



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Dpto. de Biotecnología

Alteraciones en la biogénesis de los microARNs en la  
insuficiencia cardiaca avanzada

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Biomédica

AUTOR/A: Asturiano Pérez-Chao, Alejandro

Tutor/a: García Gimeno, María Adelaida

Cotutor/a externo: TARAZON MELGUIZO, ESTEFANIA

Director/a Experimental: ROSELLO LLETI, ESTHER

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



## *ALTERACIÓN DE LA BIOGÉNESIS DE miARNs EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA AVANZADA*

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA

ALUMNO: ALEJANDRO ASTURIANO PÉREZ-CHAO

TUTORA UPV: MARÍA ADELAIDA GARCÍA GIMENO

TUTORAS IISLaFe : ESTEFANÍA TARAZÓN MELGUIZO

ESTHER ROSELLÓ LLETÍ

2021-22

VALENCIA, 20 de Agosto de 2022

# ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN .....	2
1. <i>Insuficiencia cardiaca</i> .....	2
1.1 Definición y terminología .....	2
1.2 Epidemiología y etiología .....	3
1.3 Miocardiopatías.....	6
1.4 Diagnóstico.....	7
1.5 Tratamiento.....	8
2. <i>microARNs</i> .....	9
2.1 Biogénesis de los microARNs .....	9
2.2 Transcripción y regulación de los miARNs .....	10
2.3 Procesamiento nuclear.....	11
2.4 Exportación nuclear.....	15
2.5 Procesamiento citoplasmático .....	15
3. <i>miARNs en la insuficiencia cardiaca</i> .....	18
4. <i>Alteraciones en la biogénesis de los miARNs</i> .....	19
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	20
III. MATERIAL Y MÉTODOS .....	21
1. <i>Obtención de muestras</i> .....	21
2. <i>Extracción de ARN</i> .....	22
3. <i>Secuenciación de miARNs</i> .....	22
4. <i>Secuenciación ARNm</i> .....	23
5. <i>Identificación y clasificación de los genes relacionados con la biogénesis de los miARNs. Búsqueda de miARNs responsables de la regulación postranscripcional de estos genes.</i> .....	23
6. <i>Análisis estadístico</i> .....	24
IV. RESULTADOS .....	25
1. <i>Características clínicas</i> .....	25
2. <i>Ratio de miARNs maduros/inmaduros</i> .....	26
2. <i>Identificación y clasificación de genes involucrados en la biogénesis de los miARNs</i> .....	27
3. <i>Expresión diferencial de los ARNm involucrados en la biogénesis de los miARNs</i> .....	28
4. <i>Expresión diferencial de miARNs reguladores de la biogénesis de los miARNs</i> .....	31
V. DISCUSIÓN.....	34
VI. CONCLUSIONES.....	37
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	38

## I. INTRODUCCIÓN

### 1. Insuficiencia cardiaca

#### 1.1 Definición y terminología

La insuficiencia cardiaca (IC) es un síndrome caracterizado por distintos síntomas (fatiga, disnea o hinchazón de tobillos) que pueden ir acompañados por signos (presión de la vena yugular elevada, chasquidos pulmonares o edemas periféricos) causadas por anomalías funcionales y/o estructurales cardíacas que dan como resultado un gasto cardíaco reducido y/o presiones intracardiacas elevadas en reposo o durante eventos de estrés. (Ponikowski et al., 2016)

La definición actual de IC se restringe en si misma a estadios en los cuales los síntomas clínicos se encuentran patentes. Antes de que estos síntomas aparezcan, los pacientes pueden presentar anomalías cardíacas asintomáticas, tanto estructurales como funcionales, entre las cuales destaca la disfunción sistólica o diastólica del ventrículo izquierdo. El reconocimiento de estos antecedentes es muy importante ya que están relacionados con un peor desarrollo de la enfermedad. Por otro lado, el comienzo de un tratamiento en los estadios iniciales de la enfermedad puede reducir la mortalidad en pacientes con disfunción sistólica asintomática del ventrículo izquierdo. (Wang et al., 2003)

La demostración de un motivo cardíaco subyacente es clave para el diagnóstico adecuado de la IC. Normalmente existen anomalías en el miocardio que desencadenan una disfunción sistólica o diastólica ventricular. Sin embargo, anomalías en las válvulas, pericardio, endocardio, ritmo cardíaco y circulación pueden causar también IC. La identificación del problema cardíaco existente es crucial por razones terapéuticas, ya que la patología concreta determina el tratamiento específico utilizado para paliarla. (Ponikowski et al., 2016)

Como podemos ver en la Tabla 1, la terminología principal usada para describir la IC es histórica y está basada en la medición de la fracción de eyección (FE) del ventrículo izquierdo. La IC comprende un amplio rango de pacientes, desde aquellos con FE del ventrículo izquierdo normal (considerada como  $\geq 50\%$ ; IC con FE preservada; FE<sub>p</sub>) hasta aquellos que presentan una FE del ventrículo izquierdo reducida (FE<sub>r</sub>, considerada como  $\leq 40\%$ ). Los pacientes que poseen una FE del ventrículo izquierdo entre el 40 y el 49% representan un “área gris” que se define como IC con FE de rango medio (ICF<sub>Er</sub>). Establecer las diferencias entre los pacientes con IC basadas en la FE es muy importante debido a las diferencias existentes a niveles etiológicos, demográficos, de comorbilidades y de respuesta a distintas terapias. (Butler et al., 2014)

Tabla 1. IC en función de la FE del ventrículo izquierdo		
Tipo	Características	FEVI (%)
IC con FE preservada (ICFEp).	Aumento del grosor de la pared del y/o de la aurícula izquierda	≥50
IC con FE en rango medio (ICFErm).	Disfunción sistólica leve con características de disfunción diastólica	40-49
IC con FE reducida (ICFEr).	Presencia de disfunción tanto sistólica como diastólica	≤40

IC: Insuficiencia cardiaca; FE: Fracción de eyección; (Datos extraídos de Ponikowski et al., 2016)

Por otro lado, también se puede clasificar la IC en función del desarrollo de síntomas o cambios estructurales. La Fundación Americana de Cardiología/Asociación Americana del Corazón establece la clasificación representada en la Tabla 2. (Yancy et al., 2013)

Tabla 2. Clasificación IC por FAC/AAC	
Etapas	Síntomas
A	Con alto riesgo de IC, pero sin cardiopatía estructural ni síntomas de IC.
B	Cardiopatía estructural, pero sin signos ni síntomas de IC.
C	Cardiopatía estructural con síntomas previos o actuales de IC.
D	IC refractaria que requiere intervenciones especializadas.

IC: insuficiencia cardiaca; FAC: Fundación Americana de Cardiología; AAC: Asociación Americana del Corazón. (Datos extraídos de la Fundación Americana de Cardiología. Yancy et al., 2013)

### 1.2 Epidemiología y etiología

La prevalencia de la IC depende de la definición aplicada, pero equivale aproximadamente al 1-2% de la población adulta en los países desarrollados, llegando a crecer a más del 10% en la población mayor de 70 años. En la población mayor de 65 años que presente disnea al realizar esfuerzos, uno de cada seis padecerá de IC no diagnosticada. El riesgo de por vida con 55 años es del 33% en hombres y del 28% en mujeres. La proporción de pacientes con ICFEp varía entre el 22 y el 73% en función de la definición aplicada, el entorno clínico, la edad, el sexo o la existencia de un infarto de miocardio previo entre otros. La ICFEp y la ICFEr parecen tener perfiles epidemiológicos y etiológicos distintos. (Van Riet et al., 2014)

La mortalidad derivada de cualquier causa generalmente es mayor en pacientes con ICFEr que en pacientes con ICFEp. En numerosas ocasiones, las hospitalizaciones son debidas a causas no cardiovasculares, especialmente en pacientes con ICFEp. Las hospitalizaciones por causas cardiovasculares no variaron del 2000 al 2010, sin embargo, sí que lo hicieron aquellas que derivaban de causas no cardiovasculares. (Gerber et al., 2015) En pacientes con IC, la mayoría de las muertes se produjeron debido a causas cardiovasculares, principalmente la muerte súbita o un empeoramiento de la propia IC.

Los datos europeos más recientes demuestran que los ratios de mortalidad en pacientes hospitalizados con IC tanto de forma estable como ambulatoria fueron del 17 y el 7% respectivamente y, los ratios de hospitalización fueron del 44 y el 32% respectivamente. (Maggioni et al., 2013)

La etiología de la IC es diversa dentro y a lo largo de las distintas regiones del planeta. No existe un único sistema de clasificación para las causas de la IC y además suele haber solapamiento entre las categorías potenciales. Como se puede observar en la Tabla 3, muchos pacientes tendrán diferentes patologías, tanto cardiovasculares como no cardiovasculares, las cuales agrupadas causan IC. La identificación de estas patologías diversas debe ser parte del trabajo de diagnóstico, ya que estas pueden ofrecer oportunidades de tratamiento específicas.

<b>Tabla 3. Etiologías de la IC</b>		
<b>MIOCARDIO DAÑADO</b>		
Insuficiencia cardiaca isquémica	Cicatriz miocárdica	
	Hibernación miocárdica	
	Enfermedad epicardial de la arteria coronaria	
	Microcirculación coronaria anormal	
	Disfunción endotelial	
Daño tóxico	Abuso de sustancias	Alcohol, cocaína, anfetaminas, esteroides anabólicos .
	Metales pesados	Cobalto, hierro...
	Medicación	Drogas citostáticas
	Radiación	
Daño inflamatorio	Relacionadas con infección	Bacterias, hongos, protozoos, parásitos...
	No relacionadas con infección	Enfermedades autoinmunes, miocarditis eosinofílica...
Infiltración	Relacionadas con malignidad	Infiltraciones directas
	No relacionadas con malignidad	Enfermedades de almacenamiento del glucógeno, amiloidosis, sarcoidosis...
Desequilibrios metabólicos	Hormonal	Enfermedades de la tiroides, deficiencia en GH, diabetes, síndrome metabólico...
	Nutricional	Deficiencias en tiamina, selenio, hierro, fosfatos, calcio...
Anormalidades genéticas	Formas diversas	Miocardiopatía hipertrófica, miocardiopatía dilatada...
<b>CONDICIONES DE DESARROLLO ANORMALES</b>		
Hipertensión		
Defectos estructurales en las válvulas del miocardio	Adquirida	Enfermedades de las válvulas pulmonar, tricúspide, aortica y mitral
	Congénita	Defectos en el septo atrial y ventricular
Patologías del endomiocardio y el pericardio	Pericardial	Efusión pericardial
	Endomiocárdica	Síndrome hipereosinófilo, fibrosis endomiocárdica...
Estado de alto rendimiento		Anemia severa, sepsis, enfermedad de Paget, embarazo...
Sobrecarga de volumen		Fallo renal
<b>ARRITMIAS</b>		
Taquicardias		Arritmias ventriculares atriales
Bradicardias		Disfunciones en el nódulo sinusal, problemas de circulación

IC: Insuficiencia cardiaca (Modificado de Ponikowski et al., 2016)

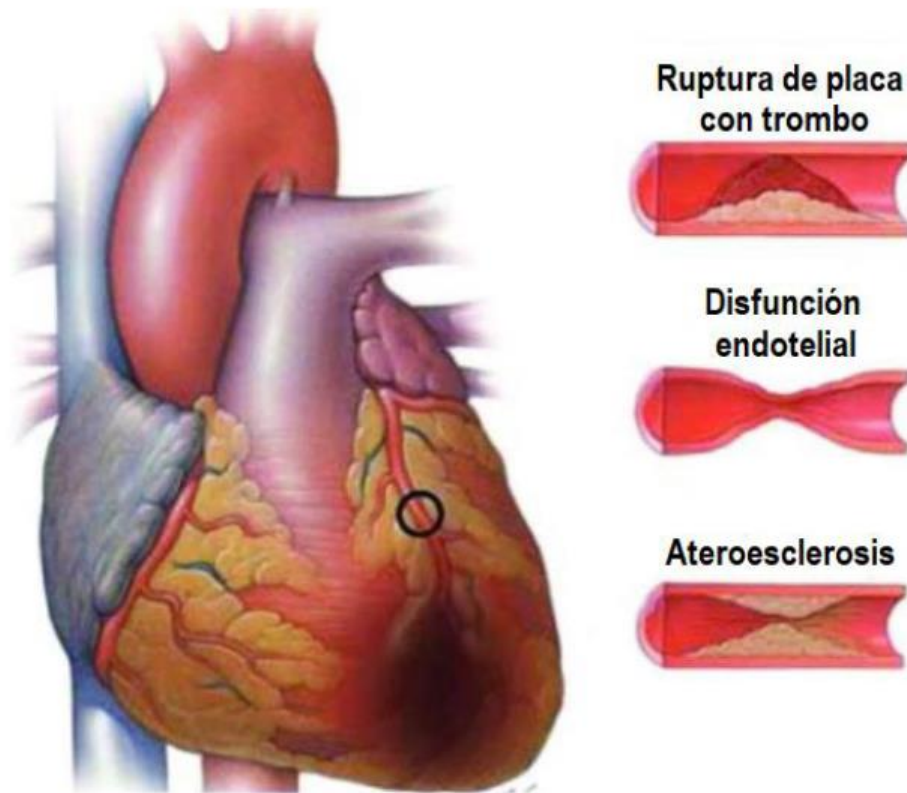
### 1.3 Miocardiopatías

Las miocardiopatías (MCI) son desórdenes del músculo cardiaco que causan una disfunción eléctrica y/o mecánica que da como resultado una patofisiología restrictiva, hipertrófica o dilatada.

La MCI isquémica se define como una disfunción sistólica del ventrículo izquierdo acompañada de alguna de las siguientes características: antecedentes de revascularización miocárdica previa o de infarto, más del 75% de estenosis en el tronco principal izquierdo o en la arteria descendente anterior izquierda, o dos vasos o más con una estenosis superior al 75%. Todo ello genera una pérdida de cardiomiocitos y la activación de distintos mecanismos de compensación para poder mantener el gasto cardiaco, los cuales generan habitualmente hiperplasia de células endoteliales y fibroblastos e hipertrofia de cardiomiocitos (Figura 1). Existen múltiples mecanismos que se atribuyen al desarrollo de la MCI isquémica, entre los cuales se incluyen factores mecánicos y neurohormonales. (Felker et al., 2002)

La MCI isquémica continúa siendo la causa de fallo cardiaco más común en el mundo desarrollado. El aumento de la incidencia se atribuye al éxito de la intervención coronaria percutánea primaria y trombolítica en infartos agudos de miocardio, lo que conduce a una mejor supervivencia del paciente, aunque a menudo también genera una mayor morbilidad debido a la remodelación del ventrículo izquierdo y la disfunción miocárdica crónica. (Gheorghide et al., 2006)





**Figura 1. MCI: Miocardiopatía isquémica.** (Modificado de Mihatov et al., 2018)

#### 1.4 Diagnóstico

Los síntomas de la IC a menudo son inespecíficos y, por lo tanto, no ayudan a discriminar entre la IC y otros problemas. Los signos, como presión venosa yugular elevada y desplazamiento del impulso apical, pueden ser más específicos, pero son más difíciles de detectar y tienen poca reproducibilidad. Los síntomas y signos pueden ser particularmente difíciles de identificar e interpretar en individuos obesos, en ancianos y en pacientes con enfermedad pulmonar crónica. Los pacientes más jóvenes con IC a menudo tienen una etiología, una presentación clínica y un resultado diferentes en comparación con los pacientes de mayor edad. (Kelder et al., 2011)

Siempre es necesario obtener un historial médico detallado. La IC es inusual en un individuo que no presente antecedentes médicos relevantes, mientras que ciertas características, particularmente el infarto de miocardio, aumentan en gran medida la posibilidad de sufrir IC en un paciente que presente los síntomas y signos adecuados. (Fonseca, 2006)

En las visitas médicas se deben evaluar los síntomas y signos de la IC, prestando especial atención a la evidencia de congestión.

La concentración plasmática de péptidos natriuréticos (PN) se puede utilizar como prueba de diagnóstico inicial, especialmente en casos no agudos cuando la ecocardiografía no está disponible de inmediato. Los PN elevados ayudan a establecer un diagnóstico inicial, identificando a aquellos pacientes que requieren de una investigación cardíaca adicional. Es

improbable que los pacientes con concentraciones plasmáticas normales de PN padezcan IC. (Roberts et al., 2015)

Un electrocardiograma (ECG) anormal aumenta la probabilidad del diagnóstico de IC, pero presenta baja especificidad. Algunas anomalías en el ECG brindan información sobre la etiología (por ejemplo, infarto de miocardio), y los hallazgos en el ECG pueden proporcionar indicaciones para el tratamiento (por ejemplo, marcapasos para bradicardia). La IC es improbable en pacientes que presentan un ECG completamente normal (posee sensibilidad del 89%). Por lo tanto, el uso rutinario de un ECG se recomienda principalmente para descartar IC.

La ecocardiografía es la prueba más útil para establecer el diagnóstico en pacientes con sospecha de IC. Proporciona información inmediata sobre los volúmenes de las cámaras, la función sistólica y diastólica ventricular, el grosor de la pared, la función valvular y la hipertensión pulmonar. Esta información es crucial para establecer el diagnóstico y determinar el tratamiento adecuado. (Paulus et al., 2007)

### 1.5 Tratamiento

Los objetivos del tratamiento de los pacientes con IC son mejorar su estado clínico, capacidad funcional y calidad de vida, prevenir el ingreso hospitalario y reducir la mortalidad.

Durante los últimos 30 años, la mejora en los tratamientos y su implementación han permitido que exista una mayor supervivencia y una tasa de hospitalización en pacientes con ICFeR mucho más reducida. Sin embargo, no existe un tratamiento curativo, sino que los tratamientos disponibles se centran en los síntomas y la causa que está originando la IC, en muchos casos, estos tratamientos no son suficientes. El trasplante cardiaco es el tratamiento de elección en la IC terminal refractaria a tratamiento médico o quirúrgico.

Se ha demostrado que los antagonistas neurohormonales (IECA, ARM y betabloqueantes) mejoran la supervivencia en pacientes con ICFeR y se recomiendan para el tratamiento de todos los pacientes con ICFeP, a menos que estén contraindicados o no se toleren.

Estos medicamentos deben usarse junto con diuréticos en pacientes con síntomas y/o signos de congestión. El uso de diuréticos debe modularse de acuerdo con el estado clínico del paciente. (Ponikowski et al., 2016)

Los síntomas y signos son de vital importancia para monitorizar la respuesta del paciente al tratamiento y conocer la estabilidad de este a lo largo del tiempo. La persistencia de los síntomas a pesar del tratamiento generalmente suele indicar la necesidad de una terapia adicional. Por otro lado, el empeoramiento de los síntomas es un desarrollo grave (que pone al paciente en riesgo de hospitalización urgente y muerte) y requiere la necesidad de atención médica inmediata. (Roberts et al., 2015)

## 2. microARNs

### 2.1 Biogénesis de los microARNs

Los microARNs (miARNs) son pequeños ARNs no codificantes monocatenarios de aproximadamente 21-23 nucleótidos de longitud. Poseen una uridina en su extremo 5' parcialmente complementaria al extremo 3' de las regiones no traducidas de los ARNs mensajeros (ARNm). (Lee & Ambros, 2001)

Los miARNs reclutan a un complejo proteico llamado Argonaute (AGO) para un ARNm diana complementario y este proceso produce la represión de la traducción o la degradación del ARNm. (Wu et al., 2006)

Se descubrieron por primera vez en *Caenorhabditis elegans* y se trata del tipo de ARN pequeño más abundante. Hoy en día se han detectado miARNs en prácticamente todos los modelos animales y la cantidad de estos se correlaciona con la complejidad del organismo. Los seres humanos tienen aproximadamente 2000 miARNs descritos. El genoma humano está formado por un gran número de genes de miARNs, los cuales representan el 1-5% de todos los genes del genoma. Además, los miARNs de mamíferos regulan aproximadamente el 60% de todos los genes que codifican proteínas. Debido a que varios miARNs tienen como diana el mismo ARNm, se puede decir que no existe una correlación lineal entre los miARNs y la expresión de los ARNm. (Friedländer et al., 2014)

En el año 2000 se descubrió un segundo miARN, let-7, el cual se encuentra altamente conservado entre diversas especies. Estos hallazgos estimularon la realización de muchos más estudios y muy pronto se descubrieron nuevos miARNs en *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* y en el genoma humano.

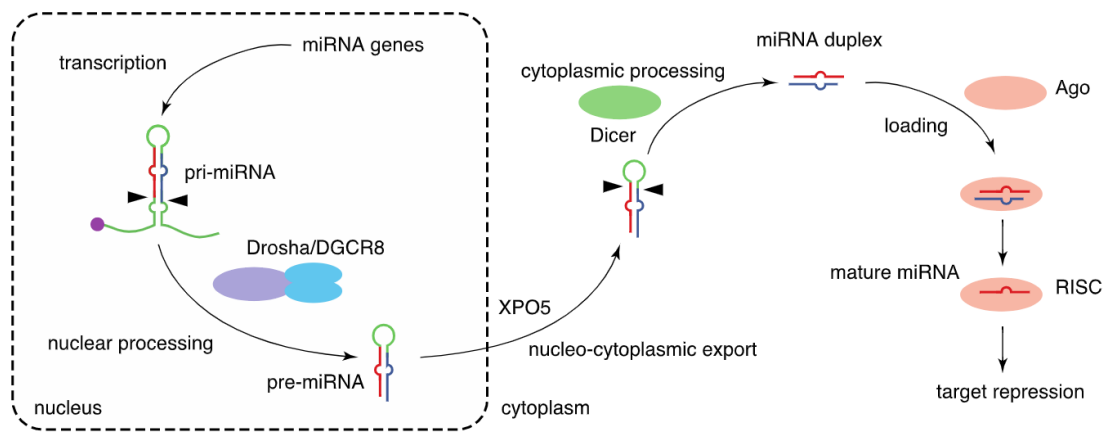
La biogénesis de los miARN (Figura 2) está mediada por múltiples pasos: la transcripción de los transcritos primarios de miARN, el procesamiento nuclear por Drosha, la exportación nucleocitoplásmica, el procesamiento citoplásmico por Dicer y la formación del complejo de silenciamiento inducido por RISC con las proteínas Argonautas (Ago). (Matsuyama & Suzuki, 2020)

La biogénesis de los miARNs comienza con la generación de largos transcritos de miARNs primarios (pri-miARNs), principalmente por la ARN polimerasa II. Los pri-miARNs son procesados a ARNs con estructura de horquilla, denominados miARNs precursores (pre-miARNs), por el complejo Drosha en el núcleo. El complejo Drosha está formado por la ARNasa III, Drosha, y la proteína de unión a ARN de doble cadena (dsARN), la región crítica 8 del síndrome de DiGeorge (DGCR8), así como por varias proteínas asociadas. Tras el procesamiento de Drosha, los pre-miARNs son exportados al citoplasma por la exportina-5 (XPO5). Posteriormente, los pre-miARNs son procesados por la ARNasa III, Dicer, en el citoplasma, liberando un dúplex de miARN de 21-24 nt. (Ha & Kim, 2014)

A continuación, el dúplex de miARN se carga en una proteína Ago para formar el *RNA-induced silencing complex* (RISC). La formación del RISC estabiliza tanto a los miARNs como a las proteínas Ago. (Becker et al., 2019)

Por último, el complejo Ago-miARN se une predominantemente a la región 3' no traducida (3'UTR) de los ARNm objetivo de forma específica a la secuencia e induce la represión de la

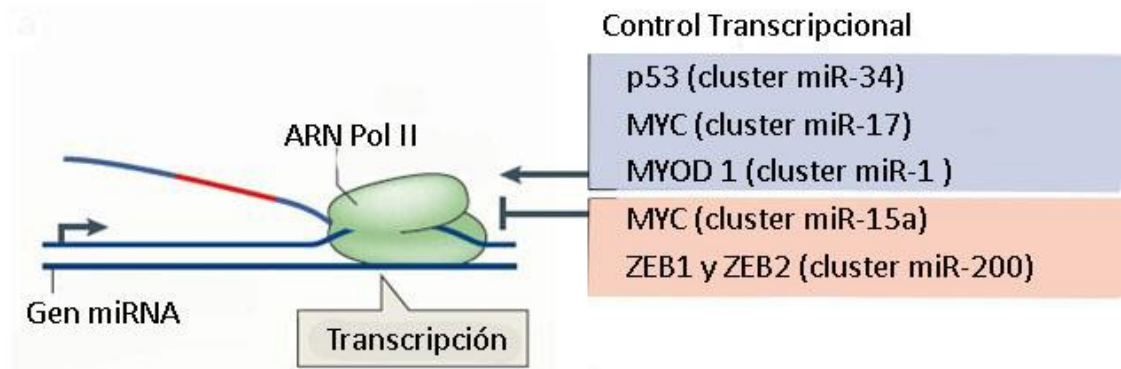
diana con la adición de proteínas TNRC6 acortando las colas de poli(A) de los ARNm, reprimiendo la traducción y desestabilizando los ARNm. (Ha & Kim, 2014)



**Figura 2. Biogénesis de miARNs** (Modificado de Matsuyama & Suzuki, 2020)

## 2.2 Transcripción y regulación de los miARNs

Los genes de miARN se transcriben a través de la ARN polimerasa II (Pol II) y el largo transcrito primario tiene una estructura de horquilla que contiene las secuencias de miARN. (Figura 3).



**Figura 3. Mecanismo de transcripción y regulación transcripcional de los miARNs.** (Modificado de Ha & Kim, 2014)

Las secuencias de miARN se encuentran en varios contextos genómicos. En los seres humanos, la mayoría de los miARNs están codificados por intrones de transcripciones no codificantes o codificantes, pero algunos miARNs están codificados por regiones exónicas. A menudo, varios loci de miARN están muy cerca unos de otros, constituyendo una unidad de transcripción policistrónica. Los miARNs de un mismo clúster generalmente se cotranscriben, pero los miARNs individuales pueden ser regulados adicionalmente a nivel post-transcripcional. (Monteys et al., 2010)

La ARN Pol II está controlada por distintos tipos de reguladores entre los cuales destacan los reguladores epigenéticos. Además, se ha demostrado que la ARN Pol III transcribe algunos miARNs virales. Algunos ARN pequeños endógenos similares a los miARN se derivan de los ARNt, son transcritos por la ARN Pol III. Los factores de transcripción, como p53, MYC, ZEB1 y ZEB2, y la proteína de determinación de mioblastos 1 (MYOD1) regulan positiva o negativamente la expresión de los miARNs. (Figura 3). El control epigenético, como la metilación del ADN y las modificaciones de las histonas, también contribuyen a la regulación génica de los miARNs. (Davis-Dusenbery & Hata, 2010)

### 2.3 Procesamiento nuclear

Tras la transcripción, el miARN primario (pri-miARN) se somete a varios pasos de maduración. El pri-miARN es largo (normalmente más de 1 kb) y contiene una estructura local de bucle de tallo, en la que se acoplan secuencias de miARN maduras. Un pri-miARN típico consta de un tallo de 33-35 pb, un bucle terminal y segmentos de ARN monocatenario en los lados 5' y 3'. La ARNasa III nuclear Drosha inicia el proceso de maduración recortando el bucle del tallo para de esta forma poder liberar un pequeño ARN en forma de horquilla de alrededor de 65 nucleótidos de longitud (pre-miARN). Junto con su cofactor esencial DGCR8, Drosha forma un complejo llamado Microprocessor. (Figura 4). (Davis-Dusenbery & Hata, 2010)

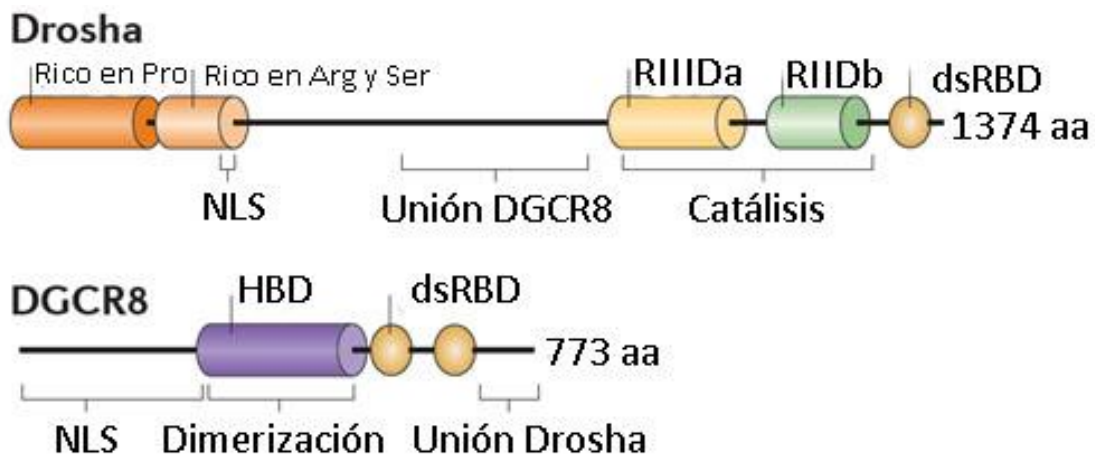


Figura 4. Estructura de Drosha y DGCR8. (Modificado de Ha & Kim, 2014)

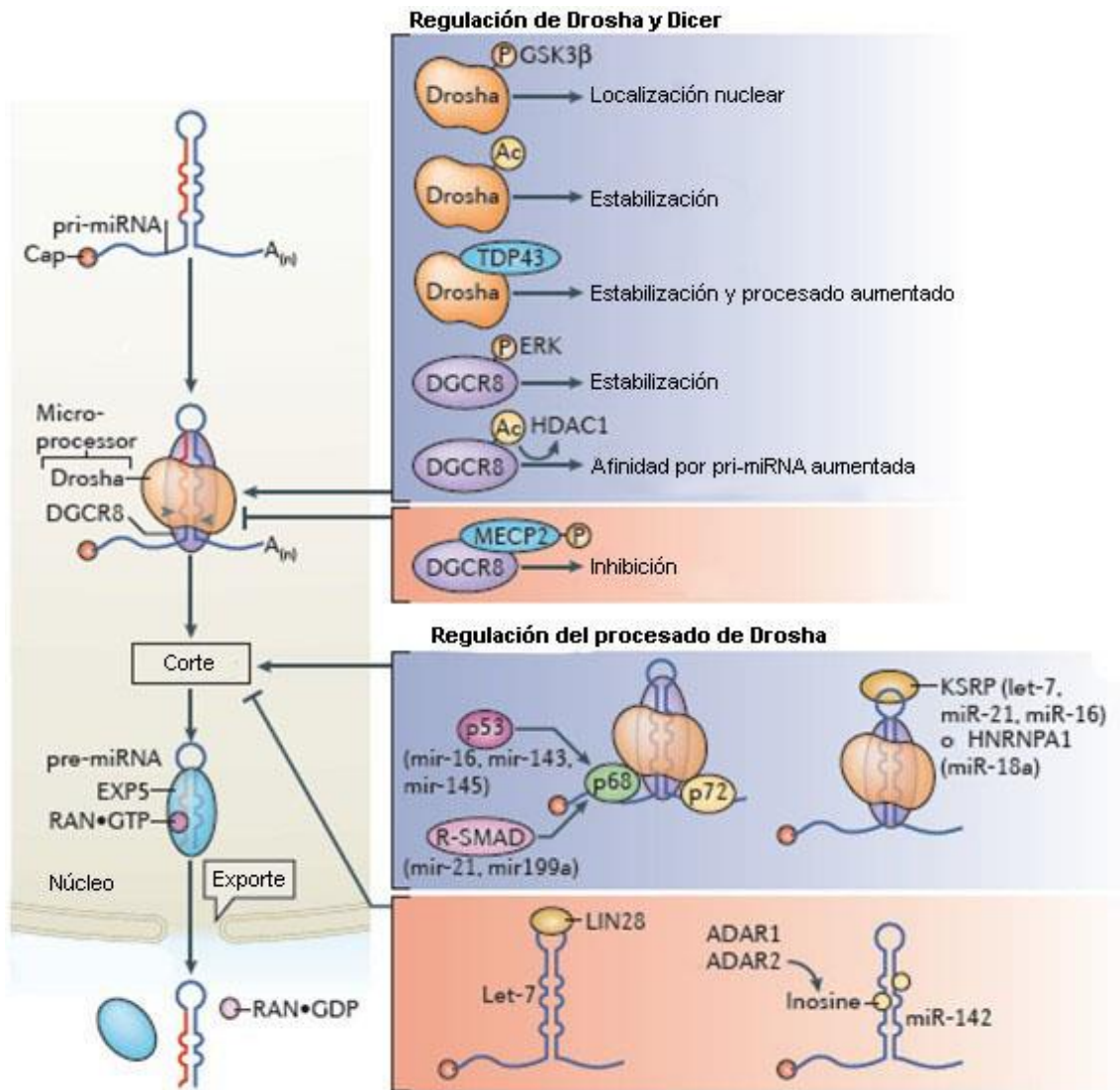
### 2.3.1 El complejo Microprocesador

Drosha (Figura 4) es una proteína nuclear de alrededor de 160 kDa, pertenece a una familia de endonucleasas de tipo RNasa III que actúan específicamente sobre el ARN de doble cadena. La parte aminoterminal de Drosha es prescindible para el procesamiento de pri-miARN in vitro pero es necesaria para la localización nuclear en las células. En su extremo carboxilo, Drosha tiene dominios RNasa III en tándem (RIIIDs) y un dominio de unión a dsARN (dsRBD). Dos RIIIDs dimerizan intramolecularmente para formar un centro de procesamiento en la interfaz entre los RIIIDs. El primer RIIID (RIIIDa) corta la cadena 3' del tallo del pri-miARN, mientras que el segundo RIIID (RIIIDb) corta la cadena 5' para producir un extremo escalonado con un saliente en 3' de dos nucleótidos de longitud. (Achkar et al., 2016)

La actividad adicional de unión al ARN la proporciona DGCR8, que se recluta a través de la región media de Drosha. DGCR8 (Figura 4) es una proteína de 90 kDa que se localiza en el nucleoplasma y el nucléolo. Los dos dsRBDs de DGCR8 reconocen el pri-miARN, mientras que su extremo C conservado interactúa con Drosha. La estructura de una proteína DGCR8 parcial sugiere que los dos dsRBDs están fuertemente empaquetados contra la hélice terminal C50. La región terminal N contiene la señal de localización nuclear. La región central de DGCR8 se une al hemo y media la dimerización. El dominio de unión al hemo y su interacción con los iones férricos son necesarios para el procesamiento eficiente del pri-miARN. (Weitz et al., 2014)

La eficiencia del procesamiento mediado por Drosha es crucial para determinar la abundancia de miARNs. Existen múltiples mecanismos para controlar el nivel de expresión, la actividad y la especificidad de Drosha. Un ejemplo notable es la autorregulación entre Drosha y DGCR8. DGCR8 estabiliza a Drosha a través de interacciones proteína-proteína, mientras que Drosha desestabiliza el ARNm de DGCR8 cortándolo en una horquilla en el segundo exón. Este bucle de regulación cruzada permite el mantenimiento homeostático de la actividad del microprocesador y está profundamente conservado en todo el reino animal.

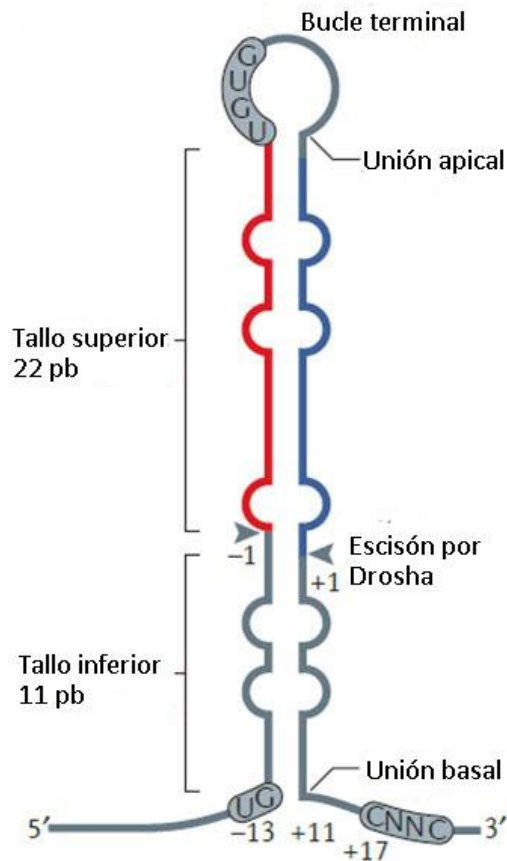
La modificación postraducciona puede regular la estabilidad de la proteína, la localización nuclear y la actividad de procesamiento del Microprocesador. La fosforilación de Drosha por la glucógeno sintasa quinasa 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) es necesaria para la localización nuclear de Drosha. La acetilación de Drosha por una enzima no identificada inhibe su degradación y la estabiliza. DGCR8 puede ser desacetilada por la histona desacetilasa 1 (HDAC1), lo que aumenta la afinidad de DGCR8 por los pri-miARNs. DGCR8 es fosforilada por ERK, lo que aumenta la estabilidad de DGCR8. (Wada et al., 2012)



**Figura 5. Regulación del Microprocesador.** (Modificado de Ha & Kim, 2014)

### 2.3.2 Procesamiento del pri-miARN

Dado que el corte de Drosha define la terminación de un miARN y, por tanto, determina su especificidad, es importante que el microprocesador reconozca y corte con precisión un pri-miARN. Drosha escinde la horquilla a aproximadamente 11 pb de la unión “basal” entre el ARN monocatenario y el ARNdc, y a aproximadamente 22 pb de la unión “apical” ligada al bucle terminal. La unión basal funciona como el principal punto de referencia para determinar el sitio de corte, pero la unión apical también es importante para un procesamiento eficiente y preciso (Figura 6). (Auyeung et al., 2013)



**Figura 6. Procesamiento del pri-miARN.** (Modificado de Ha & Kim, 2014)

Existen elementos de secuencia adicionales implicados en el procesamiento de pri-miARNs. Los elementos residen en la región basal (el motivo UG y el motivo CNNC) y el bucle terminal (el motivo UGUG) de los pri-miARNs humanos. Al menos uno de estos tres motivos está presente en el 79% de los miARNs humanos, lo que sugiere que también pueden existir otros determinantes. SRp20 (también conocido como SRSF3), que es un factor de splicing, se une al motivo CNNC y aumenta el procesamiento de los pri-miARNs humanos. Se ha observado que el motivo CNNC también es necesario para la unión de la ARN helicasa DEAD-box p72 (también conocida como DDX17), que aumenta el procesamiento por parte de Drosha. Por lo tanto, es posible que múltiples factores auxiliares contribuyan al procesamiento de pri-miARN, y es necesario delinear las funciones mecánicas de estos factores auxiliares. (Mori et al., 2014)



## 2.4 Exportación nuclear

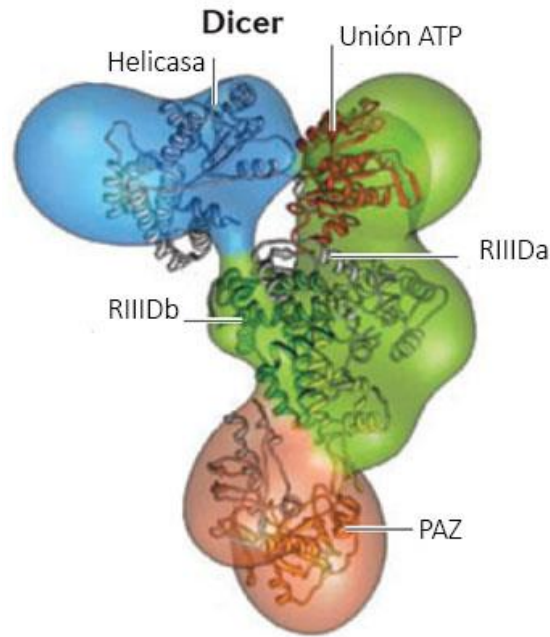
Tras el procesamiento de Drosha, el pre-miARN se exporta al citoplasma, donde puede completarse la maduración. La proteína exportina 5 (EXP5; codificada por *XPO5*) forma un complejo de transporte con la proteína nuclear de unión a GTP, Ran-GTP y un pre-miARN. Tras la translocación a través del complejo del poro nuclear, el GTP se hidroliza, lo que da lugar a la disolución del complejo y a la liberación del pre-miARN en el citosol. La estructura cristalina de este complejo muestra que EXP5- Ran-GTP forma una estructura parecida a un guante de béisbol en la que se coloca el tallo del pre-miARN, lo que permite la interacción del tallo del pre-miARN con la superficie interior cargada positivamente. Hay una estructura básica en forma de túnel en la parte inferior de la estructura en forma de guante, que interactúa fuertemente con el saliente de 3' de dos nucleótidos de longitud del pre-miARN. EXP5 reconoce un tallo de dsARN de >14 pb de longitud junto con un corto voladizo de 3' (de 1 a 8 nucleótidos de longitud). La supresión de *XPO5* da lugar a la reducción de los niveles de miARN sin una acumulación de pre-miARN nuclear, lo que sugiere que EXP5 puede no sólo exportar pre-miARN sino también protegerlo del ataque nucleolítico en el núcleo. (Ha & Kim, 2014)

EXP5 se expresa de forma ubicua, pero se ha demostrado que EXP5 se induce post-transcripcionalmente durante la entrada en el ciclo celular en un mecanismo mediado por PI3K86. Un informe reciente descubrió que la exportación nuclear de pre-miARN aumenta cuando se produce un daño en el ADN, de forma dependiente de ATM. La ATM activa la AKT, que a su vez fosforila la proteína del nucleoporo NUP153. Esto conduce a un aumento de las interacciones entre NUP153 y exportina 5. En algunos tumores, la *XPO5* está mutada y la EXP5 resultante, truncada en su terminal C, no puede transportar su carga de pre-miARN, lo que reduce globalmente el nivel de miARNs maduros. La regulación de exportina-5 ha sido menos investigada que la de otros factores de biogénesis de miARN. (Iwasaki et al., 2013)

## 2.5 Procesamiento citoplasmático

Tras la exportación al citoplasma, el pre-miARN es escindido por Dicer (Figura 7) cerca del bucle terminal, liberando un pequeño dúplex de ARN.

Dicer es una endonucleasa del tipo RNasa III de 200 kDa. Los dominios RNasa III terminales C de Dicer forman un dímero intramolecular para crear un centro catalítico, de forma similar a los de Drosha. El dominio helicasa N terminal de Dicer facilita el reconocimiento del pre-miARN al interactuar con el bucle terminal y aumenta el procesamiento de ciertos pre-miARNs. El dominio PAZ (PIWI - AGO- ZWILLE) se une a las terminaciones de los pre-miARN. Dicer interactúa con una proteína de unión al ARN llamada TRBP, la cual modula la eficiencia del procesado de algunos pre-miARNs así como la longitud de los miARNs maduros. (Ha & Kim, 2014)

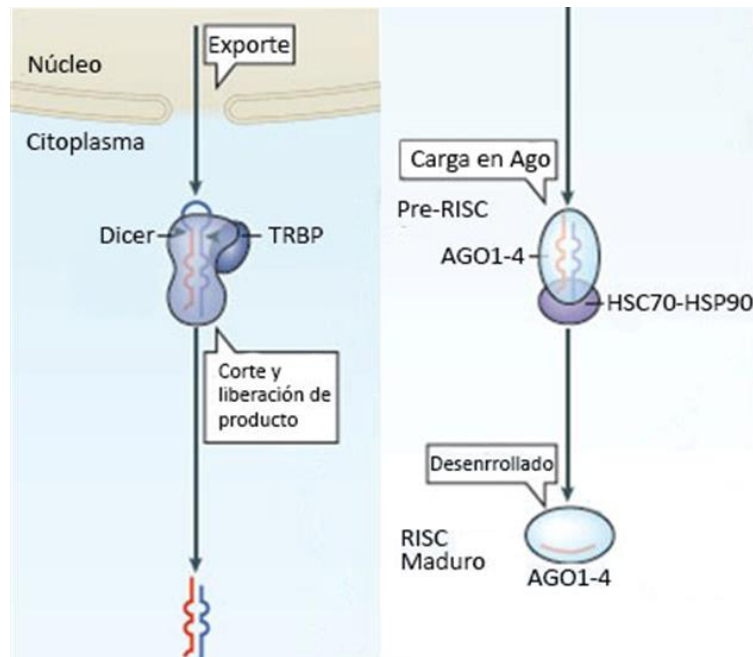


**Figura 7. Estructura de Dicer.** (Modificado de Ha & Kim, 2014)

Dicer se une al pre-miARN con preferencia por un voladizo de dos nucleótidos de longitud 3' que es generado inicialmente por Drosha. En general, los sitios de corte de Dicer se sitúan a una distancia fija del extremo 3' del terminal de los dsARNs. Esta distancia suele ser de 21-25 nucleótidos y depende de la especie y del tipo de Dicer. En mamíferos, existe un mecanismo adicional para determinar el sitio de corte del pre-miARN: Dicer se une al extremo fosforilado de 5' del pre-miARN y lo corta a 22 nucleótidos de distancia del extremo de 5'. La unión del extremo 5' se produce cuando el extremo es termodinámicamente inestable, pero no cuando el extremo está fuertemente emparejado (como a través de pares de bases G-C). La estructura del dominio PAZ de Dicer humano muestra dos bolsillos básicos que se unen al extremo 5' y al extremo 3' del pre-miARN. Los bolsillos están dispuestos espacialmente de manera que pueden ser ocupados simultáneamente por el extremo 5' y el extremo 3' del pre-miARN cuando el ARN tiene un saliente 3' de dos nucleótidos de longitud. Esta disposición estructural puede explicar, al menos en parte, la preferencia de Dicer humana por una estructura de voladizo de 3' de dos nucleótidos de longitud. (Park et al., 2011)

### 2.5.1 Formación del complejo de silenciamiento inducido por ARN

Un pequeño dúplex de ARN generado por Dicer se carga posteriormente en una proteína AGO para formar un complejo efector llamado complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) (Figura 8). El ensamblaje del RISC implica dos pasos: la carga del dúplex de ARN y su posterior desenrollado. Todas las proteínas AGO humanas son capaces de inducir la represión de la traducción y el decaimiento de los ARNm objetivo mediante la interacción con la maquinaria de traducción y los factores de decaimiento del ARNm. (Elkayam et al., 2012)



**Figura 8. Exportación nuclear y formación del Complejo RISC.**(Modificado de Ha & Kim, 2014)

### 3. miARNs en la insuficiencia cardiaca

En la IC crónica, se han descrito múltiples miARNs como candidatos a futuros biomarcadores en la IC. Unos pocos estudios han informado sobre miARNs circulantes que pudieron distinguir a los pacientes con disnea debida a la IC y otras causas de disnea. Tijssen et al. descubrieron que miR-423-5p se expresaba de forma diferencial entre los pacientes con IC y los controles sanos. (Akat et al., 2014)

Otros estudios también han descrito una expresión diferencial de miARNs circulantes en la IC aguda, incluidos niveles bajos de miR-103, miR-142-3p, miR-30b y miR-342-3p así como niveles elevados de miR-499. Un estudio reciente identificó un panel de miARNs específicos de la IC aguda, en el que se observó una disminución en comparación con los controles sanos y los pacientes con una exacerbación aguda de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. (Ellis et al., 2013)

En el plasma de pacientes diagnosticados de miocardiopatía hipertrófica obstructiva (MCH) sin síntomas de IC, se encontró que miR-29a, entre otros, estaba significativamente alterado. Estos resultados sugieren que este miARN puede funcionar como biomarcador de los procesos de remodelación en la MCH. La especificidad de miR-29a para la MCH fue confirmada por Derda et al., demostrando que miR-29a era capaz de diferenciar entre MCH, miocardiopatía hipertrófica no obstructiva, la amiloidosis senil y la estenosis aórtica. El miR-29a se correlacionó positivamente con el tamaño interventricular, que es un parámetro de los procesos de remodelación que incluyen la hipertrofia y la fibrosis. (Derda et al., 2015)

Las pruebas recientes sugieren que los miARNs podrían discriminar entre la IC con ICFEr y ICFEp. Hasta la fecha tres estudios han informado de niveles diferenciales de varios miARNs circulantes en la ICFEr y la ICFEp, con sólo unas pocas similitudes. Los miARN que se expresan de forma diferencial entre los distintos tipos de IC podrían no sólo ser relevantes para el diagnóstico, sino que podría proporcionar información sobre fisiopatología diferencial. (Vegter et al., 2016)

Por otro lado, en el corazón, los miARN regulan procesos clave como el desarrollo, la fibrosis, la inflamación y la regeneración (Thum & Condorelli, 2015) y se sabe que varios miARN están desregulados en el tejido cardíaco dañado. Se ha observado que el miR-21, está implicado en el remodelado cardíaco y se sobreexpresa en varias células cardíacas del miocardio dañado en humanos y distintos modelos animales. Se ha descrito que la inhibición sistémica del miR-21 con un antimicroARN previene la fibrosis cardíaca en un modelo de ratón de hipertrofia cardíaca, lo que constituyó el primer informe exitoso de una terapia basada en miARN en un modelo de enfermedad cardiovascular. (Thum et al., 2008)

Estudios posteriores demostraron que miR-21 también controla el desarrollo de la fibrosis intersticial en numerosas enfermedades no cardiovasculares y que los antimicroARN reducen la fibrosis patológica en el riñón y el pulmón (Liu et al., 2010). Se sabe que estos antimicroARNs experimentan un emparejamiento de bases complementarias a regiones de los miARNs diana (Lennox & Behlke, 2010), y su entrega eficiente al órgano diana puede ser el factor clave para que se pueda desarrollar una eficacia terapéutica.

Sin embargo, la administración de estos fármacos tan innovadores preferentemente en el miocardio por vía local es un reto y puede limitar su transición a la medicina clínica en comparación con otros protocolos basados en la administración sistémica. Hinkel et al. fueron

pioneros en aportar pruebas de la administración local por catéter de un inhibidor de miR-92a en el miocardio en un modelo animal de gran tamaño, consolidando una base para futuros proyectos de investigación. (Hinkel et al., 2013)

#### 4. Alteraciones en la biogénesis de los miARNs

En distintos estudios se han observado alteraciones en los genes y las proteínas que procesan los miARN.

En un estudio de cáncer de pulmón, Karube et al. demostraron que los niveles de expresión de Dicer, pero no de Drosha, estaban reducidos, lo que conducía a una baja probabilidad de supervivencia (Karube et al., 2005). Una reducción similar de las tasas de supervivencia en relación con bajas cantidades de Dicer se identificó para el miARN let-7 (Takamizawa et al., 2004). Estos hallazgos sugieren que las anomalías en los niveles de miARNs maduros en el tejido canceroso surgen de una expresión aberrante, así como de un proceso de maduración alterado de miARNs.

En otro estudio se examinaron los perfiles de expresión de Drosha y Dicer como las dos enzimas importantes en la maquinaria de maduración (Sand et al., 2012). Todos los tipos de tumores epiteliales presentaban niveles de expresión desregulados de Drosha o Dicer, o de ambos, en comparación con el tejido sano. Especialmente en el caso de Dicer, se han reportado muchas más asociaciones con el cáncer. Curiosamente, en este contexto, se ha demostrado que el factor de transcripción Sox4, asociado a ciertos tipos de cáncer como el melanoma, impulsa la expresión de Dicer (Jafarnejad et al., 2013).

Por otro lado, en relación con el funcionamiento normal de la retina, se ha descubierto que los miARNs desempeñan papeles esenciales. Todavía no está claro si cada tipo de célula tiene su propio fenotipo de miARN, pero los estudios han confirmado la presencia de miARNs expresados de forma diferencial en la retina neural y sus patrones de expresión pueden utilizarse para distinguir los tipos de células de la retina (Andreeva & Cooper, 2014). La expresión reducida de miARNs en la retina se observa en ausencia de Dicer (Damiani et al., 2008), una enzima principal en la biogénesis de miARNs, lo que lleva a la alteración de la función y la supervivencia de las neuronas de la retina y, en última instancia, al deterioro de la visión (Lumayag et al., 2013).

La exportación nuclear de pre-miARNs está regulada con precisión en las células normales y su desregulación puede causar una expresión anormal de miARNs maduros en células cancerosas. Llamativamente, se encuentra que hay más pre-miARNs retenidos en el núcleo de las células cancerosas y de los tumores, cuando se comparan con las células y los tejidos normales. En un estudio, utilizando PCR en tiempo real, Lee et al. han perfilaron la expresión de 225 pre-miARNs y miARNs maduros en 22 tejidos humanos diferentes, 37 líneas celulares de cáncer humano, así como 16 tejidos/tumores de páncreas e hígado. Encontraron que un gran número de genes se transcriben y procesan en pre-miARNs, pero no se procesan a miARNs maduros en las células cancerosas, indicando defectos en la exportación nuclear de pre-miARNs por *XPO5* en los tumores humanos (Eun et al., 2008). La función anormal de *XPO5* podría estar causada por un cambio genético o epigenético de *XPO5*, así como por un nivel de expresión anormal o por modificaciones postraduccionales la proteína exportina 5.

## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La biogénesis de los miARNs es un proceso que está altamente regulado tanto a nivel nuclear como a nivel citoplasmático por diferentes moléculas que forman parte del procesado de este tipo de ARN. La existencia de alteraciones en cada uno de estos componentes puede generar cambios en la transcripción de los miARNs, en su procesado nuclear, en la exportación al citoplasma, en el procesado citoplasmático, o en la maduración de estas moléculas. En numerosos estudios se ha observado que en pacientes con IC existe una expresión alterada de determinados miARNs. Sin embargo, el estado de maduración global de los miARNs en la IC y como la maquinaria de procesado de estos controla este proceso se desconoce.

Por tanto, nuestra hipótesis del trabajo es que existe una alteración en la maduración de los miARNs, en los corazones de pacientes con IC, asociada a la desregulación de la maquinaria molecular que controla su biogénesis.

Analizando, mediante técnicas de biología molecular, muestras del tejido ventricular izquierdo de pacientes sometidos a trasplante cardiaco diagnosticados de IC con etiología isquémica y, sujetos control (CNT), se pretende confirmar esta hipótesis a través de los siguientes objetivos:

1. Análisis del estado de maduración de los miARNs a través de una secuenciación masiva de ARNs no codificantes.
2. Identificación de los genes implicados en el proceso de biogénesis de los miARNs mediante una revisión bibliográfica exhaustiva utilizando las bases de datos *Pubmed* y *Uniprot*
3. Evaluación de la expresión de los genes que están involucrados en el proceso de biogénesis de los miARNs mediante secuenciación de ARNm.
4. Evaluación de la expresión de los miARNs reguladores de los genes implicados en el proceso de biogénesis de miARNs mediante secuenciación de ARNnc.

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 1. Obtención de muestras

Se obtuvieron muestras de tejido miocárdico cerca del ápice del ventrículo izquierdo de pacientes diagnosticados de MCI sometidos a trasplante de corazón y de donantes CNT. Las muestras de tejido se conservaron en NaCl al 0,9% a 4°C durante  $4 \pm 3$  h tras la pérdida de circulación coronaria y posteriormente se almacenaron a -80°C hasta su uso. Un tiempo reducido entre la recepción de la muestra y el almacenamiento de esta da lugar a muestras de gran calidad, como demuestran los números de integridad del ARN de  $\geq 9$ .

El diagnóstico de los pacientes se basó en la historia clínica y en los resultados de los estudios hemodinámicos, electrocardiográficos, en la ecocardiografía Doppler y en la angiografía coronaria. El diagnóstico de MCI se basó en los siguientes criterios de inclusión:

- 1- Existían episodios previos documentados de infarto agudo de miocardio.
- 2- La ecocardiografía mostraba segmentos de contractilidad normales que coexistían con otros segmentos discinéticos o acinéticos.
- 3- La electrocardiografía mostraba signos de isquemia o necrosis miocárdica.

Todos los pacientes estaban clasificados según los criterios funcionales de *la New York Heart Association (NYHA)* y recibían tratamiento médico según las directrices de la Sociedad Europea de Cardiología (Ponikowski et al., 2016). Se les había diagnosticado previamente comorbilidades significativas, como hipertensión y diabetes tipo 2.

Las muestras CNT se obtuvieron de corazones no enfermos que no pudieron ser trasplantados por razones quirúrgicas o por incompatibilidad de grupo sanguíneo. La causa de la muerte de estos donantes fue un evento cerebrovascular o un accidente de tráfico. Todos los CNT tenían una función ventricular izquierda normal ( $FE > 50\%$ ), determinada por ecocardiografía Doppler, y no tenían ni habían tenido antecedentes de enfermedad cardíaca.

La investigación se ajusta a los principios señalados en la Declaración de Helsinki (Macrae, 2007) aprobada por el Comité de Ética (Comité de Ética de Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Fe de Valencia, España; código de protocolo 2016/0320, 15 de noviembre de 2016) y todos los sujetos dieron su consentimiento informado por escrito para participar en el estudio.

## 2. Extracción de ARN

Las muestras de corazón se homogeneizaron en un TissueLyser LT (Qiagen). Las extracciones de ARN se realizaron utilizando un kit PureLink™ (Ambion Life Technologies) para la secuenciación de ARNm (ARNm-seq) o el kit Quik-RNA™ miniprep plus (Zymo Research) para la secuenciación de ARN no codificante (ARNnc-seq), según las instrucciones del fabricante. El ARN se cuantificó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop1000 y en el fluorímetro Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific). La pureza e integridad de las muestras de ARN se determinó utilizando un bioanalizador Agilent 2100 con el kit ARN 6000 Nano LabChip (Agilent Technologies). Todas las muestras presentaban una relación de absorbancia 260/280 > 2,0 y números de integridad del ARN  $\geq 9$ .

## 3. Secuenciación de miARNs

Las librerías de ADNc se han obtenido siguiendo las recomendaciones de Illumina. Brevemente, se ligaron secuencialmente adaptadores 3' y 5' al ARN antes de la transcripción inversa y la generación del ADNc. El ADNc se enriqueció mediante PCR para crear una librería de ADNc de doble cadena indexada, y la selección de tamaño se realizó mediante un gel de poliacrilamida al 6%. La calidad y la cantidad de las librerías se analizaron mediante un ensayo de alta sensibilidad TapeStation D1000 4200. Las librerías de ADNc se agruparon y los grupos se secuenciaron utilizando la secuenciación por pares (100 x 2) en el secuenciador Illumina HiSeq 2500.

El control de calidad de los datos brutos se realizó con la herramienta FastQC. Para el adaptador y el relleno de calidad de los datos brutos se aplicó trim\_galore [[http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim\\_galore/](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/)]. A continuación, las lecturas de calidad insuficiente (puntuación phred < 20) se eliminaron utilizando el software Picard Tools (Langmead et al., 2009). Las predicciones de ARNs se estimaron utilizando el software HT Seq (versión 0.6.0). El análisis de la expresión diferencial entre condiciones se evaluó mediante el método DESeq2 (Love et al., 2014) (versión 3.4). Consideramos como ARNsnc de expresión diferencial aquellos con un valor P (P adj) corregido por FDR  $\leq 0,05$  para evitar la identificación de falsos positivos en los datos de expresión diferencial.

Por otro lado, se analizó el ratio de miARN maduro/inmaduro. Los datos brutos de cada muestra se compararon con las secuencias humanas maduras y de horquilla contenidas en mirBase utilizando el algoritmo bowtie. Las lecturas de baja calidad se filtraron utilizando un umbral Q20. Por último, sólo las lecturas únicas mapeadas se consideraron para los siguientes análisis. Se calculó la fracción de lecturas maduras mapeadas frente a las precursoras de las horquillas. La diferencia estadística de la fracción entre condiciones se evaluó mediante la prueba de Wilcoxon



#### 4. Secuenciación ARNm

Se aisló el ARN-poli(A) de 25 microgramos de ARN total utilizando el kit MicroPoly(A) Purist (Ambion). Las muestras de ARN poli(A) total se utilizaron para generar librerías del transcriptoma completo para su secuenciación en la plataforma SOLiD 5500XL, siguiendo las recomendaciones del fabricante (Life Technologies). No se utilizó ningún control de picos de ARN. La calidad del ADNc amplificado se analizó con el kit Bioanalyzer 2100 DNA 1000 (Agilent Technologies) y se cuantificó con el fluorómetro Qubit 2.0 (Invitrogen). Las librerías del transcriptoma completo se utilizaron para fabricar *SOLiD Template Beads* siguiendo la guía de preparación de SOLiD. La calidad de las *Beads* se estimó en base a los parámetros del WFA (análisis del flujo de trabajo). Las muestras se secuenciaron utilizando el protocolo 50625 paired-end, generando secuencias de 75 nt +35 nt (Paired-End) +5 nt (Barcode). Los datos de calidad se midieron utilizando los parámetros del software SETS (Sistema de Seguimiento Experimental SOLiD).

Las lecturas iniciales del transcriptoma completo obtenidas de la secuenciación fueron mapeadas contra la última versión del genoma humano disponible en este momento (versión GRchr37/hg19) utilizando el algoritmo de mapeo de Life Technologies (<http://www.lifetechnologies.com/>), versión 1.3. Se utilizaron los parámetros estándar de Bioscope de la versión 1.3, en los extremos emparejados y en el análisis del transcriptoma completo. Para ambas lecturas, hacia adelante y hacia atrás, *seed* fue los primeros 25 nucleótidos con un máximo de 2 *mismatches* permitidos. Los registros alineados fueron reportados en formato BAM/SAM (H. Li et al., 2009). Las lecturas de mala calidad (puntuación Phred <10) se eliminaron utilizando el software Picard Tools, versión 1.83 (<http://broadinstitute.github.io/picard/>).

Posteriormente, la predicción de los genes se estimó utilizando el método cufflinks (Trapnell et al., 2010) y los niveles de expresión se calcularon utilizando el software HTSeq, versión 0.5.4p3 (Anders et al., 2015), este método elimina las lecturas multimapping, sólo se consideran las lecturas únicas para la estimación de la expresión génica. El método edgeR, versión 3.2.4, se aplicó para el análisis de la expresión diferencial entre condiciones (Robinson et al., 2009). Este método se basa en un proceso de normalización diferente basado en la profundidad de las muestras globales, la composición del GC y la longitud de los genes. En el proceso de expresión diferencial, este método se basa en un modelo de Poisson para estimar la varianza de los datos de ARN-seq para las expresiones diferenciales.

#### 5. Identificación y clasificación de los genes relacionados con la biogénesis de los miARNs. Búsqueda de miARNs responsables de la regulación postranscripcional de estos genes.

Por un lado, se ha llevado a cabo una exhaustiva revisión bibliográfica con el objetivo de conocer los genes fundamentales que han sido descritos con relación al proceso de biogénesis de los miARNs utilizando las bases de datos de *PubMed* y *Uniprot*. Estos, se han clasificado en 3 grupos diferentes en función de la ubicación en la que desarrolla su actividad dentro de la arquitectura celular y además, se han agrupado según la función que desempeñan

Por otro lado, la expresión de genes se regula a nivel postranscripcional a través de distintos mecanismos, siendo uno de los más habituales el llevado a cabo por los miARNs. Por ello se ha realizado una revisión bibliográfica en busca de los miARNs descritos que tuvieran como diana

el ARNm de aquellos genes diferencialmente expresados incluidos en el estudio, utilizando la base de datos *PubMed*.

Se seleccionaron únicamente los miARNs que hubieran sido validados de forma previa como reguladores génicos directos de cada una de sus dianas en experimentos que emplearan la luciferasa como gen reportero. Confirmando las secuencias de los miARNs descritos en las diferentes publicaciones con las que se muestran en la base de datos de miARNs miRBase.

#### 6. Análisis estadístico

Los datos se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar para las variables continuas y como valores porcentuales para las variables discretas. Se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para analizar la distribución de los datos. Las características clínicas de los pacientes se compararon mediante la prueba t de Student para las variables continuas y la prueba exacta de Fisher para las variables discretas. Las diferencias medias en los niveles de miARN y ARNm se analizaron mediante la prueba t de Student para las variables con una distribución normal y la prueba U de Mann-Whitney para las variables con una distribución no normal.  $P < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software SPSS (versión 20.0) para Windows (IBM SPSS Inc. Chicago. IL, USA).

## IV. RESULTADOS

### 1. Características clínicas

Para llevar a cabo este estudio se analizaron corazones que habían sido explantados de pacientes con IC de etiología isquémica (MCI) y de individuos CNT. Las características clínicas de los pacientes se muestran en la Tabla 4. Los pacientes con MCI tenían una edad media comprendida entre los 53 y los 55 años. Todos los pacientes de este estudio tenían una clasificación funcional de la *New York Heart Association* de III-IV y mostraban una fracción de eyección reducida, la cual oscilaba entre un 22 y un 24 %, dilatación del ventrículo izquierdo con diámetros telediastólicos entre 63 y 67 mm y el diámetro telesistólico, entre 54 y los 58 mm. Además, la mayoría de los pacientes habían sido diagnosticados de forma previa con alguna comorbilidad como la diabetes mellitus o la hipertensión entre otras.

Las características clínicas del grupo CNT, a excepción de la edad ( $54 \pm 8$  años) y del sexo (100% varones), no se encontraban disponibles de acuerdo con la legislación española (Ley Orgánica de Protección de Datos 15/1999).

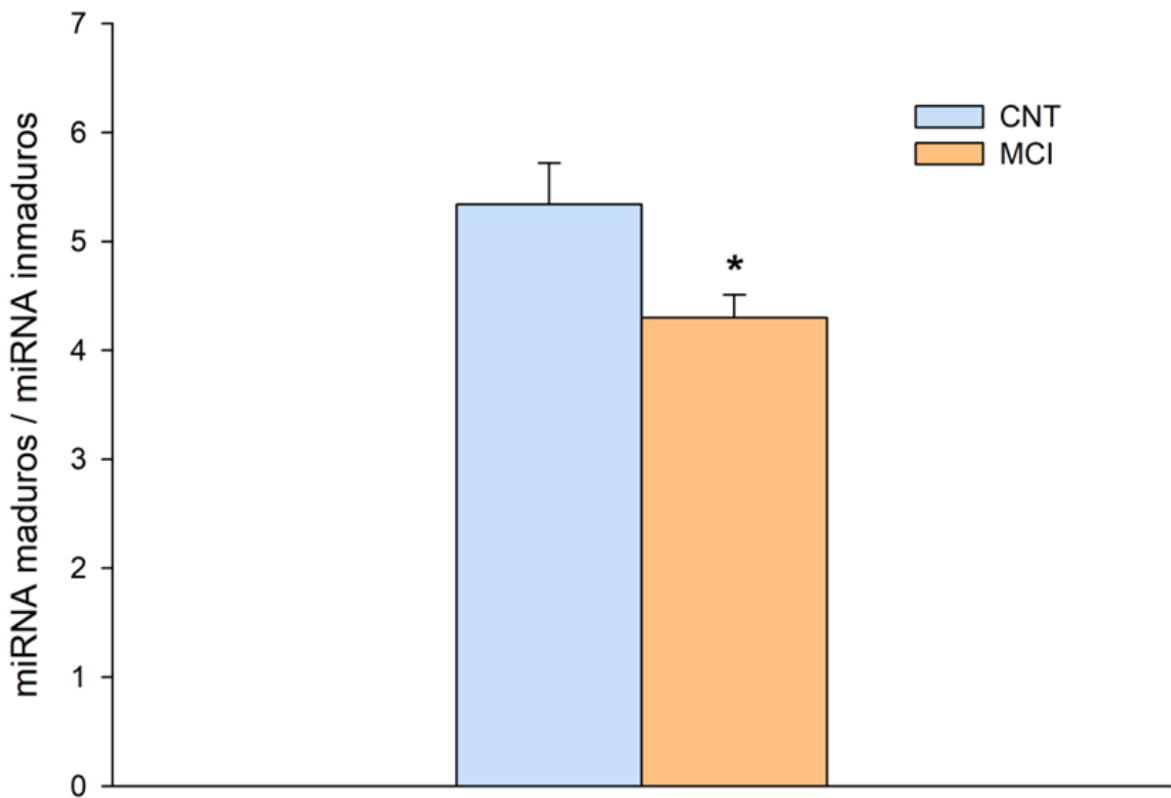
**Tabla 4.** Características clínicas de pacientes con MCI.

	ARN -seq	ARNnc -seq
	MCI (n=13)	MCI (n=22)
Edad (años)	$54 \pm 8$	$55 \pm 8$
Género masculino (%)	100	100
Clasificación NYHA	III-IV	III-IV
IMC ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	$27 \pm 4$	$26 \pm 3$
Hemoglobina (mg/dL)	$14 \pm 3$	$14 \pm 2$
Hematocrito (%)	$41 \pm 6$	$41 \pm 4$
Colesterol total (mg/dL)	$162 \pm 41$	$175 \pm 46$
Hipertensión (%)	33	35
Exfumadores (%)	92	78
Diabetes mellitus (%)	42	47
FEVI (%)	$24 \pm 4$	$23 \pm 6$
DTSVI (mm)	$56 \pm 8$	$53 \pm 8$
DTDVI (mm)	$64 \pm 8$	$62 \pm 9$

MCI, miocardiopatía isquémica; NYHA, New York Heart Association; IMC, índice de masa corporal; FEVI, fracción de eyección del ventrículo izquierdo; DTSVI, diámetro telesistólico del ventrículo izquierdo; DTDVI, diámetro telediastólico del ventrículo izquierdo.

## 2. Ratio de miARNs maduros/inmaduros

Al llevar a cabo la secuenciación de ARN no codificante (MCI, n=22; CNT, n=8), realizamos el cálculo de la fracción de lecturas maduras mapeadas frente a las precursoras de horquilla de los miARNs. De esta forma encontramos una disminución en la proporción de miARNs maduros/de horquilla en pacientes con MCI en comparación con los CNT (Figura 9).



**Figura 9. Fracción de lecturas mapeadas frente a las precursoras de horquilla de los miARNs.**

CNT: control, MCI: miocardiopatía isquémica, miRNAs: microARNs. Los datos están expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media. \* p-valor < 0,05.

2. Identificación y clasificación de genes involucrados en la biogénesis de los miARNs

Debido a la menor maduración de los miARNs observada en los pacientes diagnosticados con MCI, quisimos profundizar de una forma más detallada en la ruta de su biogénesis. Para ello, en primer lugar, se ha llevado a cabo un proceso de revisión bibliográfica con el objetivo de conocer los genes implicados en el proceso de biogénesis de los miARNs. De esta forma se han identificado un total de 23 genes que han sido detectados en el estudio de ARNseq, los cuales se han distribuido en 3 grupos diferentes en función de la ubicación en la que desarrolla su actividad (núcleo, membrana nuclear y citoplasma) y la proteína que codifican (Tabla 5). Además, se han agrupado según la función que desempeñan.

**Tabla 5.** Genes implicados en la biogénesis de los miARNs.

NÚCLEO		
Función	Gen	Proteína
Endorribonucleasas específica de ARN	<i>DGCR8</i>	Subunidad del complejo microprocesador DGCR8
	<i>DROSHA</i>	Ribonucleasa 3
Transcripción de miARNs	<i>POLR2A</i>	Subunidad RPB1 de la ARN Pol II
	<i>POLR2B</i>	Subunidad RPB2 de la ARN Pol II
	<i>POLR2C</i>	Subunidad RPB3 de la ARN Pol II
	<i>POLR2D</i>	Subunidad RPB4 de la ARN Pol II
	<i>POLR2E</i>	Subunidad RPABC1 de la ARN Pol II
	<i>POLR2F</i>	Subunidad RPABC2 de la ARN Pol II
	<i>POLR2G</i>	Subunidad RPB7 de la ARN Pol II
	<i>POLR2H</i>	Subunidad RPABC2 de la ARN Pol II
	<i>POLR2I</i>	Subunidad RPB7 de la ARN Pol II
	<i>POLR2J</i>	Subunidad RPB11-a de la ARN Pol II
	<i>POLR2K</i>	Subunidad RPABC4 de la ARN Pol II
	<i>POLR2L</i>	Subunidad RPABC5 de la ARN Pol II
	<i>POLR2M</i>	Subunidad GRINL1A de la ARN Pol II

MEMBRANA NUCLEAR		
Función	Gen	Proteína
Exportación de miARNs	<i>XPO5</i>	Exportina 5
	<i>RAN</i>	GTPasa RAN
CITOPLASMA		
Función	Gen	Proteína
Procesamiento y maduración de los miARNs	<i>DICER1</i>	Endorribonucleasa Dicer
	<i>AGO1</i>	Proteína argonauta 1
	<i>AGO2</i>	Proteína argonauta 2
	<i>AGO3</i>	Proteína argonauta 3
	<i>AGO4</i>	Proteína argonauta 4
	<i>TRBP</i>	Subunidad del complejo de carga RISC TARBP2

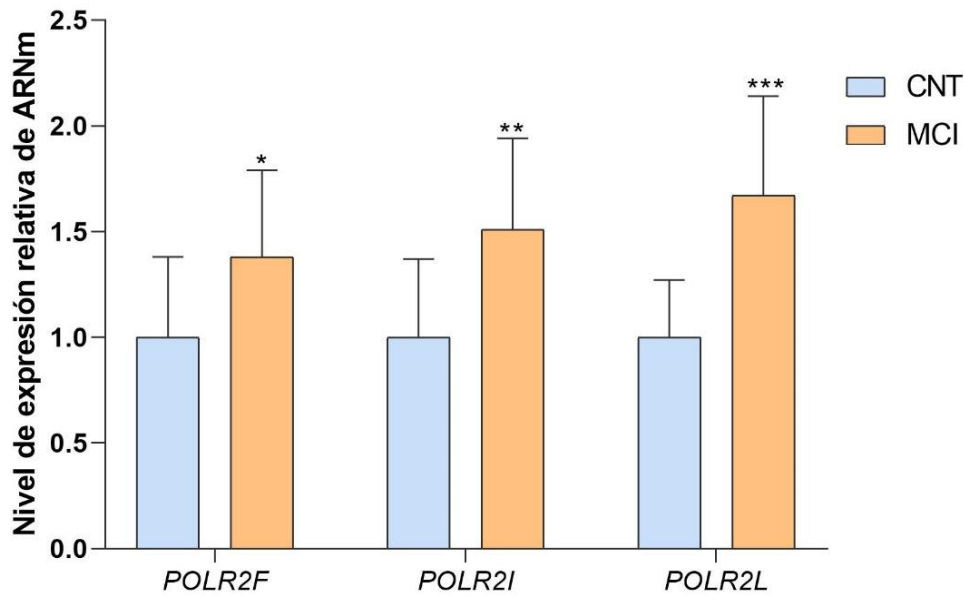
### 3. Expresión diferencial de los ARNm involucrados en la biogénesis de los miARNs

Al realizar la comparación de los niveles de expresión del ARNm de estos genes entre el grupo MCI y el grupo CNT se ha observado que existe una desregulación génica en distintos componentes de la biogénesis de los miARNs en pacientes que padecen MCI. De esta forma se han hallado un total de 8 genes cuya expresión presentaba diferencias estadísticamente significativas (p-valor < 0.05).

En primer lugar, se ha observado que en los genes *DGCR8* y *DROSHA*, los cuales codifican endorribonucleasas específicas de ARN no presentan una desregulación génica estadísticamente significativa

Por otro lado, existe una desregulación génica en 3 genes que codifican distintas subunidades de la ARN pol II (Figura 10), la cual lleva a cabo la transcripción de los miARNs en el núcleo. En concreto estos 3 genes son *POLR2F*, *POLR2I* y *POLR2L*. Los tres presentan una sobreexpresión estadísticamente significativa (FC: 1,38 y p-valor < 0,05; FC: 1,52 y p-valor < 0,05 y FC: 1,67 y p-valor = 0,001 respectivamente).

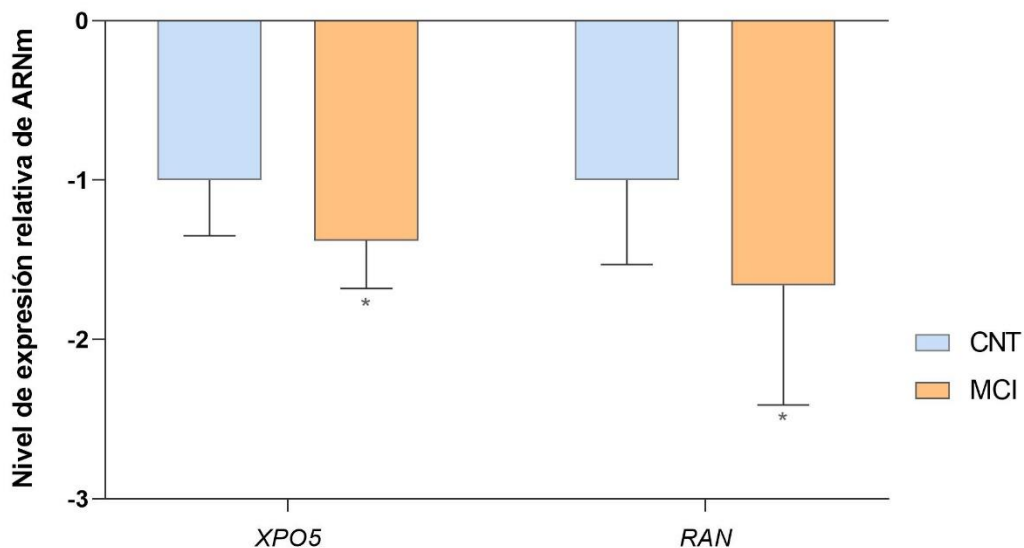
### Genes implicados en la transcripción



**Figura 10. Nivel de expresión relativa de ARNm de los genes implicados en la transcripción de los miARNs.** CNT: control. MCI: miocardiopatía isquémica. En comparación con el grupo CNT: \* p-valor < 0,05, \*\* p-valor < 0,01, \*\*\* p-valor < 0,001.

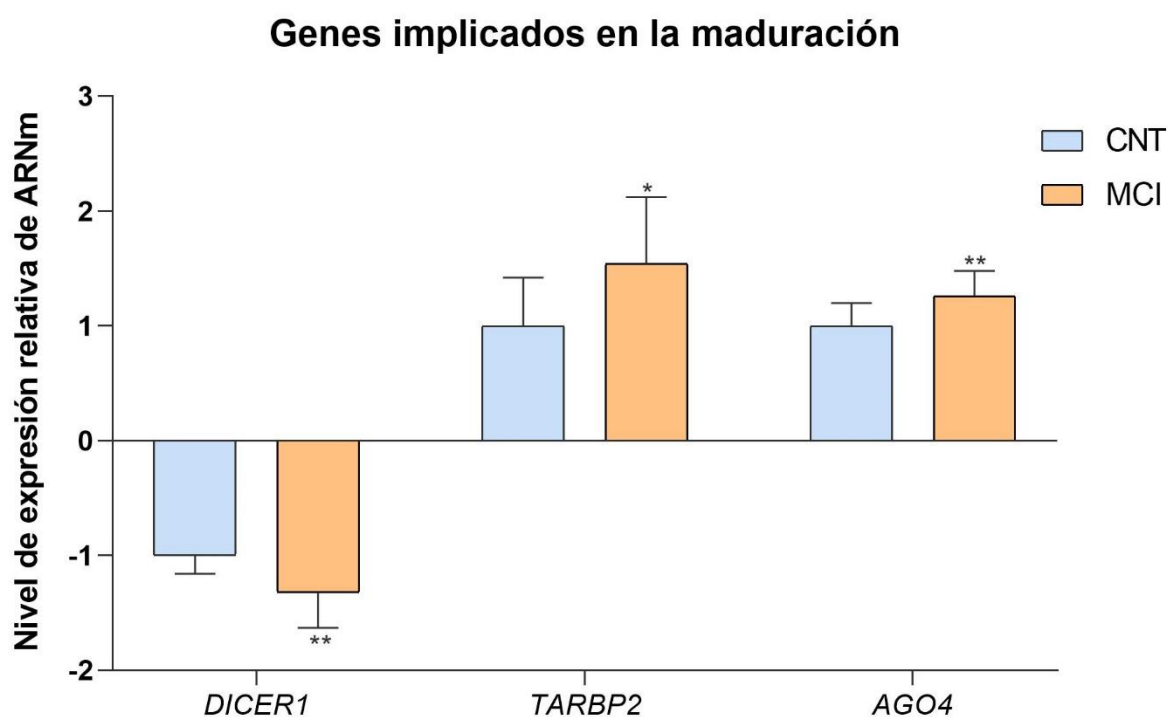
Por otro lado, *XPO5* y *RAN* (Figura 11), los cuales codifican la GTPasa Ran y la Exportina-5 respectivamente, que son los responsables de la exportación de los miARNs desde el interior del núcleo hacia la región citoplasmática se encuentran infraexpresados (FC: -1,66 y p-valor < 0,05; FC: -1,38 y p-valor < 0.05).

### Genes implicados en la exportación



**Figura 11. Nivel de expresión relativa de ARNm de los genes implicados en la exportación nuclear de los miARNs.** CNT: control. MCI: miocardiopatía isquémica. En comparación con el grupo CNT: \* p-valor < 0.05.

Por último, 3 genes relacionados con el procesamiento y la maduración de los miARNs en el citoplasma, *DICER1*, *TRBP* y *AGO4* (Figura 12), los cuales codifican las proteínas endorribonucleasa Dicer, la proteína argonauta 4 y la subunidad del complejo de carga RISC TRBP, se encuentran diferencialmente expresados. Por un lado, *DICER1* se encuentran infraexpresado (FC: -1,32 y p-valor < 0,05) y por otro *TRBP* y *AGO4* se hallan sobreexpresados (FC: 1,54 y p-valor < 0.05; FC: 1,26 y p-valor < 0,05).



**Figura 12. Nivel de expresión relativa de ARNm en genes implicados en el procesamiento y maduración citoplasmático de los miARNs.** CNT: control. MCI: miocardiopatía isquémica. En comparación con el grupo CNT: \*p-valor < 0,05; \*\* p-valor < 0.01.



4. Expresión diferencial de miARNs reguladores de la biogénesis de los miARNs

Debido a que los ARNm están sometidos a una gran regulación postranscripcional, se ha complementado el estudio llevando a cabo un análisis de los distintos miARNs que regulan de forma postranscripcional los genes de estudio. De esta forma, se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica para identificar aquellos miARNs que han sido descritos hasta el momento y que tienen como diana los transcritos de genes que se encuentran relacionados con la biogénesis de los miARNs.

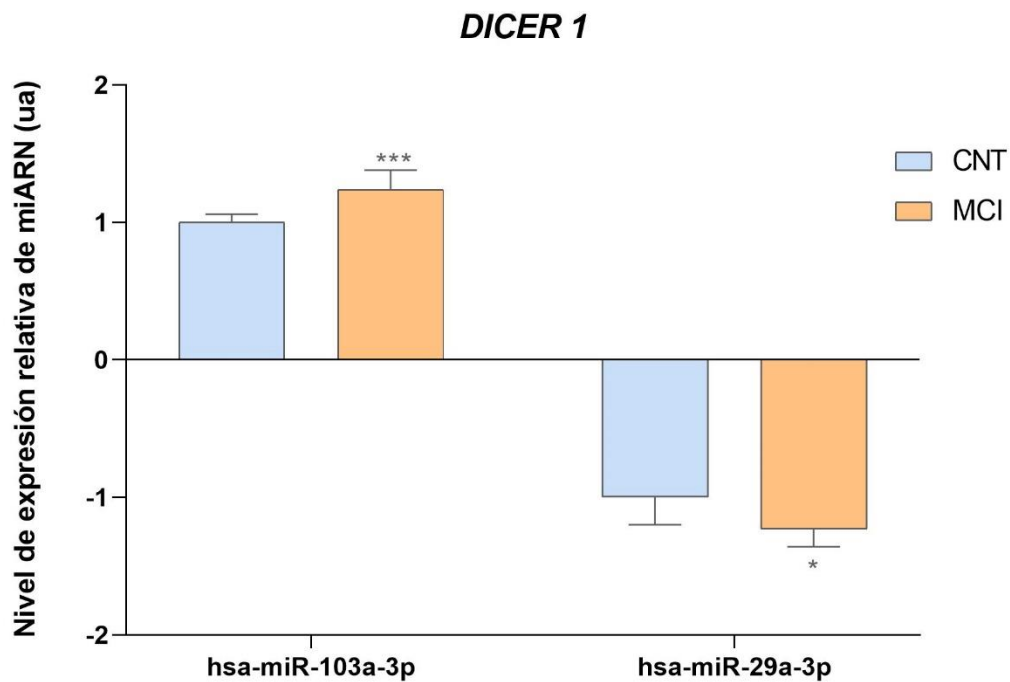
De esta forma se ha observado que los distintos procesos implicados de la biogénesis de los miARNs se encuentran regulados postranscripcionalmente, identificando 9 miARNs que participan en dicha regulación. (Tabla 8)

**Tabla 6.** miARNs reguladores de la biogénesis de los miARNs.

ARNm	miARN	Referencia
<i>DICER1</i>	miR-130a-3p	(Kovaleva et al., 2012)
	miR-103a-3p	(Martello et al., 2010)
	miR-107	(Martello et al., 2010)
	miR-146b-5p	(Ramírez-Moya et al., 2019)
	miR-29a-3p	(Cochrane et al., 2010)
	miR-222-3p	(Cochrane et al., 2010)
<i>XPO5</i>	miR-138-5p	(J. Li et al., 2014)
<i>TARBP2</i>	let-5f-5p	(G.Chen et al.,2020)
<i>RAN</i>	miR-203a-3p	(Viticchiè et al., 2012)

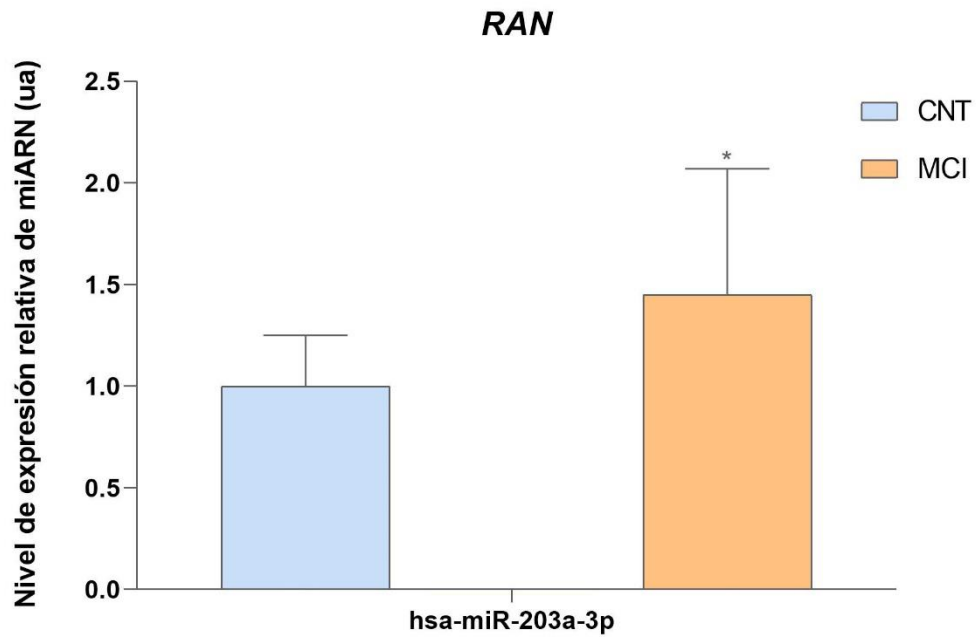
Al realizar la comparación de los niveles de expresión de los distintos miARNs entre los pacientes diagnosticados con MCI (n=22) y los individuos del grupo CNT (n=8), se han observado diferencias significativas en 3 de los miARNs estudiados: hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-29a-3p y hsa-miR-203a-3p

Tanto hsa-miR-103a-3p como hsa-miR-29a-3p son reguladores postranscripcionales de *DICER1*, gen que codifica para la proteína Dicer. Observamos que hsa-miR-103a-3p se encuentra sobreexpresado en pacientes con MCI (FC= 1,24 ; p-valor < 0,001) mientras que hsa-miR-29a-3p se halla infraexpresado (FC= -1,23; p – valor < 0,05). (Figura 13)



**Figura 13. Niveles de expresión relativa de miARNs que tienen como diana *DICER1*.** CNT: control. MCI: miocardiopatía isquémica. En comparación con el grupo CNT: \*p-valor < 0,05; \*\*\*p-valor < 0,001

Por otro lado, se ha observado que el miARN hsa-miR-203a-3p, el cual tiene como diana los transcritos de *RAN* se encuentra sobreexpresado (FC= 1,45 ; p-valor < 0,05) (Figura 14).



**Figura 14. Niveles de expresión relativa del miARN hsa-miR-203a-3p.** CNT: control. MCI: miocardiopatía isquémica. En comparación con el grupo CNT: \*p-valor < 0,05.

## V. DISCUSIÓN

La IC es un grave problema de salud pública en todo el mundo debido principalmente a su gran índice de mortalidad. Se trata de una patología que produce un gran impacto social y económico. En la actualidad, el tipo de IC más común es la MCI. Por todos estos motivos, es de vital importancia continuar investigando acerca de rutas moleculares que se encuentran alteradas para, de esta forma, poder aumentar nuestro conocimiento sobre los mecanismos de esta patología e identificar dianas terapéuticas y así poder desarrollar tratamientos efectivos para conseguir reducir los niveles de mortalidad de esta enfermedad.

En distintos estudios funcionales acerca de los miARNs, como el llevado a cabo por Vegter et al., 2016, han observado que existen una gran variedad de miARNs con distintos niveles de expresión que tienen un papel importante en los mecanismos patológicos que llevan a sufrir IC, como por ejemplo la hipertrofia, la apoptosis o la hipoxia. Por ello es importante conocer las alteraciones que pueden existir en el proceso de biogénesis de los miARNs, ya que la alteración de distintos puntos del proceso y la desregulación en los niveles de expresión y maduración de los miARNs pueden ser eventos de gran importancia relacionados con esta patología.

Por todo ello, este trabajo se ha centrado en el estudio del proceso de biogénesis de los miARNs en pacientes con MCI frente a individuos CNT sanos. En primer lugar, el hecho de observar una disminución en la proporción de miARNs maduros en pacientes con MCI podría indicar alteraciones en el proceso de maduración de la biogénesis de los miARNs. Existen diversos estudios a nivel cardiovascular, como el llevado a cabo por Dosenko et al., 2012, en el que se han observado alteraciones en los niveles de expresión de miARNs en cardiomiocitos de ratas neonatales durante eventos de anoxia reoxigenación obteniendo unos niveles del miR-208a y el miR-29a inmaduros muy elevados durante este tipo de eventos.

En el presente trabajo, al observar una menor maduración de los miARNs se llevó a cabo un análisis de las moléculas implicadas en el proceso de síntesis y maduración de los mismos. Los resultados de la secuenciación del ARN mostraron la existencia de una alteración en la expresión de varios de los genes analizados, revelando de esta forma la existencia de una desregulación de los mecanismos relacionados con la biogénesis de los miARNs en pacientes con MCI.

Ante la sobreexpresión de los genes *POLR2F*, *POLR2I* y *POLR2L*, genes se encargan de la transcripción de los miARNs en el núcleo (Achkar et al., 2016), puede existir un mayor número de miARNs transcritos en la región nuclear de las células cardiacas en pacientes que padecen MCI. De esta forma, se podría estar generando una acumulación de miARNs mayor de lo normal en el núcleo de las células cardiacas de pacientes diagnosticados con MCI.

Por otro lado, ante la infraexpresión de *XPO5* y *RAN*, genes involucrados de forma conjunta en el proceso de exportación de los miARNs desde el núcleo hacia el citoplasma, se podrían estar generando alteraciones en este proceso y ocasionando así una mayor acumulación de miARNs en el núcleo. En un estudio realizado por Borghini et al., 2019 se observó que distintos polimorfismos genéticos en *XPO5* se asocian a un menor riesgo de sufrir enfermedad de la arteria coronaria, probablemente por afectar a los niveles de expresión de miARNs vasculares y específicos del corazón.

Existen distintos mecanismos que regulan postranscripcionalmente a exportina 5 (Wu et al., 2018). Cabe destacar que en los resultados obtenidos en el análisis de expresión diferencial de miARNs reguladores de la biogénesis de los miARNs se ha observado que el miARN hsa-miR-203a-3p, el cual tiene como diana los transcritos de *RAN*, se encuentra sobreexpresado. Esto podría generar una menor expresión de la proteína GTPasa Ran, la cual colabora de forma estrecha con exportina 5 para llevar a cabo la exportación de los miARNs desde el interior del núcleo hacia el citoplasma.

Por otro lado, en diversos estudios se ha observado que *TARBP2*, proteína de unión al ARN sobreexpresada en nuestro estudio, es necesaria para una función cardíaca normal. En un modelo murino se observó que la inactivación cardíaca específica del gen *TARBP2* causa una MCI progresiva y una IC letal en este tipo de modelo. (Ding et al., 2016)

Se ha observado en distintas patologías, que la alteración en la expresión de los componentes de la biogénesis de los miARNs se asocia con un peor pronóstico en algunos tipos de carcinoma. En concreto, se ha estudiado, que alteraciones en la expresión de *AGO4*, implicado en el procesamiento y la maduración de los miARNs en el citoplasma y sobreexpresado en nuestro estudio, están vinculadas a un peor pronóstico en el carcinoma hepatocelular. (Kitagawa et al., 2013)

Se ha observado en un estudio que la delección de *DICER1*, gen infraexpresado en nuestros pacientes, genera que los corazones presenten un edema pericárdico y un miocardio ventricular insuficientemente desarrollado. (Thum, 2008) También se ha visto que distintos polimorfismos genéticos en *DICER1* se asocian a un menor riesgo de sufrir enfermedad de la arteria coronaria, con mucha probabilidad por afectar a los niveles de expresión de miARNs específicos y vasculares del corazón. (Borghini et al., 2019)

Varios estudios han revelado la implicación de *DICER1* en una amplia gama de enfermedades cardiovasculares, ya que su correcto funcionamiento es vital para la función de las células endoteliales y la angiogénesis. Estudios en modelos murinos han mostrado un aumento de la tasa de mortalidad y una disminución de la actividad espontánea de los ratones deficientes en *DICER1*, mientras que la depleción de este gen ha provocado defectos geométricos y funcionales del corazón. (Theotoki et al., 2020)

*DICER 1* da lugar a la proteína Dicer, una endorribonucleasa de ARN de doble cadena que desempeña un papel central en el silenciamiento génico postranscripcional. El hecho de que *DICER1* se encuentre infraexpresado y que los miARNs hsa-miR-130a-3p y hsa-miR-29a-3p (los cuales tienen como diana transcritos de *DICER1*) se encuentren alterados muestra una clara desregulación de esta molécula implicada en el procesamiento y la maduración de los miARNs.

Con todo ello se podría plantear el hecho de que debido a la mayor acumulación de miARNs en el núcleo en consecuencia a la sobreexpresión de las subunidades de la ARN Pol II y la infraexpresión tanto de *XPO5* como de *RAN* se genere un estado de maduración de los miARNs en el citoplasma menor en pacientes diagnosticados con MCI, teniendo en cuenta también que *DICER1* se encuentra infraexpresado y por tanto el procesamiento y maduración de los miARNs en el citoplasma también debería ser menor.

Existen una serie de limitaciones en el estudio, especialmente, aquellas que han sido ocasionadas por la variabilidad que existe entre los diferentes individuos diagnosticados con MCI que, al mismo tiempo pueden tener distintas condiciones al estar tratados farmacológicamente, generando de esta forma que los resultados puedan estar influidos por esta serie de tratamientos. Otra limitación es que en esta investigación se han utilizado muestras obtenidas del VI por lo que no se puede sugerir de forma cierta que existan las mismas alteraciones en la biogénesis de los miARNs en otras regiones del VI.

## VI. CONCLUSIONES

- Existe una menor proporción de miARNs maduros en el tejido cardiaco de pacientes diagnosticados con MCI en comparación con corazones control.
- Los niveles de expresión de ARNm de los genes implicados en la transcripción de los miARNs que codifican distintas subunidades de la ARN pol II (*POLR2F*, *POLR2I* y *POLR2L*), están aumentados en la MCI.
- Existe una infraexpresión de *XPO5* y *RAN*, moléculas relacionadas con la exportación de los miARNs desde el núcleo al citoplasmas. Además, hsa-miR-203a-3p, el cual tiene como diana los transcritos de *RAN*, se encuentra sobreexpresado.
- Hemos observado una infraexpresión de *DICER*, molécula directamente relacionada en el proceso de maduración de los miARNs, además identificamos alteraciones en sus reguladores hsa-miR-103a-3p y hsa-miR-29a-3p.
- Todas estas alteraciones apuntan a una mayor transcripción, un menor transporte núcleo-citoplasma y una desregulación del proceso de maduración de los miARNs en la MCI, apoyando la mayor cantidad de miARNs inmaduros observada en esta patología.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abe, H., Kamai, T., Shirataki, H., Oyama, T., Arai, K., & Yoshida, K. I. (2008). High expression of Ran GTPase is associated with local invasion and metastasis of human clear cell renal cell carcinoma. *International Journal of Cancer*, *122*(10), 2391–2397. <https://doi.org/10.1002/ijc.23400>
- Achkar, N. P., Cambiagno, D. A., & Manavella, P. A. (2016). miRNA Biogenesis: A Dynamic Pathway. *Trends in Plant Science*, *21*(12), 1034–1044. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.09.003>
- Akat, K. M., Moore-McGriff, D., Morozov, P., Brown, M., Gogakos, T., Da Rosa, J. C., Mihailovic, A., Sauer, M., Ji, R., Ramarathnam, A., Totary-Jain, H., Williams, Z., Tuschl, T., & Schulze, P. C. (2014). Comparative RNA-sequencing analysis of myocardial and circulating small RNAs in human heart failure and their utility as biomarkers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(30), 11151–11156. <https://doi.org/10.1073/pnas.1401724111>
- Anders, S., Pyl, P. T., & Huber, W. (2015). HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, *31*(2), 166–169. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>
- Andreeva, K., & Cooper, N. G. F. (2014). MicroRNAs in the neural retina. *International Journal of Genomics*, *2014*. <https://doi.org/10.1155/2014/165897>
- Auyeung, V. C., Ulitsky, I., McGeary, S. E., & Bartel, D. P. (2013). Beyond secondary structure: Primary-sequence determinants license Pri-miRNA hairpins for processing. *Cell*, *152*(4), 844–858. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.031>
- Becker, W. R., Ober-Reynolds, B., Jouravleva, K., Jolly, S. M., Zamore, P. D., & Greenleaf, W. J. (2019). High-Throughput Analysis Reveals Rules for Target RNA Binding and Cleavage by AGO2. *Molecular Cell*, *75*(4), 741-755.e11. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.06.012>
- Borghini, A., Pulignani, S., Mercuri, A., Vecoli, C., Turchi, S., Carpeggiani, C., & Andreassi, M. G. (2019). Influence of genetic polymorphisms in DICER and XPO5 genes on the risk of coronary artery disease and circulating levels of vascular miRNAs. *Thrombosis Research*, *180*, 32–36. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2019.05.021>
- Butler, J., Fonarow, G. C., Zile, M. R., Lam, C. S., Roessig, L., Schelbert, E. B., Shah, S. J., Ahmed, A., Bonow, R. O., Cleland, J. G. F., Cody, R. J., Chioncel, O., Collins, S. P., Dunmon, P., Filippatos, G., Lefkowitz, M. P., Marti, C. N., McMurray, J. J., Misselwitz, F., ... Gheorghide, M. (2014). Developing therapies for heart failure with preserved ejection fraction. Current state and future directions. *JACC: Heart Failure*, *2*(2), 97–112. <https://doi.org/10.1016/j.jchf.2013.10.006>
- Chen, G., Gu, H., Fang, T., Zhou, K., Xu, J., & Yin, X. (2020). Hypoxia-induced let-7f-5p/TARBP2 feedback loop regulates osteosarcoma cell proliferation and invasion by inhibiting the Wnt signaling pathway. *Aging*, *12*(8), 6891–6903. <https://doi.org/10.18632/aging.103049>
- Cochrane, D. R., Cittelly, D. M., Howe, E. N., Spoelstra, N. S., McKinsey, E. L., LaPara, K., Elias, A., Yee, D., & Richer, J. K. (2010). MicroRNAs Link Estrogen Receptor Alpha Status and Dicer Levels in Breast Cancer. *Hormones and Cancer*, *1*(6), 306–319. <https://doi.org/10.1007/s12672-010-0043-5>
- Davis-Dusenbery, B. N., & Hata, A. (2010). Mechanisms of control of microRNA biogenesis.



*Journal of Biochemistry*, 148(4), 381–392. <https://doi.org/10.1093/jb/mvq096>

- Damiani, D., Alexander, J. J., O'Rourke, J. R., McManus, M., Jadhav, A. P., Cepko, C. L., Hauswirth, W. W., Harfe, B. D., & Strettoi, E. (2008). Dicer inactivation leads to progressive functional and structural degeneration of the mouse retina. *Journal of Neuroscience*, 28(19), 4878–4887. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0828-08.2008>
- Derda, A. A., Thum, S., Lorenzen, J. M., Bavendiek, U., Heineke, J., Keyser, B., Stuhmann, M., Givens, R. C., Kennel, P. J., Christian Schulze, P., Widder, J. D., Bauersachs, J., & Thum, T. (2015). Blood-based microRNA signatures differentiate various forms of cardiac hypertrophy. *International Journal of Cardiology*, 196, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.05.185>
- Di Carlo, V., Grossi, E., Laneve, P., Morlando, M., Dini Modigliani, S., Ballarino, M., Bozzoni, I., & Caffarelli, E. (2013). TDP-43 regulates the microprocessor complex activity during in vitro neuronal differentiation. *Molecular Neurobiology*, 48(3), 952–963. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8564-x>
- Ding, J., Chen, J., Wang, Y., Kataoka, M., Ma, L., Hu, X., Lin, Z., Nie, M., Deng, Z., Pu, W. T., & Wang, D. (2016). *Repression*. 47(7), 776–783. <https://doi.org/10.1038/ng.3324>.Trbp
- Dosenko, V. E., Gurianova, V. L., Surova, O. V., Stroy, D. A., & Moibenko, A. A. (2012). Mature and immature microRNA ratios in cultured rat cardiomyocytes during anoxia-reoxygenation. *Experimental and Clinical Cardiology*, 17(2), 84–87.
- Dunlay, S. M., Pereira, N. L., & Kushwaha, S. S. (2014). Contemporary strategies in the diagnosis and management of heart failure. *Mayo Clinic Proceedings*, 89(5), 662–676. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2014.01.004>
- Elkayam, E., Kuhn, C. D., Tocilj, A., Haase, A. D., Greene, E. M., Hannon, G. J., & Joshua-Tor, L. (2012). The structure of human argonaute-2 in complex with miR-20a. *Cell*, 150(1), 100–110. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.017>
- Ellis, K. L., Cameron, V. A., Troughton, R. W., Frampton, C. M., Ellmers, L. J., & Richards, A. M. (2013). Circulating microRNAs as candidate markers to distinguish heart failure in breathless patients. *European Journal of Heart Failure*, 15(10), 1138–1147. <https://doi.org/10.1093/eurjhf/hft078>
- Eun, J. L., Baek, M., Gusev, Y., Brackett, D. J., Nuovo, G. J., & Schmittgen, T. D. (2008). Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and tumors. *Rna*, 14(1), 35–42. <https://doi.org/10.1261/rna.804508>
- Felker, G. M., Shaw, L. K., & O'Connor, C. M. (2002). A standardized definition of ischemic cardiomyopathy for use in clinical research. *Journal of the American College of Cardiology*, 39(2), 210–218. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(01\)01738-7](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(01)01738-7)
- Fonseca, C. (2006). Diagnosis of heart failure in primary care. *Heart Failure Reviews*, 11(2), 95–107. <https://doi.org/10.1007/s10741-006-9481-0>
- Friedländer, M. R., Lizano, E., Houben, A. J. S., Bezdán, D., Bález-Coronel, M., Kudla, G., Mateu-Huertas, E., Kagerbauer, B., González, J., Chen, K. C., LeProust, E. M., Martí, E., & Estivill, X. (2014). Evidence for the biogenesis of more than 1,000 novel human microRNAs. *Genome Biology*, 15(4), 1–17. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-4-r57>
- Gerber, Y., Weston, S. A., Redfield, M. M., Chamberlain, A. M., Manemann, S. M., Jiang, R., Killian, J. M., & Roger, V. L. (2015). A contemporary appraisal of the heart failure epidemic in Olmsted County, Minnesota, 2000 to 2010. *JAMA Internal Medicine*, 175(6),

996–1004. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2015.0924>

- Gheorghide, M., Sopko, G., Luca, L. De, Velazquez, E. J., Parker, J. D., Binkley, P. F., Sadowski, Z., Golba, K. S., Prior, D. L., Rouleau, J. L., & Bonow, R. O. (2006). Navigating the crossroads of coronary artery disease and heart failure. *Circulation*, *114*(11), 1202–1213. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.623199>
- Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *15*(8), 509–524. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>
- Hinkel, R., Penzkofer, D., Zühlke, S., Fischer, A., Husada, W., Xu, Q. F., Baloch, E., Van Rooij, E., Zeiher, A. M., Kupatt, C., & Dimmeler, S. (2013). Inhibition of microRNA-92a protects against ischemia/reperfusion injury in a large-animal model. *Circulation*, *128*(10), 1066–1075. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001904>
- Iwasaki, Y. W., Kiga, K., Kayo, H., Fukuda-Yuzawa, Y., Weise, J., Inada, T., Tomita, M., Ishihama, Y., & Fukao, T. (2013). Global microRNA elevation by inducible Exportin 5 regulates cell cycle entry. *Rna*, *19*(4), 490–497. <https://doi.org/10.1261/rna.036608.112>
- Jafarnejad, S. M., Ardekani, G. S., Ghaffari, M., Martinka, M., & Li, G. (2013). Sox4-mediated Dicer expression is critical for suppression of melanoma cell invasion. *Oncogene*, *32*(17), 2131–2139. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.239>
- Karube, Y., Tanaka, H., Osada, H., Tomida, S., Tatematsu, Y., Yanagisawa, K., Yatabe, Y., Takamizawa, J., Miyoshi, S., Mitsudomi, T., & Takahashi, T. (2005). Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Science*, *96*(2), 111–115. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2005.00015.x>
- Kelder, J. C., Cramer, M. J., Van Wijngaarden, J., Van Tooren, R., Mosterd, A., Moons, K. G. M., Lammers, J. W., Cowie, M. R., Grobbee, D. E., & Hoes, A. W. (2011). The diagnostic value of physical examination and additional testing in primary care patients with suspected heart failure. *Circulation*, *124*(25), 2865–2873. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.019216>
- Kitagawa, N., Ojima, H., Shirakihara, T., Shimizu, H., Kokubu, A., Urushidate, T., Totoki, Y., Kosuge, T., Miyagawa, S., & Shibata, T. (2013). Downregulation of the microRNA biogenesis components and its association with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Science*, *104*(5), 543–551. <https://doi.org/10.1111/cas.12126>
- Kovaleva, V., Mora, R., Park, Y. J., Plass, C., Chiramel, A. I., Bartenschlager, R., Döhner, H., Stilgenbauer, S., Pscherer, A., Lichter, P., & Seiffert, M. (2012). miRNA-130a targets ATG2B and DICER1 to inhibit autophagy and trigger killing of chronic lymphocytic leukemia cells. *Cancer Research*, *72*(7), 1763–1772. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3671>
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., & Salzberg, S. L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology*, *10*(3). <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-3-r25>
- Lee, R. C., & Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, *294*(5543), 862–864. <https://doi.org/10.1126/science.1065329>
- Lennox, K. A., & Behlke, M. A. (2010). A direct comparison of anti-microRNA oligonucleotide potency. *Pharmaceutical Research*, *27*(9), 1788–1799. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0156-0>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., &

- Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Li, J., Chen, Y., Qin, X., Wen, J., Ding, H., Xia, W., Li, S., Su, X., Wang, W., Li, H., Zhao, Q., Fang, T., Qu, L., & Shao, N. (2014). MiR-138 downregulates miRNA processing in HeLa cells by targeting RMND5A and decreasing Exportin-5 stability. *Nucleic Acids Research*, 42(1), 458–474. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt839>
- Liu, G., Friggeri, A., Yang, Y., Milosevic, J., Ding, Q., Thannickal, V. J., Kaminski, N., & Abraham, E. (2010). miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. *Journal of Experimental Medicine*, 207(8), 1589–1597. <https://doi.org/10.1084/jem.20100035>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lumayag, S., Haldin, C. E., Corbett, N. J., Wahlin, K. J., Cowan, C., Turturro, S., Larsen, P. E., Kovacs, B., Witmer, P. D., Valle, D., Zack, D. J., Nicholson, D. A., & Xu, S. (2013). Inactivation of the microRNA-183/96/182 cluster results in syndromic retinal degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(6). <https://doi.org/10.1073/pnas.1212655110>
- Macrae, D. J. (2007). The Council for International Organizations and Medical Sciences (CIOMS) guidelines on ethics of clinical trials. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 4(2), 176–178. <https://doi.org/10.1513/pats.200701-011GC>
- Maggioni, A. P., Dahlström, U., Filippatos, G., Chioncel, O., Leiro, M. C., Drozd, J., Fruhwald, F., Gullestad, L., Logeart, D., Fabbri, G., Urso, R., Metra, M., Parisis, J., Persson, H., Ponikowski, P., Rauchhaus, M., Voors, A. A., Nielsen, O. W., Zannad, F., ... Asserlund, B. (2013). EURObservational Research Programme: Regional differences and 1-year follow-up results of the Heart Failure Pilot Survey (ESC-HF Pilot). *European Journal of Heart Failure*, 15(7), 808–817. <https://doi.org/10.1093/eurjhf/hft050>
- Martello, G., Rosato, A., Ferrari, F., Manfrin, A., Cordenonsi, M., Dupont, S., Enzo, E., Guzzardo, V., Rondina, M., Spruce, T., Parenti, A. R., Daidone, M. G., Bicciato, S., & Piccolo, S. (2010). A microRNA targeting dicer for metastasis control. *Cell*, 141(7), 1195–1207. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.05.017>
- Matsuyama, H., & Suzuki, H. I. (2020). Systems and synthetic microRNA biology: From biogenesis to disease pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1), 1–23. <https://doi.org/10.3390/ijms21010132>
- McMurray, J. J. V., Adamopoulos, S., Anker, S. D., Auricchio, A., Böhm, M., Dickstein, K., Falk, V., Filippatos, G., Fonseca, C., Gomez-Sanchez, M. A., Jaarsma, T., Køber, L., Lip, G. Y. H., Maggioni, A. Pietro, Parkhomenko, A., Pieske, B. M., Popescu, B. A., Rønnevik, P. K., Rutten, F. H., ... ESC Committee for Practice Guidelines. (2012). ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European Heart Journal*, 33(14), 1787–1847. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs104>
- Monteys, A. M., Spengler, R. M., Wan, J., Tecedor, L., Lennox, K. A., Xing, Y., & Davidson, B. L.

- (2010). Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *Rna*, *16*(3), 495–505. <https://doi.org/10.1261/rna.1731910>
- Mori, M., Triboulet, R., Mohseni, M., Schlegelmilch, K., Shrestha, K., Camargo, F. D., & Gregory, R. I. (2014). Hippo signaling regulates microprocessor and links cell-density-dependent mirna biogenesis to cancer. *Cell*, *156*(5), 893–906. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.043>
- Park, J. E., Heo, I., Tian, Y., Simanshu, D. K., Chang, H., Jee, D., Patel, D. J., & Kim, V. N. (2011). Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. *Nature*, *475*(7355), 201–205. <https://doi.org/10.1038/nature10198>
- Paulus, W. J., Tschöpe, C., Sanderson, J. E., Rusconi, C., Flachskampf, F. A., Rademakers, F. E., Marino, P., Smiseth, O. A., De Keulenaer, G., Leite-Moreira, A. F., Borbély, A., Édes, I., Handoko, M. L., Heymans, S., Pezzali, N., Pieske, B., Dickstein, K., Fraser, A. G., & Brutsaert, D. L. (2007). How to diagnose diastolic heart failure: A consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology. *European Heart Journal*, *28*(20), 2539–2550. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehm037>
- Ponikowski, P., Voors, A. A., Anker, S. D., Bueno, H., Cleland, J. G. F., Coats, A. J. S., Falk, V., González-Juanatey, J. R., Harjola, V. P., Jankowska, E. A., Jessup, M., Linde, C., Nihoyannopoulos, P., Parissis, J. T., Pieske, B., Riley, J. P., Rosano, G. M. C., Ruilope, L. M., Ruschitzka, F., ... Davies, C. (2016). 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *European Heart Journal*, *37*(27), 2129–2200m. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw128>
- Ramírez-Moya, J., Wert-Lamas, L., Riesco-Eizaguirre, G., & Santisteban, P. (2019). Impaired microRNA processing by DICER1 downregulation endows thyroid cancer with increased aggressiveness. *Oncogene*, *38*(27), 5486–5499. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0804-8>
- Roberts, E., Ludman, A. J., Dworzynski, K., Al-Mohammad, A., Cowie, M. R., McMurray, J. J. V., & Mant, J. (2015). The diagnostic accuracy of the natriuretic peptides in heart failure: Systematic review and diagnostic meta-analysis in the acute care setting. *BMJ (Online)*, *350*(March), 1–16. <https://doi.org/10.1136/bmj.h910>
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2009). edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, *26*(1), 139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
- Achkar, N. P., Cambiagno, D. A., & Manavella, P. A. (2016). miRNA Biogenesis: A Dynamic Pathway. *Trends in Plant Science*, *21*(12), 1034–1044. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.09.003>
- Sand, M., Skrygan, M., Georgas, D., Arenz, C., Gambichler, T., Sand, D., Altmeyer, P., & Bechara, F. G. (2012). Expression levels of the microRNA maturing microprocessor complex component DGCR8 and the RNA-induced silencing complex (RISC) components argonaute-1, argonaute-2, PACT, TARBP1, and TARBP2 in epithelial skin cancer. *Molecular Carcinogenesis*, *51*(11), 916–922. <https://doi.org/10.1002/mc.20861>
- Takamizawa, J., Konishi, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Osada, H., Endoh, H., Harano, T., Yatabe, Y., Nagino, M., Nimura, Y., Mitsudomi, T., & Takahashi, T. (2004). Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Research*, *64*(11), 3753–3756. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0637>
- Theotoki, E. I., Pantazopoulou, V. I., Georgiou, S., Kakoulidis, P., Filippa, V., Stravopodis, D. J., &

- Anastasiadou, E. (2020). Dicing the disease with dicer: The implications of dicer ribonuclease in human pathologies. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 1–24. <https://doi.org/10.3390/ijms21197223>
- Thum, T. (2008). Cardiac dissonance without conductors: How dicer depletion provokes chaos in the heart. *Circulation*, 118(15), 1524–1527. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.807230>
- Thum, T., & Condorelli, G. (2015). Long noncoding RNAs and microRNAs in cardiovascular pathophysiology. *Circulation Research*, 116(4), 751–762. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303549>
- Thum, T., Gross, C., Fiedler, J., Fischer, T., Kissler, S., Bussen, M., Galuppo, P., Just, S., Rottbauer, W., Frantz, S., Castoldi, M., Soutschek, J., Koteliansky, V., Rosenwald, A., Basson, M. A., Licht, J. D., Pena, J. T. R., Rouhanifard, S. H., Muckenthaler, M. U., ... Engelhardt, S. (2008). MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature*, 456(7224), 980–984. <https://doi.org/10.1038/nature07511>
- Trapnell, C., Williams, B. A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., Van Baren, M. J., Salzberg, S. L., Wold, B. J., & Pachter, L. (2010). Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology*, 28(5), 511–515. <https://doi.org/10.1038/nbt.1621>
- Vegter, E. L., Van Der Meer, P., De Windt, L. J., Pinto, Y. M., & Voors, A. A. (2016). MicroRNAs in heart failure: From biomarker to target for therapy. *European Journal of Heart Failure*, 18(5), 457–468. <https://doi.org/10.1002/ejhf.495>
- Viticchiè, G., Lena, A. M., Cianfarani, F., Odorisio, T., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Melino, G., & Candi, E. (2012). MicroRNA-203 contributes to skin re-epithelialization. *Cell Death and Disease*, 3(11), 1–7. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.174>
- Wang, T. J., Evans, J. C., Benjamin, E. J., Levy, D., LeRoy, E. C., & Vasan, R. S. (2003). Natural history of asymptomatic left ventricular systolic dysfunction in the community. *Circulation*, 108(8), 977–982. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000085166.44904.79>
- Weitz, S. H., Gong, M., Barr, I., Weiss, S., & Guo, F. (2014). Processing of microRNA primary transcripts requires heme in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(5), 1861–1866. <https://doi.org/10.1073/pnas.1309915111>
- Wu, K., He, J., Pu, W., & Peng, Y. (2018). The Role of Exportin-5 in MicroRNA Biogenesis and Cancer. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 16(2), 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2017.09.004>
- Wu, L., Fan, J., & Belasco, J. G. (2006). MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(11), 4034–4039. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510928103>
- Yancy, C. W., Jessup, M., Bozkurt, B., Butler, J., Casey, D. E., Drazner, M. H., Fonarow, G. C., Geraci, S. A., Horwich, T., Januzzi, J. L., Johnson, M. R., Kasper, E. K., Levy, W. C., Masoudi, F. A., McBride, P. E., McMurray, J. J. V., Mitchell, J. E., Peterson, P. N., Riegel, B., ... Wilkoff, B. L. (2013). 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: Executive summary: A report of the American college of cardiology foundation/American Heart Association task force on practice guidelines. *Circulation*, 128(16), 1810–1852. <https://doi.org/10.1161/CIR.0b013e31829e8807>