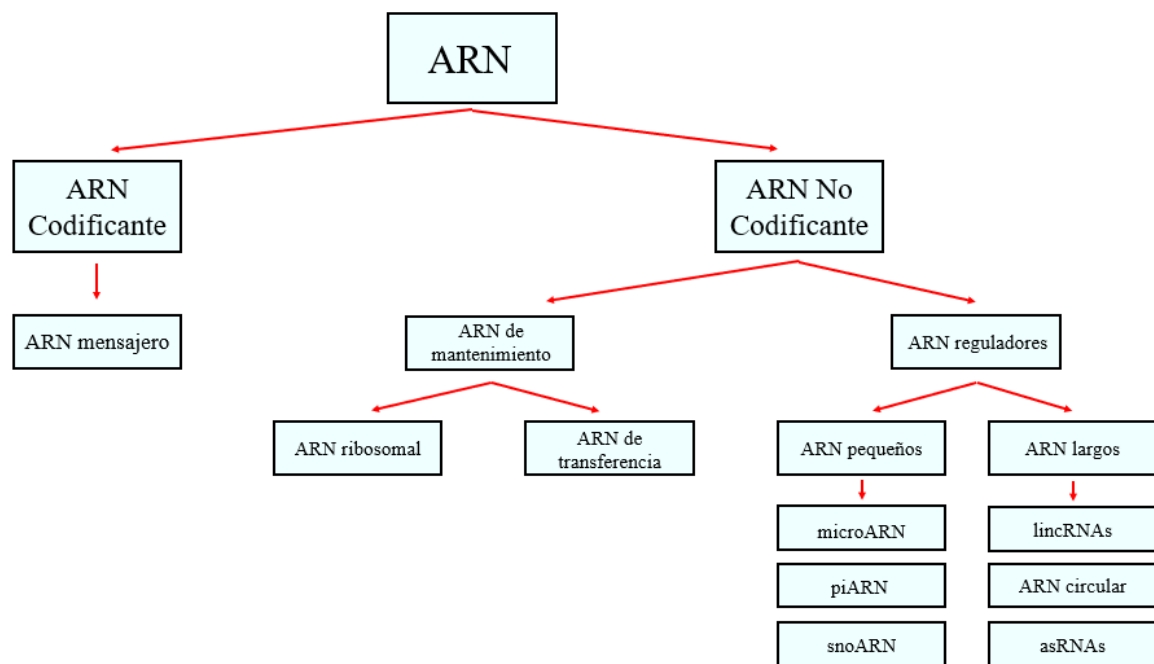
Es sabido que una gran parte del loci del genoma humano es transcrito en ARN, pero no todas las transcripciones son traducidas en proteínas, es más solo 1-2% corresponden a estas, mientras que el 98% restante se transcribe principalmente en ARN sin potencial o con un potencial mínimo de codificación de proteínas. Es por ello, que los ARN pueden clasificarse en aquellos que se traducen en proteínas, es decir ARNm y los que poseen un fin funcional como lo son los ARN no codificante (ARNnc) (98, 99).

Se considera que los ARNnc corresponden a ARNs no traducidos a proteínas claves en la regulación de la expresión génica (100). Es por ello que se han considerado como elementos residuales del genoma humano durante bastante tiempo, ya que estos no tienen la capacidad de codificación de proteínas, pero si pueden participar en procesos de regulación de transcripción y regulación génica, empalme, configuración de dominios nucleares, reforma de cromatina, control del ciclo celular, apoptosis, diferenciación celular, etc. (98, 99).

Dentro de las funciones que son asociadas a los ARNnc, se encuentran la inhibición de los ARNm, la represión del transposón, la metilación del ADN, modificación de la cromatina y la influencia en la estabilidad del ARNm. Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en regiones no codificantes o la interrupción de la expresión de ARNnc se han asociado con la progresión de enfermedades cardiovasculares. Además, se ha observado que la señalización paracrina de los ARNnc mediante vesículas ha tenido una creciente importancia como mecanismo molecular que influye en la fisiopatología y como objetivo terapéutico potencial para enfermedades cardiovasculares (101).



La parte no codificante del genoma se ha visto como un importante regulador en la fisiología y la enfermedad, donde estos pueden subdividirse en diferentes categorías en función de su longitud, donde se incluyen los ARN de “mantenimiento” como el ARN ribosómico (ARNr) y el ARN de transferencia (ARNt) y los reguladores, los que se clasifican en pequeños siendo más cortos que 200 nucleótidos como microARN (miR), los cuales son los que mayor atención han recibido debido a su acción mediadora en la expresión de ARNm en variadas enfermedades, ARN nucleolares pequeños (snoARN), ARN que interactúan con PIWI (piARN) y pequeños ARN interferentes endógenos (endo-siARN) y los ARN largos no codificantes (ARNlnc) mayor a 200 nucleótidos, que también han sido asociados con el desarrollo de enfermedades humanas (99, 101). Los ARNlnc constituyen la clase más grande de ARNncs en el genoma de los mamíferos, y pueden categorizarse aún más en ARNncs intergénicos largos (ARNlinc), RNAs anti sentido (asRNAs), pseudogenes y ARNcircs (Figura 11) (102).



Angela Inzulza, 2020.

**Figura 11. Esquema de tipos de ARN.** Se presenta la clasificación de ARNs codificantes y no codificantes, donde en lila se destacan los ARNnc que serán descritos posteriormente: microARN, ARN largo y ARN circular.

Diversos estudios han encontrado que los miARN y ARNlnc regulan la aparición y desarrollo del envejecimiento vascular, llevando a disfunciones y enfermedades cardiovasculares, por lo que es importante y necesario desarrollar estrategias clínicas para impedir las apuntado a los ARN no codificante (99).

## **3.2 MicroARN**

### **3.2.1 Generalidades**

Entre la gran cantidad de ARNs no codificantes, el miR ha llamado la atención por sus efectos en el desarrollo de cambios fenotípicos y patológicos cuando se encuentra desregulado (103). Los miR son un tipo de ARNnc pequeño que contienen aproximadamente entre 22-23 nucleótidos (nt). Son reguladores postraduccionales ya que pueden unirse a una secuencia complementaria dentro de su ARNm objetivo (104), conllevando al bloqueo del proceso de traducción o la degradación del ARNm dependiendo de la complementariedad entre el miR y el ARNm (101).

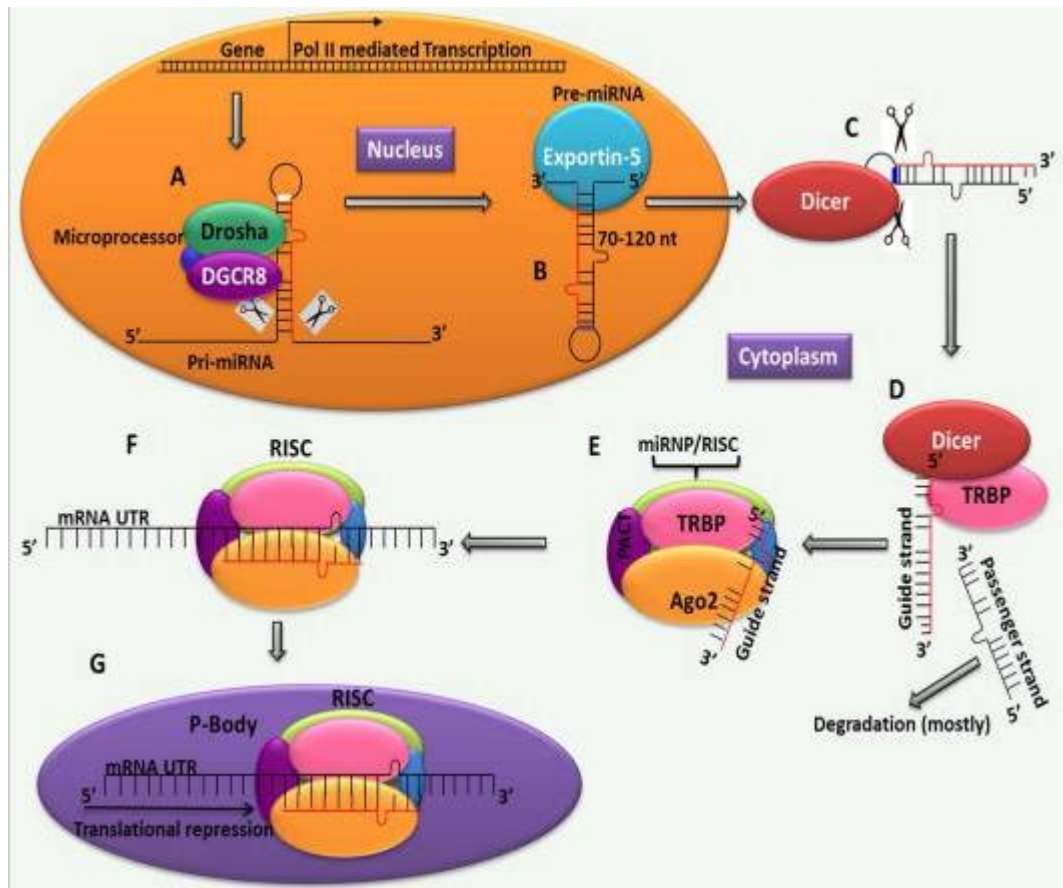
El primer miR, “lin-4” se describió en el año 1993 como un miR relacionado al desarrollo de la larva de *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), donde se encontró que lin-4 disminuye la expresión de la proteína LIN-14 involucrada en la primera etapa larval (103). En los humanos, los genes de miR se encuentran presentes en todos los cromosomas, pero en el Y solo se han identificado un par. Puesto que se encuentran ampliamente distribuidos y por su pequeño tamaño pueden localizarse en regiones intergénicas, intrones y exones (105).

### **3.2.2 Biosíntesis**

La síntesis de miR se inicia con su transcripción mediada por la ARN polimerasa II o III, donde se forma un pri-miR de aproximadamente 110 nucleótidos (Figura 11A), siendo muy similar al ARNm ya que contiene en sus extremos 5' y 3' la Cap y la cola de poliA,

respectivamente. El pri-miR posee una estructura de horquilla, importante para su reconocimiento por las enzimas de procesamiento de miRNA. El pri-miR formado es procesado por ARNasa Drosha, enzima que es capaz de reconocer y cortar los extremos de las estructuras de ARN en forma de horquilla, formando un pre-miR en el núcleo de 60-70 nucleótidos (Figura 12A). Mediante las proteínas Exportina 5 (Figura 12B) es llevado al citoplasma donde es procesado por una ARNasa Dicer, formando un miR dúplex intermediario de 21-25 nucleótidos (Figura 12C). Finalmente, la proteína Argonata II (Ago2) selecciona una hebra guía, incorporando el microARN maduro de cadena simple para la formación del complejo Ago-ARN, mientras que una hebra anti guía es degradada por el complejo RISC (RNA induced silencing complex) (Figura 12E), donde miR guía a Ago2 al ARNm diana mediante un emparejamiento de 2 a 5 nucleótidos y luego a una unión más fuerte, conllevando a la inhibición de la traducción del ARNm y silenciando o reduciendo la expresión genética (Figura 12F) (44, 103, 105).

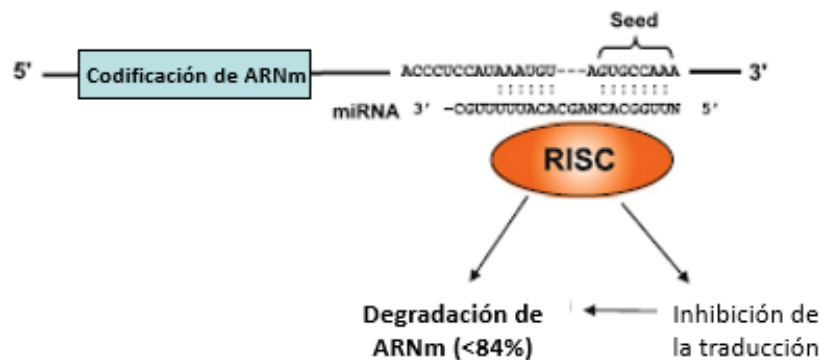
Existen organismos como *Drosophila megaloblaster*, *Giardia lamblia*, entre otros que producen microARNs por vías no canónicas, la que se diferencia de la canónica (antes nombrada) por presentar solo una de las proteínas descritas anteriormente, Drosha o Dicer, por lo que los microARNs generados mediante esta vía se denominan microARN producidos por vías no canónicas independientes de Drosha o independientes de Dicer (106).



**Figura 12. Vía de biogénesis de microARN canónico (miR).** Los miR se transcriben inicialmente como sustratos de ARN de horquilla largos y de longitud variable llamados miR primarios (pri-miR) directamente de la plantilla de ADN en el núcleo por la ARN polimerasa II (A). En el núcleo, estos microprocesadores son procesados nuevamente por el Microprocesador, un gran complejo que incluye la enzima RNasa tipo III llamada Drosha y la proteína de unión al ARN DGCR8, en un precursor de la horquilla (pre) prematuro de 70 a 120 nucleótidos de largo. formas llamadas pre-miARN (B). Los pre-miARN son luego exportados al citoplasma por Exportina 5 (C), donde la región del bucle del pre-miARN es escindida por la enzima ARNasa tipo III llamada Dicer en miRNAs maduros de 18 a 23 nucleótidos de largo (D). Una proteína celular llamada proteína de unión a ARN de respuesta de transactivación (TRBP) (E) facilita la entrada del complejo Dicer-miRNA en el complejo silenciador inducido por ARN (RISC) que contiene Argonauta 2 (Ago2), activador de ARN de proteína quinasa (PACT), gen que contiene repetición de trinucleótidos 6A (TNRC6A) y otras proteínas de unión a ARN (F). Después de la incorporación de los miR maduros en el complejo silenciador inducido por ARN (RISC), la cadena "pasajero" se degrada, y la cadena "guía" se guía a la UTR 3' del ARN mensajero objetivo (ARNm) para degradarse (en caso de complementariedad de base perfecta) o provocar inhibición traduccional (en caso de desajustes de secuencia múltiple entre el ARNm objetivo y el miR). Tomado de Bhaskaran M., y col. (2015) (107).

### 3.2.3 Función

Puesto a que los miR poseen un pequeño tamaño y que la complementariedad es incompleta con el ARNm objetivo, es posible que un mismo miR pueda impedir la expresión de distintos genes funcionalmente relacionados (100). El grado de complementariedad entre el miR y ARNm tiene un rol crucial en la regulación, ya que si dicha complementariedad es alta, el ARNm será degradado, pero si es menor se generará inhibición a nivel traduccional (Figura 13) (107). Esta unión ARNm-miR se produce mediante una región de los microARN de 6-8 nucleótidos denominadas región no traducida (UTR), donde estos pequeños ARN no codificantes pueden regular la expresión de variados genes a través de la unión a la región 3' UTR del ARNm (108). Si bien se ha mencionado que miR se une a 3'UTR, los últimos estudios han demostrado que también los sitios de unión se pueden encontrar en 5' UTR (107).



**Figura 13. Función de microARN.** La región de semillas del miRNA (pb 2-8) se une a sitios complementarios en la 3' UTR de los ARNm diana donde predominantemente disminuye los niveles de ARNm, pero también puede inhibir la traducción. Tomado y Adaptado de Edelstein y Bray (2011).

De esta manera se forma un complejo de silenciamiento, deteniendo la maquinaria de traducción, conllevando a la degradación del ARNm. Es por ello que se han estudiado sus efectos en el sistema biológico como en la proliferación celular, diferenciación, metabolismo, inflamación, envejecimiento y apoptosis, donde todos ellos contribuyen en distintas patologías (109). Además, un ARNm puede tener variados sitios de unión para muchos miR,

generando una compleja red de interacciones de miR-ARNm. Es por ello que se estima que los miR son capaces de regular la expresión de aproximadamente 60% de los genes humanos, controlando diversas rutas moleculares en niveles diferentes (100).

### **3.2.4 Uso como biomarcador**

La mayoría de los miRs se expresan de manera intracelular y específica de tejido, o pueden ser circulantes, por lo que es posible detectarlos en fluidos como saliva, plasma, suero y leche, pudiendo secretarse en las siguientes condiciones:

- Fuga pasiva de células lesionadas, en inflamación crónica, apoptosis, necrosis o de plaquetas.
- Secreción activa de micropartículas (ver sección 2.5).
- Secreción activa por un complejo proteína-miR, donde los microARNs se asocian a una proteína como HDL y una Argonauta (110).

Se encuentran protegidos de la degradación por el empaquetamiento de micropartículas, cuerpos apoptóticos, por unión a la proteína Ago2, a nucleofosmina 1 (NPM1) o lipoproteínas incluyendo las de alta y baja densidad (100). Esta estabilidad le confiere resistencia a la acción de ribonucleasas, permaneciendo estables en condiciones extremas como agua hirviendo, temperatura ambiente, incubación prolongada o repeticiones de congelación-descongelación, niveles muy altos o bajos de pH, largos tiempos de almacenamiento y ebullición, teniendo larga vida en fluidos biológicos, por lo que se han propuesto como factores diagnósticos y biomarcadores (109, 110).

Debido a que los miRs se encuentran en fluidos biológicos, la toma de muestra es poco invasiva, permitiendo una fácil aislación de los miRs de interés a través de distintas técnicas como Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa (qRT-PCR) o mediante microarrays, los que permiten evaluar la expresión y cuantificación de múltiples miRs (111). Además de su cuantificación, se han desarrollado investigaciones acerca del

establecimiento de sus genes objetivo y manipulación de los niveles donde actúa, con el fin de lograr un mayor entendimiento de la función que cumple para ser usado como herramienta terapéutica (112).

Dadas las características de los miRs y los avances en las investigaciones sobre ellos, se han propuesto nuevas estrategias para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, relacionadas a los niveles de los miR, donde se desea manipular su expresión y poder revertir la patología (112, 113). Existen diversas bases de datos que proporcionan información acerca de los distintos tipos de miRs descritos como lo es “miRBase”, que contiene antecedentes sobre la ubicación y secuencia de los miR maduros. Esta página es administrada por el laboratorio de Griffiths-Jones de la Facultad de Biología, Medicina y Salud de la Universidad de Manchester (114).

### **3.3 ARN largo no codificante**

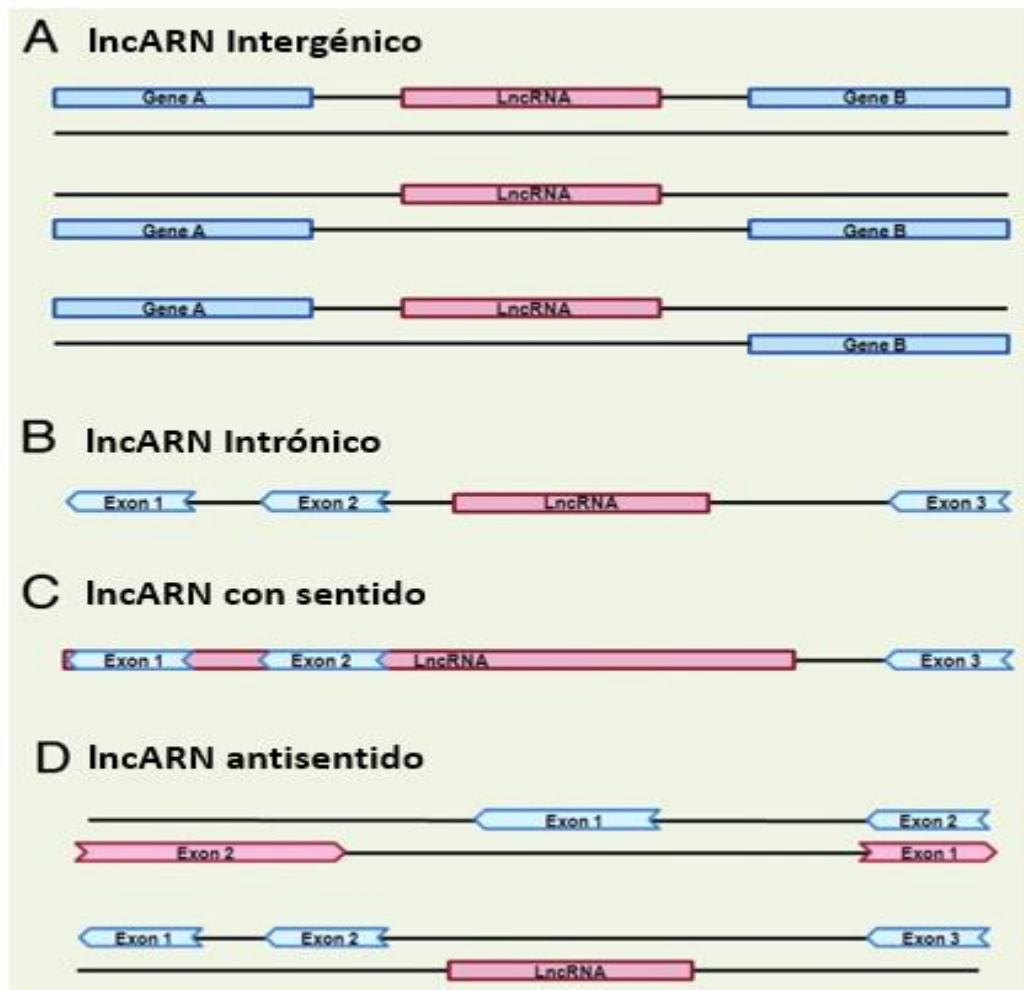
#### **3.3.1 Generalidades**

Durante el último tiempo se ha descubierto que los ARNlnc se involucran como mediadores de variados procesos fisiológicos y patológicos (115). Se definen como largas transcripciones de ARN que poseen más de 200 pares de bases de largo, careciendo de cualquier potencial de codificación, donde a pesar de que no producen proteínas, se han visto casos donde dan origen a pequeños péptidos funcionales. Se han reportado aproximadamente entre 30.000 – 60.000 tipos de ARNlnc en humanos (aproximadamente el 65% del genoma), por lo que ha aumentado el interés en investigarlos (116, 117). Se caracterizan por presentar pocos exones, tener pocas bases nucleotídicas del tipo guanina y citosina, encontrándose mucho más conservados. La mayoría son generados por la ARN polimerasa II al igual que los ARNm, por lo que también poseen una cola poli A en su extremo 3' y una cap en el 5' (117).

### 3.3.2 Biosíntesis

Es de tipo celular, donde diferentes tipos de ARNlnc son transcritos mediante elementos de ADN como potenciadores, promotores y regiones intergénicas. Por lo tanto, existen distintos mecanismos relacionados a su biogénesis, como la escisión por ribonucleasa P (ARNasaP) para formar extremos maduros, formación de pequeños complejos de ARN nucleolar (snoARN) y proteína (snoRNP) en sus extremos (118). Es por ello, que los ARNlnc se clasifican según su ubicación y contexto del genoma, por su efecto ejercido en la secuencias de ADN, mecanismo de funcionamiento y de orientación (119). Según su ubicación se dividen en 5 categorías: ARNnc intergénicos largos (liARNnc), ARNnc intrónicos largos, ARNlnc sensoriales, ARNlnc antisentido y ARNlnc bidireccionales (120). Los ARN no codificantes intergénicos largos (liARNnc) se encuentran en el intervalo entre 2 genes, por lo que se transcriben de ambas cadenas en regiones intergénicas (Figura 14A). Los ARN no codificante largos intrónicos son generados desde el intrón de otras transcripciones de genes codificadores de proteínas (Figura 14B), los ARNnc con sentido o sensorial se transcriben de la cadena de genes que codifican proteínas, los cuales pueden superponerse con parte de estos genes o cubrir la secuencia completa de un gen codificador de proteínas (Figura 14C), las transcripciones antisentido naturales no codificantes largas (lncNAT) se superponen con genes codificadores de proteínas en orientación opuesta, pudiendo ser con regiones exónicas o intrónicas (Figura 14D), finalmente, ARNlnc bidireccionales, ubicados cercanos a una transcripción de codificación de cadena opuesta (119-121).





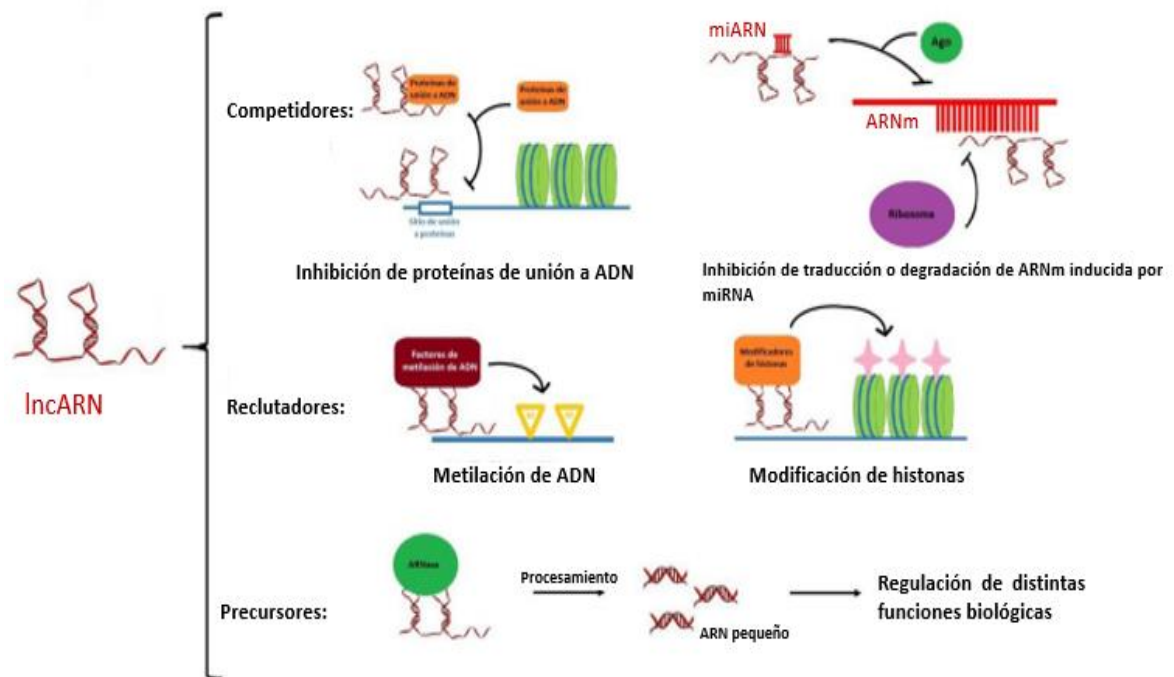
**Figura 14. Ubicación genómica y contexto de ARNlncs.** Los genes que codifican proteínas y sus exones están representados por el color azul, mientras que los ARNc y sus exones están representados por el color rojo. **A.** ARNnc Intergénico, transcrito intergénicamente de ambas cadenas. **B.** ARNnc intrónico, transcrito completamente de intrones de genes que codifican proteínas. **C.** ARNnc con sentido, es transcrito de la cadena de sentido de los genes codificadores de proteínas y que contiene exones de genes codificadores de proteínas, que se superponen con parte de los genes codificadores de proteínas o que cubren la secuencia completa de un gen codificador de proteínas a través de un intrón. **D.** ARNnc antisentido, transcrito a partir de la cadena antisentido de genes que codifican proteínas, superponiéndose con regiones exónicas o intrónicas o cubriendo toda la secuencia codificante de proteínas a través de un intrón. Tomado y Adaptado de Ma L., (2013) (119).

### 3.3.3 Funciones

Los ARNlnc tienen un mecanismo de regulación de la expresión génica, donde son capaces de regularla a nivel transcripcional, post-transcripcional o a nivel epigenético. Es por

ello, que se relacionan con variados procesos biológicos y patológicos como lo son la diferenciación y proliferación celular, modificación de cromatina, apoptosis celular, migración celular, respuesta inmune, desarrollo tisular, empalme de ARNs mensajeros etc. (24, 117). Participan en la recolección, transporte de proteínas, regulación de actividades del promotor mediante secuencias cis o trans proximales, modificación, silenciamiento o represión epigenética (122).

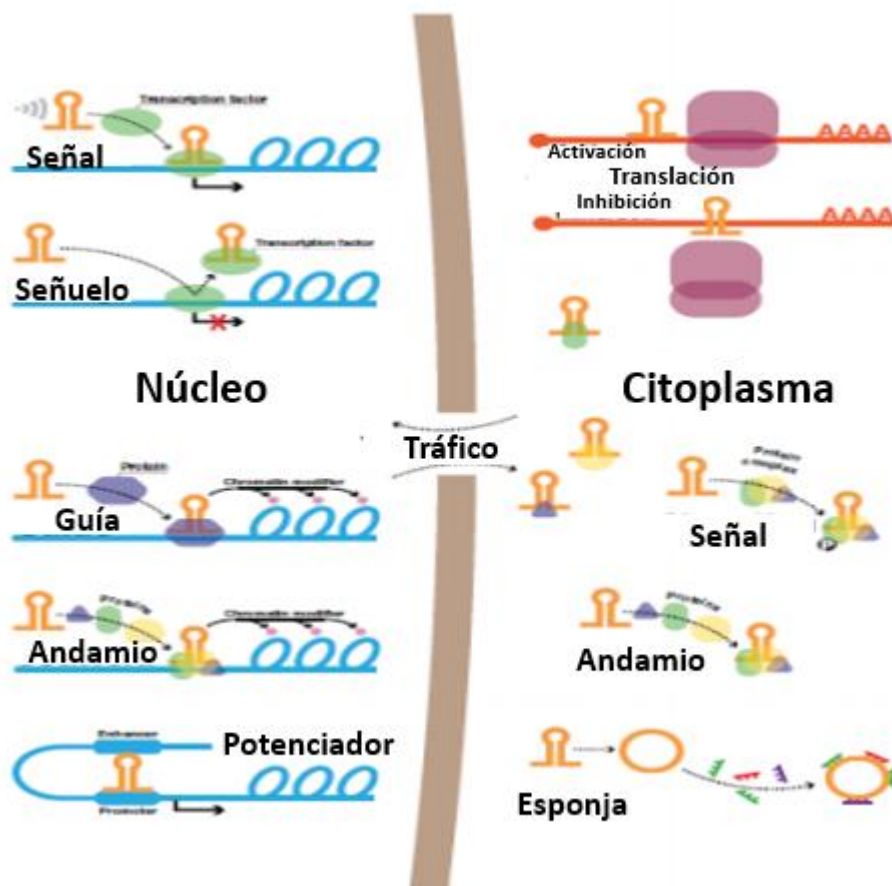
Si bien su rol biológico y mecanismos de acción aun no son del todo conocidos, se cree que podrían actuar como: competidores, compitiendo con otras moléculas por el sitio de unión a ADN o proteínas; reclutadores o activadores, activando modificadores del estado de la cromatina (modificaciones epigenéticas); y precursores, siendo procesados y dando lugar a pequeños ARNs, entre otros mecanismos (Figura 15) (117).



**Figura 15. Posibles modos de acción de ARNlnc: competidores, reclutadores y precursores.** A los ARNlnc se le atribuyen funciones de competidores ya que pueden inhibir las proteínas de unión a ADN, la traducción o inhibición de ARNm inducida por miR, también de reclutadores debido a que pueden modificar proteínas como las histonas y de precursores, debido a que son capaces de generar miRs. Tomado y Adaptado de Trovero M., (2019) (117).

Por otra parte, pueden desarrollar su función mediante distintos mecanismos como señalización, donde su transcripción se produce en momento y lugares específicos, sirven como señales moleculares de desarrollo para la interpretación del contexto celular y dar respuesta a distintos estímulos. Tienen función reguladora o son subproductos de la transcripción, es decir de la iniciación, alargamiento o terminación. Señuelo, como reguladores positivos y negativos del proceso de transcripción, ya que al unirse a factores de transcripción o proteínas, eliminan los factores proteicos de su acción sobre el ADN objetivo, los guía son capaces de conducir cambios en la expresión génica, ya sea cis, es decir en genes vecinos o trans en genes localizados lejanamente, los de andamiaje sirven como plataformas donde se ensamblan componentes moleculares relevantes, vital para el control de especificidad y dinámica de interacciones intermoleculares y eventos de señalización. Se ha propuesto que es el mecanismo funcional más complejo, ya que posee distintos dominios de unión a diferentes moléculas efectoras, por lo que participa en actividades transcripcionales de activación o represión y por último los esponja incluyen los ARNcirc que son reguladores de expresión génica a nivel post-transcripcional (Figura 16) (24, 99, 118).

Los ARNlnc se encuentran principalmente en el núcleo y la cromatina, por lo que podrían tener un importante impacto en las secuencias de ADN, por tanto también se clasifican según su efecto en cis-ARNlnc, encargados de la regulación de expresión de genes en proximidad cercana y en trans-ARNlnc reguladores de la expresión de genes lejanos (119). Además, estos tipos de ARNs son capaces de modular la expresión de miR, ARNm y una gran variedad de genes codificadores de proteínas, ya que pueden unirse a la secuencia nucleotídica a la que se dirigen los miR, evitando su función en los ARNm (101), por lo que participan en el desarrollo de muchas enfermedades, incluyendo las cardiovasculares (123). A esto se le suma que tienen patrones de expresión específicos de tejidos, pudiendo encontrarse en plasma y orina (124).



**Figura 16. . Clasificación de los ARNlnc mediante su mecanismo de acción.** Los ARNlnc señalizadores (signal) responden a estímulos específicos y por consiguiente muestran una expresión específica para un tipo celular. ARNlnc “señuelo” se unen a factores de transcripción y otras proteínas reprimiendo la transcripción génica. Los señalizadores interactúan con proteínas reguladoras, formando complejos ribonucleicos y dirigen a éstos con sus localizaciones diana en localizaciones subcelulares. ARNlnc de “andamiaje” sirven como plataformas para unir diferentes proteínas, a nivel tanto del citoplasma como del núcleo, activando o reprimiendo la transcripción. Los Potenciadores son secuencias reguladoras a las cuales se unen los factores de transcripción para iniciar la misma. Tomado y Adaptado de González L., (2018) (24).

Existen diversas bases de datos con información de ARNlnc, como “NONCODE” se dedica a la publicación de contenido de ARN no codificante con excepción de ARNt y ARNr, donde existe información de 17 especies, incluyendo los humanos (125). También “RNA Central” permite el acceso a secuencias de ARN no codificantes coordinada por el Instituto Europeo de Bioinformática (126).

Como se ha mencionado a lo largo de este subcapítulo, los ARNlnc presentan distintas formas de ejercer su función, por lo que se han relacionado al crecimiento, desarrollo y aparición de enfermedades, incluyendo las cardiovasculares (122). También se nombró que dan origen a estructuras capaces de regular la expresión génica a nivel transcripcional, como lo son los ARNcirc (24).

### **3.4 ARN Circular**

#### **3.4.1 Generalidades**

Se descubrieron en los años 70s, y fueron descritos en plantas como moléculas de ARN infecciosas, las cuales se observaron mediante un microscopio electrónico en el citoplasma de células eucariontes en el año 1979 y posteriormente se identificaron en viroides como hepatitis B, donde fueron ignorados (127), ya que se pensó que eran errores del proceso de empalme de ARN (128). Tienen un tamaño variable, encontrándose entre 100 nucleótidos hasta miles de ellos, donde se han identificado más de 32.000 tipos en humanos (129).

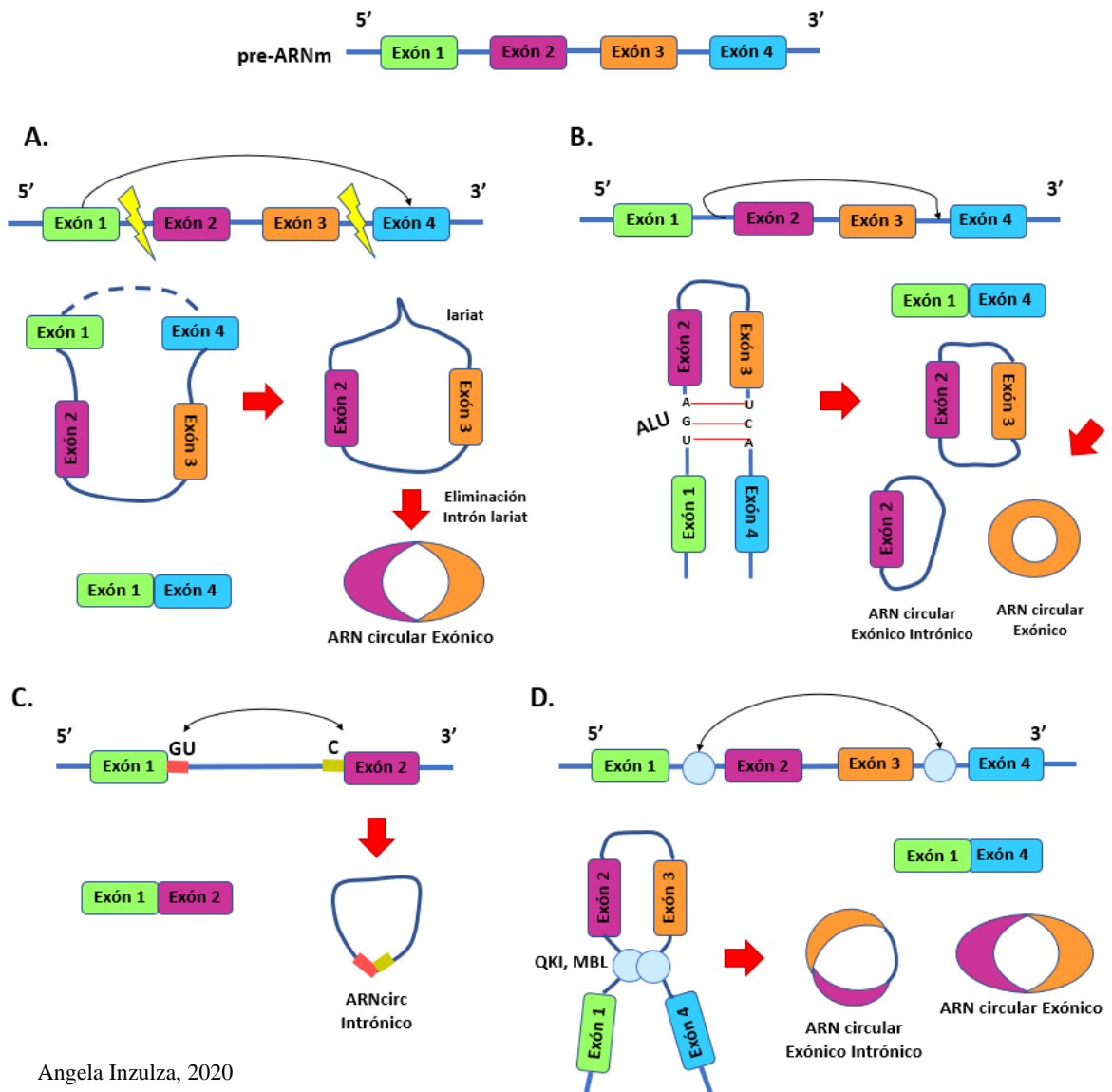
Los ARNcirc forman parte de los ARNnc endógenos, caracterizándose por presentar un enlace fosfodiéster covalente entre los extremos 3' y 5', por lo que carecen de estructuras terminales como 5'cap o una cola poli A (128, 130). Son originarios de exactamente el mismo precursor que los ARN lineales, pero se forman por un proceso denominado empalme posterior, generando un bucle cerrado (131).

#### **3.4.2 Biosíntesis**

Se relaciona al empalme del pre-ARNm, un proceso realizado por el spliceosoma, un complejo proteico que se encarga de eliminar intrones y unir exones (129). Los pre-ARNm son sometidos a un empalme canónico para la producción de ARNm o empalme posterior

para generar ARNcirc. En el empalme posterior, existe la unión del sitio 5' de un exón a un sitio 3' de otro exón para la formación del ARNcirc (132). Se forma una circulación dada por la fusión de 2 segmentos de genes que pueden ser Intrónicos y/o exónicos (133). Generalmente provienen de exones codificadores de proteínas, algunos de exones e intrones, otros de regiones no traducidos y de intrones de ARNm o ARNnc como el ARNinc. Las cantidades de exones son variables, encontrando desde 1 a docenas, pero la mayoría contiene entre 2 o 3 (129).

Según su producción y determinación, se clasifican en 4 tipos: ARNcirc Exónico (ARNcirce), ARN Intrónico circular (ARNci), intrón o exón-intrón ARNcirc (ARNcircEI) y ARNcirc generados a partir de proteínas de unión (130). Normalmente, luego del empalme, las regiones exónicas resultantes se unen para formar el ARNm. Este empalme exónico y su unión no siempre son de forma secuencial 5'-3'. Cuando es no secuencial, el sitio de empalme 3' de exones es aceptor del sitio de empalme del 5', pero de exones adyacentes, formando los ARNcirc exónicos (127), pudiendo generarse a partir de uno o múltiples exones (128). En este caso se forma un bucle que contiene los exones que formarán el ARNcirce e intrones lariat que los unen, los cuales se denominan de esta manera porque presentan forma de lazo. Estos intrones serán degradados formando el círculo de exón (Figura 17A) (25). Los ARN Exónicos Intrónicos circulares son secuencias complementarias inversas, de las cuales las repeticiones ALU son las más frecuentes y se encuentran dentro de los intrones cercanos a los exones para estimular el emparejamiento de intrones entre sí, por lo que impulsan el empalme a medida que 3' y 5' acortan su distancia para la formación del bucle (Figura 17B) (132, 134). Se ha observado que elementos ALU son relevantes en la formación de los ARNcirc, pero no imprescindibles ya que también se pueden generar a través del emparejamiento directo de bases en presencia de repetición invertida (25). Por lo tanto, si el intrón es retenido entre los exones, la transcripción se denomina exón-intrón (128), que corresponden a los más abundantes, representando el 80% de los conocidos, pero si se libera el intrón se forma un ARNcirce (134). En cuanto a los ARNcirci, pueden provenir de intrones lariat, que se relaciona a un elemento rico en GU de 7 nt cercano a 5' y uno rico en C de 11 nt cerca de 3', los cuales en la formación del ARNm se cortarán y unirán, formando un ARN circular (Figura 17C) (25).



Angela Inzulza, 2020

**Figura 17. Biosíntesis del ARN circular.** **A.** Durante el empalme del pre-ARNm se forma un enlace covalente entre el hidroxilo 5' y el fosfato 3' aguas abajo donde se produce un ARN circular impulsado por lariat, el cual posteriormente es eliminado generando un ARN circular Exónico. **B.** Los ARN circulares pueden ser formados por complementariedad de bases entre los intrones, donde la secuencia más común es ALU, presentándose en la mayoría de los casos. Esto forma un ARN circular Exónico Intrónico, pero si el intrón se elimina también se puede generar un ARN circular Exónico. **C.** También se pueden unir regiones que posean GU y C, formando un ARN circular Intrónico. **D.** La interacción entre intrones puede deberse a una proteína de unión a ARN (RBP), que permite la generación de un ARN circular Exónico Intrónico o ARN circular Exónico.

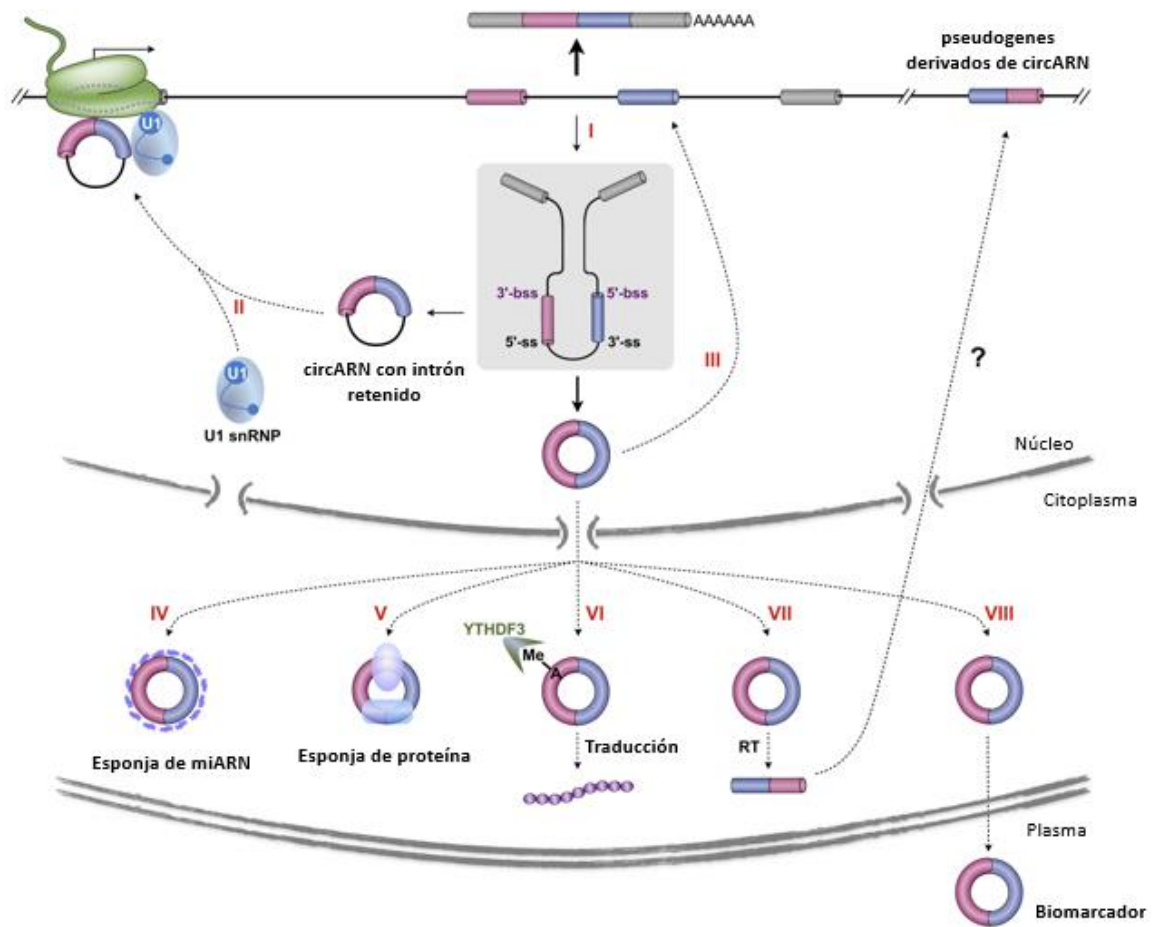
También pueden formarse durante el empalme del pre-tARN, denominándose ARNcirc Intrónicos de tARN (127). Por otra parte, se ha sugerido que pueden generarse a partir de proteínas de unión a ARN (RBP), donde proteínas Quaking (QKI) y Muscblind (MBL) unen algunos intrones flanqueantes, actuando como RBP con el fin de acercar estas secuencia para formar la circularización (25). En este caso si se conservan los intrones durante la formación del ARN circular la estructura se denomina ARNcircEI, pero si los intrones son degradados corresponde a un ARNcirce (Figura 17D) (135). Los sitios de unión de QKI en intrones son suficientes para la formación de ARNcircs, ya que al generar dímeros, los exones se acercan y se estimula la producción de este tipo de ARN (129). La formación de ARNcirc puede ser activada o inhibida por proteínas de unión a ARN (RBP), ya que cuando se encuentra en altas concentraciones se une al pre-ARNm y permite el empalme en el ARNc, evitando el empalme lineal (128).

Debido a que en este tipo de ARNnc se unen los extremos 3' y 5', formando un bucle continuo y cerrado, permite evitar la degradación de exonucleasas de ARN, dándole más estabilidad que los ARN lineales (128).

### **3.4.3 Funciones**

Luego de la biosíntesis son transportados desde el núcleo al citoplasma donde ejercen sus funciones reguladoras (132). Dentro de las funciones que se le relacionan se encuentran que son activadores transcripcionales o esponjas de miR, segrega proteínas de unión a ARN o es capaz de transformarse en proteínas mediante el inicio de la traducción (133). Su función más clásica es mediante la formación de esponjas con miR y proteínas. El secuestro de miR por el ARNcirc permite la unión de maquinaria de traducción al ARNm específico, generando desrepresión genética (130). La presencia o ausencia de los ARNcirc puede afectar la actividad de los miR, ya que se pueden unir de forma competitiva, puesto que tienen un sitio de unión para los miRs lo que resulta en la disminución de miR, por lo que tendrían menos efector inhibitorios en los genes objetivos (25, 127) (Figura 18).





**Figura 18. Funciones de los ARNcirc.** Los ARNcirc endógenos están involucrados en la regulación de la expresión génica a través de distintos mecanismos. **I:** el procesamiento de los ARNcirc afecta el empalme de sus homólogos lineales de ARNm. **II:** los ARNcirc regulan la transcripción de sus genes parentales. **III:** los ARNcirc pueden regular el empalme de ARNs lineales. **IV:** los ARNcirc pueden actuar como esponjas de miRNA. **V:** los ARNcirc pueden actuar a través de proteínas asociadas. **VI:** los ARNcirc pueden traducirse. **VII:** los ARNcirc son recursos para la derivación de pseudogenes. **VIII:** los ARNcirc son biomarcadores prometedores. Tomado y Adaptado de Li X., (2018) (136).

También interactúan con proteínas de unión a ARNcirc, pues presentan un importante rol en la regulación de la síntesis y la degradación de los ARNcirc y a su vez, esta interacción influye en la expresión de proteínas, biogénesis y procesos fisiopatológicos. Son capaces de unir, almacenar, clasificar y secuestrar a proteínas a ubicaciones subcelulares (134). Adicionalmente, compiten con otros tipos de ARN por la unión de RBP, lo que podría causar un efecto parecido al de esponja con los miR. Esta interacción también permite la formación de complejos de proteínas (132). A pesar de que se clasifican como ARN no codificante, se

ha demostrado que son capaces de traducirse en proteínas si presentan un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), que corresponde a un medio alternativo de iniciación de traducción en células eucariontes independiente de la estructura 5' y 3', permitiendo la formación de péptidos o proteínas a partir de ARN (128). Los ARNcirc Intrónicos regula a nivel de expresión de genes parentales por medio de la polimerasa II en la transcripción, pero no se conoce mayor información, a pesar de que se asocia con el alargamiento del complejo Pol II, conllevando a la regulación positiva de transcripción (127).

Además, tienen una vida media más larga que otros ARN lineales, excediendo las 48 horas en comparación con los ARNm que duran aproximadamente 10 horas, por lo que son ideales como biomarcadores de enfermedad (134). Junto con ello, estudios han demostrado que se encuentran altamente expresados en biofluidos como saliva, plasma, suero y exosomas, convirtiéndolos en candidatos de biomarcadores (131).

Por otra parte, existen diversas base de datos que contienen información acerca de los ARNcirc como “circAtlas” la cual incluye 6 especies y una gran cantidad de tejidos donde se ven involucrados, siendo bastante útil para la investigación de este tipo de ARN (137), por lo que cada vez se avanza más en el estudio de los ARNcirc.

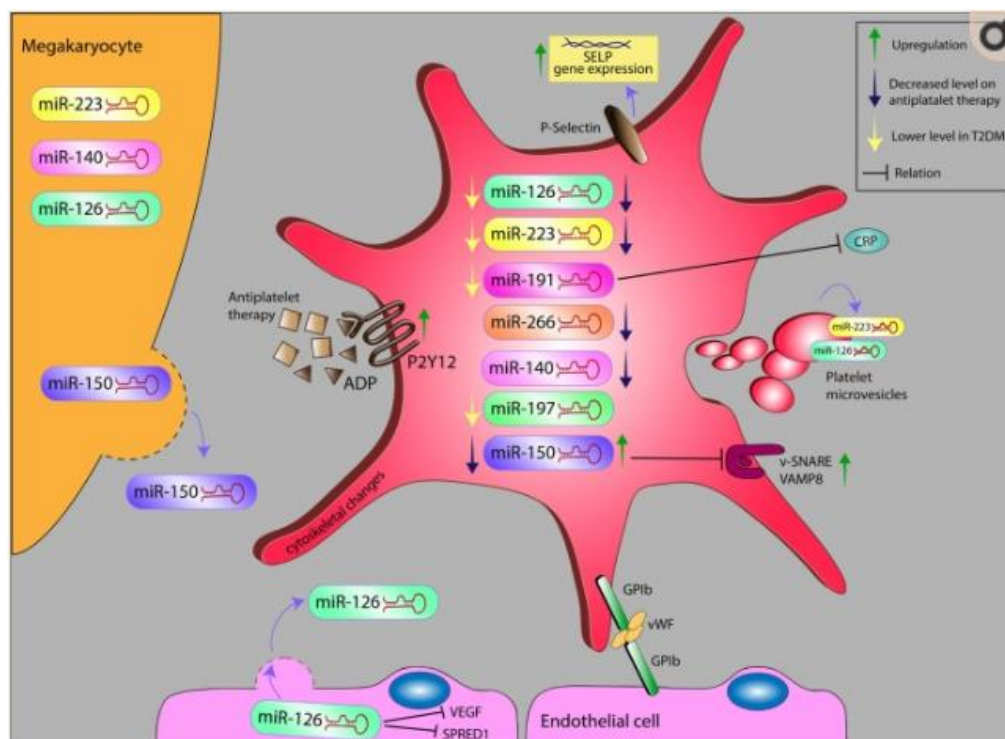
Los 3 tipos de ARNnc investigados se encuentran implicados en el desarrollo de patologías cardiovasculares, por lo que resulta necesario conocer específicamente cuales de ellos se ven relacionados en la regulación positiva o negativa de la generación de la enfermedad y los avances al respecto.

## **4. RELACIÓN DE ARNnc CON ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES**

Como se ha mencionado a lo largo de esta memoria, el estudio sobre los ARN no codificantes se ha incrementado durante los últimos años por su relación con diversas enfermedades entre ellas las cardiovasculares, de las cuales las más prevalentes en Chile y el mundo son Infarto Agudo al Miocardio, Insuficiencia cardiaca y Accidente Cerebrovascular. Por lo que en las siguientes páginas serán descritas su relación con los distintos ARNnc mencionados con anterioridad, que son microARN, ARN no codificante largo y ARN circular.

### **4.1 Relación microARN con ECV**

Está demostrado que las plaquetas liberan mediante micropartículas un alto número de miRs, alcanzando cantidades cercanas al 90% (ver sección 2.5) (86), de los cuales los más expresados corresponden a miR-223, miR-126, miR-197, miR-24 y miR-21 (138). Estos y otros miRs pueden verse alterados en algunas patologías como ECV, donde si bien no se tiene claridad del todo, se postula que la hiperactividad plaquetaria puede generar un aumento de las MP liberadas y por tanto de los miRs (Figura 19) (139), pues estudios han demostrado que las plaquetas hiperreactivas también asociada a factores de riesgo (ver sección 1.2) presentan hasta 5 veces más miRs que las hiporreactivas (140). Por otra parte, otros autores proponen que cuando la plaqueta se hiperactiva, aumenta el calcio intracitoplasmático y se activa la calpaína, esta escinde a Dicer, proteína esencial en la síntesis de los microARN, lo que conlleva a la disminución de los miRs (141), además la liberación de los miRs puede estar regulada de manera selectiva dependiendo del microambiente en que se encuentre (142), en este caso por las condiciones causadas por los factores de riesgo. Por lo que la razón del alza o baja de estos ARN no codificante no se ha dilucidado por completo.



**Figura 19: MicroARNs presentes en plaquetas.** Se observan niveles de alteración de miR en plaquetas y micropartículas plaquetarias, y su posible relación con marcadores inflamatorios en la terapia antiplaquetaria en diabetes. miR, microARN; ADP Difosfato de adenosina; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular; SPRED1, proteína 1 que contiene el dominio EVH1 relacionado con el brote; GPIb, glicoproteína Ib; vWF, factor de von Willebrand; SELP, selectina P; VAMP8, proteína 8 de membrana asociada a vesículas; CRP, proteína C reactiva. Tomado de Pordzik J. y cols. (2018) (138).

Es por ello que en las siguientes líneas se analizará y comparará algunos de los microARNs que se encuentran alterados en las ECV y también presentes en las plaquetas. Para su realización, se investigó un alto número de microARNs expresados en plaquetas y luego se hizo lo mismo con cada una de las enfermedades (Tabla 3), para finalmente comparar los que estaban presentes en ambas, ya que de esa forma se asegura que la procedencia de los microARNs que se nombrarán a continuación es de las plaquetas.

**Tabla 3: MicroRNAs expresados en Plaquetas y ECV. Angela Inzulza, 2020**

PLAQUETAS	IAM	IC	ACV
miR-223, miR-126, miR-197, miR-24, miR-21, miR-191, miR-266, miR-140, miR-150, miR-26b, miR-26a, miR-22, miR-720, miR-16, miR-23b, miR-142, miR-103, miR-25, miR-185, miR-221, miR-423, miR-101, miR-320, miR-199, miR-15a, miR-15b, miR-20, miR-29a, miR-29b, miR-30b/c/d, miR-34a/b, miR-155, miR-146a/b, miR-96, miR-451, miR-19a/b, miR-133a/b, miR-1246, miR-130a/b, miR-98, miR-495, miR-365, miR-361, miR-339, Let 7 f, a, g, b, d, i, c; miR-107, miR-92, miR-222, miR-265, miR-190, miR-584, miR-144, miR-625, miR-136, miR-376, miR-337, miR-611.	miR-1, miR-133a, miR-133b y miR-499-5p, miR-1, miR-25, miR-499, miRNA-197, miR-30, miRNA-223, miR-208a, 195, let7b, miR-21, miR-29a, miR-423, miR-208b, miR-328, miR-320, miR-221, miR-29b, miR-192, miR-194, miR-34a, miR-126, miR-134, miR-486, miR-122, miR-375, miR-150, miR-186, miR-342, miR-106, miR-374b, miR-483.	miR-26a, miR-145, miR-150, miR-485, miR-487b-3p, miR-423, miR-18b, miR-129, miR-622, miR-654, miR-1254, miR-21, miR-499, miR-210, miR-23, miR-129, miR-212, miR-100, miR-195, miR-24, miR-125b, miR-199, miR-214, miR-342, miR-675, miR-22, miR-92, miR-133b, miR-1, miR-7, miR-29b, miR-30, miR-378, miR-Let7i, miR-18b, miR-18a, miR-223, miR-301a, miR-652, miR-122, miR-499, miR-1306.	miR-let-7b, miR-125b, miR-27a, miR-422a, miR-488, miR-627, miR-363, miR-478b, miR-124, miR-290, miR-106b, miR-4306, miR-10a, miR-182, miR-200b, miR-298, miR-130a, miR-21, miR-25, miR-181, miR-513a, miR-550, miR-602, miR-665, miR-819a, miR-923, miR-939, miR-1184, miR-1246, miR-1261, miR-1275, miR-1285, miR-1290, let-7e, miR-106, miR-223, miR-301, miR-126, miR-210, miR-122, miR-148a, miR-let-7i, miR-19a, miR-320d, miR-4429, miR-30a, miR-320e, miR-219, miR-15a, miR-142, miR-186, miR-519, miR-768, miR-1259, miR-let-7f, miR-222, miR-let-7b, miR-155, miR-99a, miR-424, miR-let-7c, miR-132, miR-103, miR-367, miR-27b, miR-181a, miR-124.

#### 4.1.2 microARN en Infarto Agudo al Miocardio

##### 4.1.2.1 miR-223 en IAM

Investigaciones han demostrado que en pacientes sanos unos de los microARNs más expresados es el miR-223 (143). Se ha relacionado a los miRs-223 con la activación plaquetaria, ya que tiene la capacidad de unirse al 3'UTR del ARNm del receptor de ADP, P2Y12 plaquetario (144), por lo que la expresión del receptor se encuentra regulada por este microARN (138). Estudios demostraron que pacientes con IAM presentaron disminución en los niveles de miR-223 (145), desencadenando una desregulación del receptor de ADP y amplificando la agregación plaquetaria. También puede ser utilizado como biomarcador pronóstico, ya que por ejemplo en pacientes con diabetes Mellitus 2, se expresan bajos niveles de miR-223, regulando positivamente el receptor P2Y12, por lo que contribuye a la

hiperactivación plaquetaria (138). Además, se ha encontrado que a mayor nivel de miR-223, menor riesgo de padecer IAM, teniendo un efecto protector de la enfermedad. También se puede utilizar como marcador de la evolución del tratamiento con Clopidogrel en pacientes con IAM sin elevación del segmento ST, en el cual se ha demostrado que ante un tratamiento antiplaquetario, los niveles del miR-223 disminuyen junto a la activación plaquetaria (144).

#### **4.1.2.2 miR-133a en IAM**

miR-133a es un microARN específico del corazón, donde realiza importantes funciones como desarrollo de la diferenciación celular y relacionadas a la morfogénesis cardiaca (146), participa en el control de los primeros estadios de cardiogénesis, donde dirige las células madre embrionarias y precursoras al linaje muscular cardiaco y también es mediador de la conductancia cardiaca, ya que regula las fases del potencial de acción en el corazón. Por lo que es importante para un correcto desarrollo del corazón, porque si se eliminan los genes de miR-133a, se produce una expresión anómala del gen del musculo liso del corazón (147).

Puesto que en pacientes con IAM los niveles de miR-133a del miocardio disminuyen y los circulantes que se encuentran en suero aumentan, se concluye que estos provienen del corazón infartado, siendo proporcionales al daño generado (148). Los niveles de miR-133a aumentan en suero poco tiempo después del comienzo del dolor en el pecho, siendo más precoz que la elevación de la creatina fosfoquinasa (CK) o troponina T cardiaca (cTnT) (149), por lo que se asocian a la mortalidad de la enfermedad (147). Investigadores encontraron que en pacientes con IAM los niveles en plasma de miR-133a aumentan entre 12-16 veces luego de 3 horas transcurridos el evento cardiaco, siendo más prematuro que la troponina I (148), por lo que podría utilizarse como biomarcador de daño miocárdico (149).

La disminución de miR-133a en IAM puede generar fibrilación ventricular en los pacientes, siendo esta una causa de muerte. Sin embargo, observado que la sobreexpresión de este microARN mejora la función cardiaca, ya que incrementa la fracción de eyección del

ventrículo izquierdo. También se ha encontrado que miR-133a junto a otros miRs inhiben la expresión de factores que promueven la fibrosis como CTGF. Por lo que según los conocimientos actuales, miR-133a tendría efectos beneficiosos en corazones infartados relacionados a angiogénesis, inflamación, apoptosis, fibrosis, etc. (147).

#### **4.1.2.3 miR-29a en IAM**

miR-29a es uno de los microARNs que también se encuentra alterado en IAM, donde estudios han demostrado que sus niveles disminuyen en corazones que presentan IAM y lesión por isquemia reperusión cardiaca (CIR) en comparación con pacientes sanos. Además, la inhibición de miR-29a podría aumentar la cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS), desencadenando apoptosis celular. Por lo que al inhibir miR-29a se aumenta la apoptosis de cardiomiocitos, teniendo un efecto perjudicial luego de la lesión por isquemia reperusión cardiaca. miR-29a presenta un sitio de unión a 3'UTR de Bax, que ejerce un efecto proapoptótico, por lo que la sobreexpresión de miR-29a suprime Bax, induce disfunción y lesión miocárdica (146). La apoptosis de cardiomiocitos impide que se establezca contacto con miocitos contráctiles, imposibilitando las contracciones sistólicas (147). Luego de la muerte de cardiomiocitos causada por la isquemia, sigue la fibrosis miocárdica, donde el miR-29a a pesar de encontrarse en bajos niveles en zonas cercanas al corazón infartado, genera el aumento de la fibrosis miocárdica, pues desreprime la traducción de colágeno y elastina (148). Los miR-29a se dirigen a los ARNm que codifican proteínas relacionadas a la fibrosis, donde se incluye colágeno, fibrilinas y elastina. Es por ello que la disminución de los niveles de miR-29 desreprime la expresión de estos ARNm mejorando la respuesta fibrótica. Por lo que este microARN corresponde a un regulador de la fibrosis cardiaca, siendo un objetivo terapéutico para la fibrosis tisular en general (149). Por lo tanto, miR-29 tiene un rol importante en la regulación de la expresión de colágeno y desarrollo de fibrosis, donde su disminución genera el aumento de genes de colágeno. En cuanto a sus niveles, la información varía entre autores, donde algunos plantean que disminuyen a las 2 semanas de infarto, pero aumenta luego de 2 meses (150).

## **4.1.3 microARN en Insuficiencia Cardíaca**

### **4.1.3.1 miR-423**

Estudios han demostrado que miR-423 actúa sobre los reguladores claves en el metabolismo de los cardiomiocitos por lo que podría estar implicado en la función cardíaca (151). miR-423 permite identificar la insuficiencia cardíaca de pacientes sanos o con otro tipo de problema cardíaco, haciéndolo específico de la enfermedad, ya que sus niveles se encuentran más altos en pacientes con insuficiencia cardíaca que en sanos (152), además su nivel de expresión se triplicó en el miocardio de pacientes con insuficiencia cardíaca en comparación con pacientes sanos. Se propone que esta alza en sus niveles es derivada del miocardio, pero no se tiene seguridad de ellos pues los autores del estudio no contaban con datos de otros miRs que sean expresados localmente en el miocardio, por lo que se transforma en una suposición (153). Si bien se ha mencionado que miR.423 se encuentra elevado en IC, otros autores plantean que depende del origen de la lesión cardíaca, en IC del ventrículo derecho no se encontraron elevaciones de sus niveles en comparación con el ventrículo izquierdo que sí (154). Se sabe que es inductor de apoptosis en los cardiomiocitos, por lo que se asocia al diagnóstico y pronóstico de la enfermedad (155). También se ha observado que este microARN presenta una correlación positiva con Péptido natriurético cerebral (BNP) en pacientes con insuficiencia cardíaca, por lo que se propone como biomarcador de la enfermedad (151).

### **4.1.3.2 miR-150**

miR-150 se caracteriza por realizar funciones antiapoptóticas, ya que suprime genes proapoptóticos como p53, por lo que su deficiencia genera la activación de la señalización de la apoptosis en los cardiomiocitos, importante en la progresión de la IC. Sus niveles se encuentran muy disminuidos en pacientes con IC avanzada por lo que da indicios de la progresión y pronóstico de la enfermedad. Además, se relaciona con la remodelación



ventricular adversa en pacientes que presentaron anteriormente un IAM (156). La desregulación del miR-150 se asocia a la remodelación desadaptativa, gravedad de la enfermedad y la falla cardiaca grave, ya que puede generar la muerte o necesidad urgente de tratamientos en pacientes con IC (157). Además, debido a que reprime la expresión del ARNm p300 que es un cofactor de diversos factores de transcripción de la hipertrofia, generando la dilatación y engrosamiento ventricular (158). Puesto a que se encuentra disminuido en pacientes IC, se propone como mejor biomarcador de la enfermedad que los tradicionales, donde se incluye el péptido natriurético cerebral (BNP) (159).

#### **4.1.3.3 miR-21**

A miR-21 se le asocian funciones en la proliferación y apoptosis de células del músculo liso vascular, crecimiento y muerte de cardiomiocitos y función en fibroblastos cardiacos, relacionándolo en la patogénesis de IC, mediante la pérdida o ganancia de función. La hipertrofia cardiaca es una posible causa de insuficiencia cardiaca, en la cual se descubrió que miR-21 se encontraba bastante aumentado, por lo que lo hace un importante determinante de la mortalidad y morbilidad de la enfermedad. La expresión de miR-21 se relaciona al desarrollo del corazón, ya que en miocitos cardiacos neonatales se encuentra mucho más alto que en los adultos. La inhibición de miR-21 tiene un impacto negativo en la hipertrofia de cardiomiocitos, ya que se genera bloqueo del crecimiento de estos, pero al sobre expresar miR-21 el crecimiento de las células cardiacas se incrementó (160). Se encuentra enriquecido en fibroblastos, por lo que contribuye a la fibrosis y por tanto a la IC (161). La fibrosis genera el endurecimiento de las paredes del ventrículo y disminución en la contractilidad, siendo consecuencia de diversas ECV que progresan a IC (162). Por lo que al ser regulador de los fibroblastos cardiacos en corazones de pacientes con IC, el aumento de este microARN en respuesta al estrés cardiaco conduce a la proliferación de fibroblastos y fibrosis mediante la activación de la proteína de colágeno. Al silenciar miR-21, se inhibe la fibrosis atenuando la disfunción cardiaca (160, 163) y mejorándola. Un estudio en ratones con inhibición de miR-21 demostró que al someter a sobrecarga de presión al ventrículo izquierdo estos presentaron resultados beneficiosos, demostrando que este miR tiene un papel clave en la terapia de pacientes con IC (161).

#### **4.1.4 microARN en Accidente Cerebro Vascular**

##### **4.1.4.1 miR-15a**

A miR-15a se le relaciona con la inhibición del gen antiapoptótico bcl-2 (164), por lo que daña la integridad de la barrera hematoencefálica, ya que provoca apoptosis de células endoteliales vasculares (165), las cuales normalmente se encargan de sintetizar y liberar diversas sustancias reguladoras del tono vascular, de la presión y flujo sanguíneo, participantes de la coagulación, fibrinólisis, en reacciones inflamatorias, etc. (166). Este microARN se encuentra regulado por el receptor  $\delta$  activado por el proliferador de peroxisoma (PPAR $\delta$ ), donde un estudio demostró que al añadir un agonista específico para dicho receptor, ocasionó la reducción de la expresión de miR-15a, aumentando los niveles de bcl-2, disminuyendo así la apoptosis y la interrupción de la barrera hematoencefálica y con ello reduciendo el ACV (164). En pacientes con ACV isquémicos se encontraron niveles altos de miR-15a en comparación a pacientes sanos o control, donde el estudio mostró que el miR-15a en sangre predice en sangre el inicio del ACV con una especificidad de casi 99%. Mientras más elevados tengan los niveles de este microARN, mejor pronóstico. Por lo que podría servir como biomarcador diagnóstico de esta enfermedad (167).

##### **4.1.4.2. miR-let-7b**

Si bien son pocos los estudios relacionados a este microARN, se ha informado que miR-let-7b se caracteriza por la regulación del IFN- $\beta$ , una citoquina antiinflamatoria en humanos, por lo que modula la respuesta inflamatoria después de un ACV (168), ya que estudios demostraron que los niveles de miR-let-7b se encuentran aumentados en pacientes ACV durante 24 semanas, normalizándose 48 semanas después de iniciados los síntomas (169). La producción de inflamación favorece la activación de vías inflamatorias, el incremento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, infiltración leucocitaria y edema cerebral

(170). Es por ello que puede ser un potencial biomarcador, ya que sus niveles circulantes en pacientes con ACV se encuentran alterados (171).

#### **4.1.4.3 miR-155**

miR-155 también se relaciona a procesos inflamatorios, donde se ha demostrado que su expresión se encuentra muy alterada en ACV (172). Este microARN es un regulador transcendental en la regulación de la inflamación ya que puede aumentar la señalización del factor proinflamatorio NF- $\kappa$ B. miR-155 se encuentra regulado al alza en la corteza cerebral luego de 24 horas posterior a la isquemia cerebral, pues se han encontrado importantes cambios en los niveles de miR-155 en el hipocampo y en sangre después de un ACV (173). Es por ello que se tuvo la hipótesis que la inhibición del miR-155 posterior a ACV podría mejorar la vasculatura cerebral y su función. Por lo que se realizó un experimento donde se demostró que al agregar un inhibidor anti-miR-155 luego de 48 horas iniciada la oclusión arterial, se generó la reducción de aproximadamente un 50% del microARN conllevando a una reducción considerable del tamaño del infarto y del daño neuronal. Por lo tanto, la inhibición de miR-155 permite la preservación de tejido cerebral, modifica la neuro inflamación y genera una recuperación funcional más eficaz (174).

## **4.2 Relación ARNlnc con ECV**

Durante los últimos años se ha analizado la presencia de los ARNlnc en plaquetas, donde estudios han demostrado que son aproximadamente 1286 los expresados en ellas, verificados mediante qRT-PCR (175). Junto con los microARNs, los ARNlnc también se han estudiado por su relación al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, puesto que mediante técnicas como RNA-seq o microarrays se ha observado que se han expresado de forma aberrante en ECV (176), por lo que se analizará los ARNlnc provenientes de plaquetas que influyen en el desencadenamiento de este tipo de patologías. Al igual que en el caso anterior, para realizar este análisis se investigó en distintas publicaciones acerca de los ARNlnc presentes en

plaquetas y relacionados a cada una de las enfermedades que se ha tratado a lo largo de esta memoria, con el fin de evidenciar que su procedencia es plaquetaria (Tabla 4).

**Tabla 4: ARNlnc presentes en plaquetas y ECV.** Angela Inzulza, 2020

PLAQUETAS	IAM	IC	ACV
MT1P3, MIAT, ZFAS1, MALAT1, HOTAIR, ANRIL, FBXL4, ECHDC3, KCNE1, TAOK2, AURKB, ERG, FKBP5, PVRL3 y PZP, etc.	MIAT, ZFAS1, GAS5, MALAT1, H19, aHIF, HOTAIR.	ANRIL, EGOT, H19, HOTAIR, LOC285194 / TUSC7, RMRP, SOX2-OT y SRA1, NRON y MHRT.	ANRIL, MALAT1, N1LR, (MEG3), H19, CaMK2D 1, Fos, SNHG14, TUG1, MIAT.

#### 4.2.1 ARNlnc en IAM

##### 4.2.1.1 MIAT en IAM

MIAT (Transcripción asociada a infarto de miocardio) en diversos estudios se encontró aumentado en pacientes con IAM en comparación con voluntarios sanos, siendo considerado como un posible biomarcador para el diagnóstico de la patología (177). MIAT tiene función de factor hipertrófico, donde estudios demostraron que luego del tratamiento con Ang II en cardiomiocitos, actúa como esponja molecular del miR-93, importante en la inactivación de la vía PI3K/Akt/mTOR, una importante vía de señalización intracelular para la regulación del ciclo celular mediante TLR4 dirigido hacia la hipertrofia cardiaca inducida por AngII (178), encontrando que los niveles de MIAT aumentaban paulatinamente. Se sabe también que MIAT regula la expresión del miR-150 y ARNm P3000, por lo que el silenciamiento de MIAT genera la sobreexpresión del ARNm y este miR, contribuyendo a la regulación de la hipertrofia de los cardiomiocitos. Por otra parte, se le relaciona con miR-24, pues la sobreexpresión de este ARN largo induce la desregulación del microARN aumentando la fibrosis cardiaca (179). El IAM aumenta los niveles de MIAT, promoviendo así la fibrosis,

mediante la reducción de miR-24 en el corazón, ya que tiene función reguladora en él. Estudios donde MIAT se encuentra disminuido posterior a un IAM, muestran reducción en el tamaño del infarto, fibrosis y una función cardíaca mejorada (178). La eliminación del gen MIAT podría generar la reducción de la liberación de citoquinas proinflamatorias inducidas por la enfermedad, reduciendo así el daño vascular (177).

#### **4.2.1.2 MALAT1 en IAM**

MALAT1 es regulador del miR-320a el cual a su vez tiene como objetivo a la proteína PTEN que regula negativamente la vía de señalización de PI3K-Akt. Por lo que MALAT1/miR320 contribuyen al desarrollo de IAM, puesto que la disminución de miR-320 y el aumento de PTEN generan cardiomiocitos en condiciones hipóxicas. También se han encontrado elevados niveles en cardiomiocitos sometidos a hipoxia por lo que investigadores sugieren que podría asociarse al crecimiento de cardiomiocitos y por ello al desarrollo y progresión de IAM (180). Investigaciones han demostrado que MALAT1 se expresa en altos niveles en tejidos cardíacos posterior a un IAM en comparación con las regiones cercanas no infartadas. También, puede modular procesos de cardiomiocitos durante el IAM, ya que es un regulador de miR-200, cumpliendo un importante rol en la regulación de la apoptosis, siendo un objetivo terapéutico en el tratamiento de IAM. Este ARN largo se encontró en niveles más altos en ratas diabéticas, donde una reducción de MALAT1 generó la reducción de la apoptosis en cardiomiocitos, mejorando la función sistólica y diastólica del ventrículo izquierdo (179). La disminución de MALAT1 se relaciona al proceso de patogénesis y desarrollo de ECV, pues su disminución atenúa la apoptosis miocárdica en IAM. No obstante, los mecanismos por los cuales se genera la apoptosis de cardiomiocitos aún no son del todo claros (181).

### **4.2.1.3 ZFAS1 en IAM**

ZFAS1 es un ARNlnc antisentido del gen que codifica la proteína ZNFX1, un predictor del IAM. Este ARNlnc se encuentra muy disminuido en el torrente sanguíneo, pero en elevados niveles en el miocardio, por lo que se ha propuesto como biomarcador de la enfermedad (182). Aumenta sus niveles en zonas miocárdicas infartadas luego de 48 horas transcurridas el evento cardiaco para luego disminuir en 1 o 2 semanas siguientes. ZFAS1 interactúa con miR-150 donde la disminución del ARNlnc mejoró la viabilidad celular en ratas con IAM luego de una semana. Además, ZFAS1 es afín con la proteína SERCA2a relacionada al mantenimiento de las concentraciones normales de calcio, donde la sobreexpresión de ZFAS1, generó una sobrecarga de calcio intracelular, afectando la contractilidad de músculos cardiacos (179). Es por ello que estudios lo clasifican como un factor perjudicial luego de IAM, donde su eliminación disminuye la disfunción contráctil (182).

## **4.2.2 ARNlnc en IC**

### **4.2.2.1 ANRIL en IC**

Son pocos los estudios sobre ARNlnc relacionados a IC que se conocen, ya que la mayor parte de ellos es acerca de factores de riesgo u otras enfermedades cardiovasculares que en su forma más grave generan insuficiencia cardiaca como IAM. De todas formas, a pesar de no ser específica de este tipo de enfermedad, ANRIL se relaciona a la insuficiencia cardiaca, ya que en pacientes con IC se encuentra aumentado (183). Este ARNlnc comienza a aumentar desde el desencadenamiento de algunos factores de riesgo como la diabetes, donde estudios demuestran que se encuentran altamente expresados en tejido miocárdico de ratas diabéticas. Se relaciona a los factores proinflamatorios, ya que en investigaciones encontraron que inhibir su expresión mejoraba la función cardiaca, el estado patológico del tejido miocardio, disminuyó el área de depósito de colágeno, la apoptosis de cardiomiocitos y mejoró la expresión de factores inflamatorios. Además se relaciona a la progresión de la aterosclerosis

mediante la regulación de genes relacionados a la apoptosis y respuesta inflamatoria, lo que causa que el corazón no pueda bombear sangre eficazmente (184).

#### **4.2.2.2 HOTAIR en IC**

Corresponde a uno de los ARNlnc que se encuentra mayormente expresado en sangre periférica en pacientes con ECV, encontrándose desregulado de la IC (185), por lo que ha sido investigado como posible biomarcador, ya que sus niveles se encuentran desregulados durante la enfermedad (179). Se descubrió que en enfermedades cardiovasculares como IC, HOTAIR se encuentra disminuido y que su sobreexpresión podría mejorar la apoptosis de cardiomiocitos generada por hipoxia a través de la regulación de miR-1. Por otra parte, estudios han demostrado que mejora la apoptosis causada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, utilizado para generar un ambiente de estrés oxidativo, teniendo un efecto protector en cardiomiocitos (176).

#### **4.2.3 ARNlnc en ACV**

##### **4.2.3.1 ANRIL en ACV**

ANRIL es un ARNlnc antisentido que se caracteriza por participar en procesos ateroscleróticos como remodelación y/o reparación vascular, trombogénesis, estabilidad de la placa y en respuestas inflamatorias, ya que se relacionan a la regulación de proteínas ciclina 2A y CDKN2B (186). La aterosclerosis y las respuestas inflamatorias son 2 factores muy importantes en el desarrollo de la oclusión arterial cerebral (187). En investigaciones realizadas en ratas con ACV, se vio incrementados los niveles ANRIL más 1,5 veces en comparación con los controles normales y a raíz de ello, posteriormente se activaron las vías IκB /NF-κB, promoviendo así procesos inflamatorios. Por lo que ANRIL causa fenómenos proinflamatorios (188).

#### **4.2.3.2 MALAT1 en ACV**

MALAT1 se caracteriza por tener efecto protector, ya que protege a la microvasculatura cerebral y al parénquima de la lesión isquémica (187). Tiene interacción con BIM (proapoptótico) y E-selectina (proinflamatoria), por lo que realiza funciones antiapoptóticas y antiinflamatorias en la microvasculatura del cerebro con la finalidad de disminuir los daños causados por el ACV (189), por lo que cuando MALAT1 es silenciado, se incrementa el factor proapoptótico Bim y la expresión de citoquinas proinflamatorias. Por otra parte, en una investigación en ratones donde MALAT1 se encontraba inhibido, se generó un infarto cerebral de mayor tamaño, funciones sensitivo motoras reducidas, peores puntuaciones neurológicas y mayor inflamación. Esto significa que el aumento de la expresión de MALAT1 en ACV tiene un efecto protector y curativo en un cerebro isquémico (188).

#### **4.2.3.3 MIAT en ACV**

MIAT es un ARNlnc que se encuentra desregulado en múltiples enfermedades, entre ellas el ACV. Sus niveles en sangre se encuentran considerablemente altos en comparación con las personas que no poseen la enfermedad correlacionándose con magnitud del infarto y los resultados transcurridos 3 meses del evento isquémico (190). Por lo que la sobreexpresión de MIAT indica un mal pronóstico de la enfermedad (191). Es por ello que se considera como un marcador pronóstico de la enfermedad (190).

### **4.3 ARN circular en ECV**

Uno de los últimos tipos de ARN no codificante que se ha comenzado a investigar estos años corresponde a los ARN circulares. Estos debido a sus variadas funciones descritas anteriormente, también se encuentran relacionados al desarrollo de diversas patologías como las ECV. Por lo que siguiendo la metodología antes señalada, se utilizó una base de datos



obtenida de la publicación denominada “A map of human circular RNAs in clinically relevant tissues” (192), que contiene una gran cantidad de ARNcirc presentes en plaquetas y otras células, los cuales se compararon con los que se encuentran en las enfermedades que se han estudiado.

### **4.3.1 ARNcirc en IAM**

#### **4.3.1.1 MICRA en IAM**

El ARN circular asociado al infarto de miocardio (MICRA)/circZNF609/hsa\_circ\_0001939/ hsa\_circ\_0000615 se ha propuesto como biomarcador de IAM. Es un regulador de miR-150 durante la remodelación del ventrículo izquierdo luego del infarto. En pacientes IAM, se describen bajos niveles sanguíneos de MICRA al compararlos con sujetos sanos. Además, se ha demostrado que a menores niveles de MICRA en la reperfusión se presentará una reducción en la fracción de eyección cardiaca y por el contrario un aumento en la expresión de MICRA generará una fracción de eyección conservada (193). Es por ello, que los pacientes con IAM que tienen niveles disminuidos de MICRA, tienen un alto riesgo de presentar disfunción ventricular izquierda (194).

### **4.3.2 ARNcirc en IC**

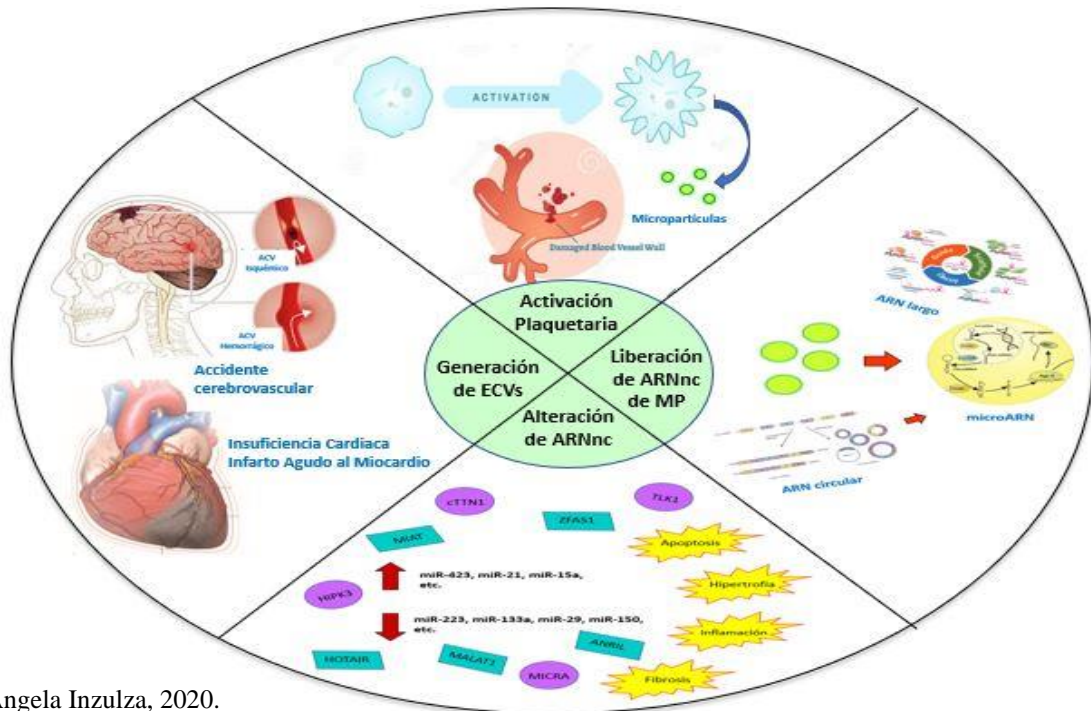
Entre los ARNcirc presentes en IC se encuentran cTTN1, cTTN2, cTTN4 y cTTN5, de los cuales se sabe que está disminuidos en corazones dilatados, pero no se tiene mayor información con respecto a su mecanismo de acción y función específica (129).

### **4.3.3 ARNcirc en ACV**

#### **4.3.3.1 circTLK1 en ACV**

Un estudio demostró que luego de la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) de forma transitoria se generó un incremento en los niveles del ARNcirc TLK1 en el cerebro y plasma de ratones con ACV. Al disminuir el ARN circular, los ratones con la enfermedad reflejaron una reducción de la apoptosis, mejoraron los déficit neurológicos disminuyeron el volumen del infarto y mejoraron las funciones somatosensoriales. Los efectos producidos por circTLK1 fueron mediados por la poli (ADP-ribosa) polimerasa (TIPARP), que participa en la reparación de ADN y muerte celular. Luego de la MCAO transitoria el nivel del ARNm de TIPARP aumento, mientras que el miR-335 objetivo disminuyó. Cuando TIPARP fue inhibido se redujeron los déficits neurológicos, el volumen del infarto y de la atrofia cerebral. La disminución de miR-335 causada por la regulación de circTLK1 propone que circTLK1/miR-335 provoca un empeoramiento de la lesión isquémica (195).

Como se ha mencionado a lo largo de esta revisión, los ARNnc podrían tener una gran relevancia desde la hiperactividad plaquetaria hasta el desencadenamiento de enfermedades cardiovasculares, donde su alteración genera un aumento en procesos inflamatorios, fibrosis, hipertrofia y apoptosis de cardiomiocitos pudiendo ser los causantes del desarrollo de diversas patologías cardiovasculares como Infarto Agudo de Miocardio, Accidente Cerebro Vascular o Insuficiencia Cardiaca (Figura 20).



Angela Inzulza, 2020.

**Figura 20: Resumen de la función de los ARNnc.** La activación plaquetaria libera a circulación micropartículas y exosomas, los cuales presentan en su interior microARN, ARN largo y ARN circular. Estos cuando se desregulan y alteran su expresión, como miR-223, miR-150, miR-133, MICRA, HIPK3, MALAT1, ZFAS1, entre otros, generan diversos procesos negativos como apoptosis de cardiomiocitos, hipertrofia, inflamación, fibrosis, etc. lo que conlleva al desencadenamiento de enfermedades cardiovasculares como Infarto Agudo al Miocardio, Insuficiencia Cardíaca y Accidente Cerebrovascular.

#### 4.4 Propuesta

Existen estudios donde se demuestra que circHIPK3 de origen plaquetario se relaciona a la ruptura de la placa aterosclerótica y posterior generación de ACV (196). Por otro lado, investigaciones en tejidos de cáncer gástrico revelan que circHIPK3 es regulador de diversos miRs como miR-152, miR-193a, miR-338, miR-29b, entre otros (197). Este último, se encuentra disminuido en pacientes con ACV, contribuyendo a la muerte de las células neurales y al infarto cerebral, ya que se une al ARNm de AQP4 regulando al alza su expresión, por lo que aumenta la permeabilidad de la BHE e induce edema cerebral, que exacerba la lesión cerebral isquémica (198). Es por ello, que se propone que la sobreexpresión de circHIPK3 generado por la hiperactividad plaquetaria conduce al silenciamiento del miR-29b lo que podría originar la enfermedad de ACV.

## 5. CONCLUSIÓN

Las enfermedades cardiovasculares son grupo de patologías de mayor mortalidad a nivel mundial. Es por ello que se requiere investigar un mecanismo para predecir los eventos cardíacos con el fin de lograr la disminución de los fallecimientos por infarto agudo al miocardio, insuficiencia cardíaca o accidente cerebrovascular.

Los últimos años se ha analizado la utilidad de los ARN no codificante como los miRs, ARNlnc y ARNcirc, los cuales se encuentran circulando en el torrente sanguíneo, en micropartículas o exosomas liberados por las plaquetas. Los ARNnc se encargan de diversos procesos de regulación, por lo que su alteración se relaciona al desarrollo de patologías cardíacas. Debido a que son estables ante la acción de las ribonucleasas y en condiciones extremas, se han convertido en posibles biomarcadores de enfermedad, por lo cual se ha investigado el mecanismo de acción de estos tipos de ARNs. Es por ello que se ha cuantificado e identificado el tipo de tejido en el que ejercen su efecto, para de esa forma dilucidar el aumento o disminución en condiciones normales y de enfermedad, con la finalidad de manipular su concentración para así evitar que se desencadenen las patologías anteriormente mencionadas y utilizarlos como biomarcadores de la enfermedad dependiendo de los niveles de expresión en muestras sanguíneas que presenten, ya que algunos tienen función protectora. Es de destacar que a pesar de los grandes avances sobre los ARNs no codificantes durante los últimos años, aún quedan muchos mecanismos y funciones por comprender, ya que su participación en las diferentes enfermedades todavía no se conoce con claridad.

## 6. REFERENCIAS

1. OMS. Prevención y control de las enfermedades cardiovasculares 2014 [Available from: [https://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/es/](https://www.who.int/cardiovascular_diseases/es/)].
2. OPS/OMS. Enfermedades Cardiovasculares 2007 [Available from: [https://www.paho.org/chi/index.php?option=com\\_content&view=article&id=172:enfermedades-cardiovasculares&Itemid=1005](https://www.paho.org/chi/index.php?option=com_content&view=article&id=172:enfermedades-cardiovasculares&Itemid=1005)].
3. MINSAL. Mes del Corazón 2017 2017 [Available from: <https://www.minsal.cl/mes-del-corazon-2017/>].
4. OMS. ¿Qué son las enfermedades cardiovasculares? 2016 [Available from: [https://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/about\\_cvd/es/](https://www.who.int/cardiovascular_diseases/about_cvd/es/)].
5. de Gonzalo-Calvo D, Vea A, Bär C, Fiedler J, Couch LS, Brotons C, et al. Circulating non-coding RNAs in biomarker-guided cardiovascular therapy: a novel tool for personalized medicine? *European Heart Journal*. 2018;40(20):1643-50.
6. Lu D, Thum T. RNA-based diagnostic and therapeutic strategies for cardiovascular disease. *Nature Reviews Cardiology*. 2019;16(11):661-74.
7. Vega J, Guimará M, Garces Y, Vega L, Rivas M. Predicción de riesgo coronario y cardiovascular global en la atención primaria de salud. *ccm vol19 no2 Holguín*. 2015.
8. Lobos Bejarano JM, Brotons Cuixart C. Factores de riesgo cardiovascular y atención primaria: evaluación e intervención. *Atención Primaria*. 2011;43(12):668-77.
9. Norte A, Sansano M, Sospedra I, Martínez J, Hurtado J, Ortiz R. Estudio de factores de riesgo de enfermedad cardiovascular en trabajadores universitarios españoles. *Nutr Hosp vol33 no3*. 2016.
10. FCA. Factores de Riesgo: Fundación Cardiológica Argentina; 2018 [Available from: <http://www.fundacioncardiologica.org/4-Factores-de-Riesgo.note.aspx>].
11. NPHW. Módulo 4: Factores de Riesgo de las Enfermedades Cardiovasculares. In: NPHW CdCpTdISNM, editor. *Manual de Capacitación NPHW: Instituto de Investigación de la Salud de la Población PHRI*; 2015.
12. Ortiz-Benavides RE, Torres-Valdez M, Sigüencia-Cruz W, Añez-Ramos R, Salazar-Vílchez J, Rojas-Quintero J, et al. Factores de riesgo para hipertensión arterial en población adulta de una región urbana de Ecuador. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*; 2016 Vol 33 (2)DO - 1017843/rpmesp20163322214. 2016.
13. Valle A. Hipertensión: Fundación Española del Corazón; [Available from: <https://fundaciondelcorazon.com/prevencion/riesgo-cardiovascular/hipertension-tension-alta.html>].
14. Calle J. Diabetes y enfermedad cardiovascular Fundación para la Diabetes 2017 [Available from: <https://www.fundaciondiabetes.org/general/articulo/199/diabetes-y-enfermedad-cardiovascular>].
15. Mediavilla Bravo J. Diabetes y riesgo cardiovascular. *Medicina de Familia SEMERGEN*. 2004;30:36-8.
16. Bryce-Moncloa A, Alegría-Valdivia E, San Martín-San Martín MG. Obesidad y riesgo de enfermedad cardiovascular. *Anales de la Facultad de Medicina*. 2017;78:202-6.
17. Fernández D, Moral I, Puig M, Vilella T, Brotons C. Actividad física y prevención cardiovascular. *APSalut*. 2019;7.
18. corazón FEEd. Factores de Riesgo [Available from: <https://fundaciondelcorazon.com/prevencion/riesgo-cardiovascular.html>].

19. Thanassoulis G, Afshar M. Atherosclerosis Manual MSD versión para profesionales 2017 [Available from: <https://www.msdmanuals.com/es-cl/professional/trastornos-cardiovasculares/arteriosclerosis/aterosclerosis>].
20. Sarre D, Cabrera R, Rodríguez F, Díaz E. Enfermedad cardiovascular aterosclerótica. Revisión de las escalas de riesgo y edad cardiovascular. *Med interna Méx* vol34 no6. 2018.
21. Hernández Puentes YZ. Aterosclerosis y sistema aterométrico. *Revista Cubana de Medicina Militar*. 2016;45:183-94.
22. Storino M, Rojano J, Molina A, Martínez X, Pulgar A, Paniagua R, et al. Aterosclerosis y estatinas: rol de la epigenética. *MedWave*. 2015.
23. Gonzalo Dd, Iglesias E, Llorente V. Biomarcadores epigenéticos y enfermedad cardiovascular: los microARN circulantes. *Revista Española de Cardiología*. 2017;70.
24. González L. El papel de los long non-coding RNAs en enfermedades cardiovasculares.: Universidad de Cantabria; 2018.
25. Fan X, Weng X, Zhao Y, Chen W, Gan T, Xu D. Circular RNAs in Cardiovascular Disease: An Overview. *BioMed Research International*. 2017;2017:5135781.
26. Calvachi Prieto P, Barrios DD, Puccini M, Mojica HA, Delgadillo D, Gómez M, et al. Frecuencia de los tipos de infarto agudo de miocardio según la tercera definición. *Revista Colombiana de Cardiología*. 2017;24(6):592-7.
27. Cassiani C, Cabrera A. Síndromes coronarios agudos: epidemiología y diagnóstico. *Salud Uninorte Barranquilla* [Internet]. 2009; 25:[118-34 pp.].
28. Sánchez Abalos VM, Bosch Costafreda C, Sánchez Abalos TM, González Blanco JC. Morbilidad y mortalidad por infarto agudo del miocardio. *MEDISAN*. 2014;18:516-22.
29. Nazzari C, Alonso FT. Incidencia y letalidad por infarto agudo del miocardio en Chile: 2001-2007. *Revista médica de Chile*. 2011;139:1253-60.
30. Casanova E. Infarto Agudo al Miocardio: Situación en Región del Maule 2005.
31. MINSAL. Guía de Práctica Clínica - Problema de Salud AUGE N°05: Infarto agudo del miocardio 2015 [Available from: <https://diprece.minsal.cl/garantias-explicitas-en-salud-auge-ogues/guias-de-practica-clinica/infarto-agudo-del-miocardio/descripcion-y-epidemiologia/>].
32. Borrayo G, Rosas M, Pérez G, Ramírez E, Almeida E, Arriaga J. Infarto agudo del miocardio con elevación del segmento ST: Código I. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2017;56.
33. Amsterdam EA, Wenger N, Brindis R, Casey D, Ganiats T, Holmes D, et al. Guía 2014 de la AHA / ACC para el manejo de pacientes con síndromes coronarios agudos sin elevación del segmento ST: un informe del Grupo de trabajo del Colegio Americano de Cardiología / Asociación Americana del Corazón sobre las guías de práctica. 2014. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25260718>.
34. Song N, Li X-M, Luo J-Y, Zhai H, Zhao Q, Zhou X-R, et al. Construction and analysis for differentially expressed long non-coding RNAs and mRNAs in acute myocardial infarction. *Scientific Reports*. 2020;10(1):6989.
35. Schulte C, Molz S, Appelbaum S, Karakas M, Ojeda F, Lau DM, et al. miRNA-197 and miRNA-223 Predict Cardiovascular Death in a Cohort of Patients with Symptomatic Coronary Artery Disease. *PLoS One*. 2015;10(12):e0145930.
36. Li N, Zhou H, Tang Q. miR-133: A Suppressor of Cardiac Remodeling? *Frontiers in Pharmacology*. 2018;9:903.
37. Bostjancic E, Zidar N, Stajner D, Glavac D. MicroRNA miR-1 is up-regulated in remote myocardium in patients with myocardial infarction. *Folia Biol (Praha)*. 2010;56(1):27-31.
38. Khanaghaei M, Tourkianvalashani F, Hekmatimoghaddam S, Ghasemi N, Rahaie M, Khorramshahi V, et al. Circulating miR-126 and miR-499 reflect progression of cardiovascular disease; correlations with uric acid and ejection fraction. *Heart Int*. 2016;11(1):e1-e9.
39. Rodríguez-Artalejo F, Banegas Banegas JR, Guallar-Castillón P. Epidemiología de la insuficiencia cardíaca. *Revista Española de Cardiología*. 2004;57(2):163-70.

40. Farmakis D, Parissis J, Lekakis J, Filippatos G. Insuficiencia cardiaca aguda: epidemiología, factores de riesgo y prevención. *Revista Española de Cardiología*. 2015;68(3):245-8.
41. Díaz F, Nazzal C, Verdejo H. Incidencia y letalidad intrahospitalaria por insuficiencia cardiaca en Chile: ¿Existen diferencias por sexo? 2017; 145:[703-9 pp.]. Available from: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rmc/v145n6/0034-9887-rmc-145-06-0703.pdf>.
42. Alva C. Insuficiencia cardiaca en niños. *Revista mexicana de cardiología*. 2014;25:15-20.
43. MINSAL. Guía Clínica Insuficiencia Cardíaca. In: Salud SCdCyCCyMd, editor. 2015. p. 96.
44. Arias Sosa LA. Uso de micro RNA en el manejo de la insuficiencia cardiaca. *Archivos de Cardiología de México*. 2017;87(3):205-24.
45. Bover R. Infarto de Miocardio (enfermedad coronaria, cardiopatía isquémica) - causa de Insuficiencia Cardiaca Insuficiencia Cardiaca para pacientes 2018 [Available from: <https://www.myendnoteweb.com/EndNoteWeb.html?func=new&>].
46. González, Fernández, Rodríguez, González. ARNm e insuficiencia cardíaca 2017; 37:[49-55 pp.].
47. Clasificaciones de la Insuficiencia Cardíaca Escuela de Medicina Pontificia Universidad Católica de Chile 2018 [Available from: <https://medicina.uc.cl/publicacion/clasificaciones-la-insuficiencia-cardiaca/>].
48. Abraham G, Malik R, Yonova-Doing E, Salim A, Wang T, Danesh J, et al. Genomic risk score offers predictive performance comparable to clinical risk factors for ischaemic stroke. *Nature Communications*. 2019;10(1):5819.
49. Siriratnam P, Godfrey A, O'Connor E, Pearce D, Hu C-C, Low A, et al. Prevalence and risk factors of ischaemic stroke in the young: a regional Australian perspective. *Internal Medicine Journal*. 2020;50(6):698-704.
50. Gaudio J, Graña D, Goñi M, Colina V, Cosentino A, Pensado R, et al. Epidemiológica del ataque cerebro vascular en un hospital universitario. *Revista Uruguaya de Medicina Interna*. 2019;4:24-31.
51. Rusek L, Persson CU, Svärdsudd K, Blomstrand A, Blomstrand C, Welin L, et al. Lifetime risk of stroke in the general male population. *Acta Neurologica Scandinavica*. 2020;142(1):30-6.
52. Anderlini D, Wallis G, Marinovic W. Incidence of Hospitalization for Stroke in Queensland, Australia: Younger Adults at Risk. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 2020;29(6):104797.
53. ENCUESTA NACIONAL DE SALUD 2016-2017: Primeros resultados [Internet]. Departamento de Epidemiología, División de Planificación Sanitaria, Subsecretaría de Salud Pública. 2017.
54. Ataque Cerebrovascular Ministerio de Salud 2017 [Available from: <https://medicina.uc.cl/publicacion/clasificaciones-la-insuficiencia-cardiaca/>].
55. CDC. Conozca los signos y síntomas de los accidentes cerebrovasculares Centro para el control y prevención de Enfermedades (CDC) 2016 [Available from: [https://www.cdc.gov/dhdsps/spanish/fs\\_strokesigns\\_spanish.htm](https://www.cdc.gov/dhdsps/spanish/fs_strokesigns_spanish.htm)].
56. Oberreuter G, Silva N, Caba S, Morales M, Nieto E, Guevara C. Accidente cerebrovascular isquémico en pacientes con trombo intracavitario: Experiencia con tratamientos distintos en fase aguda. *Revista médica de Chile*. 2014;142:1200-4.
57. Khoshnam SE, Winlow W, Farbood Y, Moghaddam HF, Farzaneh M. Emerging Roles of microRNAs in Ischemic Stroke: As Possible Therapeutic Agents. *J Stroke*. 2017;19(2):166-87.

58. Guzmán Grenfell AM, Maldonado Noriega L, Mendoza Atencio R, Hicks Gómez JJ. La función plaquetaria más allá de la hemostasis: participación en las enfermedades respiratorias. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*. 2005;18:240-6.
59. González-Villalva A, Bizarro-Nevarés P, Rojas-Lemus M, López-Valdez N, Ustarroz-Cano M, Barbosa-Barrón F, et al. El megacariocito: una célula muy original. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*. 2019;62:6-18.
60. Fisher MH, Di Paola J. Genomics and transcriptomics of megakaryocytes and platelets: Implications for health and disease. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*. 2018;2(4):630-9.
61. Palomo I, Pereira J, Palma J. *Hematología, Fisiopatología y Diagnóstico*. Talca EUd, editor. Talca, Chile 2005.
62. González A, Falcón C, Fortoul T. Vías de señalización implicadas en la megacariopoyesis 2010; 146. Available from: [https://www.anmm.org.mx/GMM/2010/n2/50\\_vol\\_146\\_n2.pdf](https://www.anmm.org.mx/GMM/2010/n2/50_vol_146_n2.pdf).
63. PG H. Megacariocitopoyesis y trombopoyesis. *Hematología* [Internet]. 2017; 21.
64. Best MG, Vancura A, Wurdinger T. Platelet RNA as a circulating biomarker trove for cancer diagnostics. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2017;15(7):1295-306.
65. Dahiya N, Sarachana T, Vu L, Becker KG, Wood WH, Zhang Y, et al. Platelet MicroRNAs: An Overview. *Transfusion Medicine Reviews*. 2015;29(4):215-9.
66. Edelstein LC, McKenzie SE, Shaw C, Holinstat MA, Kunapuli SP, Bray PF. MicroRNAs in platelet production and activation. *J Thromb Haemost*. 2013;11 Suppl 1:340-50.
67. Edelstein L, Bray PF. Noncoding RNAs in Platelet Biology. *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders*: Springer, Cham; 2017. p. 239-52.
68. Fernández-Delgado N, Hernández-Ramírez P, Forrellat-Barríos M. Espectro funcional de las plaquetas: de la hemostasia a la medicina regenerativa. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. 2012;28:200-16.
69. Nassa G, Giurato G, Cimmino G, Rizzo F, Ravo M, Salvati A, et al. Splicing of platelet resident pre-mRNAs upon activation by physiological stimuli results in functionally relevant proteome modifications. *Scientific Reports*. 2018;8(1):498.
70. Palomo I PJ, Palma J. *Hematología, Fisiopatología y Diagnóstico*. Talca Ud, editor. Talca, Chile 2005.
71. Bermejo E. Plaquetas. Instituto de Investigaciones Hematológicas “Mariano R. Castex”. Academia Nacional de Medicina de Bs As, Dpto. de Hemostasia y Trombosis; 2017.
72. Monteiro MC, O’Connor JE, Martínez M. La Citometría de Flujo en el Análisis de las Plaquetas: (I) Aspectos Estructurales y Funcionales de las Plaquetas. *Revista de Diagnóstico Biológico*. 2001;50:111-36.
73. García M, Coma C. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LAS PLAQUETAS. *Rev Cubana Angiol y Cir Vasc*. 2000;1.
74. Alberto M, Asensio M, Sánchez A. Fisiología de la función plaquetaria. 2018;22.
75. García E, Jay D. Filamina plaquetaria: Una proteína del citoesqueleto integradora de la función celular+. *Archivos de cardiología de México*. 2006;76:67-75.
76. Rumbaut R, Thiagarajan P. Platelet Adhesion to Vascular Walls. *Platelet-Vessel Wall Interactions in Hemostasis and Thrombosis*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences 2010.
77. Gibbins JM. Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation. *Journal of Cell Science*. 2004;117(16):3415.
78. Flores O, Ramírez K, Meza J, Nava J. Fisiología de la coagulación. *Revista Mexicana de Anestesiología*. 2014;37.
79. Rumbaut R, Thiagarajan P. Platelet Aggregation. *Platelet-Vessel Wall Interactions in Hemostasis and Thrombosis*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences 2010.



80. Bye AP, Unsworth AJ, Gibbins JM. Platelet signaling: a complex interplay between inhibitory and activatory networks. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2016;14(5):918-30.
81. Ennis I, Villa M. RECEPTORES Y MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES. 2011.
82. Tallano C. MICROPARTÍCULAS CIRCULANTES. Rosario, Argentina: Centro de Investigación y Biotecnología – Wiener Laboratorios SAIC; 2018.
83. El-Gamal H, Parray AS, Mir FA, Shuaib A, Agouni A. Circulating microparticles as biomarkers of stroke: A focus on the value of endothelial- and platelet-derived microparticles. *Journal of Cellular Physiology*. 2019;234(10):16739-54.
84. Campbell LE, Nelson J, Gibbons E, Judd AM, Bell JD. Membrane Properties Involved in Calcium-Stimulated Microparticle Release from the Plasma Membranes of S49 Lymphoma Cells. *The Scientific World Journal*. 2014;2014:537192.
85. Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Cantaluppi V, Biancone L. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney International*. 2010;78(9):838-48.
86. Burnouf T, Goubran HA, Chou M-L, Devos D, Radosevic M. Platelet microparticles: Detection and assessment of their paradoxical functional roles in disease and regenerative medicine. *Blood Reviews*. 2014;28(4):155-66.
87. Lazar S, Goldfinger LE. Platelet Microparticles and miRNA Transfer in Cancer Progression: Many Targets, Modes of Action, and Effects Across Cancer Stages. *Frontiers in cardiovascular medicine*. 2018;5:13-.
88. Nomura S, Shimizu M. Clinical significance of procoagulant microparticles. *Journal of Intensive Care*. 2015;3(1):2.
89. Catalano M, O'Driscoll L. Inhibiting extracellular vesicles formation and release: a review of EV inhibitors. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2020;9(1):1703244.
90. Pordzik J, Piszczak K, De Rosa S, Jones AD, Eyileten C, Indolfi C, et al. The Potential Role of Platelet-Related microRNAs in the Development of Cardiovascular Events in High-Risk Populations, Including Diabetic Patients: A Review. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:74.
91. Wang Y, Liu J, Ma J, Sun T, Zhou Q, Wang W, et al. Exosomal circRNAs: biogenesis, effect and application in human diseases. *Molecular Cancer*. 2019;18(1):116.
92. Osman A, Hitzler WE, Ameer A, Provost P. Differential Expression Analysis by RNA-Seq Reveals Perturbations in the Platelet mRNA Transcriptome Triggered by Pathogen Reduction Systems. *PLOS ONE*. 2015;10(7):e0133070.
93. Patrick P. The clinical significance of platelet microparticle-associated microRNAs. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2017;55(5):657-66.
94. Clancy L, Freedman JE. The role of circulating platelet transcripts. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2015;13(S1):S33-S9.
95. Stojkovic S, Nossent AY, Haller P, Jäger B, Vargas KG, Wojta J, et al. MicroRNAs as Regulators and Biomarkers of Platelet Function and Activity in Coronary Artery Disease. *Thromb Haemost*. 2019;119(10):1563-72.
96. Xia L, Zeng Z, Tang WH. The Role of Platelet Microparticle Associated microRNAs in Cellular Crosstalk. *Frontiers in cardiovascular medicine*. 2018;5:29-.
97. Rowley JW, Chappaz S, Corduan A, Chong MM, Campbell R, Khoury A, et al. Dicer1-mediated miRNA processing shapes the mRNA profile and function of murine platelets. *Blood*. 2016;127(14):1743-51.
98. Ghafouri-Fard S, Esmaeili M, Taheri M. Expression of non-coding RNAs in hematological malignancies. *Eur J Pharmacol*. 2020;875:172976.
99. Cao Q, Wu J, Wang X, Song C. Noncoding RNAs in Vascular Aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020;2020:7914957.

100. de Gonzalo-Calvo D, Iglesias-Gutiérrez E, Llorente-Cortés V. Biomarcadores epigenéticos y enfermedad cardiovascular: los microARN circulantes. *Revista Española de Cardiología*. 2017;70(9):763-9.
101. Peters MMC, Sampaio-Pinto V, da Costa Martins PA. Non-coding RNAs in endothelial cell signalling and hypoxia during cardiac regeneration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2020;1867(3):118515.
102. Cajal SRy, Hümmel S. Más allá de los genes. *Cómo podemos entender el DNA No codificante* 2018; 135.
103. Silva DCPd, Carneiro FD, Almeida KCd, Fernandes-Santos C. Role of miRNAs on the Pathophysiology of Cardiovascular Diseases. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2018;111:738-46.
104. Lin R, Rahtu-Korpela L, Magga J, Ulvila J, Swan J, Kemppe A, et al. miR-1468-3p Promotes Aging-Related Cardiac Fibrosis. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. 2020;20:589-605.
105. Ramírez J, Jiménez M. Implicaciones funcionales de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en genes codificantes de proteínas y no codificantes en enfermedades multifactoriales. *Gac Med Mex [Internet]*. 2017; 153. Available from: [http://www.anmm.org.mx/GMM/2017/n2/GMM\\_153\\_2017\\_2\\_238-250.pdf](http://www.anmm.org.mx/GMM/2017/n2/GMM_153_2017_2_238-250.pdf).
106. Pabón-Martínez YV. MicroARNs: una visión molecular. *Revista de la Universidad Industrial de Santander Salud*. 2011;43:289-97.
107. Bhaskaran M, Mohan M. MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. *Veterinary pathology*. 2014;51(4):759-74.
108. Jesús G-L, Miguel AB-E, Jesús del M. MicroRNA biogenesis and variability. *Biomolecular Concepts*. 2013;4(4):367-80.
109. Hembrom AA, Srivastava S, Garg I, Kumar B. MicroRNAs in venous thromboembolism. *Clinica Chimica Acta*. 2020;504:66-72.
110. Nik Mohamed Kamal NNSB, Shahidan WNS. Non-Exosomal and Exosomal Circulatory MicroRNAs: Which Are More Valid as Biomarkers? *Frontiers in Pharmacology*. 2020;10:1500.
111. Salone V, Rederstorff M. Stem-loop RT-PCR based quantification of small non-coding RNAs. *Methods Mol Biol*. 2015;1296:103-8.
112. Arias Sosa LA. Uso de micro RNA en el manejo de la insuficiencia cardiaca. *Archivos de cardiología de México*. 2017;87:205-24.
113. Martinez-Sanchez A, Murphy CL. MicroRNA Target Identification-Experimental Approaches. *Biology*. 2013;2(1):189-205.
114. miRBase [Internet]. Universidad de Manchester. Available from: <http://www.mirbase.org/index.shtml>.
115. Lin L, Li Q, Hao W, Zhang Y, Zhao L, Han W. Upregulation of LARNnc Malat1 Induced Proliferation and Migration of Airway Smooth Muscle Cells via miR-150-eIF4E/Akt Signaling. *Frontiers in Physiology*. 2019;10:1337.
116. Ruan X, Li P, Chen Y, Shi Y, Pirooznia M, Seifuddin F, et al. In vivo functional analysis of non-conserved human lARNncs associated with cardiometabolic traits. *Nature Communications*. 2020;11(1):45.
117. Trovero MF, Geisinger A. Los ARNs no codificantes largos y su vinculación con las patologías testiculares. *Anales de la Facultad de Medicina*. 2019;6:12-47.
118. Dahariya S, Paddibhatla I, Kumar S, Raghuwanshi S, Palapati A, Gutti RK. Long non-coding RNA: Classification, biogenesis and functions in blood cells. *Molecular Immunology*. 2019;112:82-92.
119. Ma L, Bajic VB, Zhang Z. On the classification of long non-coding RNAs. *RNA biology*. 2013;10(6):925-33.

120. Zhang P, Wu W, Chen Q, Chen M. Non-Coding RNAs and their Integrated Networks. *Journal of integrative bioinformatics*. 2019;16(3):20190027.
121. Shen E, Zhu X, Hua S, Chen H, Ye C, Zhou L, et al. Genome-wide identification of oil biosynthesis-related long non-coding RNAs in allopolyploid *Brassica napus*. *BMC Genomics*. 2018;19(1):745.
122. Ma X, Zhang X, Traore SM, Xin Z, Ning L, Li K, et al. Genome-wide identification and analysis of long noncoding RNAs (lARNncs) during seed development in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *BMC Plant Biology*. 2020;20(1):192.
123. Yao P, Li Y-L, Chen Y, Shen W, Wu K-Y, Xu W-h. Overexpression of long non-coding RNA Rian attenuates cell apoptosis from cerebral ischemia-reperfusion injury via Rian/miR-144-3p/GATA3 signaling. *Gene*. 2020;737:144411.
124. Li G-J, Ding H, Miao D. Long-noncoding RNA HOTAIR inhibits immunologic rejection of mouse leukemia cells through activating the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in a mouse model of leukemia. *Journal of Cellular Physiology*. 2019;234(7):10386-96.
125. NONCODE [Internet]. NetWatch Science. 2017. Available from: <http://www.noncode.org/>.
126. RNA Central [Internet]. Instituto Europeo de Bioinformática. Available from: <https://rnacentral.org/>.
127. Kumar L, Shamsuzzama, Haque R, Baghel T, Nazir A. Circular RNAs: the Emerging Class of Non-coding RNAs and Their Potential Role in Human Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology*. 2017;54(9):7224-34.
128. Greene J, Baird A-M, Brady L, Lim M, Gray SG, McDermott R, et al. Circular RNAs: Biogenesis, Function and Role in Human Diseases. *Frontiers in molecular biosciences*. 2017;4:38-.
129. Devaux Y, Creemers EE, Boon RA, Werfel S, Thum T, Engelhardt S, et al. Circular RNAs in heart failure. *European Journal of Heart Failure*. 2017;19(6):701-9.
130. Jamal M, Song T, Chen B, Faisal M, Hong Z, Xie T, et al. Recent Progress on Circular RNA Research in Acute Myeloid Leukemia. *Frontiers in Oncology*. 2019;9:1108.
131. Vromman M, Vandesompele J, Volders P-J. Closing the circle: current state and perspectives of circular RNA databases. *Briefings in Bioinformatics*. 2020.
132. Huang S, Yang B, Chen BJ, Bliim N, Ueberham U, Arendt T, et al. The emerging role of circular RNAs in transcriptome regulation. *Genomics*. 2017;109(5):401-7.
133. Nicolet BP, Engels S, Aglialoro F, van den Akker E, von Lindern M, Wolkers MC. Circular RNA expression in human hematopoietic cells is widespread and cell-type specific. *Nucleic Acids Research*. 2018;46(16):8168-80.
134. Huang A, Zheng H, Wu Z, Chen M, Huang Y. Circular RNA-protein interactions: functions, mechanisms, and identification. *Theranostics*. 2020;10(8):3503-17.
135. Lei B, Tian Z, Fan W, Ni B. Circular RNA: a novel biomarker and therapeutic target for human cancers. *International journal of medical sciences*. 2019;16(2):292-301.
136. Li X, Yang L, Chen L-L. The Biogenesis, Functions, and Challenges of Circular RNAs. *Molecular Cell*. 2018;71(3):428-42.
137. circAtlas 2.0 [Internet]. Institutos de Ciencias de la Vida de Beijing, Academia de Ciencias de China. Available from: <http://159.226.67.237:8080/new/index.php>.
138. Pordzik J, Piszczak K, De Rosa S, Jones AD, Eyileten C, Indolfi C, et al. The Potential Role of Platelet-Related microRNAs in the Development of Cardiovascular Events in High-Risk Populations, Including Diabetic Patients: A Review. *Frontiers in endocrinology*. 2018;9:74-.
139. Espinosa-Parrilla Y, Gonzalez-Billault C, Fuentes E, Palomo I, Alarcón M. Decoding the Role of Platelets and Related MicroRNAs in Aging and Neurodegenerative Disorders. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2019;11:151.

140. Fuentes E, Palomo I, Alarcón M. Platelet miRNAs and cardiovascular diseases. *Life Sciences*. 2015;133:29-44.
141. Elgheznawy A, Shi L, Hu J, Wittig I, Laban H, Pircher J, et al. Dicer Cleavage by Calpain Determines Platelet microRNA Levels and Function in Diabetes. *Circulation Research*. 2015;117(2):157-65.
142. Best MG, Sol N, Kooi I, Tannous J, Westerman BA, Rustenburg F, et al. RNA-Seq of Tumor-Educated Platelets Enables Blood-Based Pan-Cancer, Multiclass, and Molecular Pathway Cancer Diagnostics. *Cancer cell*. 2015;28(5):666-76.
143. Shi R, Zhou X, Ji W-J, Zhang Y-Y, Ma Y-Q, Zhang J-Q, et al. The Emerging Role of miR-223 in Platelet Reactivity: Implications in Antiplatelet Therapy. *BioMed research international*. 2015;2015:981841-.
144. Chen Z, Li C, Lin K, Zhang Q, Chen Y, Rao L. MicroRNAs in acute myocardial infarction: Evident value as novel biomarkers? *Anatolian journal of cardiology*. 2018;19(2):140-7.
145. Corsten Maarten F, Dennert R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, Hofstra L, et al. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 Reflect Myocardial Damage in Cardiovascular Disease. *Circulation: Cardiovascular Genetics*. 2010;3(6):499-506.
146. Zhang L, Zhang J, Tong Q, Wang G, Dong H, Wang Z, et al. Reduction of miR-29a-3p induced cardiac ischemia reperfusion injury in mice via targeting Bax. *Experimental and therapeutic medicine*. 2019;18(3):1729-37.
147. Rosero-Salazar DH, Ortiz-Salazar MA, Salazar-Monsalve L. Miocardiocitos conducentes ventriculares. *Universidad y Salud*. 2015;17:262-70.
148. Kukreja RC, Yin C, Salloum FN. MicroRNAs: new players in cardiac injury and protection. *Molecular pharmacology*. 2011;80(4):558-64.
149. van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, et al. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(35):13027.
150. Port JD, Walker LA, Polk J, Nunley K, Buttrick PM, Sucharov CC. Temporal expression of miRNAs and mRNAs in a mouse model of myocardial infarction. *Physiological Genomics*. 2011;43(19):1087-95.
151. Yan H, Ma F, Zhang Y, Wang C, Qiu D, Zhou K, et al. miRNAs as biomarkers for diagnosis of heart failure: A systematic review and meta-analysis. *Medicine*. 2017;96(22):e6825-e.
152. Fan K-L, Zhang H-F, Shen J, Zhang Q, Li X-L. Circulating microRNAs levels in Chinese heart failure patients caused by dilated cardiomyopathy. *Indian heart journal*. 2013;65(1):12-6.
153. Tijssen Anke J, Creemers Esther E, Moerland Perry D, de Windt Leon J, van der Wal Allard C, Kok Wouter E, et al. MiR423-5p As a Circulating Biomarker for Heart Failure. *Circulation Research*. 2010;106(6):1035-9.
154. Zhang X, Schulze PC. MicroRNAs in heart failure: Non-coding regulators of metabolic function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2016;1862(12):2276-87.
155. Jäntti T, Segersvärd H, Tolppanen H, Tarvasmäki T, Lassus J, Devaux Y, et al. Circulating levels of microRNA 423-5p are associated with 90 day mortality in cardiogenic shock. *ESC Heart Failure*. 2019;6(1):98-102.
156. Abu-Halima M, Meese E, Saleh MA, Keller A, Abdul-Khaliq H, Raedle-Hurst T. MicroRNA 150-5p predicts overt heart failure in patients with univentricular hearts. *PLOS ONE*. 2019;14(10):e0223606.
157. Scrutinio D, Conserva F, Passantino A, Iacoviello M, Lagioia R, Gesualdo L. Circulating microRNA-150-5p as a novel biomarker for advanced heart failure: A genome-wide prospective study. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2017;36(6):616-24.

158. Wehbe N, Nasser SA, Pintus G, Badran A, Eid AH, Baydoun E. MicroRNAs in Cardiac Hypertrophy. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(19):4714.
159. Tang Y, Wang Y, Park K-M, Hu Q, Teoh J-P, Broskova Z, et al. MicroRNA-150 protects the mouse heart from ischaemic injury by regulating cell death. *Cardiovascular research*. 2015;106(3):387-97.
160. Cheng Y, Zhang C. MicroRNA-21 in cardiovascular disease. *Journal of cardiovascular translational research*. 2010;3(3):251-5.
161. Desiree B. MicroRNA-21 as Therapeutic Target in Cancer and Cardiovascular Disease. *Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery (Discontinued)*. 2010;5(3):156-61.
162. Yuan J, Chen H, Ge D, Xu Y, Xu H, Yang Y, et al. Mir-21 Promotes Cardiac Fibrosis After Myocardial Infarction Via Targeting Smad7. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017;42(6):2207-19.
163. Huang C-K, Bär C, Thum T. miR-21, Mediator, and Potential Therapeutic Target in the Cardiorenal Syndrome. *Frontiers in Pharmacology*. 2020;11:726.
164. Rink C, Khanna S. MicroRNA in ischemic stroke etiology and pathology. *Physiological Genomics*. 2010;43(10):521-8.
165. Li G, Morris-Blanco KC, Lopez MS, Yang T, Zhao H, Vemuganti R, et al. Impact of microRNAs on ischemic stroke: From pre- to post-disease. *Progress in Neurobiology*. 2018;163-164:59-78.
166. Carvajal Carvajal C. El endotelio: estructura, función y disfunción endotelial. *Medicina Legal de Costa Rica*. 2017;34:90-100.
167. Wen-Jing L, Li-Li Z, Yang W, Yu Z, Huai-Bin L, Xuan-Qiang T, et al. Blood microRNA-15a Correlates with IL-6, IGF-1 and Acute Cerebral Ischemia. *Current Neurovascular Research*. 2018;15(1):63-71.
168. Yan H, Fang M, Liu X-Y. Role of microRNAs in Stroke and Poststroke Depression. *The Scientific World Journal*. 2013;2013:459692.
169. Ultimo S, Zauli G, Martelli AM, Vitale M, McCubrey JA, Capitani S, et al. Cardiovascular disease-related miRNAs expression: potential role as biomarkers and effects of training exercise. *Oncotarget*. 2018;9(24):17238-54.
170. Ruiz-Mejía AF, Pérez-Romero GE, Ángel-Macías MA. Ataque cerebrovascular isquémico: fisiopatología desde el sistema biomédico y su equivalente en la medicina tradicional china. *Revista de la Facultad de Medicina*. 2017;65:137-44.
171. Long G, Wang F, Li H, Yin Z, Sandip C, Lou Y, et al. Circulating miR-30a, miR-126 and let-7b as biomarker for ischemic stroke in humans. *BMC neurology*. 2013;13:178-.
172. Jiang T, Zhou S, Li X, Song J, An T, Huang X, et al. MicroRNA-155 induces protection against cerebral ischemia/reperfusion injury through regulation of the Notch pathway in vivo. *Experimental and therapeutic medicine*. 2019;18(1):605-13.
173. Zhang L, Liu C, Huang C, Xu X, Teng J. miR-155 Knockdown Protects against Cerebral Ischemia and Reperfusion Injury by Targeting MafB. *BioMed Research International*. 2020;2020:6458204.
174. Roitbak T. Silencing a Multifunctional microRNA Is Beneficial for Stroke Recovery. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2018;11:58-.
175. Sun Y, Liu R, Xia X, Xing L, Yang C, Jiang J, et al. Large-Scale Profiling of lARNncs in Human Non-Nucleated Cells: Implications in Cell Function and Disease. *SSRN Electronic Journal*. 2018.
176. Xu G, Zhang W, Wang Z, Chen M, Shi B. Matrine regulates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress through long non-coding RNA HOTAIR/miR-106b-5p axis via AKT and STAT3 pathways. *Bioscience reports*. 2020;40(5):BSR20192560.

177. Wang X-M, Li X-M, Song N, Zhai H, Gao X-M, Yang Y-N. Long non-coding RNAs H19, MALAT1 and MIAT as potential novel biomarkers for diagnosis of acute myocardial infarction. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019;118:109208.
178. Collins L, Binder P, Chen H, Wang X. Regulation of Long Non-coding RNAs and MicroRNAs in Heart Disease: Insight Into Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Frontiers in Physiology*. 2020;11:798.
179. Chen C, Tang Y, Sun H, Lin X, Jiang B. The roles of long noncoding RNAs in myocardial pathophysiology. *Bioscience reports*. 2019;39(11):BSR20190966.
180. Hu H, Wu J, Li D, Zhou J, Yu H, Ma L. Knockdown of lARNnc MALAT1 attenuates acute myocardial infarction through miR-320-Pten axis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018;106:738-46.
181. Hu H, Wu J, Yu X, Zhou J, Yu H, Ma L. Long non-coding RNA MALAT1 enhances the apoptosis of cardiomyocytes through autophagy inhibition by regulating TSC2-mTOR signaling. *Biological Research*. 2019;52.
182. Zhang Y, Jiao L, Sun L, Li Y, Gao Y, Xu C, et al. LARNnc ZFAS1 as a SERCA2a Inhibitor to Cause Intracellular Ca(2+) Overload and Contractile Dysfunction in a Mouse Model of Myocardial Infarction. *Circulation research*. 2018;122(10):1354-68.
183. Papait R, Kunderfranco P, Stirparo GG, Latronico MVG, Condorelli G. Long Noncoding RNA: a New Player of Heart Failure? *Journal of Cardiovascular Translational Research*. 2013;6(6):876-83.
184. Dai W, Lee D. Interfering with long chain noncoding RNA ANRIL expression reduces heart failure in rats with diabetes by inhibiting myocardial oxidative stress. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2019;120(10):18446-56.
185. Avazpour N, Hajjari M, Yazdankhah S, Sahni A, Foroughmand AM. Circulating HOTAIR RNA Is Potentially Up-regulated in Coronary Artery Disease. *Genomics & informatics*. 2018;16(4):e25-e.
186. Tan C, Liu J, Wei J, Yang S. Effects of ANRIL variants on the risk of ischemic stroke: a meta-analysis. *Bioscience reports*. 2019;39(5):BSR20182127.
187. Feng L, Guo J, Ai F. Circulating long noncoding RNA ANRIL downregulation correlates with increased risk, higher disease severity and elevated pro-inflammatory cytokines in patients with acute ischemic stroke. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2019;33(1):e22629-e.
188. Bao M-H, Szeto V, Yang BB, Zhu S-z, Sun H-S, Feng Z-P. Long non-coding RNAs in ischemic stroke. *Cell Death & Disease*. 2018;9(3):281.
189. Zhang X, Tang X, Liu K, Hamblin MH, Yin K-J. Long Noncoding RNA Malat1 Regulates Cerebrovascular Pathologies in Ischemic Stroke. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2017;37(7):1797-806.
190. Sun C, Huang L, Li Z, Leng K, Xu Y, Jiang X, et al. Long non-coding RNA MIAT in development and disease: a new player in an old game. *Journal of biomedical science*. 2018;25(1):23-.
191. Wang S-W, Liu Z, Shi Z-S. Non-Coding RNA in Acute Ischemic Stroke: Mechanisms, Biomarkers and Therapeutic Targets. *Cell Transplantation*. 2018;27(12):1763-77.
192. Maass PG, Glažar P, Memczak S, Dittmar G, Hollfinger I, Schreyer L, et al. A map of human circular RNAs in clinically relevant tissues. *Journal of Molecular Medicine*. 2017;95(11):1179-89.
193. Gabriel AF, Costa MC, Enguita FJ. Circular RNA-Centered Regulatory Networks in the Physiopathology of Cardiovascular Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(2).
194. Bayoumi AS, Aonuma T, Teoh J-P, Tang Y-L, Kim I-M. Circular noncoding RNAs as potential therapies and circulating biomarkers for cardiovascular diseases. *Acta pharmacologica Sinica*. 2018;39(7):1100-9.

195. Mehta SL, Dempsey RJ, Vemuganti R. Role of circular RNAs in brain development and CNS diseases. *Progress in Neurobiology*. 2020;186:101746.
196. Sun Y, Chen R, Lin S, Xie X, Ye H, Zheng F, et al. Association of circular RNAs and environmental risk factors with coronary heart disease. *BMC Cardiovascular Disorders*. 2019;19(1):223.
197. Cheng J, Zhuo H, Xu M, Wang L, Xu H, Peng J, et al. Regulatory network of circRNA–miRNA–mRNA contributes to the histological classification and disease progression in gastric cancer. *Journal of Translational Medicine*. 2018;16(1):216.
198. Wang Y, Huang J, Ma Y, Tang G, Liu Y, Chen X, et al. MicroRNA-29b is a therapeutic target in cerebral ischemia associated with aquaporin 4. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2015;35(12):1977-84.