

Trabajo fin de Máster
Máster en Nutrición y Metabolismo

**EFECTO DE LA DIETA SOBRE LA
EXPRESIÓN DE MIRNAS
INVOLUCRADOS EN LA CAPACIDAD
REGENERATIVA DEL ENDOTELIO EN
PACIENTES DE ALTO RIESGO
CARDIOVASCULAR**



Rosa Jiménez Lucena

Licenciada en Farmacia

Tutores: *José López Miranda*

Carmen Marín Hinojosa

Grupo de investigación: B02- Nutrigenómica y Síndrome Metabólico

Unidad de Lípidos y Aterosclerosis

Servicio de Medicina Interna

ÍNDICE

• <u>RESUMEN</u>	2
• <u>INTRODUCCIÓN</u>	4
• <u>METODOLOGÍA</u>	
• Pacientes	7
• Cuantificación de EPCs circulantes	9
• Aislamiento de células mononucleares	10
• Cultivo y caracterización de EPCs	11
• Extracción de RNA total en EPCs	11
> Retrotranscripción del ARN a c-DNA	12
> PCR	12
• Extracción de miRNA del plasma	13
> Retrotranscripción del ARN a c-DNA	13
> PCR	13
• Cultivo de células endoteliales	13
• Detección de especies reactivas de oxígeno (ROS)	14
• Cuantificación de los niveles plasmáticos de IL-6	14
• Análisis estadístico	14
• <u>RESULTADOS</u>	
• Características de la población	15
• Análisis de la expresión de miRNAs en las EPCs circulantes	15
• Análisis de la expresión de los miRNAs en muestras de plasma	20
• Estudio del estrés oxidativo intracelular	23
• <u>DISCUSIÓN</u>	25
• <u>CONCLUSIONES</u>	30
• <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	31

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de mortalidad en todo el mundo. Una manifestación temprana de la enfermedad cardiovascular es la disfunción endotelial, asociada a un entorno oxidativo e inflamatorio. El conocimiento de los mecanismos subyacentes a estos procesos es de vital importancia para el desarrollo de nuevos objetivos terapéuticos. La búsqueda de nuevos biomarcadores o mediadores de la enfermedad, como es el caso de los miRNAs, nos puede permitir profundizar en los mecanismos oxidativos e inflamatorios que desencadenan la disfunción endotelial, presente en estos pacientes.

Nuestro **objetivo** es evaluar la influencia de dos modelos de dieta saludable (dieta Mediterránea rica en MUFA, a expensas de aceite de oliva virgen extra, y una dieta baja en grasa) sobre los miRNAs implicados en la disfunción endotelial, en pacientes con enfermedad coronaria de alto riesgo.

Metodología: Este estudio se ha llevado a cabo en 40 pacientes, de entre 20 y 75 años, con alto riesgo cardiovascular incluidos en el estudio de intervención CordioPrev. Estos pacientes consumieron de forma aleatorizada *dos dietas* saludables, una dieta Mediterránea (38% grasa, con 22% MUFA, 6% PUFA y 7% SAT) y otra baja en grasa y rica en carbohidratos complejos (28% grasa, con 12% MUFA, 8% PUFA y 8% SAT). A estos pacientes se les realizó extracciones sanguíneas al inicio y tras el primer año de intervención dietética. Se determinaron los niveles de colesterol, triglicéridos, c-HDL, c-LDL, apo A, apo B, PCR, insulina y glucosa. Además, se cuantificó los niveles plasmáticos de IL-6 mediante ensayo inmunoenzimático. Se aislaron y se cultivaron las células progenitoras endoteliales (EPC) a partir de células mononucleares, mediante un gradiente de ficoll y se analizó la expresión de los miRNAs, miR 34a, miR-126, miR130a, miR-221, miR-222, y miR-92a, en las EPCs procedentes de cada uno de los pacientes, mediante RT-qPCR. También se ha investigado la expresión de los miRNAs, miR-210 y miR-30a3p, en muestras de plasma procedentes de cada paciente. Por último, se han determinado los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en HUVEC incubadas con suero procedente de cada uno de los pacientes.

Resultados: Hemos observado que la dieta mediterránea, comparada con la dieta baja en grasa, induce una mayor expresión de los miRNAs 126 y 34a en pacientes con un incremento en el número de EPCs circulantes y una mayor expresión de los miRNAs 130a y 221 en pacientes con síndrome metabólico. También hemos observado una correlación negativa entre el miRNA 126 y la IL-6 tras el consumo de la dieta mediterránea. Además, nuestros resultados muestran que la dieta mediterránea induce un incremento en la expresión plasmática del miRNA 210 en pacientes con síndrome metabólico y del miRNA 30a-3p en pacientes diabéticos, en comparación con una dieta baja en grasa. Finalmente, hemos observado que la dieta mediterránea tiende a disminuir el daño oxidativo en comparación con la dieta baja en grasa. Estos resultados sugieren que la dieta mediterránea podría modular la expresión de miRNAs implicados en el daño endotelial, induciendo una mayor supervivencia y proliferación celular, así como, una mejoría del estado inflamatorio y oxidativo en pacientes con enfermedad cardiovascular.

Palabras clave: Biomarcadores, miRNAs, dieta mediterránea, células progenitoras endoteliales, daño endotelial.

ABSTRACT

Cardiovascular disease is the main cause of mortality worldwide. Endothelial dysfunction is an early manifestation of cardiovascular disease associated with oxidative and inflammatory environment. Knowledge of the mechanisms underlying these processes is important for the development of new therapeutic targets. Therefore, the search for new biomarkers or mediators for cardiovascular disease, as miRNAs, will allow us to examine oxidative and inflammatory mechanism in endothelial dysfunction.

Our **objective** is to evaluate the influence of two models of healthy diet (Mediterranean diet rich in MUFA, expense of virgin olive oil, and a low fat diet) on miRNAs involved in endothelial dysfunction in patients with high risk coronary disease.

Methodology: We selected 40 patients, aged between 20 and 75 years old, with high cardiovascular risk included in the intervention study CORDIOPREV. These patients consumed two models of healthy diets: The Mediterranean diet (34% fat, 22% MUFA, 6% PUFA and 7% SAT) and low-fat diet (28% fat, with 12 % MUFA, 8% and 8% PUFA SAT). Blood samples were taken at the starting point and one year after the start of dietary intervention. We determined cholesterol, triglycerols, HDL-c, LDL-c, apo A, apo B, insulin, PCR and glucose. Furthermore, we determined plasma levels of IL-6 by immunoassays. Endothelial progenitor cells (EPC) were isolated from PBMCs (peripheral blood mononuclear cell) by ficoll gradient centrifugation and were cultured in medium EGM. Finally, we analyzed the expression of miRNAs: miR-34a, miR-126, miR130a, miR-221, miR-222 and miR-92a in EPC from each of the patients by RT-qPCR

Also, we investigated the expression of miRNAs, miR- 210 and miR- 30a3p in plasma samples from each patient. Lastly, we have determined the levels of reactive oxygen species (ROS) in HUVEC incubated with serum from each patient.

Results: We observed that the Mediterranean diet, versus low fat diet, induce an higher expression of the miRNA 126 and miRNA 34a in patients with an increase in the number of EPCs and an higher expression of miRNAs 130a and miRNA 221 in patients with metabolic syndrome. We also observed a negative correlation between miRNA 126 and IL-6 after consumption of the Mediterranean diet. In addition, our results show that the Mediterranean diet could induces an increased levels of expression miRNA 210 in plasma of patients with metabolic syndrome and miRNA 30a- 3p in diabetic patients, compared with a low fat diet.

In conclusion, Mediterranean diet could modulate the expression of miRNAs involved in the damage of endothelial dysfunction, inducing cellular survival and proliferation, as well as, an improvement of inflammatory and oxidative status in patients with cardiovascular disease. Thus, this diet could be used as dietary therapeutic strategy associated a reduction of high risk of coronary disease.

Keywords: Biomarkers, miRNAs, Mediterranean diet, endothelial progenitor cells, endothelial damage.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad cardiovascular y sus factores de riesgo, tales como hipertensión arterial, colesterol elevado, diabetes, tabaquismo, inactividad física, son los principales contribuyentes a la morbilidad de la población. A pesar del tratamiento, uno de cada tres pacientes que sufre un evento coronario tiene una recurrencia (1).

El daño sufrido en el endotelio vascular conduce a la disfunción endotelial, que determina el riesgo de eventos cardiovasculares. Por consiguiente, la disfunción endotelial es considerada una manifestación temprana de la enfermedad cardiovascular y está asociada con un entorno oxidativo e inflamatorio. La senescencia endotelial inducida por el envejecimiento o por condiciones patológicas podría desempeñar un papel importante en el desarrollo y progresión de la arteriosclerosis. (2)

A nivel celular y molecular, la disfunción endotelial se caracteriza por la disminución en la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO), producido por la óxido nítrico sintasa endotelial, y una pérdida progresiva de las células endoteliales. El mantenimiento de la función endotelial requiere un equilibrio entre los prooxidantes y el mecanismo antioxidante celular. En varios estudios se ha visto que, en pacientes con síndrome metabólico y enfermedad cardiovascular, la producción crónica de especies reactivas de oxígeno (ROS) puede superar la capacidad antioxidante celular, contribuyendo así a la disfunción endotelial (3,4).

Múltiples mecanismos moleculares como acortamiento de los telómeros, expresión de oncogenes, daño al ADN, estrés oxidativo están involucrados en la senescencia endotelial asociada a la arteriosclerosis (5), pero la mayoría de los estudios indican que el estrés oxidativo es el principal mecanismo desencadenante de disfunción del endotelio. (6)

La terapia ideal para prevenir la aterosclerosis, y, por consiguiente, el daño que induce en los diferentes órganos, principalmente en el sistema cardiovascular, es restaurar y recuperar la disfunción vascular (7). Se ha sugerido recientemente que las células progenitoras endoteliales (EPCs) pueden contribuir al mantenimiento y la reparación del endotelio (8). Las EPCs son una pequeña población de células mononucleares, entre 0,002% y 0,01% en sangre periférica y 0,2%-1% en sangre de cordón umbilical. La movilización de estas células depende en parte de NO, por lo que puede ser modificado en pacientes con enfermedad cardiovascular (9). Por esta razón, el conocimiento de los mecanismos subyacentes a estos procesos es primordial en el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas, más eficaces, para restaurar la función fisiológica normal de las arterias que han sido afectadas en pacientes con enfermedad cardiovascular previa.

El equilibrio entre la apoptosis y la regeneración de las células endoteliales puede determinar el grado y la progresión de la aterosclerosis a través de cambios en los diferentes niveles: genoma, transcriptoma, proteoma y metaboloma. El creciente desarrollo de tecnologías moleculares de alto rendimiento que permiten, con un esfuerzo razonable, el análisis de transcriptomas enteros, proteomas y metabolomas de las

personas en situación de riesgo, puede conducir al descubrimiento de nuevos biomarcadores de enfermedad (10, 11). Hoy en día, los biomarcadores juegan un papel clave en el diagnóstico precoz, la estratificación del riesgo, y el manejo terapéutico de las enfermedades cardíacas tales como el infarto de miocardio agudo y la insuficiencia cardíaca.

Los miRNAs conforman una gran familia de genes reguladores postranscripcionales que controlan muchos procesos celulares, tales como la proliferación, diferenciación, senescencia, apoptosis, y respuesta al estrés (12). Los miRNAs son secuencias cortas de RNA no codificantes, de 18 a 22 nucleótidos (13), que se expresan de forma endógena en la mayoría de eucariotas. Se estima que el 30% de todos los genes humanos son regulados por mecanismos dependientes de miRNAs, y que un solo miRNA puede regular alrededor de 200 transcritos, involucrados en diferentes vías celulares. Además, un RNA mensajero puede ser regulado por múltiples miRNAs. Los miRNAs regulan el procesamiento postranscripcional del RNA, mediante el apareamiento de bases con su RNA mensajero (mRNA) complementario en la región 3' no traducida, conduciendo a la represión de la transcripción o al clivaje del RNA mensajero (14). La versatilidad en el modo de acción de los miRNAs no se limita a inhibir la expresión génica, sino que pueden actuar induciendo o incrementando la traducción del transcrito sobre el que ejercen su efecto, más que impedirlo (15).

Estos miRNAs modulan la angiogénesis de células endoteliales al regular el crecimiento celular, la migración, la apoptosis y, la formación del tubo capilar (16). Estudios recientes sugieren que los miRNAs están asociados con la senescencia endotelial y podrían jugar un papel importante en la regulación de la función de las EPCs (17,18).

Existen múltiples miRNAs que desempeñan un papel clave en la biología endotelial vascular. El miRNA 126 es altamente expresado en el endotelio vascular y desempeña distintas funciones en la angiogénesis, vasculogénesis e inflamación endotelial. Estudios recientes han identificado a este miRNA como un biomarcador de lesión del miocardio. Se ha visto que está implicado en la proliferación, migración y liberación de las EPCs desde la médula ósea hasta el sitio de la lesión y disminuye la apoptosis (31,32) Un estudio publicado recientemente, sugiere que el miR-130a es importante en el mantenimiento de la función normal de las EPCs y, además, promueve la angiogénesis. (34,35). Existen otros miRNAs que colaboran en la disfunción endotelial, y cuya represión podría representar una nueva estrategia para la regeneración endotelial. Es el caso, por ejemplo, de los miRNAs 221 y 92a (25).

Además de la reconocida función reguladora intracelular de los miRNAs (angiogénesis, reparación vascular e inflamación), existen evidencias de que se encuentran en forma extracelular estable circulante y pueden ser detectados en los líquidos corporales como saliva, orina y sangre (19).

Recientemente, se han publicado algunos estudios que evalúan el perfil de expresión de los miRNAs en sangre. Estos estudios sugieren que, bajo determinadas condiciones

Máster en Nutrición y Metabolismo

patológicas, alteraciones en esos perfiles de expresión, pueden ser útiles para identificar determinadas enfermedades, como la DT2 (diabetes tipo 2) (20). Un estudio reciente de Laterza et al sugiere que determinados biomarcadores de enfermedad son secretados a la circulación sistémica tras la lesión de los tejidos (21). Por tanto, los miRNAs podrían ser indicadores potenciales de lo que está sucediendo a nivel tisular. De hecho, Kosaka et al han publicado que estos miRNAs circulantes son liberados mediante la maquinaria secretora celular y transferidos a los tejidos de destino, donde pueden reanudar sus funciones (22).

Aún no está establecido el papel funcional de los miRNAs en los fluidos extracelulares, pero todo esto, nos crea la intrigante posibilidad de la participación de estas pequeñas moléculas de ARN en un nuevo modelo de comunicación intercelular.

Datos recientes, muestran que el miRNA 210 puede mejorar la angiogénesis, la función cardíaca e inhibir la apoptosis. (44,45). Zhao DS et al sugieren que un aumento en los niveles de los miRNA 210 y miRNA 30a en suero supone una mejora de la insuficiencia cardíaca crónica (52).

El riesgo individual de desarrollar aterosclerosis y enfermedad cardiovascular depende de la interacción entre factores genéticos y ambientales, como la dieta. Se ha visto en distintos estudios como diversos componentes de la dieta pueden afectar al perfil de expresión o a la función de los miRNAs.

Distintos estudios de intervención dietética han mostrado una mejoría de la función endotelial, tanto con nutrientes aislados, tales como los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen, L-arginina o compuestos antioxidantes, como por el consumo de una dieta sana (23). Recientemente, se ha visto que el consumo de una dieta mediterránea, rica en aceite de oliva, conduce a un aumento en el número de EPCs circulantes y una mejora en la capacidad de regeneración del endotelio (24). Además, este estudio sugiere que el consumo de una dieta mediterránea rica en aceite de oliva protege a las células endoteliales contra la senescencia, mediante la reducción de estrés oxidativo intracelular y la apoptosis celular, en comparación con la ingesta de una dieta rica en grasas saturadas y una dieta baja en grasas y alta en hidratos de carbono (24). Por todo ello, la dieta podría interactuar con los mecanismos de expresión y regulación de los miRNAs modulando el daño endotelial. Por consiguiente, la dieta podría ser usada como estrategia terapéutica asociada a una reducción del riesgo cardiovascular.

METODOLOGÍA

1. *Pacientes*

El estudio CORDIOPREV (CORonary Diet Intervention with Olive oil and cardiovascular PREVention study), es un ensayo clínico de intervención dietética en pacientes de alto riesgo cardiovascular, realizado en el Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba y cuyo periodo de inclusión se inició en Noviembre de 2009. En él participan más de 1000 pacientes, con una edad comprendida entre 20 y 75 años, en los que se realizará un seguimiento durante cinco años, con un estrecho control dietético y clínico por parte de especialistas en Nutrición y Dietética y médicos especialistas en Medicina Interna y Cardiología. El tamaño de la muestra del estudio CORDIOPREV se calculó para una recurrencia de 35% en el grupo control y de 25% en el de intervención en 5 años, con una pérdida anual de 2%, un error $\alpha=0,05$ y una potencia de 0,90. Para estos cálculos, se utilizaron datos de estudios recientes de intervención, considerando que los porcentajes que se prevé serán similares a los de dichos estudios, realizados en poblaciones similares a la nuestra. El seguimiento fue presencial, personalizado y continuo con consultas dietéticas bimensuales y cuatrimestrales (y a demanda) por parte del equipo de especialistas en Medicina Interna y Cardiología. El tamaño de la muestra se calculó teniendo en cuenta una posible pérdida de 10% en 5 años.

En nuestro estudio se seleccionaron 40 pacientes con disfunción endotelial grave ($EDV < 20\%$):

- Pacientes con un incremento en el número de EPCs circulantes, tras el periodo de intervención dietética. En este grupo se estudiaron 20 pacientes, 10 pacientes para cada tipo de dieta.
- Pacientes con un descenso en el número de EPCs circulantes, después de la intervención. Este grupo incluye 20 pacientes, 10 pacientes para cada tipo de dieta.

Este sub-estudio se realizó con los siguientes supuestos:

- Variable principal estudiada: la expresión de miR-222
- Mínima diferencia esperada: aumento de la expresión de miR-222 entre los grupos de intervención de al menos un 20% ($H_0 = 2,1$, $H_1 = 1.6$)
- Desviación estándar: 0.5; error α : 0,05; potencia ($1 - \beta$): 0,90; pérdida estimada: 10%.

Basándose en estas premisas, se necesitan al menos 18 pacientes para cada uno de los grupos estudiados.

Criterios de inclusión en el estudio CORDIOPREV:

1. *Consentimiento informado.* Todos los participantes aceptaron su inclusión en el estudio, firmando el protocolo aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Reina Sofía. En dicho consentimiento se hará constar que su inclusión en los grupos tendrá carácter aleatorio.

Máster en Nutrición y Metabolismo

2. *Criterios diagnósticos.* Se seleccionaron pacientes con enfermedad coronaria aguda (angina inestable, infarto agudo de miocardio) y enfermedad coronaria crónica de alto riesgo.

Criterios de Exclusión:

1. Edad inferior a 20 años o igual o mayor de 75 años, con una expectativa de vida que no sea inferior a 5 años.
2. Insuficiencia cardíaca severa, clase funcional III o IV de la NYHA, con la excepción de episodios autolimitados de insuficiencia cardíaca aguda en el momento del evento isquémico agudo.
3. Disfunción ventricular izquierda sistólica severa (fracción de eyección igual o inferior a 35%).
4. Pacientes con limitación para seguir el protocolo: Se deben excluir las personas sin capacidad personal o familiar de adscribirse a la dieta indicada, por cualquier causa.
5. Factores de riesgo graves o de difícil control: Se deben excluir los enfermos con hipertensión y diabetes en los que haya afectación orgánica que limite su supervivencia (insuficiencia renal crónica con creatinina persistentemente >2 mg/dl) y manifestaciones clínicas incapacitantes de arteriosclerosis cerebral.
6. Enfermedades crónicas no relacionadas con el riesgo coronario: psiquiátricas severas, procesos crónicos necesitados de tratamiento que pueda modificar el metabolismo lipídico (insuficiencia renal crónica, hepatopatías crónicas, neoplasias en tratamiento, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, endocrinopatías susceptibles de descompensación y enfermedades del tubo digestivo que cursen con episodios de diarrea).

Aspectos éticos y consentimiento Informado

El estudio ha sido elaborado respetando los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki (1964), en el Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y la biomedicina (1997), en la Declaración Universal de la UNESCO sobre el genoma humano y los derechos humanos (1997), así como cumpliendo los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética. Todos los participantes han aceptado su inclusión en el estudio, firmando el protocolo aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Reina Sofía. En dicho consentimiento se hace constar que su inclusión en los grupos tendrá carácter aleatorio.

Descripción de los modelos alimentarios

Los dos modelos de dieta son: 1. Dieta mediterránea con un 35-38% de calorías en forma de grasa (22% grasa monoinsaturada, 6% grasa poliinsaturada, 7% grasa saturada), 15% proteínas y 50% carbohidratos; 2. Dieta baja en grasa y rica en hidratos de carbono complejos recomendada por el National Cholesterol Education Program y la American Heart Association con menos del 28% de grasa total (8% grasa saturada, 12% grasa monoinsaturada, 6% grasa poliinsaturada) 15% proteínas y 55% carbohidratos. En ambas dietas el contenido de colesterol se ajusta a menos de 300 mg/día. Ambas dietas terapéuticas deben aportar una diversidad de alimentos de todos los tipos: verduras, frutas, cereales, patatas, legumbres, productos lácteos, carnes y pescados.

Además se llevó a cabo un programa de intervención conductual para promover la adherencia a dieta mediterránea de 14 puntos, los dietistas realizaron un asesoramiento nutricional personalizado a aquellos participantes asignados aleatoriamente a este modelo de dieta, con instrucciones fundamentalmente dirigidas a mejorar el score de adherencia.

En el momento de inclusión y cada 2 meses, los dietistas tuvieron sesiones de entrevistas personalizadas. No se recomendó la restricción energética ni se promoverá la realización de actividad física. La recogida del consumo de energía y nutrientes se calcularon utilizando las tablas de composición de alimentos españoles. Tanto al inicio como en la visita anual se realizó: 1) un breve cuestionario sobre variables de estilo de vida, condiciones médicas y uso de medicamentos, 2) un cuestionario de 14 puntos de adherencia a la dieta mediterránea, 3) un cuestionario validado de 137 ítems de frecuencia de consumo y 4) la versión española validada del cuestionario de actividad física en tiempo libre de Minnesota. Todo el personal que participa en la recogida de cuestionarios y medidas físicas desconocía el grupo de intervención asignado a cada paciente.

2. Extracción de sangre venosa

Al inicio y después del primer año de intervención dietética, tras 12 horas de ayuno, se extrajeron 40 ml de sangre venosa en tubos con EDTA, 10 ml en tubos de suero y 30 ml en tubos de heparina.

3. Cuantificación de EPCs circulantes

La cuantificación de EPCs circulantes en sangre total se realizó mediante citometría de flujo. En primer lugar, se añadió 100 µL de sangre completa (recogida en tubos con EDTA) en un tubo de citómetro y se incubó con 5 µL del anticuerpo CD133 (Ebioscience), 5 µL del anticuerpo VEGFR2 (KDR, R&D System), y 5 µL del anticuerpo CD34 (Ebioscience). Posteriormente, se incubó durante 20 minutos en oscuridad y en hielo. A continuación, se añadió 2 ml de solución Versalyze (Lysis solution Beckman Coulter) y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente, se adquirió en un citómetro de flujo (Coulter Mc500).

4. Aislamiento de células mononucleares

El aislamiento de las células mononucleares de sangre periférica se realizó por centrifugación en un gradiente de densidad sobre Ficoll-Hypaque Lymphoprep (Pharmacia Biotech, Upsala, Suecia), técnica descrita por Boyum en 1968 (13). El Ficoll es un polisacárido sintético de alto peso molecular (400 kDa) con un contenido en grupos hidroxilo y una buena solubilidad en medios acuosos, no presenta grupos ionizables que puedan servir de unión a las muestras y tiene una viscosidad elevada. Debido a sus propiedades, se utiliza en la separación de células y partículas subcelulares mediante centrifugación zonal.

La sangre se centrifugó a 2500 rpm, 20 °C, durante 15 min y se eliminó el sobrenadante. Para la separación celular, el infranadante se diluyó 1:1 en PBS estéril (Tampón fosfato salino, del inglés *Phosphate buffered saline*) (Sigma) y se agitó suavemente. En un tubo se añadió 1/3 de volumen de Ficoll (en relación al volumen de sangre) y sobre él se depositó lentamente la sangre diluida con PBS. Los tubos se centrifugaron a 2500 rpm durante 20 minutos y a 20°C. Tras la centrifugación se observaron 4 fases en el tubo: el plasma arriba, un halo opaco con células monocleadas (PBL, del inglés *Peripheral blood cells*), el Ficoll y el botón con el resto de las células sanguíneas (eritrocitos y neutrófilos principalmente). Se recogió el halo opaco y se lavó dos veces con PBS mediante centrifugación a 1800 rpm durante 5 minutos y a 20°C.

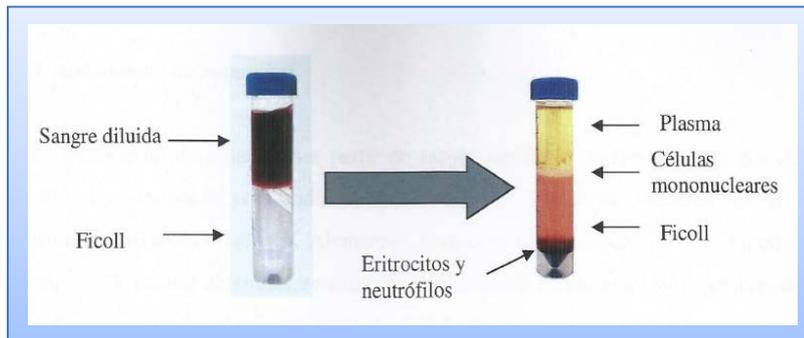


Figura 1. Separación de células mononucleadas del resto de células sanguíneas mediante centrifugación en un gradiente de densidad sobre Ficoll-Hypaque.

Recuento y medida de la viabilidad celular: Después del último lavado, se procedió al recuento celular en una cámara de Neubauer, mediante el procedimiento de exclusión con azul Tripán (BioWhittaker, Europe, Verviers, Belgium) según el siguiente procedimiento:

El recuento se realizó mezclando en un vial (v:v) azul Tripán con la solución celular y se añadieron unos μL de la mezcla a la cámara. El azul Tripán es una molécula coloreada de gran peso molecular, que sólo permanece en el interior de las células que tienen la membrana alterada. Por tanto una célula viva en perfecto estado se observará incolora mientras que una célula muerta o muy alterada se observará azul. De este modo, contando las células en cada cuadrante podemos determinar el número de células viables presente en la muestra utilizando la siguiente fórmula:

$$N = L/4 \times 10^4 \times D$$

N= Número de células viables/mL

L= Células contados en 4 cuadrantes grandes

D= Factor de dilución

5. Cultivo y caracterización de EPCs

Las células mononucleares se incubaron en placas de 6 pocillos, coactadas con fibronectina a una densidad de 5×10^6 células/pocillo y en medio suplementado con un 20% de suero y diferentes factores de crecimiento humanos (EGM-2MV, Cambrex). Tras 2 días de cultivo, se recogieron las células no adherentes y se incubaron en placas de 12 pocillos a una densidad de 1×10^6 células/pocillo. El cultivo se mantuvo siete días, con cambio de medio cada dos días. Las células consideradas como EPCs formaron colonias y además, se confirmó mediante tinción específica por citometría de flujo. Las EPCs se observaron con un microscopio de fluorescencia invertido y marcadas con FITC-UEA-1 (aglutinin-1 conjugado con FITC, Sigma).

6. Extracción de RNA total en EPCs

El protocolo para la extracción de RNA total en EPCs, procedentes de cada uno de los pacientes incluidos en el estudio, fue el siguiente:

1. Centrifugar las EPCs a 5000 g, 4°C durante 5 minutos. Retirar con cuidado el RNA-later.
2. Añadir 50 µl de suero fisiológico al pellet seco de células. Resuspender (vortex).
3. Añadir 750 µl de TRIZOL. Vortex.
4. Añadir 200 µl de cloroformo.
5. Agitar cada muestra 30 segundos con el vortex.
6. Incubar 2-3 minutos a T^a ambiente.
7. Centrifugar 15 minutos, 4°C a 12000 rpm.
8. Recoger la fase superior (500 µl) en viales de 1,5 ml y a continuación añadir 500 µl de isopropanol.
9. Agitar con vortex durante 15 segundos. Incubar 15 minutos a -20°C.
10. Centrifugar 10 minutos 4°C y 12000 rpm. Posteriormente, decantar con cuidado y añadir 500 µl de etanol al 70% frío.
11. Centrifugar 10 minutos, 4°C y 12000 rpm. Decantar y lavar con 500 µl de etanol al 100%.
12. Centrifugar 10 minutos a 4°C a 12000 rpm. Decantar y dejar secar la muestra durante 5 minutos.
16. Resuspender en 15 µl de agua libre de RNAsas y mantener en hielo.

6.1 Retrotranscripción del ARN a c-DNA

La retrotranscripción se realizó mediante el kit comercial Taqman MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied BioSystems, Foster, USA). Para ello 350 ng de ARN total de EPCs fue retrotranscrito a cDNA usando un pool de primers en un termociclador iQ5 Termocycler (BioRad).

Los reactivos usados en la retrotranscripción fueron los siguientes (tabla 1):

<i>Componentes</i>	<i>Volumen para 1 muestra (9µl/reacción)</i>
dNTPs with dTTP (100 mM)	0,4 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/ µl)	3 µl
10 X RT Buffer	1,6 µl
RNase Inhibitor (20 U/ µl)	0,2 µl
Nuclease- free water	0,4 µl
TaqMan primers (5X)	1,6 µl
MgCl ₂	1,8 µl

Tabla 1: Componentes de la mezcla para la retrotranscripción

Se hizo una mezcla con los volúmenes indicados y se cargó en la placa de retrotranscripción. El volumen total de la retrotranscripción (RT) fue de 15 µl/reacción.

6.2 PCR

Los reactivos usados en la PCR fueron los que se especifican en la tabla 2:

<i>Componentes</i>	<i>Volumen para 1 muestra (20µl reacción)</i>
TaqMan Small rNA assay primers(20X)	1 µl
TaqMan Universal PCR Master Mix II (2X), no UNG	10 µl
Nuclease-free water	8 µl
cDNA	1 µl

Tabla 2: Componentes para la PCR

En primer lugar, se añadió a la placa de PCR los oligonucleótidos o primers para los miRNAs 34a, 126, 130a, 221, 222y 92a (Taqman Assay, 20x) y el gen constitutivo RNAU6B. A continuación, se añadió agua libre de RNAsas, taqman universal master mix II y el cDNA. Por último, se añadió 19 µl a cada pocillo y se le dió un spin. La reacción se llevó a cabo en un termociclador iQ5 Termocycler (BioRad).

7. Extracción de miRNA del plasma.

En primer lugar, se centrifugaron las muestras del plasma y posteriormente se realizaron los siguientes pasos:

- 1.-Añadir 1 ml de Quiazol Lysis Reagent. Mezclar por vórtex.
- 2.-Incubar a T^a ambiente durante 5 minutos.
- 3.-Añadir 3,5 µl de miRNeasy serum plasma control (working solution).
- 4.-Añadir un volumen de cloroformo igual al de la muestra de partida. Agitar vigorosamente 15 segundos.
- 5.-Incubar a T^a ambiente 2-3 minutos.
- 6.-Centrifugar 15 minutos, a 12.000 g a 4°C.
- 7.-Transferir la fase acuosa superior a un tubo. Añadir 1,5 volúmenes de etanol al 100%. Mezclar bien con la pipeta.
- 8.-Pipetear hasta 700 µl de la muestra. Centrifugar 15 segundos a 12000g. Repetir este paso con el resto de muestra.
- 9.-Añadir 700 µl de Buffer RWT a la columna. Centrifugar 15 seg a 12000g. Eliminar el contenido.
- 10.-Añadir 500 µl del otro Buffer a la columna. Centrifugar 15 segundos a 12000g. Eliminar el contenido.
- 11.-Añadir 500 µl de etanol al 80% a la columna. Centrifugar 2 minutos a 8000g. Eliminar el contenido.
- 12.-Colocar un tubo de 2 ml a la columna. Centrifugar a máxima velocidad 5 minutos.
- 13.-Colocar la columna en un tubo nuevo de 1,5 ml. Añadir 14 µl de agua en el centro de la membrana para eluir el RNA. Centrifugar 1 minutos a máximo velocidad.

7.1 Retrotranscripción del ARN a c-DNA

Los reactivos usados en la retrotranscripción son los mismos que se especifican en la tabla 1. Se hizo una mezcla con los volúmenes indicados y se cargó en la placa de retrotranscripción. El volumen total de la retrotranscripción (RT) fue de 15 µl/reacción.

7.2 PCR

Los reactivos usados en la PCR fueron los mismos que se especifican en la tabla 2. En primer lugar, se añadió los oligonucleótidos o primers para los miRNAs 210 y 30a-3p (Taqman Assay20x) y se le dio un spin. A continuación, se añadió RNase free water, taqman universal master mix II y el cDNA. Por último, al eppendorf se le dio un vórtex, un spin y se le añadió 19 µl a cada pocillo. El termociclador utilizado para la PCR cuantitativa a tiempo real fue el iQ5 de BIORAD.

8. Cultivo de células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC)

Las células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC; CambrexBio Science Walkersville, Inc) se cultivaron durante 3-4 días en un medio de crecimiento endotelial (EGM) SingleQuots (Lonza Walkersville, Inc) que contiene 20% de suero de ternera fetal (FBS, Lonza) y en un incubador a 37°C y 5% CO₂. El medio de cultivo se cambió

cada 2 ó 3 días. Para levantar las células de la placa de cultivo se usó tripsina-EDTA (Lonza Walkersville, Inc).

9. Detección de especies reactivas de oxígeno (ROS)

La detección de ROS se realizó mediante un marcaje con hidroetidina (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.), una sustancia que se oxida por especies reactivas de oxígeno, convirtiéndose en etidio y emitiendo color rojo. Este método se usa para medir anión superóxido.

La monocapa de HUVEC se incubó en medio EGM, con y sin TNF- α (10ng/ml) y sin FBS durante 4 horas a 37°C y 5% CO₂. Las HUVEC fueron incubadas con el suero (10%), procedente de cada uno de los pacientes, durante otras 4 horas a 37°C y 5% CO₂. A continuación, se levantó las células con la solución tripsina-EDTA. Posteriormente, las células se lavaron con suero fisiológico y se centrifugó a 1800 rpm, 4°C durante 5 minutos. Tras ello, se retiró el sobrenadante y se procedió al marcaje con 2 μ L de hidroetidina 2 mM (Invitrogen), se incubó durante 15 minutos en oscuridad y en hielo. Pasado ese tiempo, se lavó con suero fisiológico y se centrifugó a 1800 rpm a 4°C durante 5 minutos. Por último, se añadió 0,5 ml de solución Cell Fix (dil 1/10 en H₂O) (Becton-Dickinson) y se mezcló mediante vortex durante unos segundos. Los análisis se realizaron en un citómetro de flujo (Coulter Mc500). La producción de ROS intracelular se midió como intensidad de fluorescencia media emitida por la hidroetidina.

10. Cuantificación de los niveles plasmáticos de IL-6

Los niveles plasmáticos de IL-6 se determinaron mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA) con el kit comercial Human IL-6 Quantikine ELISA kit (R & D System), siguiendo las instrucciones del fabricante.

11. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 15.0 for Windows Inc., Chicago, Illinois). Con el fin de detectar variaciones significativas entre grupos se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor para estudiar el efecto de la dieta sobre la expresión de los miRNAs en EPCs. Además, se realizó una correlación de Pearson entre los niveles de expresión de miRNAs y marcadores inflamatorios. Para analizar el efecto estadístico del tipo de dieta, tras el año de intervención, sobre la expresión de miRNAs en muestras de plasma se utilizó un ANOVA para medidas repetidas seguido de la corrección de Sidak. Por último, se realizó un ANOVA de un factor para estudiar el efecto de la dieta sobre la producción de ROS. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$. Todos los datos presentados en el texto y tablas son medias \pm el error estándar de la media (\pm SEM).

RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN

Las características basales y post-intervención de los pacientes incluidos en el estudio (edad, IMC, perímetro de cintura, glucosa, parámetros lipídicos, marcador de inflamación y tensión arterial) en función del tipo de dieta que han consumido se presentan en la tabla 1. No hay un efecto significativo de la interacción dieta- tiempo sobre los parámetros estudiados. Sin embargo, se observa un descenso en los niveles de colesterol, Apo B e insulina, después de la intervención con ambas dietas.

		IMC (kg/m ²)	PCR (mg/l)	Colesterol (mg/dl)	TG (mg/dl)	c-LDL (mg/dl)	c-HDL (mg/dl)	Apo B (mg/dl)	Apo A-1 (mg/dl)	Glucosa (mg/dl)	Insulina (mU/l)	Perímetro cintura (cm)
Pre- intervención	Dieta baja en grasa	31,7±0,3	3,58±0,42	173,8±8,9	151,6±21,1	92±6,9	48,1±3,3	78,7±4,2	132±4,9	119,5±11,2	7,57±1,24	108,2±2,4
	DietMed	30,6±0,7	1,63±0,41	166,2±8,9	132,4±20,6	96±6,7	43,3±3,3	73,4±4,3	126,7±4,9	119,8±10,9	9,97±1,52	103,7±2,5
Rev 1	Dieta baja en grasa	30,9±0,7	3,78±0,62	161,0±6,4	132±16,8	87,4±5,3	44,3±2,7	67,5±3,6	129,8±6,1	119,3±9,1	7,18±1,11	106,6±2,2
	DietMed	30,2±0,9	1,50±0,58	152,6±6,4	104,7±16,3	85,3±5,2	46±2,7	65,5±3,7	123,1±6,0	111±8,8	7,57±1,35	102,4±2,3
Valor de P	-Dieta	0,512	0,003	0,426	0,574	0,903	0,702	0,495	0,402	0,953	0,955	0,195
	-Tiempo	0,024	0,228	0,008	0,055	0,072	0,751	0,001	0,379	0,479	0,027	0,079
	Interacción dieta	0,444	0,940	0,933	0,725	0,463	0,066	0,444	0,843	0,515	0,385	0,871

Tabla 1: Características basales y post-intervención de los pacientes incluidos en el estudio, en función del tipo de dieta que han consumido. Los valores se presentan como la media ± SEM. N=40. ANOVA para medidas repetidas.

2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MIRNAS EN LAS EPCs CIRCULANTES

El efecto de la dieta sobre la expresión de los miRNAs en EPCs de los pacientes incluidos en este estudio se representa en la figura 1. No se observaron diferencias significativas en la expresión de los miRNAs estudiados en función del tipo de dieta.

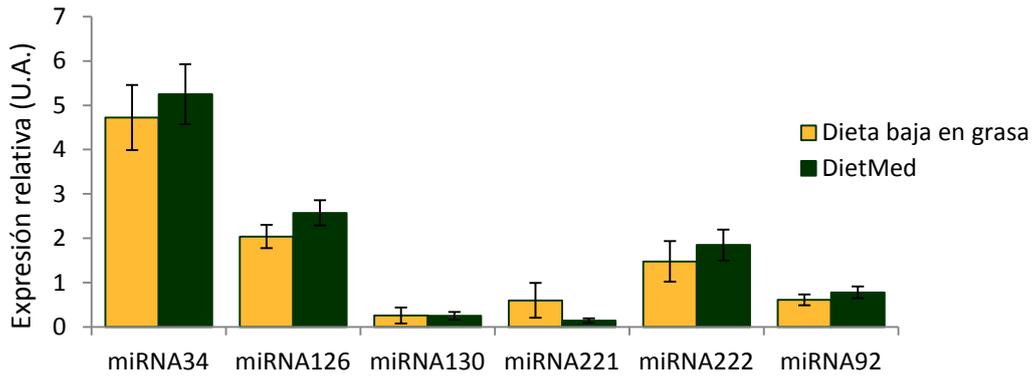


Fig.1: Niveles de expresión de los miRNAs en los pacientes incluidos en este estudio en función del tipo de dieta que han consumido. Dieta baja en grasa y rica en hidratos de carbono; DietMed, dieta tipo mediterránea. N=40. Las barras representan el error típico. ANOVA de un factor.

El análisis comparativo entre los dos tipos de dieta, en pacientes con un aumento en el número de EPC circulantes, mostró un aumento en la expresión del miRNA126 y del miRNA 34a, tras el consumo del patrón de dieta mediterránea (figura 2A). Por el contrario, no se observaron diferencias significativas entre los dos patrones dietéticos en los pacientes con un descenso en el número de EPC (figura 2B).

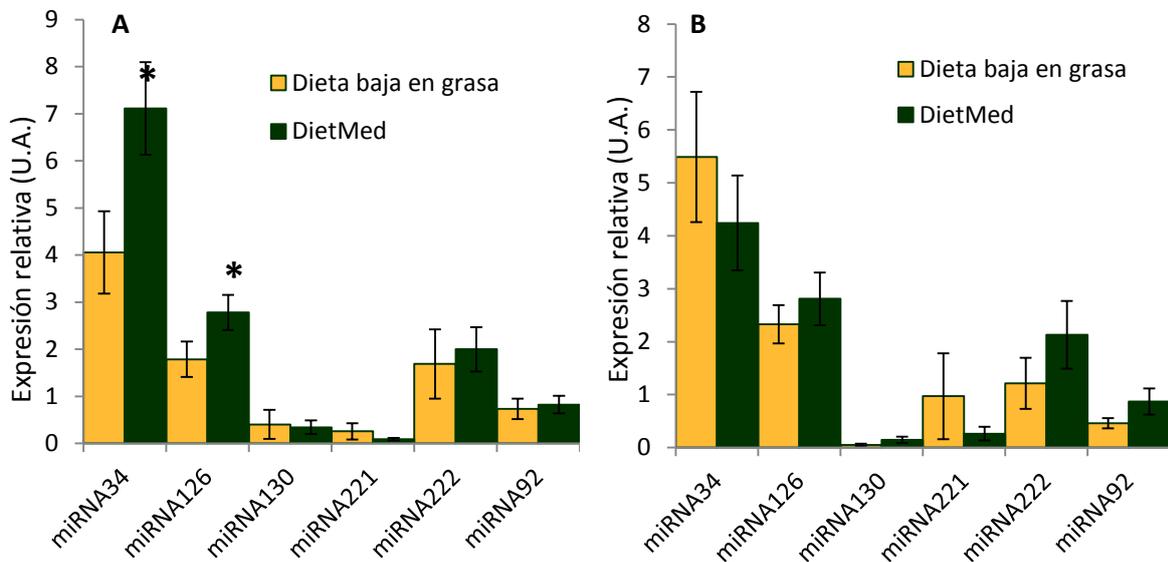


Fig.2: Niveles de expresión de los miRNAs en pacientes con un incremento (figura A, N=20) o un descenso (figura B, N=20) en el número de EPC circulantes tras un año de intervención dietética. Dieta baja en grasa y rica en hidratos de carbono; DietMed, dieta tipo mediterránea. *p=0.024 (miRNA 126) y 0,029 (miRNA 34a). Las barras representan el error típico. ANOVA de un factor.

Al realizar el análisis de correlación de Pearson entre los niveles de IL-6 y la expresión del miRNA126 se observó una correlación negativa entre IL6 y el miRNA 126, tras el consumo de la dieta mediterránea.

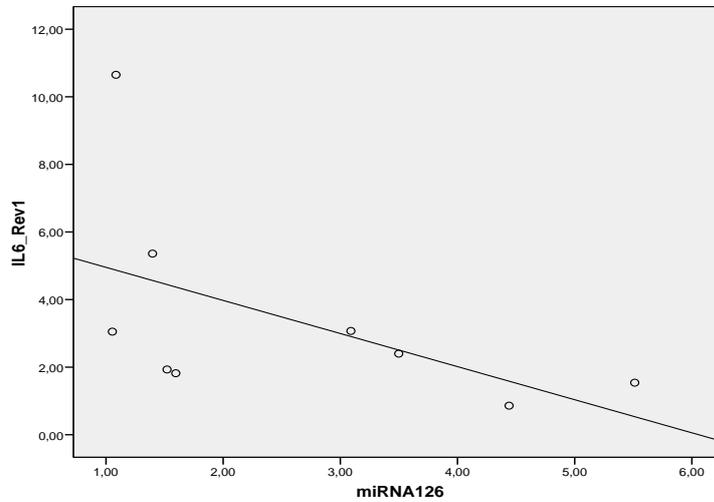


Fig. 3: Correlación de Pearson entre los niveles de IL6 y el miRNA 126, tras el consumo de la dieta mediterránea. $r=-0,668$ $p*=0,049$.

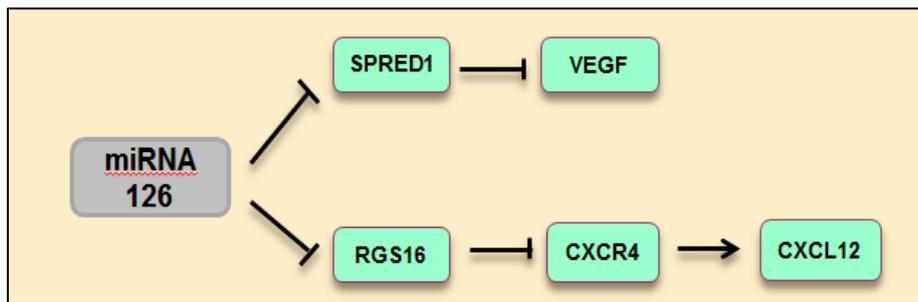


Fig. 4: Mecanismo de regulación del miRNA 126 sobre sus genes diana.

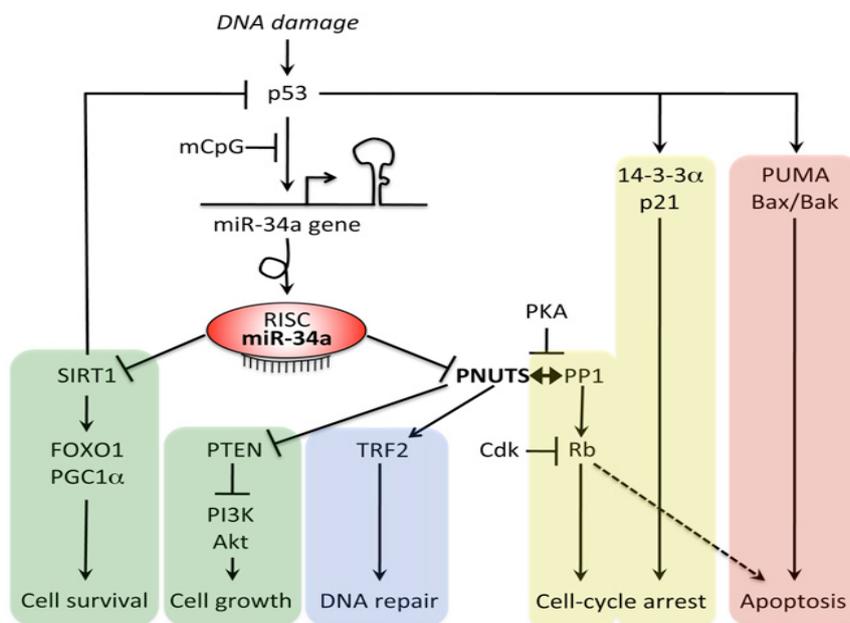


Fig.5: Mecanismo de regulación del miRNA 34a sobre sus genes diana

El estudio de la expresión de los miRNAs, tras el periodo de intervención dietética, en los pacientes con síndrome metabólico mostró una mayor expresión del miRNA 130a, tras el consumo de la dieta mediterránea, en comparación con la dieta baja en grasa (figura 6). No se observaron diferencias significativas con el resto de miRNAs estudiados.

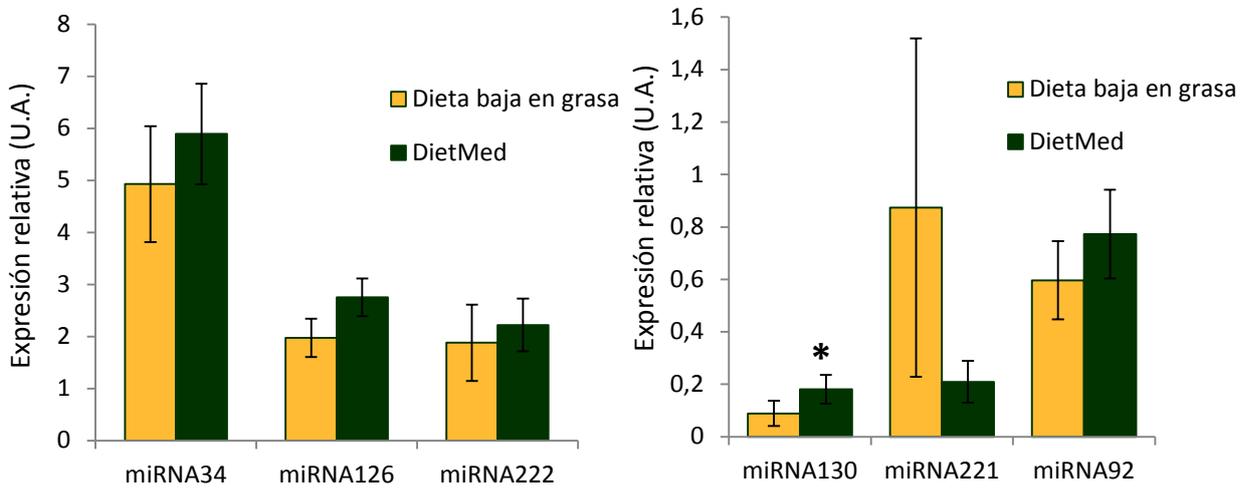


Fig. 6: Niveles de expresión de los miRNAs en pacientes con síndrome metabólico, tras el período de intervención dietética. Dieta baja en grasa y rica en hidratos de carbono; DietMed, dieta tipo mediterránea. * $p=0,016$. $N=21$. Las barras representan el error típico. ANOVA de un factor.

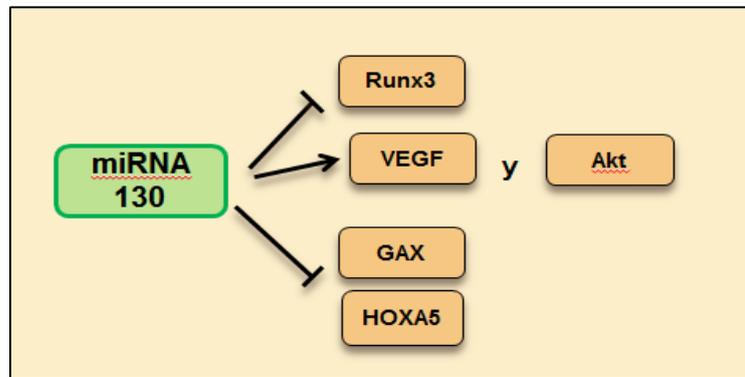


Fig. 7: Mecanismo de acción del miRNA 130

Tampoco se observaron diferencias significativas al analizar la expresión de estos miRNAs en pacientes sin síndrome metabólico, tras el periodo de intervención dietética (figura 8).

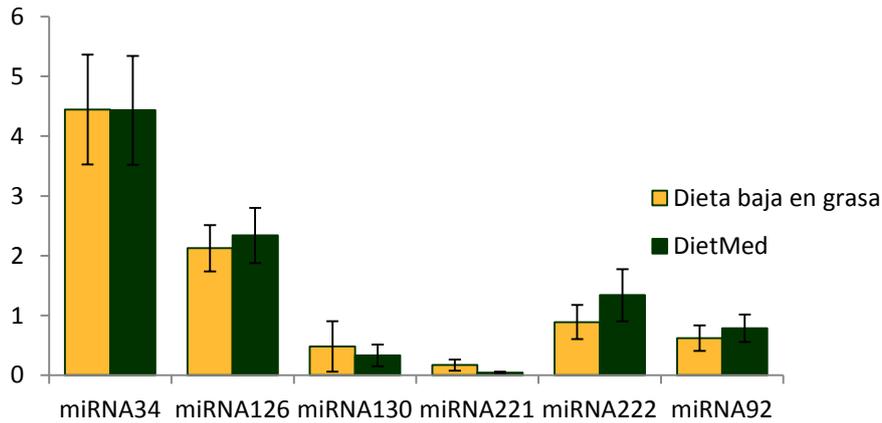


Fig. 8: Niveles de expresión de los miRNAs en pacientes sin síndrome metabólico, tras el período de intervención dietética. Dieta baja en grasa y rica en hidratos de carbono; DietMed, dieta tipo mediterránea. N=19. Las barras representan el error típico. ANOVA de un factor.

Al realizar un análisis comparativo entre pacientes con y sin síndrome metabólico, tras el consumo de la dieta mediterránea, se observó una mayor expresión del miRNA 221 en pacientes con síndrome metabólico (figura 9). No se observaron diferencias significativas con el resto de miRNAs estudiados.

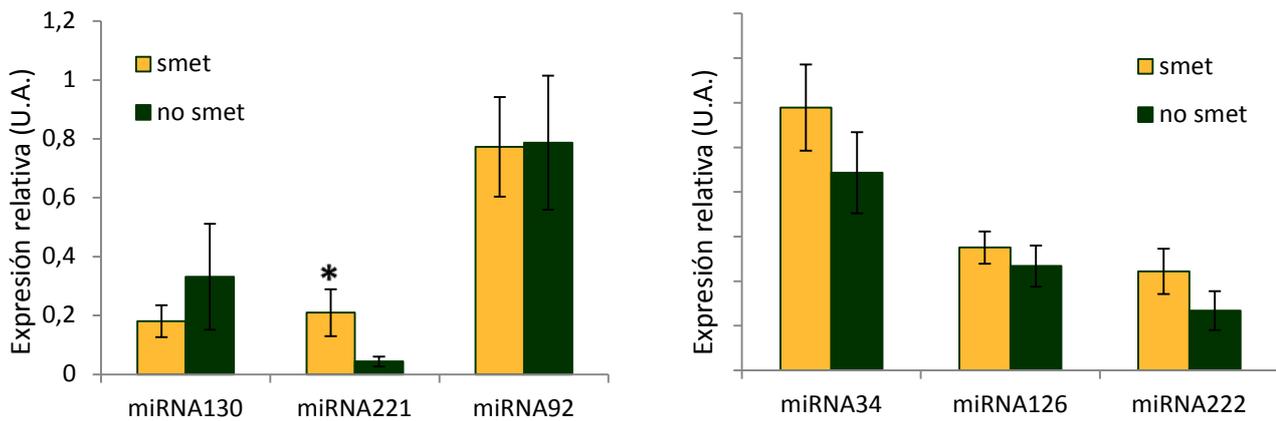


Fig.9: Niveles de expresión de los miRNAs en pacientes, con y sin síndrome metabólico, que han consumido la dieta mediterránea durante el período de intervención dietética. Smet, pacientes con síndrome metabólico; no smet, pacientes sin síndrome metabólico. *p=0, 037. N=20 (12 con SMet y 8 sin Smet). Las barras representan el error típico. ANOVA de un factor.

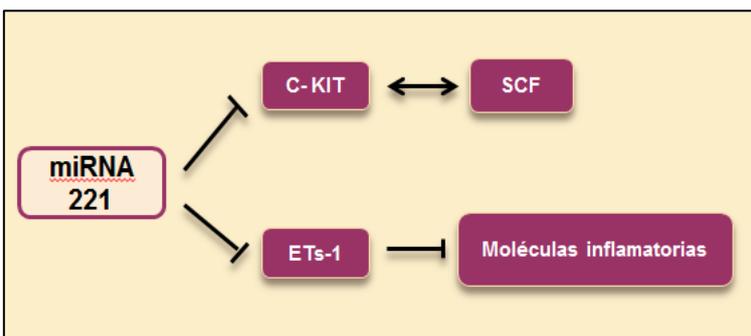


Fig. 10: Mecanismo de regulación del miRNA 221 sobre sus genes diana

Tampoco se observaron diferencias significativas, al estudiar la expresión de los miRNAs en pacientes con y sin síndrome metabólico, tras el consumo de la dieta baja en grasas (figura 11).

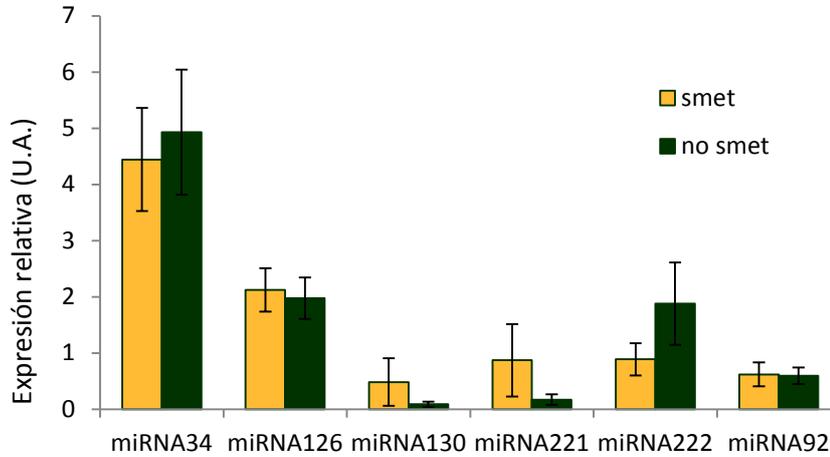


Fig. 11: Niveles de expresión de los miRNAs en pacientes, con y sin síndrome metabólico, que han consumido la dieta baja en grasas durante el período de intervención dietética. Smet, pacientes con síndrome metabólico; no smet, pacientes sin síndrome metabólico. N=19. Las barras representan el error típico. ANOVA de un factor.

3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS MIRNAS EN MUESTRAS DE PLASMA

El estudio de la expresión de los miRNAs, aislados de muestras de plasma procedentes de cada uno de los pacientes incluidos en el estudio, no mostró diferencias significativas, tras el periodo de intervención dietética (figura 12).

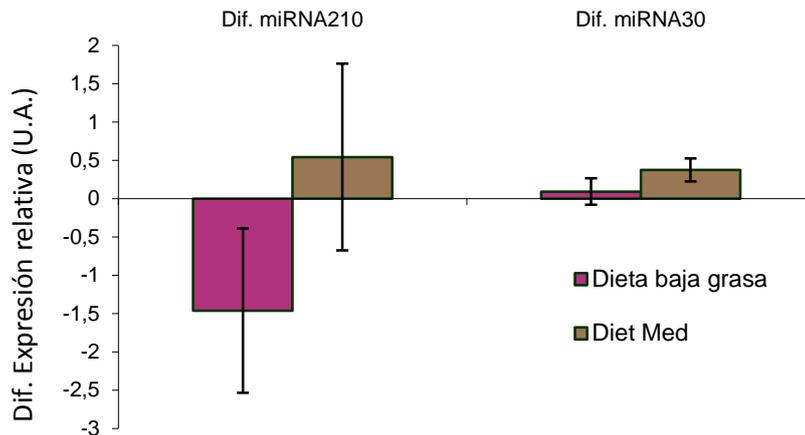


Fig. 12: Diferencia entre los niveles de expresión de los miRNAs al inicio del estudio y tras un año de intervención dietética. Dieta baja en grasa y rica en hidratos de carbono; DietMed, dieta tipo mediterránea. N=40. Las barras representan el error típico. ANOVA para medidas repetidas.

Al analizar la expresión de los miRNAs en pacientes con síndrome metabólico, se observó que la expresión del miRNA 210a aumenta tras el consumo de la dieta mediterránea, en comparación con la dieta baja en grasa (figura 13). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas con el resto de miRNAs estudiados.

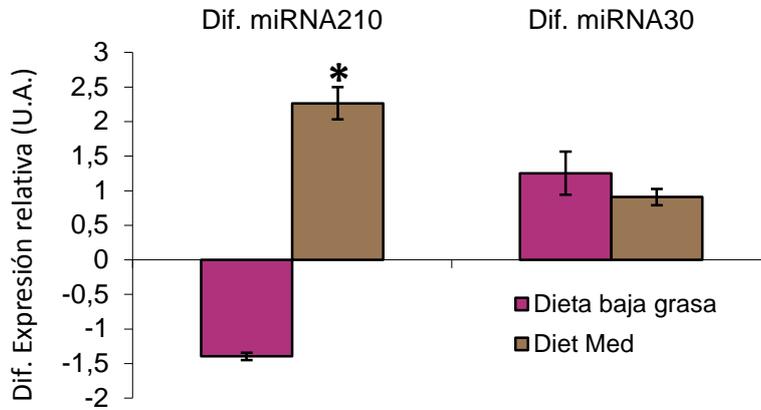


Fig. 13: Diferencia entre los niveles de expresión de los miRNAs, al inicio del estudio y tras un año de intervención dietética, en pacientes con síndrome metabólico. Dieta baja en grasa y rica en hidratos de carbono; DietMed, dieta tipo mediterránea. * $p=0,035$. $N=20$. Las barras representan el error típico. ANOVA de un factor.

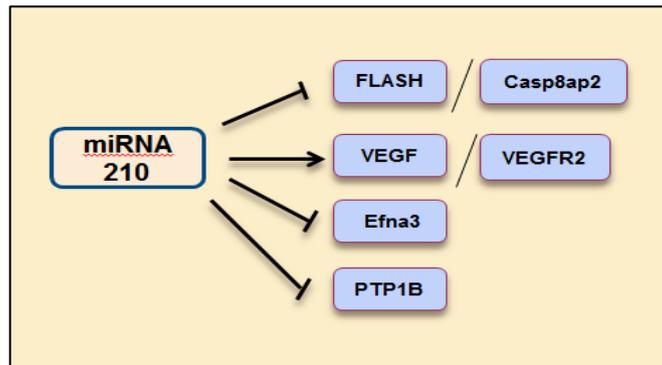


Fig. 14: Mecanismo de regulación del miRNA 210 sobre sus genes diana

Tampoco se observaron diferencias significativas, al estudiar la expresión de los miRNAs en pacientes sin síndrome metabólico (figura 15).

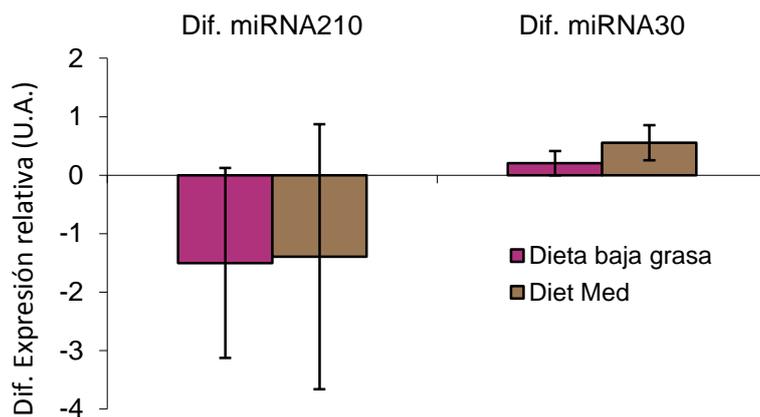


Fig.15: Diferencia entre los niveles de expresión de los miRNAs, al inicio del estudio y tras un año de intervención dietética, en pacientes sin síndrome metabólico. Dieta baja en grasa y rica en hidratos de carbono; DietMed, dieta tipo mediterránea. N=20. Las barras representan el error típico. ANOVA de un factor.

El análisis comparativo entre los dos tipos de dieta, en pacientes con diabetes, mostró un aumento del miRNA 30a-3p, tras el consumo de la dieta mediterránea (figura 16).

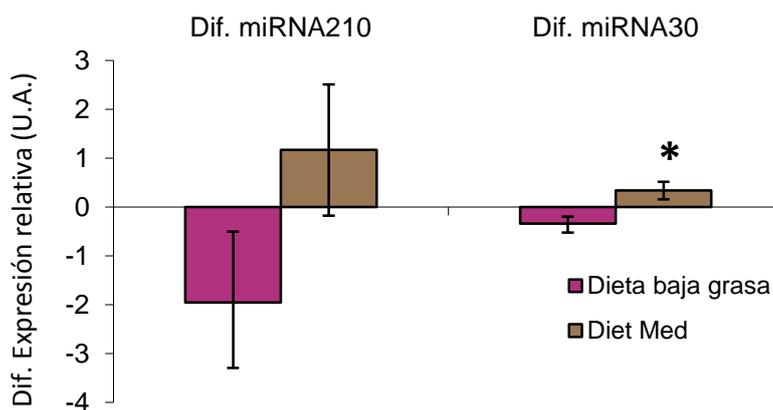


Fig. 16: Diferencia entre los niveles de expresión de los miRNAs, al inicio del estudio y tras un año de intervención dietética, en pacientes con diabetes. Dieta baja en grasa y rica en hidratos de carbono; DietMed, dieta tipo mediterránea. * $p=0,022$. N=15. Las barras representan el error típico. ANOVA para medidas repetidas.

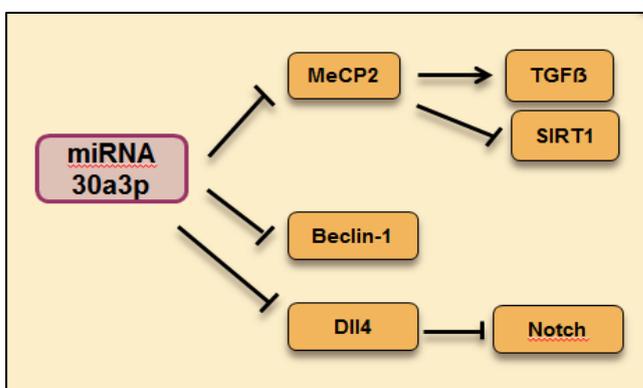


Fig. 17: Mecanismo de regulación del miRNA 30a-3p sobre sus genes diana

Tampoco se observaron diferencias significativas al estudiar la expresión de los miRNAs en pacientes sin diabetes, tras el periodo de intervención dietética (figura 18).

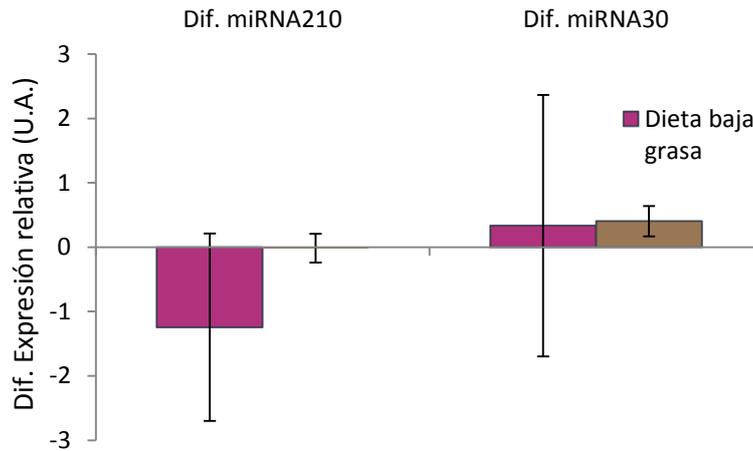


Fig.18: Diferencia entre los niveles de expresión de los miRNAs, al inicio del estudio y tras un año de intervención dietética, en pacientes sin diabetes. Dieta baja en grasa y rica en hidratos de carbono; DietMed, dieta tipo mediterránea. N=25. Las barras representan el error típico. ANOVA de un factor.

4. ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO INTRACELULAR

El estudio del estrés oxidativo intracelular se realizó mediante un análisis comparativo de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelular medidos en HUVEC incubadas con el suero procedente de cada paciente, al inicio del estudio y tras el año de intervención dietética.

Los niveles de ROS intracelular, medidos en HUVEC incubadas con suero procedente de cada uno de los pacientes y cultivadas en ausencia de TNF, tienden a incrementarse, tras el año de intervención con la dieta baja en grasa. Sin embargo, en los resultados preliminares obtenidos tras el consumo de una dieta mediterránea, los niveles de especies reactivas de oxígeno tienden a disminuir. El análisis comparativo entre ambas dietas, en HUVEC previamente incubadas con TNF, mostró que los niveles de ROS tienden a disminuir, tras el consumo de ambas dietas (figura 19).

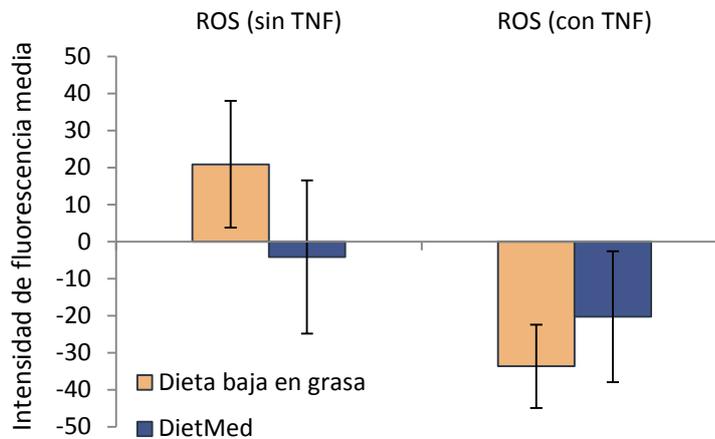


Fig. 19: Niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) medidos en HUVEC incubadas con suero procedente de cada uno de los pacientes y en presencia o ausencia de TNF, tras el consumo de una dieta mediterránea o una dieta baja en grasas. N=15. Las barras representan el error típico. ANOVA de un factor.

Máster en Nutrición y Metabolismo

El análisis comparativo de los niveles de ROS medidos en HUVEC incubadas con suero, en pacientes con un incremento o un descenso en el número de EPCs circulantes, mostró los siguientes resultados (figura 20):

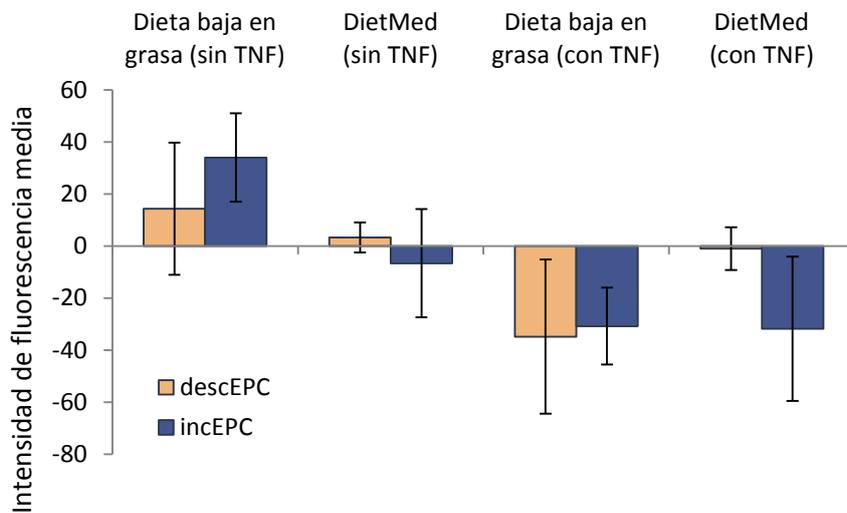


Fig. 20: Niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) medidos en HUVEC incubadas con suero procedente de cada uno de los pacientes y en presencia o ausencia de TNF, tras el consumo de una dieta mediterránea o una dieta baja en grasas, y en función del incremento o descenso en el número de EPCs circulantes. N=15 (8 con dietMed y 7 con dieta baja en grasa). Las barras representan el error típico. ANOVA de un factor.

Este análisis indicó que las HUVEC incubadas con el suero procedente de cada uno de los pacientes, en pacientes con un incremento en el número de EPCs circulantes, tras el año de intervención con la dieta baja en grasa, y en ausencia de TNF, mostraron una tendencia a incrementar los niveles de ROS intracelular. Sin embargo, en los resultados preliminares obtenidos tras el consumo de una dieta mediterránea, los niveles de especies reactivas de oxígeno tienden a disminuir en aquellos pacientes con un incremento en el número de EPCs circulantes.

El análisis comparativo entre ambas dietas, en HUVEC previamente incubadas con TNF, mostró una tendencia a disminuir los niveles de ROS, tanto en la dieta mediterránea como en la dieta baja en grasas. Este descenso tiende a ser más marcado tras el consumo de la dieta mediterránea en pacientes con un incremento en el número de EPCs.

DISCUSIÓN

En el presente estudio hemos observado que la dieta mediterránea, versus la dieta baja en grasa, induce una mayor expresión de los miRNAs 126 y 34a en pacientes con un incremento en el número de EPCs circulantes, así como una mayor expresión del miRNAs 130a y del miRNA 221 en pacientes con síndrome metabólico. Además, nuestros resultados muestran que la dieta mediterránea induce una mayor expresión plasmática del miRNA 210 en pacientes con síndrome metabólico y del miRNA 30a-3p en pacientes diabéticos, en comparación con una dieta baja en grasa.

Las causas, prevención y/o tratamiento de todos los tipos de enfermedades cardiovasculares son campos activos de la investigación biomédica, tal y como se refleja en los múltiples artículos publicados. Hoy día la investigación se centra en la identificación de nuevas dianas terapéuticas, así como la búsqueda de nuevos biomarcadores o mediadores de enfermedad que permitan establecer un diagnóstico precoz. En la última década, los miRNAs han revolucionado la forma de entender el metabolismo y la enfermedad. El estudio de los miRNAs, nos puede permitir profundizar en los mecanismos oxidativos e inflamatorios que desencadenan la disfunción endotelial, presente en pacientes con enfermedad cardiovascular. Las EPCs, precursores de las células endoteliales que participan en el mantenimiento de la integridad del endotelio, representan un marcador de la disfunción endotelial.

Por otro lado, los hábitos alimentarios saludables ayudan a prevenir el desarrollo de la enfermedad cardiovascular. Dentro de la dieta, es de gran importancia la calidad de la misma. Varios estudios epidemiológicos y clínicos han evaluado los efectos de la dieta mediterránea sobre la mortalidad cardiovascular, y todos concluyeron que la adherencia a una dieta de tipo mediterráneo se asocia con un menor riesgo cardiovascular. Recientemente, se ha observado, en personas de edad avanzada, que el consumo de una dieta Mediterránea reduce los niveles postprandiales de biomarcadores de inflamación y estrés oxidativo (SOD, H₂O₂, peróxidos lipídicos), en comparación con una dieta rica en grasa saturada y una dieta baja en grasa y alta en carbohidratos enriquecida en n-3 PUFA (26). El estudio PREDIMED mostró que el consumo de una dieta Mediterránea suplementada con aceite de oliva virgen o frutos secos, en pacientes con alto riesgo cardiovascular, tiene un efecto anti-inflamatorio (27).

En estudios recientes, se ha visto que diversos componentes de la dieta pueden afectar al perfil de expresión o a la función de los miRNAs (28, 29, 30). El miRNA 126, altamente expresado en el endotelio vascular, ha sido identificado como un biomarcador de lesión del miocardio (31). Este miRNA desempeña distintas funciones en la angiogénesis, vasculogénesis e inflamación endotelial. Además, el miRNA126 favorece la inhibición de la expresión del receptor de la proteína G16, provocando un aumento en la expresión de CXCL12 (también conocido como SDF-1 o “stromal cell-derived factor 1”), factor al que se le atribuyen efectos antiinflamatorios y protectores frente a la aterosclerosis (31,32). En nuestro estudio hemos observado una mayor expresión del miRNA126 en pacientes con un incremento del número de EPCs circulantes, tras el

consumo de la dieta mediterránea. Por consiguiente, ello podría explicar el menor estado inflamatorio observado en estos pacientes, tras el consumo de la dieta mediterránea.

Asimismo, este miRNA está implicado en la proliferación, migración y liberación de las EPCs desde la médula ósea hasta el sitio de la lesión, en el descenso de la apoptosis de EPCs (33), así como también, favorece la formación de colonias e induce la adhesión de las EPCs a las zonas dañadas del endotelio. El miRNA 126 actúa bloqueando la traducción de SPRED-1, que a su vez inhibe la expresión de VEGF (31). Por consiguiente, la dieta mediterránea, induciendo una mayor expresión del miRNA126, podría favorecer la liberación, migración e inhibición de la apoptosis de las EPCs en los pacientes con enfermedad cardiovascular de alto riesgo.

Otro de los miRNA implicados en el proceso de angiogénesis y en la funcionalidad de las EPCs es el miRNA 130a, que favorece dicho proceso mediante la inhibición de la expresión de dos bloqueadores de células endoteliales, GAX y HOXA5 (34). GAX se expresa tanto en células del músculo liso vascular, como en células endoteliales (ECs), induce la detención del ciclo celular e inhibe la angiogénesis. Dentro de todos los tipos de células que participan en el proceso de angiogénesis, las EPCs desempeñan un papel clave. Un estudio publicado recientemente, muestra que una disminución de la expresión del miRNA 130 contribuye a una función deteriorada de las EPCs (35,36). Este efecto es debido a que el miRNA 130 induce una disminución en la expresión de Runx3 y un aumento en la expresión de VEGF y Akt, mejorando así, la función de las EPCs. Jiala y col. observaron que los pacientes con síndrome metabólico poseen una menor movilización y un menor número de EPCs circulantes (37). Según muestran nuestros resultados, la dieta mediterránea induce una mayor expresión del miRNA 130a en pacientes con síndrome metabólico. Estos hallazgos sugieren que la dieta mediterránea podría inducir angiogénesis y mejorar la funcionalidad de las EPCs, ejerciendo un efecto beneficioso para la salud vascular de estos enfermos.

La disfunción endotelial y la alteración en la capacidad regenerativa de las EPCs también puede estar mediada por la expresión de los miRNAs 221/222 (38). El miRNA 221 reduce la expresión de c-kit, receptor del SCF (stem cell factor), factor que aumenta la proliferación y migración de las células endoteliales y la angiogénesis. La actuación sobre la vía miR-221-c-kit podría ofrecer una nueva estrategia para el tratamiento de la disfunción vascular. Zhu N et al, observaron que el miRNA 221 inhibe la expresión de ETs-1 (E26 transformation-specific sequence factor 1), un factor de transcripción clave en la inflamación endotelial (39). El síndrome metabólico está conformado por una serie de factores de riesgo que aumentan la probabilidad de padecer enfermedad cardiovascular (40). En nuestro estudio hemos observado un aumento de la expresión del miRNA 221 en pacientes con síndrome metabólico en comparación con aquellos pacientes que no presentan síndrome metabólico. Por consiguiente, nuestros resultados corroboran estos hallazgos, justificando que los pacientes con síndrome metabólico presentarían una menor proliferación y migración de células endoteliales, un mayor estado proinflamatorio y un mayor riesgo de padecer enfermedad cardiovascular.

Recientemente, se ha demostrado que defectos en la reparación del daño del DNA aumenta el riesgo de sufrir eventos cardiovasculares. Verschuren et al sugieren que la acumulación del daño en el DNA con el envejecimiento podría inducir muerte celular y promover la formación de placas inestables (41). En respuesta al daño del DNA se aumenta la expresión de la proteína p53, también conocida como el “guardián del genoma”. En células normales, los niveles de expresión de proteína p53 son bajos, sin embargo, el daño al DNA y otras señales como el estrés aumentan su expresión, desempeñando un papel clave en el control del ciclo celular y la apoptosis. Cuando el daño es pequeño las concentraciones de p53 son bajas induciendo detención del ciclo celular y la activación de enzimas de reparación. Sin embargo, cuando el daño es más severo las altas concentraciones de p53 inducen la apoptosis celular. Estudios recientes indican que p53 activa la expresión del miRNA 34a, lo cual impide la supervivencia celular, la proliferación celular y la reparación del daño, mediante la inhibición de la expresión de SIRT1 y PNUMS, respectivamente, e induce una apoptosis celular directa (42,43). En nuestro estudio hemos observado una mayor expresión del miRNA 34a, tras el consumo de la dieta mediterránea, en pacientes con un incremento en el número de EPCs circulantes. Los pacientes incluidos en nuestro estudio presentan enfermedad coronaria aguda (angina inestable, infarto agudo de miocardio), enfermedad coronaria crónica de alto riesgo y función braquial severa, lo que induciría cierto daño en el ADN y en el endotelio. Un posible mecanismo que explicase nuestros resultados podría ser que la dieta mediterránea provocaría un aumento de la expresión del miRNA 34a, induciendo apoptosis para evitar un contagio del daño genómico. Por consiguiente, la dieta mediterránea provocaría un aumento el miRNA 34a permite una renovación de aquellas células que presentan un daño severo debido a la enfermedad cardiovascular. Esta renovación celular sería complementada con la presencia de un mayor número de EPCs circulantes que sustituirán a las células endoteliales (ECs) dañadas.

Datos recientes, muestran que el miRNA 210 puede mejorar la angiogénesis y la función cardíaca e inhibir la apoptosis celular (44). En un modelo de rata con infarto agudo de miocardio, se observó un efecto protector de este miRNA al aumentar la supervivencia de células madre mesenquimales. Este efecto parece ser debido a la supresión de FLASH/Casp8ap2 (45). Estudios previos han observado que el miRNA 210 induce un aumento en la expresión de VEGF y VEGFR2 en HUVEC, promoviendo la angiogénesis (46). En un estudio con células endoteliales se observó que el aumento en la expresión del miR-210 estimula la formación de estructuras similares a capilares, así como la migración celular impulsada por VEGF. Dos dianas potenciales de este miRNA en relación con la angiogénesis y la apoptosis son Efna3 y PTP1B, respectivamente (47,48). Según los resultados observados en nuestro estudio, la dieta mediterránea parece tener un efecto beneficioso sobre la salud vascular al aumentar la expresión del miRNA210, el cual actuaría regulando las distintas dianas que se han indicado anteriormente, reparando parte del daño producido por los eventos cardiovasculares en los pacientes con síndrome metabólico.

Asimismo, este miRNA está implicado en la regulación de la expresión de múltiples genes relacionados con el metabolismo mitocondrial, la reparación del DNA, la supervivencia celular y la producción de ROS. El aumento que hemos observado en los niveles plasmáticos del miRNA 210 en pacientes con síndrome metabólico podría ser uno de los mecanismos por los que la dieta mediterránea ejerce un efecto protector frente al estrés oxidativo. Durante la isquemia o hipoxia, se incrementa la producción de ROS (49) y se libera el factor HIF1, que es el responsable de activar la transcripción del miRNA 210 (50,51) para contrarrestar ese aumento. Así, el miRNA 210 es un potente inhibidor del metabolismo mitocondrial disminuyendo la producción de ROS. El estrés oxidativo está implicado en numerosas patologías incluido el síndrome metabólico y las enfermedades cardiovasculares. En estudios previos se ha observado un descenso postprandial de biomarcadores de estrés oxidativo (SOD, H₂O₂, peróxidos lipídicos) tras el consumo de la dieta mediterránea en personas de edad avanzada (26). En consonancia con estos hallazgos nuestros resultados muestran que la dieta mediterránea podría inducir un menor daño oxidativo, y posiblemente ejerza un efecto beneficioso reparando el daño endotelial, en pacientes con síndrome metabólico y enfermedad cardiovascular de alto riesgo.

Zhao DS et al sugieren que un aumento en los niveles de los miRNAs 210 y 30a en suero suponen una mejora de la insuficiencia cardíaca crónica. Este efecto parece ser debido a la relación estrecha que mantienen estos miRNAs con los mecanismos patológicos que desencadenan la enfermedad, tales como, la señalización de calcio, la contracción del músculo liso vascular, señalización del TGF β y las vías que regulan la reabsorción de sodio (52). Cada vez existen más evidencias sobre la estrecha relación que mantienen la enfermedad cardiovascular y la diabetes (53, 54). La mayoría de los enfermos con DT2 permanecen sin diagnosticar durante varios años debido a que la hiperglucemia se desarrolla de forma gradual y asintomática. Sin embargo, estos pacientes presentan un alto riesgo de desarrollar enfermedad macrovascular y enfermedad microvascular. Los cambios en el estilo de vida son las medidas más efectivas para la prevención de la diabetes. Estudios previos han observado que el consumo de la dieta mediterránea reduce la incidencia de diabetes en pacientes con enfermedad cardiovascular (54). En nuestro estudio hemos observado que los pacientes con diabetes presentan mayores niveles plasmáticos del miRNA 30a-3p, tras el consumo de la dieta mediterránea. Un posible mecanismo para explicar estos resultados podría ser que la dieta mediterránea, a través del aumento en la expresión del miRNA 30a-3p, inhibe la expresión de la proteína MeCP2, rescatando de este modo los efectos perjudiciales del TGF-beta sobre las células endoteliales y aumentando la expresión de SIRT1 (55). Datos publicados recientemente, demuestran que el miR-30a estimula la ramificación arteriolar al regular la vía DII4-Notch. El miRNA 30a reduce la expresión de DII4, que es un inhibidor de Notch, controlando de este modo el comportamiento de las células endoteliales (56).

Un estudio realizado con animales de experimentación, mostró que el miRNA 30a regula la autofagia de los cardiomiocitos en la hipertrofia cardíaca. Después del

Máster en Nutrición y Metabolismo

tratamiento de los cardiomiocitos con una molécula análoga al miR-30a, observaron que la expresión de genes relacionados con la hipertrofia de miocardio se redujo, y los cardiomiocitos hipertróficos mostraron mejoras en su morfología. Pan W et al identificaron a beclin-1 como molécula diana del miRNA 30a y sugieren el siguiente mecanismo como desencadenante de la hipertrofia miocárdica: \uparrow Angiotensina II \rightarrow \uparrow expresión beclin-1 \rightarrow excesiva autofagia \rightarrow hipertrofia miocárdica (57). En nuestro estudio el aumento que hemos observado en la expresión del miRNA 30a-3p inducido por la dieta mediterránea, conduciría a una inhibición de beclin-1, impidiendo de este modo la autofagia excesiva de los cardiomiocitos.

En resumen, según los resultados observados, la dieta mediterránea modula la expresión de varios miRNAs que tienen un papel clave en la función endotelial, convirtiéndolos en posibles dianas terapéuticas para las enfermedades vasculares. Por consiguiente, podemos decir que la dieta mediterránea podría ser utilizada como estrategia terapéutica dietética asociada a una reducción del alto riesgo cardiovascular presente en estos enfermos.

CONCLUSIONES

1. La dieta mediterránea induce una mayor expresión del miRNA 126 en las EPCs, lo que podría favorecer la proliferación, migración y liberación de EPCs y ejercer un efecto antiinflamatorio.
2. La dieta mediterránea induce una mayor expresión del miRNA 130a en las EPCs de pacientes con síndrome metabólico, disminuyendo la apoptosis y favoreciendo la angiogénesis y la supervivencia celular.
3. Los pacientes con síndrome metabólico tienen una mayor expresión del miRNA 221 en las EPCs en comparación con los pacientes sin síndrome metabólico. La expresión del miRNA 221 se relacionaría con una mayor inflamación y una disminución en la proliferación y migración de las EPCs, lo que podría estar relacionado con un mayor riesgo de padecer enfermedad cardiovascular.
4. La dieta mediterránea aumenta la expresión del miRNA 210 en el plasma de pacientes con síndrome metabólico, lo que podría mejorar la angiogénesis, la función cardíaca y disminuir la apoptosis.
5. La dieta mediterránea aumenta la expresión del miRNA 30a-3p en el plasma de pacientes con diabetes, pudiendo contribuir al mantenimiento de una función normal en las EPCs y a una mejora de la angiogénesis.

BIBLIOGRAFÍA

1. Baigent C, Blakwell L, Emberson J, Holland LE, Reith C, Bhalra N et al., *Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials*. Lancet 2010, 376: 1670-1681.
2. Versari D, Daghini E, Viridis A, Ghiadoni L, Taddei S, *Endothelial dysfunction as a target for prevention of cardiovascular disease*. Diabetes Care 2009, 32: S314-321.
3. Khaper N, Bryan S, Dhingra S, Singal R, Bajaj A, Pathak CM et al., *Targeting the vicious inflammation-oxidative stress cycle for the management of heart failure*. Antioxid Redox Signal 2010, 13: 1033-1049.
4. De Rosa S, Cirillo P, Paglia A, Sasso L, Di Palma V, Chiariello M, *Reactive oxygen species and antioxidants in the pathophysiology of cardiovascular disease: does the actual knowledge justify a clinical approach?* Curr Vasc Pharmacol 2010, 8:259-275.
5. Potente M, Dimmeler S, *NO targets SIRT1: a novel signaling network in endothelial senescence*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2008, 28:1577-1579.
6. Minamino T, *Role of cellular senescence in lifestyle-related disease*. Circ J 2010, 74:2527-2533.
7. Kumar AH, Caplice NM, *Clinical potential of adult vascular progenitor cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2010, 30: 1080-1087.
8. Burba I, Devanna P, Pesce M, *When cells become a drug. Endothelial progenitor cells for cardiovascular therapy: aims and reality*. Recent Par Cardiovasc Drug Diocov 2010, 5:1-10.
9. A. Oliveras, *Células progenitoras endoteliales y enfermedad cardiovascular*. Hipertensión (Madr.). 2008; 25 Supl 2:3-13.
10. Gallego-Delgado J, Lazaro A, Osende JI, Barderas MG, Blanco-Colio LM, Duran MC et al., *Proteomic approach in the search of new cardiovascular biomarkers*. Kidney Int Suppl 2005:S103-107.
11. Gerszten RE, Wang TJ, *The search for new cardiovascular biomarkers*. Nature 2008, 451:949-952.
12. Dhahbi JM, Atamna H, Boffelli D, Magis W, Spindler SR, Martin DI, *Deep Sequencing Reveals Novel MicroRNAs and Regulation of MicroRNA Expression during Cell Senescence*. PLoS One 2011, 6:e20509.
13. Bushati N, Cohen SM, *microRNA functions*. Annu Rev Cell Dev Biol. 2007; 23:175-205
14. Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W, *Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms?* Trends Cell Biol 2007; 17:118-26.
15. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA, *Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation*. Science 2007; 318:1931-4.
16. Suarez Y, Sessa WC, *MicroRNAs as novel regulators of angiogenesis*. Circ Res 2009, 104:442-454.
17. Zhang Q, Kandic I, Kytryk MJ, *Dysregulation of angiogenesis-related microRNAs in endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease*. Biochem Biophys Res Commun 2011, 405:42-46.
18. Zhao T, Li J, Chen AF, *MicroRNA 34a induces endothelial progenitor cell senescence and impedes its angiogenesis via suppressing silent information regulator 1*. Am J Physiol Endocrinol Metab 2010, 299: E110-116.
19. Cortez MA, Calin GA, *MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases*. Expert Opin Biol Ther 2009, 9:703-711.
20. Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, et al., *Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes*. Circ Res 2010; 107:810-7.

21. Laterza OF, Lim L, Garrett-Engle PW, et al., *Plasma MicroRNAs as sensitive and specific biomarkers of tissue injury*. Clin Chem 2009; 55: 1977-83.
22. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Marsuki Y, Ochiya T, *Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells*. J Biol Chem 2010;285:17442-52.
23. Ruano J, López-Miranda J, Fuentes F, Moreno JA, Bellido C, Pérez-Martínez P et al., *Phenolic content of virgin oil improves ischemic reactive hyperemia in hypercholesterolemic patients*. J Am Coll Cardiol 2005, 46:1864-1868.
24. Marin C, Ramirez R, Delgado-Lista J, Yubero- Serrano EM, Pérez- Martínez P, Carracedo J et al., *Mediterranean diet reduces endothelial damage and improves the regenerative capacity of endothelium*. Am H Clin Nutr 2011, 93:267-274.
25. Iaconetti C, Polimeni A, Sorrentino S, Sabatino J, Pironti G, Esposito G et al., *Inhibition of miR-92a increases endothelial proliferation and migration in vitro as well as reduces neointimal proliferation in vivo after vascular injury*. Basic Res Cardiol. 2012 Sep;107(5):296. doi: 10.1007/s00395-012-0296-y.
26. Camargo A, Delgado-Lista J, Garcia-Rios A, Cruz-Teno C, Yubero-Serrano EM, Perez-Martinez P et al., *Expression of proinflammatory, proatherogenic genes is reduced by the Mediterranean diet in elderly people*. Br J Nutr. 2012 Aug;108(3):500-8. doi: 10.1017/S0007114511005812.
27. Estruch R, *Anti-inflammatory effects of the Mediterranean diet: the experience of the PREDIMED study*. Proc Nutr Soc. 2010 Aug;69(3):333-40. doi: 10.1017/S0029665110001539.
28. Milenkovic D, Jude B, C Morand, *miRNA as molecular target of polyphenols underlying their biological effects*. Free Radic Biol Med. 2013 Sep; 64:40-51. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.046.
29. Ahn J, Lee H, CH Jung, Ha T, *Lycopene inhibits hepatic steatosis via microRNA-21-induced downregulation of fatty acid-binding protein 7 in mice fed a high-fat diet*. Mol Nutr Food Res. 2012 Nov; 56 (11): 1665-74. doi: 10.1002/mnfr.201200182.
30. García-Segura L, Pérez-Andrade M, Miranda-Ríos J, *The emerging role of MicroRNAs in the regulation of gene expression by nutrients*. NutriGenet NutriGenómica. 2013; 6 (1):16-31. doi: 10.1159/000345826.
31. Van Solingen C, Bijkerk R, de Boer HC, Rabelink TJ, van Zonneveld AJ, *The Role of microRNA-126 in Vascular Homeostasis*. Curr Vasc Pharmacol. 2013 May 13.
32. Wei Y, Nazari-Jahantigh M, Neth P, Weber C, Schober A, *MicroRNA-126, -145, and -155: a therapeutic triad in atherosclerosis?* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013 Mar;33(3):449-54. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300279.
33. Yan T, Liu Y, Cui K, Hu B, Wang F, Zou L, *MicroRNA-126 regulates EPCs function: implications for a role of miR-126 in preeclampsia*. J Cell Biochem. 2013 Sep;114(9):2148-59. doi: 10.1002/jcb.24563.
34. Chen Y, Gorski DH, *Regulation of angiogenesis through a microRNA (miR-130a) that down-regulates antiangiogenic homeobox genes GAX and HOXA5*. Blood. 2008 Feb 1;111(3):1217-26.
35. Estecha A, Aguilera-Montilla N, Sánchez-Mateos P, Puig-Kröger A, *RUNX3 regulates intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3) expression during macrophage differentiation and monocyte extravasation*. PLoS One. 2012;7(3):e33313. doi: 10.1371/journal.pone.0033313.
36. Meng S, Cao J, Zhang X, Fan Y, Fang L, Wang C et al., *Downregulation of microRNA-130a contributes to endothelial progenitor cell dysfunction in diabetic patients via its target Runx*. PLoS One. 2013 Jul 12;8(7):e68611. doi: 10.1371/journal.pone.0068611.

37. Jialal I, Fadini GP, Pollock K, Devaraj S, *Circulating levels of endothelial progenitor cell mobilizing factors in the metabolic syndrome*. Am J Cardiol. 2010 Dec 1;106(11):1606-8. doi: 10.1016/j.amjcard.2010.07.039
38. Minami Y, Satoh H, Maesawa C, Takahashi Y, Tabuchi T, Itoh T, et al. *Effect of atorvastatin on microRNA 221 / 222 expression in endothelial progenitor cells obtained from patients with coronary artery disease*. Eur J Clin Invest 2009; 39: 359-367.
39. Zhu N, Zhang D, Chen S, Liu X, Lin L, Huang X, et al. *Endothelial enriched microRNAs regulate angiotensin II-induced endothelial inflammation and migration*. Atherosclerosis 2011; 215: 286-293.
40. García de Tena J, *Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease*. N Engl J Med. 2005 Jul 28;353(4):429-30.
41. Verschuren JJ, Trompet S, Deelen J, Stott DJ, Sattar N, Buckley BM et al., *Non-homologous end-joining pathway associated with occurrence of myocardial infarction: gene set analysis of genome-wide association study data*. PLoS One. 2013;8(2):e56262. doi: 10.1371/journal.pone.0056262.
42. Boon RA, Iekushi K, Lechner S, Seeger T, Fischer A, Heydt S et al., *MicroRNA-34a regulates cardiac ageing and function*. Nature. 2013 Mar 7;495(7439):107-10. doi: 10.1038/nature11919.
43. Dorn GW 2nd., *miR-34a and the cardiomyopathy of senescence: SALT PNUTS, SALT PNUTS!* Cell Metab. 2013 May 7;17(5):629-30. doi: 10.1016/j.cmet.2013.04.004.
44. Hu S, Huang M, Li Z, Jia F, Ghosh Z, Lijkwan MA et al., *MicroRNA-210 as a novel therapy for treatment of ischemic heart disease*. Circulation. 2010 Sep 14;122(11 Suppl):S124-31. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.928424.
45. Kim HW, Haider HK, Jiang S, Ashraf M, *Ischemic preconditioning augments survival of stem cells via miR-210 expression by targeting caspase-8-associated protein 2*. J Biol Chem. 2009 Nov 27;284(48):33161-8. doi: 10.1074/jbc.M109.020925.
46. Liu F, Lou YL, Wu J, Ruan QF, Xie A, Guo F et al., *Upregulation of microRNA-210 regulates renal angiogenesis mediated by activation of VEGF signaling pathway under ischemia/perfusion injury in vivo and in vitro*. Kidney Blood Press Res. 2012;35(3):182-91. doi: 10.1159/000331054.
47. Fasanaro P, D'Alessandra Y, Di Stefano V, Melchionna R, Romani S, *MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3*. J. Biol. Chem. 283, 15878– 15883.
48. Fasanaro P, Greco S, Lorenzi M, Pescatori M, Brioschi M, *An integrated approach for experimental target identification of hypoxia-induced miR-210*. J. Biol. Chem. 284, 35134– 35143.
49. Perrelli, M.G., Pagliaro, P., Penna, C., *Ischemia/reperfusion injury and cardioprotective mechanisms: Role of mitochondria and reactive oxygen species*. World J. Cardiol. 2011, 3, 186– 200.
50. Magenta A, Greco S, Gaetano C, Martelli F, *Oxidative Stress and MicroRNAs in Vascular Diseases*. Int J Mol Sci. 2013 Aug 22;14(9):17319-46. doi: 10.3390/ijms140917319.
51. Mutharasan RK, Nagpal V, Ichikawa Y, Ardehali H, *microRNA-210 is upregulated in hypoxic cardiomyocytes through Akt- and p53-dependent pathways and exerts cytoprotective effects*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2011 Oct;301(4):H1519-30. doi: 10.1152/ajpheart.01080.2010.
52. Zhao DS, Chen Y, Jiang H, Lu JP, Zhang G, Geng J et al., *Serum miR-210 and miR-30a expressions tend to revert to fetal levels in Chinese adult patients with chronic heart failure*.

Máster en Nutrición y Metabolismo

- Cardiovasc Pathol. 2013 May 6. pii: S1054-8807(13)00111-7. doi: 10.1016/j.carpath.2013.04.001.
53. Stahn A, Pistrosch F, Ganz X, Teige M, Koehler C, Bornstein S et al., *Relationship between hypoglycemic episodes and ventricular arrhythmias in patients with type 2 diabetes and cardiovascular diseases*. Diabetes Care. 2013 Sep 16.
54. Salas-Salvado J, Bulio M, Babio N, *Reduction in the incidence of type 2 diabetes with the Mediterranean diet: results of the PREDIMED-Reus nutrition intervention randomized trial*. Diabetes Care 2011;34:14-9.
55. Volkmann I, Kumarswamy R, Pfaff N, Fiedler J, Dangwal S, Holzmann A et al., *MicroRNA-Mediated Epigenetic Silencing of Sirtuin1 Contributes to Impaired Angiogenic Responses*. Circ Res. 2013 Aug 19.
56. Jiang Q, Lagos-Quintana M, Liu D, Shi Y, Helker C, Herzog W et al., *miR-30a Regulates Endothelial Tip Cell Formation and Arteriolar Branching*. Hypertension. 2013 Sep;62(3):592-8. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01767.
57. Pan W, Zhong Y, Cheng C, Liu B, Wang L, Li A et al., *MiR-30-regulated autophagy mediates angiotensin II-induced myocardial hypertrophy*. PLoS One. 2013; 8(1):e53950. doi: 10.1371/journal.pone.0053950.