

A.
INTRO
DUCCI
ÓN

A. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares siguen siendo la principal causa de morbi-mortalidad en los países desarrollados (Figura A1). Todo el arsenal farmacológico con que se cuenta en la actualidad sólo ha conseguido retrasar la edad de aparición de eventos cardiovasculares, pero en conjunto no se ha conseguido disminuir la prevalencia de dichos eventos (Fuster, 2005). Más bien al contrario, según los datos del último informe de la Organización Mundial para la Salud (OMS) las enfermedades cardiovasculares han aumentado en el periodo de los años 2000-2012 (Figura A1).

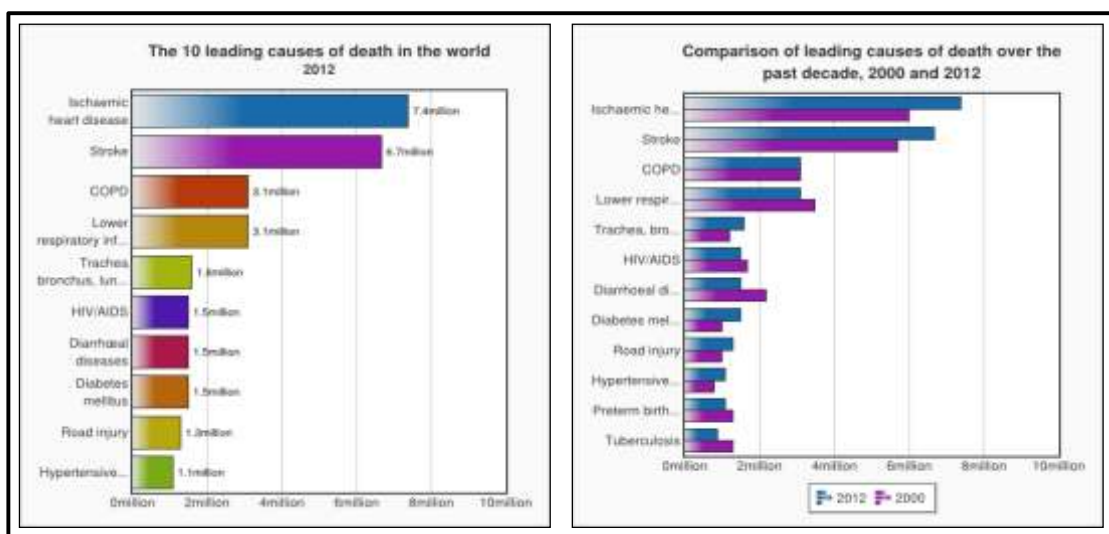


Figura A1. Principales causas de muerte en el mundo en la actualidad y su evolución en los últimos 12 años. Fuente: Organización Mundial para la Salud (2012).

Entre las enfermedades cardiovasculares más importantes la insuficiencia cardiaca es una enfermedad progresiva que incluso con el mejor tratamiento actual provoca una alta mortalidad y morbilidad. Alrededor del 50% de los pacientes diagnosticados de insuficiencia cardiaca han fallecido a los 5 años del diagnóstico (Sayago-Silva, 2013). La insuficiencia cardiaca supone el 2,5% del gasto total del Sistema Nacional de Salud, y es la primera causa de hospitalización en mayores de 65 años, lo que supone el 3% del total (Christopher, 2014). Por ello y debido sobre todo al envejecimiento de la población, actualmente el número de muertes por insuficiencia cardiaca está aumentando (Banegas, 2006).

La causa principal de insuficiencia cardiaca es la cardiopatía isquémica, que ronda alrededor del 75% de todos los casos de insuficiencia cardiaca según el estudio

de Framingham, y particularmente el infarto agudo de miocardio (IAM), que representa la primera causa de muerte en el mundo occidental. Además es la primera causa de pérdida de vida ajustada por discapacidad debido precisamente a la consecuente aparición de insuficiencia cardiaca (Townsend, 2012). Según se recoge en el Plan Integral de Cardiopatías de Andalucía, en el año 2000, las afecciones coronarias fueron responsables del 35% del total de defunciones (40% en mujeres y 30% en hombres).

El IAM ocurre por la obstrucción de una arteria coronaria que bloquea el flujo sanguíneo generando daño tisular en una parte del corazón. En los pacientes que sufren un IAM con elevación del segmento ST (STEMI), el principal objetivo terapéutico es restaurar el flujo coronario tan pronto como sea posible; la pronta y exitosa reperusión miocárdica gracias al uso de tratamiento trombolítico o la intervención coronaria percutánea mediante angioplastia es la estrategia más eficaz para reducir el tamaño del infarto de miocardio y con ello mejorar el resultado clínico en su fase aguda (Patrick, 2013). Especialmente, la angioplastia primaria ha provocado un gran impacto en la historia natural de la cardiopatía isquémica, disminuyendo significativamente la mortalidad precoz y aumentando la supervivencia tras un STEMI. En la figura A2 puede verse una coronografía antes y después de realizarse una angioplastia primaria para restablecer el flujo sanguíneo coronario en un paciente con un infarto agudo con bloqueo total del flujo sanguíneo en la arteria coronaria descendente anterior izquierda.

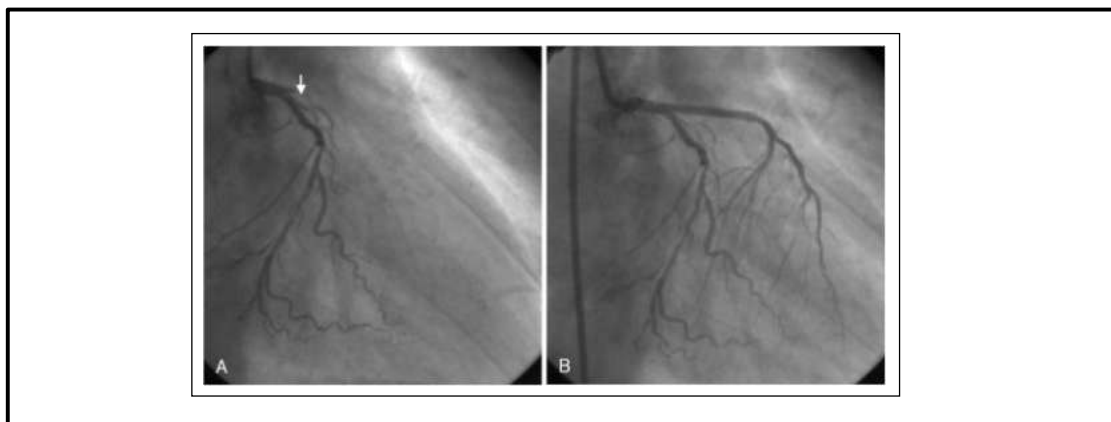


Figura A2. Imágenes de una angiografía coronaria en la unidad de hemodinámica del Hospital Virgen del Rocío de Sevilla. A) Se muestra el bloqueo al flujo sanguíneo en la arteria descendente anterior izquierda y B) el restablecimiento de la circulación sanguínea tras la intervención percutánea.

Sin embargo, a pesar del éxito en las terapias de reperfusión y la mejora en la supervivencia a corto plazo, la cardiopatía isquémica sigue siendo la principal causa de remodelado ventricular adverso a largo plazo, lo que da lugar a la aparición de insuficiencia cardiaca. Incluso con la mejor terapia de reperfusión, entre un 20% y un 30% de los pacientes tratados exitosamente sufren un remodelado adverso del ventrículo. La consecuencia de este remodelado adverso es la aparición de insuficiencia cardiaca y el incremento en 10 veces de la mortalidad de estos pacientes (Bolognese, 2002). Por tanto los resultados a largo plazo de las nuevas terapias de reperfusión han sido mucho menos espectaculares de lo que se esperaba (Halkin, 2005).

El elemento fisiopatológico clave en el desarrollo de la insuficiencia cardiaca tras un STEMI es el remodelado adverso del ventrículo, y aún a día de hoy las causas que explican la aparición de remodelado ventricular adverso tras un IAM, incluso siendo tratados exitosamente, siguen sin estar resueltas (Savoye, 2006).

A.1. Isquemia-Reperfusión en la cardiopatía isquémica.

El restablecimiento del flujo sanguíneo, o reperfusión, es la manera más eficaz de disminuir el daño miocárdico isquémico, limitando la extensión de la necrosis y mejorando la supervivencia de los cardiomiocitos. Sin embargo es bien conocido que existe un efecto desfavorable inducido por la propia reperfusión de las células isquémicas. De hecho una parte de la muerte celular se precipita, paradójicamente, por la propia restauración del flujo (Piper, 1998). Este fenómeno es conocido como síndrome de Isquemia/Reperfusión (I/R).

Los daños por reperfusión se explican al restablecerse la circulación en un escenario previamente isquémico donde se han acumulado una serie de daños. La posterior llegada de sangre oxigenada a las células previamente isquémicas produce la reactivación del metabolismo celular en unas condiciones no óptimas de la mitocondria, lo que da lugar a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). A esto hay que sumar la alteración de la homeostasis iónica de los cardiomiocitos cuyo principal problema es la acumulación de Ca^{2+} intracelular. Esto da lugar a nuevos daños estructurales a 3 niveles: i) activación de proteasas dependientes de Ca^{2+} que producen

una proteólisis generalizada de la maquinaria contráctil celular, ii) degradación de lípidos de membrana que conlleva una mayor fragilidad celular y iii) daño mitocondrial que conduce a la apertura del poro de transición mitocondrial (PTM) y muerte celular (Hori, 2009).

El daño letal por reperfusión es capaz de producir la muerte de células que sólo fueron dañadas de forma reversible durante el periodo isquémico previo. Evidentemente las alteraciones celulares que tienen lugar durante la isquemia son el principio de un daño que después de la reperfusión van a llevar a la muerte celular, pero que por sí solos no serían causa definitiva.

A.1.1. Daños agudos producidos en el miocardio por isquemia/reperfusión.

A.1.1.1. Importancia de la homeostasis del calcio.

La regulación de los niveles de Ca^{2+} intracelular es un proceso clave para los cardiomiocitos. El Ca^{2+} es un importante transductor de señales en cualquier tipo celular, pero en los cardiomiocitos es además el responsable directo de la contracción rítmica del músculo cardíaco. Los cardiomiocitos necesitan incrementar los niveles de Ca^{2+} citosólico durante un periodo breve de tiempo (sístole), y a continuación volver a recaptar todo ese Ca^{2+} rápidamente para volver a una situación de reposo (diástole) necesaria para que pueda producirse la siguiente contracción (Figura A3). Esta compleja regulación de los flujos de Ca^{2+} a través del retículo sarcoplásmico y de la membrana plasmática son procesos muy costosos energéticamente y se ven afectados durante una situación de isquemia donde los niveles de ATP bajan drásticamente al no funcionar la cadena respiratoria mitocondrial. Tras la reperfusión el problema se agrava considerablemente al perderse la capacidad de regular los niveles de Ca^{2+} citosólico (Siegmund 1992).

El tejido miocárdico tiene una alta demanda metabólica, necesita una gran cantidad de energía para mantener su actividad contráctil y el funcionamiento de sus bombas iónicas. Es un tejido funcionalmente aeróbico que depende casi por completo de la oxidación de sustratos para la obtención de energía, por tanto en una situación de isquemia la ausencia de O_2 disponible hace que la producción de fosfatos de alta

energía disminuya drásticamente. El balance energético se hace muy desfavorable, y el tejido en un corto periodo de tiempo va agotando las reservas de ATP, acumulando ADP y Pi. De modo compensatorio la célula inicia una glucólisis anaeróbica que sintetiza algo de ATP a costa de acumular lactato y protones, dando lugar a una acidificación del pH intracelular en pocos minutos (Neely, 1984). La consecuencia de esta acidificación es la activación de intercambiadores de Na^+/H^+ que van retirando protones a cambio de aumentar la concentración de Na^+ citosólico, lo que entre otros efectos provoca la pérdida del gradiente de Na^+ transmembrana resultando crítico para la actividad del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) (Pike, 1993). Por su parte, el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ juega un papel fundamental en la homeostasis del Ca^{2+} , ya que es la vía principal de extrusión del Ca^{2+} intracelular en condiciones fisiológicas normales. Sin embargo, durante una isquemia la despolarización progresiva de la membrana y la sobrecarga de Na^+ citosólico provocan un funcionamiento continuo de la bomba en forma reversa, produciendo una entrada neta de Ca^{2+} al citoplasma. A esto hay que sumar la inhibición de las ATPasas de Ca^{2+} de la membrana plasmática y del retículo por falta de ATP, lo que lleva a un aumento prolongado de la concentración de Ca^{2+} intracelular (Steenbergen, 1987).

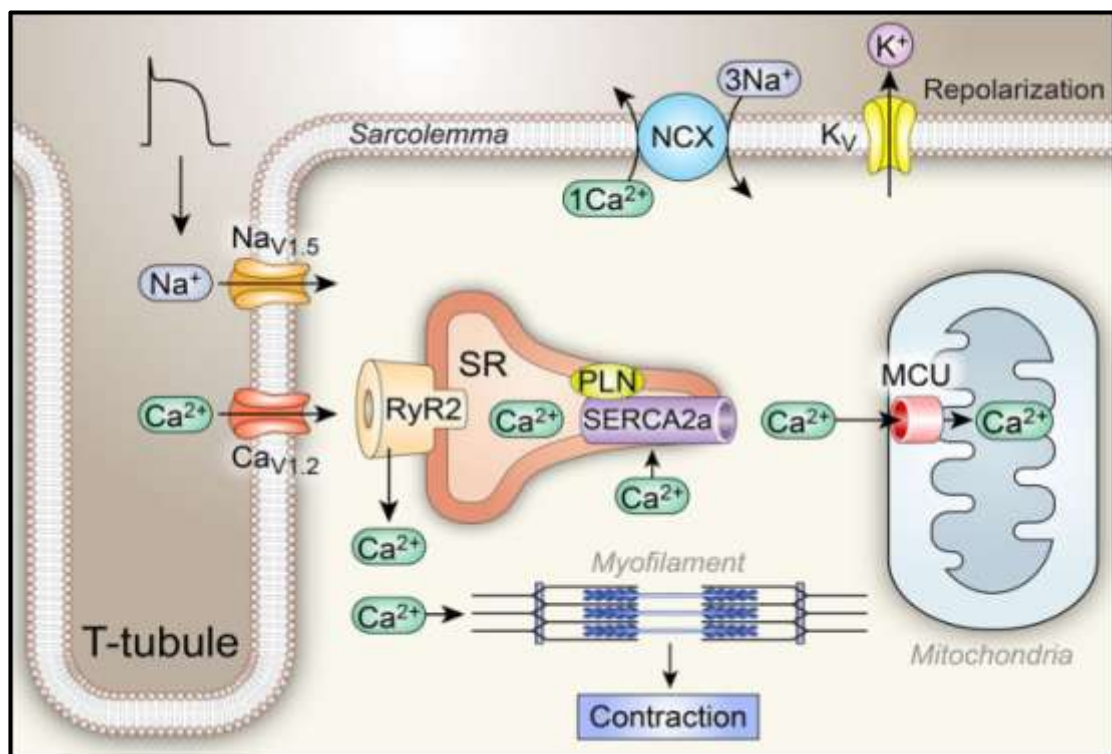


Figura A3. Acoplamiento excitación-contracción en cardiomiocitos y mecanismos de manejo de Ca^{2+} . Fuente: Min Luo, Circulation Research Image Gallery.

Posteriormente, cuando se produce la reperfusión sanguínea las células vuelven a disponer de oxígeno, volviendo a restablecerse la síntesis de ATP. Las concentraciones de ATP pueden tardar en volver a sus niveles normales, pero la disponibilidad energética se recupera a los pocos minutos de disponer de oxígeno. Sin embargo las mitocondrias que han sido dañadas tienen alterado el proceso oxidativo, dando lugar a más radicales libres de oxígeno (RLO) de lo normal (Siegmond, 1990).

La acidosis producida en isquemia se revierte de forma rápida gracias al lavado extracelular de protones, y la vuelta a la actividad del intercambiador Na^+/H^+ y del transportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$. Si la isquemia ha sido breve la concentración de Na^+ intracelular puede normalizarse con la actividad del la ATPasa Na^+/K^+ . Sin embargo, en una isquemia prolongada la concentración de Na^+ permanece alterada durante mucho tiempo debido también a la actividad del cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ y del intercambiador Na^+/H^+ que siguen introduciendo Na^+ para poder restablecer el pH (Bersohn, 1995).

Las células que sufren durante mucho tiempo la sobrecarga de Ca^{2+} citoplasmático mantienen de forma sostenida una alta actividad contráctil, lo que provoca daños en las estructuras sarcoméricas y el citoesqueleto, produciéndose un acortamiento irreversible de la célula que desembocará en la muerte celular (Piper, 1998).

A.1.1.2. Alteraciones enzimáticas y fragilidad celular

El proceso de I/R también produce alteraciones en la composición lipídica de la membrana plasmática, degradación de proteínas de membrana y pérdida de uniones entre la membrana y el citoesqueleto, lo que resulta en un aumento de la fragilidad celular (Ganote, 1988). Dicha fragilidad hace que las células soporten una menor sobrecarga mecánica. La alta concentración de Ca^{2+} intracelular, además de provocar la hipercontractura, activa fosfolipasas dependientes de Ca^{2+} . La hidrólisis de fosfolípidos y la acción de los lisofosfolípidos producidos son los responsables en mayor medida de los cambios de composición en la membrana plasmática de las células sometidas a isquemia, y de la alteración de las propiedades físicas de la membrana como consecuencia de la alteración de proteínas estructurales, canales, etc (Cummings,

2000). Un ejemplo son las calpaínas, unas proteasas dependientes de Ca^{2+} que debido a la sobrecarga de Ca^{2+} citoplasmático sufren una alteración de su actividad. La actividad de las calpaínas es dependiente del pH, de manera que durante la reperfusión y el restablecimiento de un pH neutro contribuyen negativamente en la fragilidad celular, produciendo la proteólisis de proteínas que mantienen la integridad de la membrana, miofilamentos, y canales iónicos (Inserte, 2005).

A.1.1.3. Alteraciones mitocondriales

La reactivación de la respiración mitocondrial tras la reperfusión es fundamental para la recuperación celular. Sin embargo la propia actividad de la mitocondria además de producir gran cantidad de RLO, contribuye a la alteración de los niveles de Ca^{2+} intracelular y al desencadenamiento de procesos apoptóticos. Estos RLO tienen efectos directos sobre componentes de la cadena respiratoria, afectando a la síntesis de ATP y alterando también la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Halestrap, 1998).

En la reperfusión la restauración del potencial de membrana mitocondrial hace que la mitocondria capture Ca^{2+} citoplasmático contribuyendo a la normalización de su concentración intracelular. Sin embargo la sobrecarga de Ca^{2+} en la mitocondria puede llevar a la apertura del PTM (Griffiths, 1993). El PTM es un canal inespecífico de difusión de moléculas que en condiciones fisiológicas ayuda a modular los cambios de Ca^{2+} intracelular. Sin embargo una apertura descontrolada da lugar a la despolarización de la mitocondria, pérdida del gradiente de H^+ , cese de la síntesis de ATP, y liberación del Ca^{2+} mitocondrial al citosol. Cuando esto ocurre en buena parte de las mitocondrias se produce la muerte de la célula por necrosis.

A.1.2. Mecanismos de muerte celular después de isquemia/reperfusión

Hasta hace relativamente poco tiempo se pensaba que tras un proceso de I/R la necrosis era el único mecanismo de muerte celular de los cardiomiocitos. La necrosis es la muerte producida por una grave alteración de la homeostasis celular. Se caracteriza por una fragmentación descontrolada del DNA, desorganización de los

orgánulos celulares, rotura de la membrana plasmática y liberación al exterior del contenido intracelular, lo que desencadena una respuesta inflamatoria.

Sin embargo actualmente está bastante bien establecido que si bien en los primeros minutos de isquemia se produce una muerte de cardiomiocitos por necrosis, la reperfusión desencadena posteriormente otro tipo de muerte celular que ocurre de una forma mucho más controlada; se produce muerte celular por apoptosis. La apoptosis es un proceso de muerte celular programado, que tiene lugar de una manera controlada, y que depende del balance entre la expresión de genes pro- y anti-apoptóticos (Saraste, 2000). Se caracteriza por un encogimiento de la célula y su núcleo, una condensación de la cromatina y su posterior fragmentación, y la formación de cuerpos apoptóticos que van a dar lugar a una rápida fagocitosis por macrófagos o células del parénquima, de modo no se produce respuesta inflamatoria tan severa. El entrar o no en fase apoptótica se produce por la suma de factores tanto externos como internos, y dado que es un proceso programado puede llegar a ser un proceso reversible si se dan las señales adecuadas. El hecho que determina la entrada en apoptosis es la producción de determinadas proteínas, principalmente de la familia de las caspasas, que llevarán a cabo los procesos de degradación del DNA, y degradación proteolítica en cuerpos apoptóticos.

Por otra parte aunque una isquemia severa provoca la muerte inevitable de los cardiomiocitos, parece que la muerte por necrosis ocurre relativamente tarde tras la isquemia. Los cardiomiocitos que mueren en los primeros minutos de la reperfusión muestran rotura de la membrana plasmática y liberación enzimática, y está asociada a la hipercontractura provocada por la alta concentración de Ca^{2+} intracelular, dando un patrón histológico característico llamado necrosis en bandas de contracción (Ganote, 1983). El resto de cardiomiocitos que mueren de forma tardía, incluso horas después de la reperfusión lo hacen por necrosis o por apoptosis (García-Dorado, 1992). Estos procesos apoptóticos pueden deberse a la toxicidad asociada a la respuesta inflamatoria tras la reperfusión, pero también pueden ser el resultado final de procesos iniciados en el periodo de isquemia (Bartling, 1998).

Numerosos estudios han demostrado la coexistencia de muerte por necrosis y apoptosis en la I/R (Gottlieb, 1994). Sin embargo la contribución de la apoptosis al daño por I/R es controvertida. Se ha sugerido que la apoptosis es poco importante en el tamaño final del infarto, sin embargo la inhibición de las caspasas ha disminuido el daño por I/R (Yaoita, 2000). Además la sobreexpresión de la proteína inductora de apoptosis Caspasa-3 provocó un aumento en el tamaño del infarto en un modelo de ratón (Condorelli, 2001), mientras que la del gen anti-apoptótico Bcl2 produjo el resultado contrario (Chen, 2001).

Por otras parte el proceso de apoptosis puede jugar un papel importante a largo plazo en el remodelado ventricular adverso y en la progresión hacia insuficiencia cardiaca (Anversa, 1998).

A.2. Remodelado ventricular adverso post-infarto.

El remodelado ventricular adverso post-infarto se define como el conjunto de alteraciones moleculares y estructurales en la arquitectura y geometría ventricular que comprometen tanto a la zona infartada como a la zona no infartada, y que conducen a una alteración de la función ventricular que tiene como consecuencia clínica la aparición de insuficiencia cardiaca.

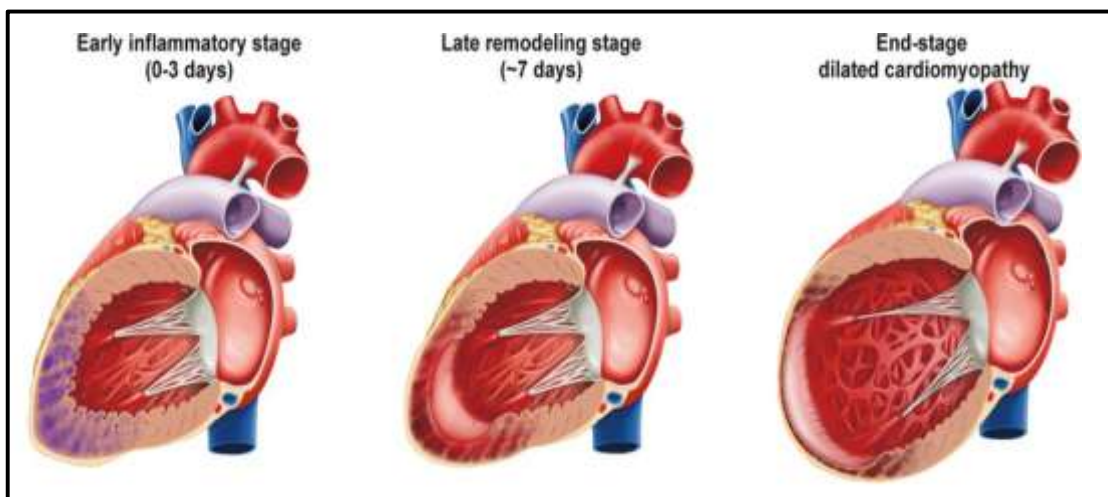


Figura A4. Proceso de remodelado ventricular adverso después de un IAM. Fuente: Xiaoxiang Y, 2012.

De forma simplificada, la contribución de los daños por reperfusión en la aparición de remodelado ventricular adverso ocurren cuando en un IAM, la falta de oxígeno y la producción posterior de ROS durante la reperfusión causan la muerte de

cardiomiocitos por apoptosis y necrosis. Posteriormente, los fibroblastos cardiacos se infiltran en el tejido dañado reemplazando las células muertas y realizando una deposición de matriz extracelular para cicatrizar el tejido dañado. Este fenómeno de fibrosis tiene como consecuencia un aumento de la tensión del tejido, y disminución de la contractilidad, que en último término y según los casos, da lugar a la aparición de insuficiencia cardiaca (Bluemke, 2011).

Sin embargo este mecanismo explica solo en parte la aparición de remodelado adverso. Se ha demostrado que la extensión y severidad de la disfunción contráctil en la zona adyacente al infarto es una característica fisiopatológica claramente asociada al proceso de remodelado adverso en humanos y modelos animales (Wenk, 2012). Dicha pérdida de contractilidad ha sido también descrita en zonas remotas al infarto, de hecho los mismos procesos celulares que provocan remodelado, como son la apoptosis de cardiomiocitos o la fibrosis, ocurren también en la zona remota al infarto (Prescimone, 2013). Sin embargo a día de hoy siguen sin conocerse los mecanismos moleculares por los que se desencadenan estos procesos en una zona que no había sido afectada por el infarto.

El remodelado adverso es un mecanismo multifactorial que implica procesos celulares de muerte celular, inflamación, fibrosis, etc, desencadenados en última instancia por cambios en los programas transcripcionales de las células cardiacas que ocurren tras la revascularización primaria después de un STEMI.

Entre las respuestas adaptativas del miocardio al estrés mecánico en un intento para adaptarse a la elevación en la tensión de la pared y mantener el gasto se encuentran la hipertrofia de los cardiomiocitos, la liberación de citocinas pro-inflamatorias (IL-6, TNF- α , IL 1- β) y los cambios en la composición y distribución de los componentes de la matriz extracelular: colágeno, metaloproteinasas matriciales y péptidos inhibidores del recambio matricial (Okada, 2010). Estos son procesos compensatorios de respuesta al daño miocardico pero que a largo plazo pueden conducir a un proceso de fibrosis que genere una disfunción ventricular propia del remodelado adverso y que en último término lleva a la insuficiencia cardiaca.

Cuando hablamos de remodelado adverso nos referimos a daños por I/R que ocurren a largo plazo, y donde participan de manera importante cambios de expresión génica de las células cardiacas. Esto ocurre como hemos visto anteriormente en el proceso de apoptosis en los cardiomiocitos sometidos a I/R, pero también en las alteraciones de la matriz de colágeno extracelular que dará lugar a la fibrosis e hipertrofia cardiaca y que se deben a cambios de expresión génica en fibroblastos y cardiomiocitos, y que a nivel de órgano darán lugar al llamado remodelado ventricular y una disminución en la contractilidad del área no infartada (McKay, 1986).

A.3. Protección cardiaca frente al daño por I/R.

A pesar del considerable progreso en el campo de la protección miocárdica, sigue habiendo un alto riesgo de que los pacientes tengan complicaciones asociadas a la reperfusión (Verma, 2002), por tanto determinadas actuaciones en el momento de la reperfusión pueden mejorar la supervivencia celular y funcional del miocardio (Piper, 2004).

Frente a todos los procesos de daño celular que tienen lugar durante la isquemia, en el miocardio se generan de forma natural una serie de mecanismos protectores que tratan de evitar la muerte celular. Varios de estos mecanismos se describieron a consecuencia del preconditionamiento isquémico descrito por C.E. Murray en 1986. Hablamos de “una respuesta rápida y adaptativa a una isquemia breve que disminuye la tasa de muerte celular durante un período posterior de isquemia prolongada”. La inducción de breves periodos de isquemia previa reducía el tamaño de la necrosis ocasionada por una isquemia posterior más prolongada. En el preconditionamiento las propias células cardiacas disparan mecanismos fisiológicos para corregir una situación de isquemia, que de forma natural las prepara para soportar mejor un evento isquémico posterior. El primer efecto protector y más evidente es la reducción del tamaño del infarto, o área de necrosis (Schott, 1990; Yellon, 1992). Sin embargo, la protección miocárdica subyacente va mucho más allá. Se ha descrito la disminución de las arritmias inducidas por la reperfusión que sigue a la isquemia (Shiki, 1987), una mejora de la función contráctil post-isquémica en

corazones aislados (Lawson, 1993), y a nivel metabólico se encuentra una menor acidosis intracelular, y un menor consumo de ATP (Albuquerque, 1995).

El efecto protector ocurre a corto plazo mediante la liberación de sustancias como la adenosina, bradikinina, noradrenalina, y opioides (Van Wylen, 1990), que generalmente convergen en la activación de la proteína kinasa C (PKC), y una serie de proteínas como los canales de potasio dependiente de ATP (KATP) en la mitocondria, que llevan a cabo una protección temprana al modular la sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} (Ely, 1985). Posteriormente a más largo plazo se produce una transducción de señales a través de la fosforilación de factores de transcripción que concluye en la inducción de genes como las proteínas de choque térmico HSP70, HSP90, enzimas antioxidantes, y la enzima oxido nítrico sintasa inducible (Yellon, 1998).

El estudio del preconditionamiento a nivel molecular ha servido de guía para obtener dianas terapéuticas para la protección farmacológica frente al IAM. Por ejemplo se ha conseguido protección miocárdica con Dilazep y Draflazine, inhibidores del transporte de nucleosidos; y con Acadesine, un regulador de la adenosina que mantiene elevada su concentración local (Van Belle, 1993; Mullane, 1993).

Una de las moléculas liberadas en el corazón ante un proceso de isquemia es la urocortina, un péptido que actúa a través del receptor CRFR2 en el propio corazón y que tiene efecto cardioprotector (Chanalaris, 2003). El grupo de Investigación de Fisiopatología Cardiovascular del IBIS viene estudiando desde hace unos años como potenciar los mecanismos de protección endógena mediante urocortina.

A.4. Protección cardiaca mediante Urocortina.

A.4.1. Síntesis y distribución de Urocortina.

El término urocortina (Ucn) es usado comúnmente para un conjunto de péptidos que incluyen Ucn 1, Ucn 2 y Ucn 3. La Ucn es un péptido de unos 40 aminoácidos directamente relacionado con el factor liberador de corticotropina (CRF), que fue descubierto en 1981 (Vale, 1981). La Ucn está conservada evolutivamente y la Ucn 1 humana tiene una homología del 95% con la secuencia de rata (Donaldson,

1996). Por su parte Ucn2 y Ucn3 presentan menos homología con los otros miembros de la familia CRF (18-32%) (Lewis, 2001 y Reyes, 2001).

En humanos, la Ucn 1 está presente en el cerebro, placenta, tracto gastrointestinal, tejido sinovial, linfocitos, tejido adiposo, células endoteliales y corazón (Lino, 1999; Nishikimi, 2000; Kimura, 2002). La Ucn 2 se expresa mayoritariamente en el corazón, y también en áreas concretas del sistema nervioso central, piel de ratón y músculo esquelético (Chen, 2004). La Ucn 3 está también presente en las aurículas y ventrículos del corazón, pero los niveles más altos se han encontrado en regiones de la pituitaria y del hipotálamo (Lewis, 2001).

En humanos sanos y en aquellos con una insuficiencia cardiaca estable, la vida media de la Ucn 1 es de unos 50 minutos, mientras que la de Ucn 2 y 3 es más corta y con una acción y efecto inicial más rápido (Davis, 2004; Davis, 2007).

La Ucn realiza su función fisiológica mediante la activación paracrina o autocrina de receptores de CRF (CRF-R) expresados en la membrana celular de las células diana. Los CRF-R son proteínas de membrana pertenecientes a la familia de receptores acoplados a proteína G con 7 dominios transmembrana (GPCRs). Existen dos familias de receptores de CRF: CRF-R1 y CRF-R2, aunque la Ucn se une a CRF-R2 con 40 veces más afinidad que a CRF-R1 (Lovenberg, 1995).

CRF-R1 se expresa amplia y predominantemente en la pituitaria y cerebro de mamíferos, y está poco presente en una gran variedad de tejidos periféricos (Van Pett, 2000). Sin embargo, CRF-R2 que se expresa de forma discreta en el cerebro, está altamente expresado en tejidos periféricos como el músculo cardiaco, liso y esquelético. CRF-R2 tiene patrones de splicing únicos y propiedades farmacológicas notablemente distintas, que probablemente reflejan sus distintas funciones biológicas, entre otras su alta afinidad a Ucn (Perrin, 1995). De hecho esta interacción ha sido descrita en todo el sistema cardiovascular: células endoteliales, células de músculo liso, fibroblastos y cardiomiocitos (Wiley 2004).

A.4.2. Efectos vasculares de Ucn.

La Ucn se une con gran afinidad a CRF-R2 e induce la relajación de los vasos sanguíneos tanto in vivo como in vitro, dando lugar a una disminución de la presión sanguínea arterial media. En ratones carentes de CRF-R2, la presión sanguínea basal, además de la resistencia vascular sistémica, están elevadas (Bale, 2004). El tratamiento de ratas hipertensas con Ucn a largo plazo disminuye la presión sanguínea sistólica y previene el remodelado arterial mesentérico (Chen, 2009). Estos hallazgos sugieren que la Ucn es un regulador endógeno de la presión y flujo sanguíneo.

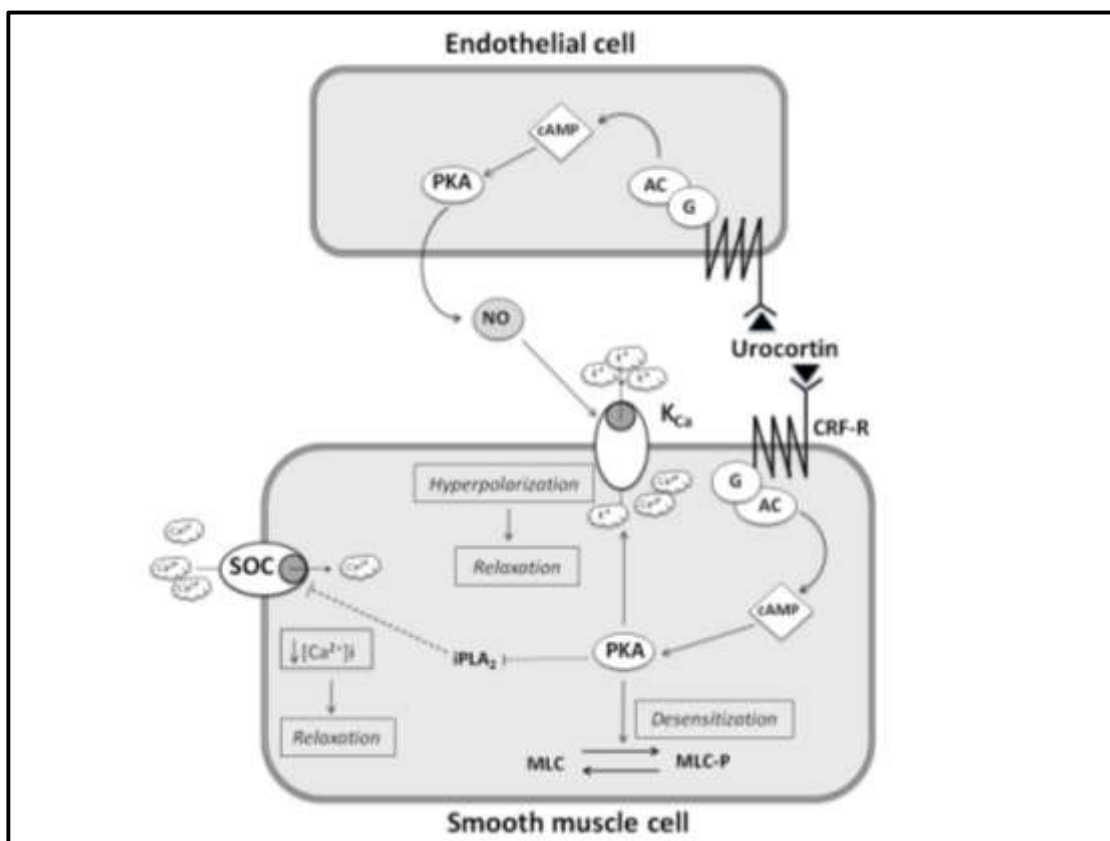


Figura A5. Señalización de Ucn a nivel vascular sobre las células de músculo liso y las células endoteliales. Fuente: Díaz I, 2012

Como se resume en la figura A5 se ha descrito que la vasodilatación inducida por Ucn tiene tanto un componente dependiente de endotelio que parece estar mediado, al menos en parte, por óxido nítrico (Huang, 2002), como por otro componente independiente de endotelio (Schilling 1998), el cual ocurre a través de células del músculo liso e implica diferentes vías de señalización. Este efecto de Ucn parece ocurrir a través de la cascada de señalización de PKA (cAMP/proteína quinasa A)

y la modulación del Ca^{2+} intracelular. La activación de PKA se asoció a la apertura de canales de K^+ y la hiperpolarización del potencial de membrana, induciendo un descenso de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la consecuente relajación (LubomiRov, 2001; Huang, 2003). Recientemente, hemos demostrado en arteria coronaria humana que el efecto independiente de endotelio de la Ucn está relacionado con el cAMP y la activación de PKA (Smani, 2011), y con la inhibición tanto de la iPLA2 (fosfolipasa A2 independiente de Ca^{2+}) como de la entrada de Ca^{2+} regulada por reservorios (SOCE) en arteria coronaria de rata (Smani, 2007).

A.4.3. Efectos de urocortina sobre el miocardio.

Existen varios tipos celulares en el corazón que expresan tanto Ucn como CRF-R2. Dado que las isoformas de Ucn tienen una concentración plasmática alta, es razonable pensar que la Ucn actúa principalmente como las hormonas sintetizadas sistemáticamente que pueden influir sobre la función cardíaca. Sin embargo, la Ucn también tiene efectos cardíacos a través del sistema nervioso parasimpático como sugirió Rademaker (2006), en cuyo trabajo indicaron que Ucn ejerce sus efectos a través del eje hipotalámico-pituitario-adrenal directamente sobre la función cardíaca. De hecho la aplicación de Ucn3 directamente en el cerebro fue capaz de modular el gasto cardíaco a través de la médula adrenal (Chu, 2004). Pero por otro lado Ucn1 incrementó el gasto, la frecuencia y la contractilidad cardíaca sin acción del sistema nervioso en ovejas conscientes (Parkes, 1997).

Diferentes trabajos también han demostrado potentes efectos de la Ucn en corazones perfundidos ex vivo en Langendorff y/o en cardiomiocitos ventriculares aislados (Yang, 2006; Calderón-Sánchez, 2009). Además, y sobre todo, hay datos que indican que la Ucn puede ser también producida directamente en el corazón por las células cardíacas ante un daño por I/R, lo que sugiere una acción autocrina de la Ucn sobre los cardiomiocitos (Knight, 2008).

Está bien aceptado que Ucn tiene un potente efecto inotrópico y lusitrópico en el corazón. La Ucn actúa a través de CRF-R2 para estimular la actividad de PKA (Yang, 2006 y 2011). Sin embargo, a diferencia de los cardiomiocitos de conejos y ratones, esta mayor actividad de PKA no parece ser la base de los efectos inotrópicos y

lusitrópicos en cardiomiocitos de rata. Recientemente nuestro grupo ha publicado un mecanismo alternativo en cardiomiocitos ventriculares de rata donde se demuestra que los efectos agudos de Ucn implican un nuevo efector relacionado con cAMP llamado Epac (proteína de intercambio activada por cAMP). El incremento de la actividad de PKA por Ucn no desencadena efectos inotrópico y lusitrópico positivos, mientras que la inhibición de Epac previene los efectos de Ucn. Además de Epac, las vías de señalización de PKC (proteín kinasa C) y de las MAPK (proteín kinasa activada por mitógenos) también contribuyen a la acción inotrópica positiva de Ucn. Por otra parte, el efecto inotrópico provocado por Ucn se relaciona con una mejora importante en el manejo del Ca^{2+} intracelular (Calderón-Sánchez, 2009). La Ucn incrementa la amplitud de la corriente de Ca^{2+} tipo L (IcaL) tanto en cardiomiocitos de rata como de conejo, así como los transientes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de cardiomiocitos estimulados eléctricamente, y por último aumenta el contenido de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (Smani, 2010).

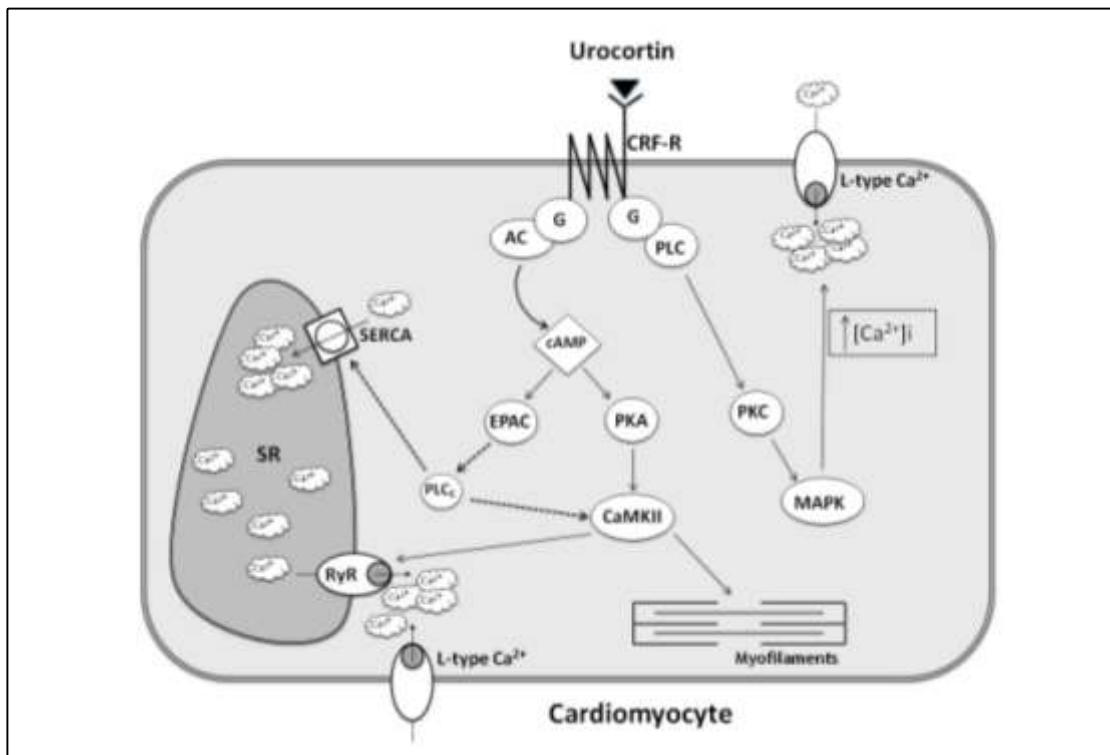


Figura A6. Efectos inotrópicos de Ucn sobre los cardiomiocitos. Fuente: Díaz I, 2012

En conjunto, según se detalla en la figura A6, Ucn actúa mediante múltiples vías de señalización, incluyendo cAMP/PKA, Epac, PKC, MAPK y CaMKII, para promover los efectos inotrópicos y lusitrópicos en cardiomiocitos.

A.4.4. Urocortina en protección cardiaca.

La aplicación de Ucn durante los primeros minutos después de un infarto reduce la muerte celular necrótica y apoptótica en corazones de rata aislados, previene parcialmente el vaciado de los reservorios de energía celular y mejora la función ventricular (Scarabelli , 2002). Ucn también promueve cardioprotección frente a I/R en corazones de rata perfundidos de forma aislada (Lawrence 2003). Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que la aplicación de Ucn en el comienzo de la reperfusión recupera totalmente la contractilidad del corazón, además de mejorar rápidamente el manejo del Ca^{2+} intracelular. Ucn induce una completa recuperación de la amplitud de los transientes de Ca^{2+} , y una recuperación a niveles normales de la concentración del Ca^{2+} diastólico, debido a la mejora de la actividad del intercambiador Na^+ / Ca^{2+} (NCX) (Calderón-Sánchez, 2011).

Varios estudios del grupo de Latchman han demostrado que Ucn previene la permeabilidad transitoria mitocondrial en respuesta al daño por reperfusión reduciendo el estrés oxidativo indirectamente (Lawrence, 2004; Townsend, 2007). Estos hallazgos sugieren que la acción a corto plazo de la Ucn es debida, al menos parcialmente, al mejor manejo intracelular de Ca^{2+} que evita la sobrecarga que se produce después de la reperfusión.

Los mecanismos de señalización implicados en la cardioprotección por Ucn se deben principalmente a tres cascadas de kinasas tales como PKC, MAPK, y PI3K (fosfoinositol 3-kinasa). La familia PKC es una familia de serina/treonina kinasas que ha sido implicada en la fisiopatología de la insuficiencia cardiaca (Simonis, 2002). En corazones perfundidos en Langendorff, Ucn promueve la relocalización de PKC-epsilon desde el citosol a la mitocondria; y además la inhibición de PKC previene el efecto cardioprotector de Ucn (Lawrence, 2005). Por otro lado, miembros de la cascada MAPK tales como MEK1/2 y ERK1/2 han sido descritos como mediadores de la cardioprotección por Ucn (Yang, 2011). Las MAPK pueden estimular diferentes factores de transcripción produciendo respuestas celulares como la proliferación, diferenciación, supervivencia o apoptosis (Bonni, 1999; Wada, 2004). Del mismo modo,

la cardioprotección provocada por Ucn se perdió cuando la PI3K, capaz de activar a la proteína Akt, fue inhibida específicamente (Brar, 2002).

Sin embargo mientras los efectos a corto plazo de Ucn son bien conocidos, estos cambios de señalización celular y cambios de expresión génica a más largo plazo han sido poco estudiados, si bien hay indicios de una fuerte modulación de la transcripción génica y la expresión de proteínas. De hecho, los efectos protectores de Ucn se relacionaron con la expresión de proteínas con propiedades cardioprotectoras bien conocidas y demostradas. Por ejemplo Ucn incrementa la expresión de la proteína de choque térmico 90 (Hsp 90) a través de la vía MEK1/2 en cardiomiocitos de rata (Brar, 2002), aumenta la expresión de cardiotrofina-1 (Janjua, 2003), o activa AKT que regula a la baja la expresión de diferentes genes que promueven la supervivencia celular (Brar, 2002). Además, en un análisis de expresión por microarray usando un modelo in vivo de daño por I/R, la administración de Ucn1 o Ucn2 revela una regulación diferencial de 66 y 141 genes respectivamente. Estos genes regulados por Ucn están implicados en procesos de metabolismo y muerte celular, estrés oxidativo, etc, y pueden ser útiles para proporcionar un mayor entendimiento de la complejidad del proceso de cardioprotección (Barry, 2010).

Ucn modula la expresión de genes importantes como el canal de K⁺ sensible a ATP (KATP), iPLA2, y PKC-epsilon, que intervienen en la regulación del medio mitocondrial y parece evitar la apoptosis inducida por la mitocondria (Steer, 2001; Lawrence, 2002). De hecho nuestro grupo ha demostrado recientemente que en células de músculo liso de arteria coronaria Ucn disminuye la actividad y la expresión de la iPLA2 independiente de Ca²⁺, que se activa en el miocardio isquémico durante la isquemia y que, en parte, es responsable del daño por I/R al liberar ácido araquidónico de las membranas (Smani, 2007).

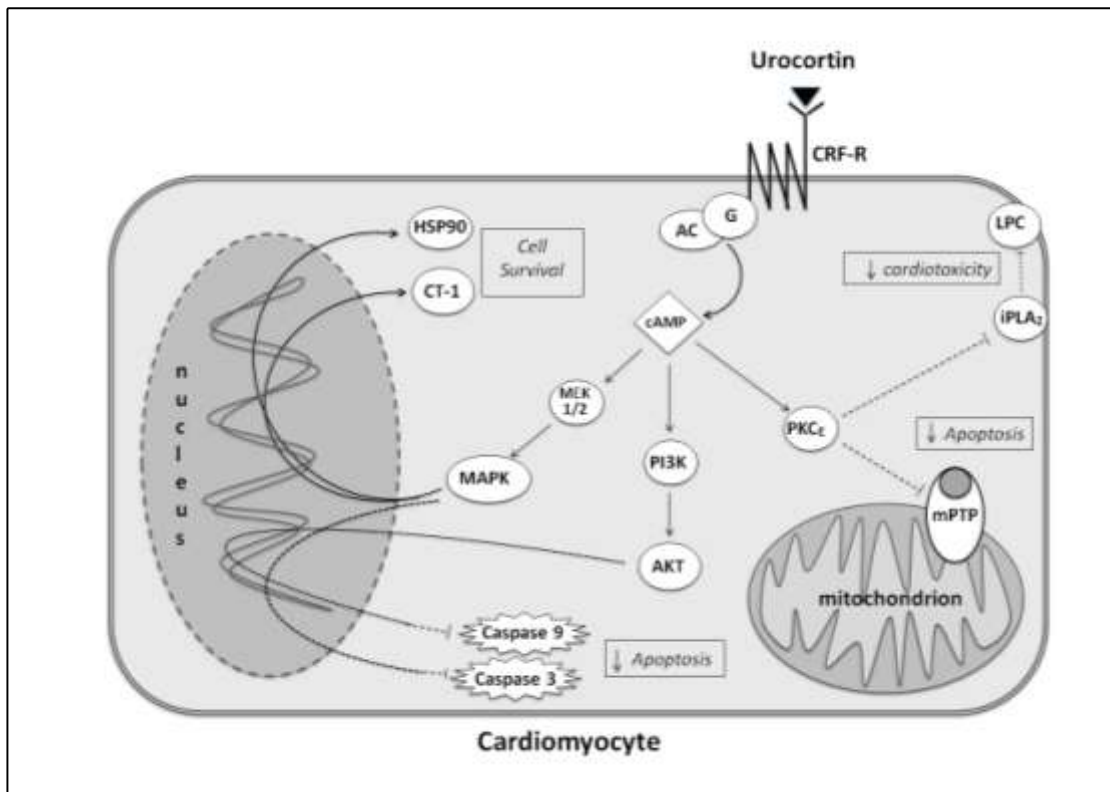


Figura A7. Vías de señalización activadas por Ucn en los cardiomiocitos. Fuente: Díaz I, 2012

A.5. Cambios de expresión génica durante un IAM: Papel de los microRNAs.

Trabajos recientes han mostrado cambios temporales en los perfiles de expresión génica en respuesta a un IAM, que además son específicos según las diferentes zonas del miocardio (Prat-Vidal, 2013). Se han encontrado cambios de expresión génica que ocurren específicamente por el daño isquémico en biopsias de miocardio humano y de modelos animales (Gabrielsen, 2007; Kittleson 2005).

Dentro de los procesos de regulación génica que están ocurriendo en el remodelado adverso después de una I/R nuestro grupo se ha interesado recientemente por un mecanismo regulador de expresión génica que ha sido descrito hace relativamente poco tiempo, y con una gran relevancia dado el gran potencial como herramienta y/o diana terapéutica. Hablamos de los microRNAs, actualmente reconocidos como uno de los mecanismos más importantes de regulación de la expresión génica.

Los microRNAs constituyen a día de hoy un área en auge en la investigación cardiovascular. La propia descripción del perfil de microRNAs en diferentes situaciones fisiopatológicas ha generado gran interés en la comunidad científica (Mendell, 2012). Actualmente está bien descrito que el propio proceso de I/R es capaz de regular la expresión de microRNAs específicos (Shan, 2009), y estos han sido descritos como reguladores de procesos tan importantes para los cardiomiocitos como la señalización por Ca^{2+} intracelular (Pan, 2015), y la actividad de las mitocondrias (Wang, 2011).

Concretamente en la cardiopatía isquémica se han descrito microRNAs como miR-24, que puede proteger a los cardiomiocitos del daño isquémico mejorando su supervivencia (Li, 2012) (Guo, 2015). Además los microRNAs juegan un papel importante en los procesos fisiológicos de remodelado ventricular, entre otros: i) en la adaptación del miocardio ante el propio daño por I/R (Karakikes, 2013; Duisters, 2009), ii) en la regulación del mecanismo de apoptosis en cardiomiocitos (Li, 2010), pero también en el proceso de muerte por necrosis (Piccoli, 2015); iii) así como en la regulación de genes pro-fibróticos (Van Rooij, 2008).

A.5.1. Biología de los microRNAs.

Los microRNAs son pequeñas moléculas de RNA de cadena simple formado por 22 nucleótidos sintetizadas de manera endógena por la propia célula, pero que no codifican para proteína. Los microRNAs regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional mediante unión con la región no codificante del extremo 3' (3' UTR) del ARN mensajero de sus genes diana, lo que induce su degradación o inhibe la traducción a proteína (Parker, 2004). Se estima que una tercera parte de los genes del organismo están regulados por microRNAs. Un gen determinado puede ser diana de varios microRNAs, mientras que un mismo microRNA puede regular decenas de genes debido a la complementariedad solamente parcial en las secuencias de apareamiento, dando lugar a la formación de circuitos de regulación altamente complejos (Lim, 2005).

Los microRNAs que modulan la transcripción de genes cardiacos pueden a su vez modular la propia transcripción de otros microRNAs, amplificando la señal. De hecho “los microRNAs trabajan juntos unos con otros” en la regulación de una solo diana, o bien regulando una ruta de señalización completa (Matkovich 2013). Como

consecuencia hay que tener en cuenta que la mayoría de microRNAs no tienen un efecto drástico sobre un gen diana, sino que más bien al contrario, suelen producir una pequeña atenuación en la expresión de sus genes diana, y que es, en conjunto trabajando de forma sinérgica, por lo que son piezas clave en la regulación de un proceso fisiológico. Por ejemplo miR-21 tiene un papel importante en el desarrollo de la fibrosis, donde está involucrado en la proliferación de fibroblastos cardiacos (Thum, 2009), en su diferenciación (Bronnum 2013), y en la secreción de proteínas de la matriz extracelular (Roy, 2009), pero también se ha descrito su papel en la muerte por apoptosis de los cardiomiocitos (Yang, 2014).

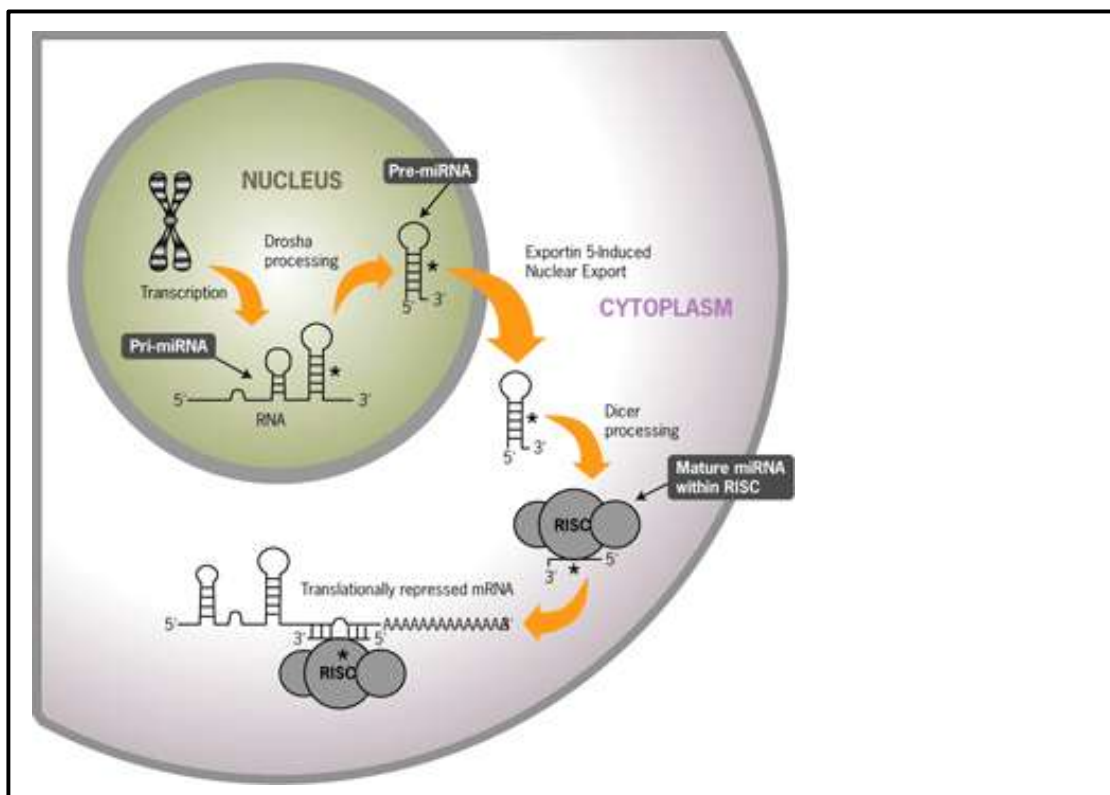


Figura A8. Biogénesis y procesamiento de los microRNAs. Fuente: Armanda Marie, Applied Biosystem

Las regiones de ADN que codifican para los microRNAs están localizadas principalmente dentro de intrones de genes que codifican para proteínas, aunque también pueden aparecer en regiones intergénicas o exónicas (Rodríguez, 2004). Cuando el microRNA se encuentra una región intrónica del gen que codifica el mRNA que va a regular, la expresión del microRNA puede ir correlacionada con la regulación transcripcional de su gen diana y de esta manera se explicaría la especificidad tisular

(Bartel, 2004). Sin embargo la expresión de los microRNAs puede ser regulada de forma independiente a través de sus propios elementos reguladores (Zeng, 2013).

Como se observa de forma resumida en la figura A8 los microRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II que produce una larga molécula de RNA, conocida como pri-microRNA (Lee, 2004). A lo largo de esta larga cadena de RNA se forma una estructura en horquilla (hairpin stem-loop) de unos 60-70 nucleótidos, la cual es cortada por una endonucleasa RNasa-III conocida con el nombre de Drosha dando lugar al pre-microRNA. (Lee, 2003; Denli, 2004). Luego es exportado al citoplasma de forma activa a través Exportina-5 (Lund, 2004). Una vez en el citoplasma este pre-microRNA es cortado por una endonucleasa RNasa-III conocida como Dicer, dando lugar a una molécula de doble cadena microRNA duplex (Hutvagner 2001). De este microRNA duplex, se separan las dos cadenas y una de ellas da lugar al microRNA maduro, que es una cadena lineal de RNA de unos 22-24 nucleótidos.

A.5.2. Mecanismos de acción de los microRNAs

Para realizar su función la molécula microRNA madura se incorpora al complejo ribonucleoproteico conocido como RISC (RNA-induced silencing complex), que es la maquinaria catalítica responsable de la degradación del mRNA diana y/o de la inhibición de su traducción. El complejo RISC humano incluye a Dicer, a las proteínas Argonata, a TRBP (HIV-1 transactivation responsive element) y a PACT (proteína de unión a RNA de doble cadena). Dicer está altamente conservada en eucariotas y siempre tiene un dominio DEAD-box RNA-helicase que hidroliza ATP para abrir RNA de doble cadena. De la familia Argonata, AGO1 es necesaria para la producción del microRNA maduro, mientras que AGO2 es el enzima catalítico que corta el mRNA diana (Khvorova, 2003).

Los dos pasos cruciales en el ensamblaje de RISC son: la selección de la cadena del microRNA sense o antisense, seguido de la potencial destrucción de la otra cadena. Una vez el RISC se ha ensamblado con la cadena (microRNA) que le hace de guía, este se une por complementariedad al mRNA diana en la región UTR 3' para inducir su degradación o bloquear su traducción.

Los microRNAs regulan negativamente la expresión génica a través de dos mecanismos principales: la degradación del mRNA diana y la represión traduccional. Una vez el microRNA se incorpora en el complejo RISC, tendrá lugar un mecanismo u otro dependiendo del grado de complementariedad del microRNA con su mensajero diana. Si la complementariedad es elevada o total se producirá la degradación del mRNA (Bagga 2005), mientras que si la complementariedad es menor se producirá una inhibición de la traducción.

Doench y Sharp (2004) demostraron que la capacidad de los microRNAs para inhibir la traducción dependía de la energía libre de unión entre los primeros 8 nucleótidos del extremo 5' del microRNA con el mRNA diana, región que se conoce como seed-sequence. Según esto un microRNA puede actuar sobre muchas zonas UTR 3' de un gran número de genes (Lim, 2005).

A.5.3. Regulación de la expresión de los microRNAs

Los microRNAs están muy conservados filogenéticamente y a menudo se organizan en tandem o en clusters (Laun, 2001). Estas organizaciones pueden tener una particular importancia en el control de la expresión génica y en la propia expresión de estos microRNAs, ya que cuando un grupo de microRNAs de secuencias similares se encuentra agrupado en un cluster, los productos de la expresión de estos microRNAs se pueden sincronizar para regular un conjunto de mRNA dianas. Sin embargo, estos clusters pueden contener también microRNAs con diferentes secuencias, que se dirigirán cada uno hacia sus dianas específicas.

Muchos de los microRNAs están codificados en regiones intrónicas de sus propios genes diana (Kim, 2006). Se cree que estos microRNAs están corregulados con sus genes huésped (Ying, 2005), aunque es posible que estos microRNAs puedan tener a su vez sus propios promotores. Un claro ejemplo son los microRNAs musculo-específicos miR-208, -208b y -499, los cuales están codificados en intrones de diferentes miosinas de cadena pesada (MHC). Los genes MHC se expresan específicamente en cardiomiocitos por lo que dichos microRNAs se expresan también casi exclusivamente en dicho tejido. Como se observa en el esquema de la figura A9 la expresión de alfa y beta MHC se regula recíprocamente durante el remodelado

cardíaco y se ha demostrado que miR-208 codificado en la isoforma alfa de MHC controla la expresión de la isoforma beta de MHC, gen que codifica a su vez a miR-208b (Van Rooij, 2007).

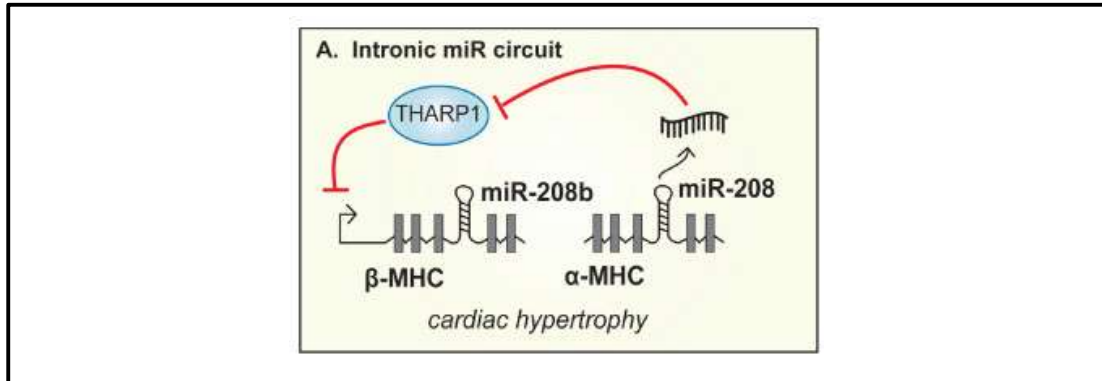


Figura A9. Circuito de regulación intrónico de miR-208 y miR-208b sobre la expresión de los genes de la cadena pesada de miosina (MHC) alfa y beta. Fuente: Van Rooij, 2007

La expresión de genes específicos de tejido es controlada por redes transcripcionales complejas. Consistentemente, la transcripción de microRNAs específicos de tejido a menudo se modula por los mismos factores reguladores que regulan el mRNA. Por ejemplo, la diferenciación del músculo esquelético y cardíaco se caracteriza por la activación transcripcional de genes específicos musculares a través de la cooperación del factor de respuesta a suero (SRF) y el factor potenciador de miocitos 2 (MEF2) con factores de transcripción hélice-bucle-hélice específicos de músculo, incluyendo Myf-5, MyoD y miogenina (Black, 1998). Recientemente se ha descrito que SRF y MEF2 promueven la transcripción de varios microRNAs específicos de cardiomiocitos, incluyendo miR-1, -133, -206, y -208 (Schlesinger 2011). Aquí hay que señalar que además de cambios estables de expresión de microRNAs, estos pueden ser rápidamente inducidos por factores de crecimiento y en algunos casos estos cambios pueden ser muy transitorios. Sin embargo muy poco se conoce sobre la tasa de recambio de los microRNAs. De hecho aunque se conoce un sistema de degradación de microRNAs en *A. thaliana* (Ramachandran, 2008), no se conoce prácticamente nada sobre el control de la degradación de microRNAs en mamíferos.

No obstante parece que los microRNAs son bastante estables in vivo, incluso después de haber inhibido la maquinaria procesadora de microRNAs (Kuehbach,

2007). Pero además el tiempo de permanencia varía entre diferentes microRNAs por lo que los mecanismos reguladores pueden ser diferentes. Por ejemplo miR-199a, pero no miR-199a* es dramáticamente degradado después de un tratamiento de hipoxia en cardiomiocitos (Rane, 2009).

Aproximadamente la mitad de los genes de los microRNAs (52.5%) se encuentran localizados en sitios frágiles, o en regiones genómicas asociadas a cáncer. Estos sitios son preferencialmente zonas de intercambio de cromatina, de translocaciones, deleciones, amplificaciones o de integraciones de DNAs plasmídicos y de virus asociados a tumores, los cuales frecuentemente causan la expresión aberrante de microRNAs durante la patogénesis (Calin, 2005). De modo que cualquier mecanismo que pueda provocar la sub, o sobreexpresión de un gen, como la amplificación génica o la deleción, podrá afectar a los niveles de microRNAs.

Una de las vías de regulación de expresión de microRNAs mejor estudiada es la mediada por las proteínas Smad, trasductores de señal de la vía TGF-beta. Las proteínas Smad juegan un papel crítico en la biogénesis de numerosos microRNAs de dos diferentes maneras: i) por translocación al núcleo de heterodímeros de R-Smad/co-Smad que regulan la transcripción de secuencias de microRNAs, y ii) por regulación post-transcripcional del procesamiento de los pri- hacia pre-microRNAs mediado por R-Smad que activa un complejo procesador formado por Drosha/Dgcr8/p68 (Matthew 2012).

Además la activación transcripcional de microRNAs por Smad es reproducible a través de toda la cascada de señalización celular promovida por TGF-beta, por ejemplo las MAPK, GSK3 y ERK1/2 son capaces de afectar la localización subcelular de Smad4 y con ello modificar la regulación transcripcional de microRNAs (Kong, 2008).

Otra evidencia de la asociación de Smad con secuencias de DNA promotoras de microRNAs es que Smad puede modular los niveles de microRNAs mediante la activación de otros factores de transcripción. miR-143/145 están transcripcionalmente regulados por SRF, myocardin y MRTFs. Y de hecho TGF-beta es capaz de incrementar los niveles de miR-143 y miR-145 a través de la activación de la proteína Myocardin (Davis-Dusenbery, 2011).

Por otra parte el hecho de que mecanismos epigenéticos post-transcripcionales puedan controlar la expresión de muchos genes que codifican para proteína y que los microRNAs sean generalmente transcritos por la polimerasa Pol-II, hace razonable pensar que la epigenética pueda jugar un papel fundamental en el control de la expresión de los microRNAs. De hecho miR-127 se ve remarcablemente sobreexpresado en líneas celulares tumorales después de una reducción de los niveles de metilación de la célula y una mayor apertura de la estructura de la cromatina, induciendo de esta forma la re-expresión de genes que han sido silenciados epigenéticamente (Saito 2006).

A.5.4. microRNAs en el sistema cardiovascular.

Los microRNAs tienen una gran relevancia en la regulación de procesos fisiológicos durante el desarrollo embrionario y de hecho juegan un papel central en el desarrollo embrionario del corazón. Mutaciones dirigidas sobre la enzima procesadora de microRNAs Dicer demostró la necesidad de una correcta actividad de Dicer para el correcto desarrollo del corazón. De hecho la pérdida de Dicer lleva a la muerte prematura de los embriones de ratón sobre el día 7 debido a un mal desarrollo cardiovascular (Saxena, 2010).

Hasta la fecha se han descrito múltiples microRNAs implicados en diferentes aspectos del desarrollo cardiovascular. Por ejemplo miR-1, miR-133a y miR-133b son microRNAs específicos del sistema muscular, y son imprescindibles para la diferenciación del músculo cardíaco (Chen, 2006), miR-126 es fundamental en el proceso de angiogénesis durante el desarrollo del corazón (Wang, 2008), o miR-143/-145 que juegan un papel clave en el proceso de proliferación y diferenciación de las células de músculo liso vascular (Cordes, 2009), y miofibroblastos (Wang, 2014).

Casi todos los primeros trabajos de microRNAs estaban relacionados con el desarrollo, sin embargo cada vez hay más evidencias de procesos fisiológicos adultos que están controlados por microRNAs como son la apoptosis, la división celular, o el metabolismo de ácidos grasos. Además numerosas patologías se deben a la reactivación de programas de transcripción fetales en el adulto, incluyendo la re-expresión de microRNAs que jugaban su papel en el desarrollo (Thum, 2007).

Cuando se empezaron a estudiar los perfiles de microRNA en diferentes patologías cardíacas, se encontró relación entre la desregulación de algunos microRNAs específicos del tejido cardíaco con patologías tales como hipertrofia y la insuficiencia cardíaca (Van Rooij, 2006). Como vimos anteriormente miR-208 sólo se expresa en corazón y es fundamental en la hipertrofia cardíaca disminuyendo los niveles de MHC alfa, lo que desencadena mayor expresión de la isoforma beta de MHC, aumento del tamaño de los cardiomiocitos, fibrosis, etc (Van Rooij, 2007). En modelos de ratón y humano de hipertrofia cardíaca se encuentra disminución de los niveles de miR-1 y miR-133, mientras que la sobre-expresión in vitro de miR-133 consigue inhibir la hipertrofia cardíaca (Catalucci, 2007).

Thum y colaboradores encontraron que miR-21 era el microRNA que más se sobre-expresaba en insuficiencia cardíaca. Demostraron que miR-21 a través de Spry1 regula la ruta de señalización de MAPK-ERK en fibroblastos cardíacos, con gran importancia en la supervivencia de los fibroblastos, la secreción de factores de crecimiento, el remodelado y la hipertrofia cardíaca. Además el silenciamiento de miR-21 in vivo por antagomiR-21 reduce la actividad de MAPK-ERK, disminuye la fibrosis del corazón y atenúa su disfunción (Thum, 2008).

A.5.5. microRNAs en el infarto agudo de miocardio.

Recientes estudios han demostrado que los microRNAs participan en el daño producido por I/R en el corazón, y pueden jugar un papel importante en la protección cardíaca frente al infarto agudo de miocardio. En un modelo in vitro de daño por I/R en corazón de ratón, Yin y colaboradores (2009) demostraron que el tamaño del infarto después de una isquemia era menor cuando inyectaban al corazón microRNAs de un corazón previamente tratado con proteínas de choque térmico (Hsp). Posteriormente se ha demostrado que miR-320 está involucrado en la regulación del daño producido por I/R a través de la proteína Hsp-20 (Ren, 2009). Por otra parte el preconditionamiento isquémico regula la expresión de miR-1, miR-21, miR-24 y miR-199, y la inyección de estos microRNAs producidos en un corazón preconditionado en un segundo corazón sometido a isquemia es capaz de protegerlo del daño por

isquemia en un modelo de corazón aislado y perfundido en Langendorff (Rane, 2009; Cheng, 2010).

Por otro lado actualmente se sabe que tratamientos cardioprotectores frente a isquemia provocan la alteración de la expresión de microRNAs, por ejemplo el tratamiento con la molécula cardioprotectora PIO aumenta la expresión de miR-29 en el tejido cardiaco. Además su inhibición con antagomiR-29 protege del daño por I/R en un modelo de IAM (Yumei, 2010).

Tabla 1 – Experimentos terapéuticos con micro-RNA			
miRNA	Aproximación experimental	Especies	Efecto terapéutico
miR-15	Anti-miRNA modificado: locked nucleic acid (LNA)	Ratón y cerdo	Reducción del tamaño del infarto y el remodelado cardiaco posterior a IAM
miR-24	AntagomiR modificado: 2'-O-metil y 3'-colesterol	Ratón	Reducción del tamaño del infarto, mejora de la vasculatura y los parámetros hemodinámicos tras daño isquémico
miR-320	AntagomiR	Ratón	Reducción del tamaño del infarto mediante regulación de Hsp20
miR-29b	miRNA mimics modificados: 2'-O-metil y 3'-colesterol	Ratón	Reducción de la fibrosis tras IAM
miR-590 y miR199	Transfección con miR-590-3p y miR-199a-3p humanos	Ratón	Reducción del tamaño del infarto y mejora de la función cardiaca por estimulación de la proliferación de cardiomiocitos, disminución del remodelado cardiaco, hipertrofia y fibrosis
miR-208a	Anti-miRNA modificado LNA	Ratas Dahl	Reducción del remodelado y mejora de la función cardiaca
miR-212 y miR-132	ratón knock-out miR-212/132	Ratón	Protección frente al remodelado adverso inducido por sobrecarga vía TAC
miR-133	AntagomiR-133	Ratón	Inducción de una hipertrofia cardiaca sostenida
miR-21	AntagomiR modificado: 2'-O-metil y 3'-colesterol	Ratón	Reducción de la fibrosis y mejora de la función cardiaca
miR-21	Anti-miRNA modificado: LNA	Ratón	Fallo en el bloqueo del remodelado ventricular en respuesta al estrés
miR-328	AntagomiR modificado: 2'-O-metil y 3'-colesterol	Ratón y perro	Rescate de la fibrilación y remodelado auricular
miR-145	Sobreexpresión con adenovirus	Rata	Regulación del fenotipo de las células de músculo liso vascular en la formación de la lesión en la neointima
miR-145	Sobreexpresión con lentivirus	Ratón	Selección de fenotipo contractil en células de músculo liso vascular y reducción del tamaño de la placa de ateroma
miR-21	AntagomiR modificado: 2'-O-metil	Rata	Disminución de la proliferación y aumento de la muerte por apoptosis de las células de músculo liso vascular
miR-33	Anti-miRNA modificado: LNA	Ratón	Elevación del colesterol HDL
miR-33	Anti-miRNA	Primates no humanos	Alteración de los índices de colesterol HDL y VLDL
miR-122	Anti-miRNA modificado: 2'-O-methoxyethyl phosphorothioate	Ratón	Disminución de los niveles de colesterol HDL y LDL en plasma
miR-122	Anti-miRNA modificado: LNA	Primates no humanos	Disminución de los niveles de colesterol total en plasma
miR-126	Cuerpos apoptóticos enriquecidos en miR-126	Ratón	Estabilización y disminución del tamaño de las lesiones arterioscleróticas
miR-29b	LNA-anti-miR-29b	Ratón	Aumento de la expresión de colágeno y reducción de aneurisma aórtico abdominal
miR-29b	LNA-anti-miR-29b	Ratón	Aumento de la matriz extracelular e inhibición de la progresión de aneurisma aórtico inducido por angiotensina II
miR-92a	AntagomiR modificado: 2'-O-metil y 3'-colesterol	Ratón	Crecimiento de vasos y recuperación funcional del tejido isquémico
miR-23 y miR-27	Anti-miRNA modificado: LNA	Ratón	Inhibición de la angiogénesis en un modelo de neovascularización
miR-24	AntagomiR modificado: 2'-O-metil y 3'-colesterol	Ratón	Disminución de la apoptosis del endotelio y mejora de la vascularización después de IAM
miR-155	Anti-miRNA modificado: LNA	Ratón	Disminución de la infiltración y activación de linfocitos T con reducción del daño miocárdico

Tabla 1. Relación de microRNAs con propiedades terapéuticas descritas en experimentación básica. Fuente: Propia

Una de las características de los microRNAs que los hacen tan interesantes es la posibilidad de modificar de forma muy específica su expresión, lo que los hace una

prometedora herramienta terapéutica. Numerosos modelos preclínicos han mostrado que la sobreexpresión o la inhibición de microRNAs pueden alterar las respuestas patológicas en las enfermedades cardiovasculares. Los antagomiR o antimicroRNAs son oligonucleótidos antisentido que se unen a un microRNA concreto consiguiendo una inactivación muy específica y eficiente. Por otro lado pueden utilizarse oligonucleótidos análogos a los microRNAs (miRNA mimics) o pre-miRNA que realicen la misma acción que los endógenos. Recientemente se ha publicado un estudio donde se utilizó un sistema terapéutico basado en la administración intravenosa de oligonucleótidos antisentido para reducir la expresión de miR-208 in vivo, consiguiendo una mejora en la función ventricular de animales con insuficiencia cardiaca (Montgomery, 2010). Este trabajo ha incrementado las expectativas terapéuticas de los microRNAs, ya que este sistema de modulación de los microRNAs in vivo es potencialmente aplicable en cardiología humana. De hecho y aunque no es en el área cardiovascular, ya hay un estudio clínico en fase II con anti-miR-122 para tratar la infección con hepatitis C (Haussecker D, 2010).

Aunque sea necesario el salto a ensayos clínicos, actualmente disponemos de una serie de trabajos muy prometedores en modelos animales basados en la inhibición de microRNAs endógenos por antagomiRs. De hecho la inhibición de microRNAs concretos ha demostrado eficacia en diferentes contextos experimentales, como son reducir la hipertrofia y remodelado cardiaco causante de insuficiencia cardiaca, reducir la muerte celular y la fibrosis tras un IAM, así como reducir la arteriosclerosis, restenosis e incluso la dislipemia. En la tabla 1 se resumen los artículos publicados hasta la fecha.

A.5.6. Los microRNAs pueden ser secretados al torrente sanguíneo tras un IAM: microRNAs circulantes.

Otra característica importante de los microRNAs es que a pesar de que su biología y función es eminentemente citoplasmática, en el interior celular, son capaces de ser secretados al torrente sanguíneo. De hecho durante un proceso de I/R se produce una gran liberación de microRNAs a la sangre. Además estos microRNAs circulantes son relativamente estables en suero o plasma y pueden ser fácilmente

detectados y cuantificados mediante técnicas rutinarias de biología molecular, lo que los hace potencialmente interesantes biomarcadores (Kato, 2014).

Recientes estudios han encontrado que los perfiles de expresión de determinados microRNAs son modificados de forma más constante y específica, y correlacionan mejor con la severidad de una determinada enfermedad que los perfiles de expresión de RNA mensajero. Por ejemplo, altos niveles de microRNAs como miR-208 o miR-499 correlacionan con el daño miocárdico. Así, los microRNAs pueden reflejar mejor el estado funcional del corazón, por lo que pueden ser potencialmente usados como marcadores más precisos de insuficiencia cardiaca (Matkovich, 2014).

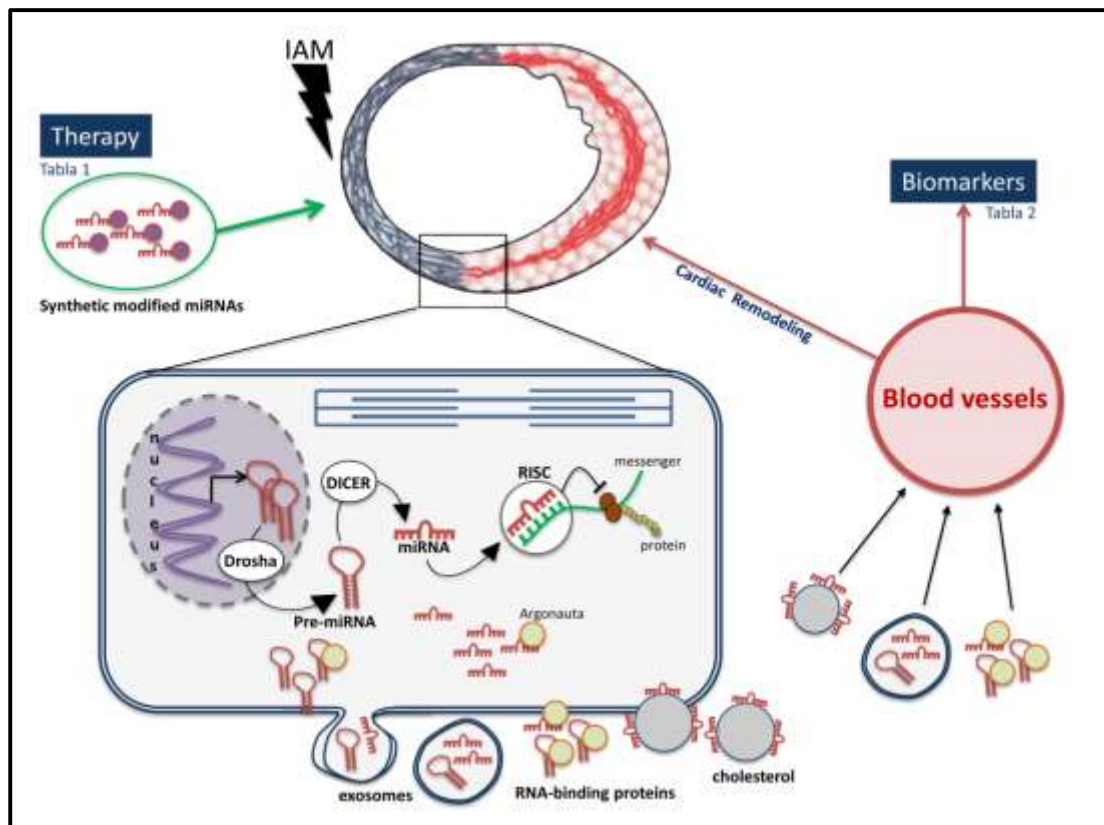


Figura A10. Liberación de microRNAs miocárdicos al torrente sanguíneo tras una lesión isquémica. Fuente: Propia

Por otra parte como se resume en la figura A10, los microRNAs extracelulares pueden encontrarse unidos a otras moléculas como el colesterol HDL o la proteína Ago2, o bien ser incluidos en pequeñas vesículas membranosas, como exosomas o microparticulas. Una de las hipótesis más interesantes sugiere que estos microRNAs están participando en procesos de comunicación celular, ya que son capaces de ser captados e introducidos por células situadas a distancia de forma paracrina o

endocrina (Vickers, 2011). De hecho hay trabajos que sugieren que más allá de una mera liberación de los microRNAs citoplasmáticos como consecuencia del daño celular por I/R, esta liberación podría estar mediada y regulada, formando parte de un proceso activo mucho más complejo (Zhu, 2011). Además recientemente se ha demostrado que microRNAs circulantes son capaces de modificar la expresión de genes diana en las células receptoras (Viereck, 2014). Que los microRNAs liberados en un proceso de I/R tengan una función específica en el posterior remodelado del miocardio les hace ser unos potenciales biomarcadores tanto de daño como predictores de la aparición posteriormente de insuficiencia cardiaca.

A.5.7. microRNAs marcadores de IAM.

Se han publicado varios trabajos proponiendo microRNAs candidatos con potencial valor como biomarcadores de IAM y enfermedad coronaria. Sin embargo son series muy pequeñas de pacientes y en algunos casos con datos contradictorios.

No obstante hay algunos resultados prometedores; miR-208 y miR-499, microRNAs específicamente expresados en corazón, parecen ser claros marcadores de IAM, ya que se encuentran niveles muy aumentados en las primeras horas tras el evento. Los niveles de miR-208 son indetectables en los pacientes sin IAM y se pueden detectar en el 100 % de los pacientes con IAM a las 4 horas del inicio del cuadro, con un área bajo la curva de 0,94. En otro estudio, los niveles de miR-499 estaban elevados a las 3 horas del dolor en el 93 % de los pacientes con IAM, con un área bajo la curva de 0,97 (Devaux, 2012).

Por otro lado miR-1 y miR-133a que son microRNAs altamente expresados en células de músculo liso vascular parecen encontrarse elevados en sangre en pacientes con enfermedad cardiovascular de origen isquémico (Kuwabara, 2011).

En un estudio prospectivo internacional y multicéntrico, se analizaron 6 microRNAs (miR-133a, miR-208b, miR-223, miR-320a, miR-451 y miR-499) en 1155 pacientes atendidos por dolor torácico en un servicio de urgencias. El 19 % fue diagnosticado de IAM. Los niveles de miR-208b, miR-499 y miR-320a fueron significativamente mayores en estos pacientes. El mejor rendimiento diagnóstico se

observó con miR-208b, si bien menor que el de la troponina T y troponina T ultrasensible. Asimismo, si bien los niveles de miR-208b fueron mayores en los pacientes que murieron en los primeros 30 días, el valor de predicción fue bajo, y ninguno de los microRNAs predijo la mortalidad a largo plazo (Devaux, 2015).

En la tabla 2 puede verse un resumen de diferentes microRNAs estudiados como biomarcadores hasta la fecha.

Tabla 2 – Micro-RNA como marcadores en enfermedad cardiovascular			
Enfermedad	miRNA	Efecto	Aplicación
IAM	miR-208	Aumentados	Diagnóstico
	miR-208a	Aumentados	Diagnóstico
	miR-208b	Aumentados	Diagnóstico
	miR-1	Aumentados	Diagnóstico
	miR-133	Aumentados	Diagnóstico
	miR-499	Aumentados	Diagnóstico
	miR-30a	Aumentados	Diagnóstico
	miR-29a	Aumentados	Pronóstico. Riesgo de disfunción ventricular
	miR-101, miR-150	Reducidos	Pronóstico. Riesgo de disfunción ventricular tras IAM
	miR-16, miR-27a, miR-194, miR-34a	Aumentado	
	miR-126	Reducidos	Diagnóstico
Insuficiencia cardiaca	miR-328, miR-134	Aumentados	Pronóstico. Mayor mortalidad e IC a los 6 meses
	miR-652	Aumentados	Pronóstico del síndrome coronario agudo
	miR-423-5p, miR-188	Aumentados	Diagnóstico
	miR-499	Aumentados	Diagnóstico. Aumenta en IAM, miocarditis, insuficiencia cardíaca aguda
	miR-103, miR-142-3p, miR-30b, miR-342-3p	Reducidos	Diagnóstico
	miR-454, miR-500	Reducidos	Diagnóstico de disfunción diastólica
	miR-1246	Aumentados	Diagnóstico de disfunción diastólica
	miR-320a, miR-22	Aumentados	Pronóstico

Tabla 2. Relación de microRNAs circulantes utilizados como marcadores de IAM e insuficiencia cardiaca en ensayos clínicos. Fuente: propia

A pesar de todos los avances y de algunos resultados alentadores sobre el uso de microRNAs circulantes como futuros biomarcadores, todavía es necesario resolver algunas cuestiones. La extracción de microRNAs extracelulares no es una tarea fácil, ya que se encuentran en cantidades relativamente bajas en la sangre y la falta de normalizadores endógenos fiables dificulta la cuantificación específica de microRNAs circulantes. De momento, no existe un consenso en cuanto a la metodología a seguir, la obtención y preparación de las muestras y el método de cuantificación y normalización de los resultados. Por tanto, es necesaria la estandarización de protocolos para el desarrollo de microRNAs circulantes como nuevos biomarcadores.

B.
HIPÓTE
SIS Y OB
JETIVOS

B. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La cardiopatía isquémica es un problema de salud de primer orden y las complicaciones asociadas a la terapia de revascularización derivan en la aparición de insuficiencia cardíaca a largo plazo en un gran número de pacientes. La investigación de nuevos tratamientos cardioprotectores debe tener como objetivo buscar la recuperación de la función cardíaca a corto plazo, y tratar de reducir la frecuencia de aparición de remodelado ventricular adverso a largo plazo.

Nuestra hipótesis de trabajo se basa en la posibilidad de que Urocortina, como molécula cardioprotectora con efectos inotrópicos positivos a corto plazo, sea capaz de desencadenar procesos de regulación transcripcional que podrían estar generando una respuesta celular sobre procesos de supervivencia y muerte celular. Siendo la regulación post-transcripcional por microRNAs un factor de estudio clave para el entendimiento de este proceso.

El objetivo principal de esta tesis ha sido profundizar en el conocimiento de la vía de señalización activada por Urocortina en el tratamiento cardioprotector frente a I/R, principalmente a través de los procesos de regulación génica y expresión de microRNAs que a más largo plazo están implicados en los procesos de supervivencia y muerte celular de los cardiomiocitos.

Los objetivos específicos son los siguientes:

- i) Validar el efecto cardioprotector de Ucn en diferentes modelos experimentales de I/R.
- ii) Determinar el efecto de Urocortina sobre los procesos de supervivencia y muerte celular de cardiomiocitos adultos después de I/R.
- iii) Estudiar el efecto de Urocortina sobre la expresión de genes relacionados con los procesos de supervivencia y muerte celular por apoptosis.
- iv) Caracterizar los microRNAs implicados en la cardioprotección inducida por Urocortina después de I/R.

C.
MATERI
ALESYM
ÉTODOS

C. MATERIALES Y MÉTODOS

C.1. Animales de experimentación.

Todos los animales utilizados fueron tratados según las normas establecidas en la Convención Europea para la protección de animales empleados con fines experimentales (86/609/EEC) y conforme a la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio”, publicado por el US National Institute of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). Todos los procedimientos fueron aprobados por el comité ético para la investigación animal de la Universidad de Sevilla.

Las ratas utilizadas fueron sujetos machos de entre 250 y 300 g de peso de la raza Wistar que permanecían estabuladas en unas condiciones de luz/oscuridad con ciclos de 12h y con una temperatura y humedad controladas.

C.2. Modelo animal de I/R in vivo.

Realizamos un modelo animal de I/R en rata, mediante ligadura reversible de la arteria coronaria. La técnica quirúrgica se inicia con la anestesia mediante ketamina a 10 mg/kg e intubación con un catéter de 16g para la ventilación con respirador de 2,5 ml de volumen tidal y 60 ventilación/minuto. La temperatura se controla de forma precisa entre 35 y 37°C mediante una manta eléctrica con sonda rectal acoplada (HB 101/2, Harvard Apparatus). Se practica toracotomía por el quinto espacio intercostal izquierdo tras la apertura del pericardio para exponer el corazón. Se localiza la coronaria descendente anterior izquierda que se encuentra junto a la orejuela izquierda hacia el ápex del ventrículo. La arteria se ocluye mediante un lazo reversible con sutura fina del nº 6 durante 30 minutos. El infarto es confirmado por la elevación del segmento ST del ECG y por la cianosis distal en la superficie pericárdica. Tras 40 minutos de isquemia se abre de nuevo la arteria para reperfundir el corazón y se resuelve la toracotomía (Circ Res 1996; 79:949-956). Para evitar la alta mortalidad los animales se medican con Lidocaína 10 mg/Kg. Para evitar la trombosis se administra por vía intraperitoneal heparina 200 UI/Kg. Después de la reperusión se cierra rápidamente el tórax y se restaura la presión negativa intratorácica.

Grupos de experimentación en modelo animal de I/R.

1. Grupo I/R: grupo experimental de isquemia/reperfusión por oclusión transitoria de la arteria coronaria descendente anterior. A lo largo de la experiencia se evaluaron los diferentes parámetros de la función ventricular por ecografía a 1 y a 6 semanas.
2. Grupo I/R tratado con Ucn: ratas sometidas al mismo protocolo de I/R junto con la administración de Ucn a concentración de 150 µg/Kg por vía intravenosa.
3. Grupo Sham: ratas control que se someten al mismo estrés quirúrgico sin realizar la oclusión transitoria de la arteria coronaria, y en su caso se inyecta suero salino como control específico de la administración de Ucn.

Cada grupo experimental se formó con 5 ratas y se replicó exactamente igual a diferencia del tiempo de estabulación post-quirúrgica para obtener otros 3 subgrupos temporales; sacrificio a las 24h, 7 días y 6 semanas.

C.2.1. Evaluación de la función cardiaca en el modelo animal de isquemia/reperfusión.

En todos los grupos se evaluó la función ventricular a lo largo de 1 y/o 6 semanas mediante ecocardiografía y al finalizar se realizó cardioectomía para la recogida de muestras.

La función ventricular fue evaluada por ecocardiografía mediante una prueba pre-operatoria, y pruebas post-operatorias a las 24h, a los 7 días y a las 6 semanas. Se utiliza un sistema de imagen Vevo2100 con un transductor para animales de pequeño tamaño de 13-24 MHz (Visualsonics; Amsterdam, Netherlands). Las medidas convencionales (diámetros telediastólico y telesistólico del ventrículo izquierdo, grosor de pared anterior y posterior del ventrículo) se obtienen del registro en modo M por debajo del borde de los velos de la válvula mitral. De estas medidas se obtiene la fracción de acortamiento y la masa del ventrículo izquierdo. Los volúmenes telediastólico y telesistólico, así como la fracción de eyección del ventrículo izquierdo se obtienen mediante el método de Simpson a partir de las proyecciones de eje largo paraesternal y eje corto a nivel basal, medio y apical, como ha sido previamente

descrito (Thibault, 2007). El análisis se realiza off-line mediante el paquete EchoPAC (GE Medical Systems).

C.3. Perfusión de corazones ex-vivo en el sistema Langendorff.

Las ratas utilizadas fueron heparinizadas (4IU/g i.p.) y anestesiadas mediante administración intraperitoneal de Ketamina (1-2 ml/ 250g). Los corazones fueron extraídos lo más rápidamente posible y montados a través de una cánula aórtica al sistema Langendorff donde fueron perfundidos con una solución oxigenada (95 %O₂ y 5%CO₂) denominada Krebs-Henseleit (118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,25 mM CaCl₂, 1,2 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄, 25 mM NaHCO₃, 5 mM Glucosa) y calentada a 37°C.

Para poder evaluar la función isovolumétrica del ventrículo izquierdo se introdujo en dicho ventrículo un balón de latex inflado con agua destilada de manera que se consiguiera estabilizar la presión telediastólica en el ventrículo izquierdo (PVD) en 10 mm Hg. Todos los corazones fueron sometidos a un periodo de estabilización de 30 minutos en el que se instalan los electrodos, el balón ventricular y el sensor de temperatura en el ventrículo derecho. Se conecta un estimulador de marcapasos y se fija una frecuencia cardiaca de 160 latidos por minuto.

A través de transductores de presión y mediante el software Power Lab (AD Instrument) se obtuvieron registros de la frecuencia cardiaca, la presión de perfusión coronaria (PPC) y la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (PVS). A continuación se explican los principales parámetros hemodinámicos.

PVS: Valor máximo de la Presión Ventricular Sistólica o Presión Pico. Es el valor máximo de la curva de presión ejercida por el ventrículo izquierdo para un momento dado en el que se toma la medida.

PVM: Presión Ventricular Media. Es el valor medio calculado entre el valor mínimo y máximo de la curva de presión ejercida por el ventrículo izquierdo sobre el balón intraventricular.

PVD: Presión Ventricular Diastólica. Es el valor mínimo de la curva de presión ejercida por el ventrículo izquierdo en un momento dado. Esta variable fue fijada a 10 mmHg

mediante el llenado del balón intraventricular de manera que los cambios de presión registrados fuesen debidos al funcionamiento del ventrículo izquierdo.

RV: Resistencias vasculares. Es un parámetro que informa de la resistencia que ejercen las coronarias a la perfusión. Se calcula a partir de la PPC y el flujo de perfusión en cada momento.

dP/dt: Derivada de la curva de Presión del Ventrículo Izquierdo (PVI) respecto del tiempo. Es el Incremento de Presión respecto al tiempo de la curva de Presión del Ventrículo Izquierdo. Permite el análisis de la velocidad de acortamiento de la fibra cardiaca, y es un parámetro representativo de la función sistólica o Contractilidad. La contractilidad del corazón en los diferentes protocolos fue evaluada mediante el análisis de la +dP/dt, el cual corresponde al porcentaje de incremento del +dP/dt normalizado respecto al valor basal de +dP/dt tras el periodo de estabilización.

C.3.1. Protocolos experimentales realizados.

- Isquemia/reperfusión (I/R). El protocolo de isquemia/reperfusión en los corazones montados en este sistema Langendorff se realiza mediante el cierre de la perfusión externa, lo que provoca una isquemia global del corazón por la ausencia de flujo, durante 40 minutos. El periodo de reperfusión comienza con la apertura de la válvula de perfusión y la restauración del flujo con solución de perfusión y se mantiene durante 120 minutos.

- Postcondicionamiento con Urocortina (Ucn). El protocolo realizado fue similar al anterior con la diferencia de que durante los 30 minutos primeros de reperfusión se aplicó 10nM de Urocortina en la solución de perfusión.

C.4. Cultivo in vitro de cardiomiocitos.

C.4.1. Dispersión y cultivo primario de cardiomiocitos adultos de rata.

La ratas utilizadas fueron heparinizadas (4IU/g i.p.) y anestesiadas mediante administración intraperitoneal de Ketamina (1-2 ml/ 250g). Los corazones se extraen lo más rápidamente posible y son montados a través de una cánula aórtica al sistema Langendorff especialmente diseñado para la dispersión de células de miocardio.

Durante 2 minutos se perfunde el corazón con una solución “Tyrode” (130 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,5 mM MgCl₂, 25 mM Hepes, 22 mM glucosa, 0,4 mM Na₂H₂PO₄, 5 mM NaHCO₃) libre de Ca²⁺ y con 0,2 mM de EGTA a 37°C. Entonces se pasa a perfundir durante 10 minutos con solución Tyrode sin EGTA y que contiene colagenasa tipo II (Worthington) y 50µM de CaCl₂.

Después de esta digestión los corazones son extraídos del aparato Langendorff y tanto el ventrículo izquierdo como el derecho se cortan en pequeños trozos mediante bisturí estéril e incubados en agitación con solución Tyrode con 0,5 mM CaCl₂ y 1 mg/ml de BSA (albumin from serum bovine, Sigma) para disociar las células del tejido muscular cardíaco. Finalmente las células aisladas son filtradas, centrifugadas y resuspendidas en solución Tyrode con 1 mM de CaCl₂, de manera que los cardiomiocitos resistentes a Ca²⁺ se siembran en placas de cultivo previamente tratadas con laminina (Sigma Aldrich) y se mantienen en un incubador a 37°C y atmósfera controlada con 95% de O₂ y 5 % de CO₂ durante 3-4 horas hasta la realización de los protocolos de isquemia-reperfusión.

C.4.2. Dispersión y cultivo primario de cardiomiocitos neonatos de rata.

Para la dispersión y cultivo de cardiomiocitos neonatales se utilizan las crías procedentes de dos madres gestantes entre el primer y tercer día desde su nacimiento. Tras el sacrificio de los animales mediante decapitación, se procede a la extracción y lavado con PBS de los corazones, manteniéndolos en todo momento a 4°C. Posteriormente los corazones se limpian, eliminando las aurículas y el tejido vascular, hasta quedarnos con los ventrículos aislados.

En condiciones de esterilidad, se procede a trocear los ventrículos con ayuda de una tijera curva hasta conseguir una buena homogenización. Posteriormente se lavan con PBS y los corazones se incuban en 5 ml de tripsina en un baño a 37°C durante 20 minutos, agitando vigorosamente cada 10 minutos. Acto seguido se deja decantar y se elimina el sobrenadante. Se vuelve a incubar otros 20 minutos con tripsina. Se deja decantar y ahora recogemos el sobrenadante en el que se encuentran las células que van dispersándose. Se pasan a un falcon de 15 ml con PBS y suero para inactivar la tripsina, y se centrifugan a 1000rpm durante 5 minutos. Se elimina el sobrenadante, se

resuspenden las células en 1 ml de FBS, y se reservan en el incubador mientras seguimos con la digestión del corazón. Los restos de corazón decantados tras la incubación con tripsina se vuelven a incubar con tripsina durante 20 minutos, repitiendo el proceso dos o tres veces más para obtener todas las células posibles, hasta que acabamos sin tejido cardiaco.

Una vez tenemos las células procedentes de tres o cuatro rondas de tripsinización realizamos un pre-plaqueo para eliminar la población de fibroblastos. Para esto sembramos las células en una placa de petri de 60mm en medio de cultivo de neonatos compuesto por 21% de medio M199 (Gibco), 64% de DMEM (Gibco), 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco BRL), 10% de suero fetal equino (Gibco), 4% de suero fetal bovino (GIBCO), durante 45 minutos. Posteriormente recogemos el medio de cultivo donde estarán enriquecidos los cardiomiocitos, se cuentan y se siembran según el experimento a realizar.

C.4.3. Isquemia/reperfusión simulada en los cultivos celulares.

El siguiente protocolo de I/R se realiza tanto con los cardiomiocitos primarios adultos como con los neonatos. El protocolo de isquemia se realiza mediante el cambio del medio normal de cultivo por una solución isquémica "Ringer" que simula lo mejor posible las condiciones que tienen lugar en el tejido cardiaco al que no le llega flujo sanguíneo. Dicha solución de isquemia se compone de 125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄·7H₂O, 1,25 mM CaCl₂, 4 mM NaHCO₃, 20 mM Na-lactato, 20mM HEPES, 0,5 mM MgCl₂·6H₂O, 0,5 mM KH₂PO₄, a pH 6,2. La solución Ringer se equilibra durante toda la noche en una atmósfera de hipoxia en el interior de una cámara de hipoxia con una atmósfera controlada del 1% de O₂, 5 % CO₂ y saturación de N₂, que permanece estable durante todo el protocolo gracias a la presencia de una cámara intermedia donde se realizan al menos 3 purgas de gases cada vez que se introduce algún objeto.

El protocolo I/R consiste en un periodo de 45 minutos de isquemia en el interior de la cámara de hipoxia, tras lo cual se pasa a reperfusión sacando las células de la cámara y cambiando la solución isquémica por su medio de cultivo normal de la manera más dinámica posible y manteniendo dichas condiciones de reperfusión al 95% de O₂ y 5% de CO₂ el tiempo indicado en cada experimento.

C.5. Cuantificación de proteínas mediante western-blot.

C.5.1. Extracción de proteínas y preparación de muestras:

Las proteínas fueron extraídas tanto de cultivos celulares de cardiomiocitos adultos como directamente de tejido cardiaco de rata. La homogenización se realiza en 100 μ l de tampón de lisis Tris-NP40 suplementado con un cocktail de inhibidores de proteasas y PMSF con la ayuda de un scraper en los cultivos celulares, y mediante el homogenizador TissueLyzer (Qiagen) para los tejidos. Las muestras se mantienen en hielo durante 30 minutos para realizar la lisis celular. Posteriormente se centrifugan a 13000 rpm a 4°C durante 20 minutos para descartar los restos celulares. Se recogen los sobrenadantes o extractos celulares y se mantienen en frío para la cuantificación de la cantidad total de proteínas mediante el método de Bradford, midiendo su absorbancia en un lector de placas modelo Oasys UVM40 (595nm) tras ser incubadas con el reactivo Bradford (Sigma Aldrich) en una proporción 1:40. De forma inmediata las muestras se diluyen en tampón Laemli hasta 1-3 μ g/ μ l y se calientan a 95°C durante 5 minutos para desnaturalizarlas. Una vez atemperadas todas las muestras de proteínas se almacenan a -20°C hasta el momento de la electroforesis.

C.5.2. Electroforesis y detección.

A la hora de realizar el Western Blot, cantidades iguales de proteínas (40-50 μ g) en tampón Laemli fueron corridas en un gel SDS-PAGE con 8-12 % de acrilamida (Sigma Aldrich) según el tamaño de la proteína de interés, a una corriente de 120V durante 1h30 aproximadamente.

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfieren eléctricamente a una membrana PVDF (GE Heathcore) a 0,34 amperios durante 1h en un sistema de transferencia semi-seco de Biorad. Una vez finalizada la transferencia la membrana se incuba durante 10 minutos con rojo Ponceau (Sigma Aldrich) con el fin de teñir las proteínas y comprobar que la transferencia se ha llevado a cabo de forma correcta. Después de bloquear los sitios de unión inespecíficos antígeno-anticuerpo con 5% de leche en polvo desnatada disuelta en tampón TRIS con 0,1% detergente Tween (TBS-T) a 37°C durante 1 hora, las membranas se incuban toda la noche a 4°C con el

anticuerpo primario correspondiente disuelto en TBS-T con 5% BSA (sigma Aldrich). Tras lavar de 3 a 5 veces las membranas con TBS-T, estas se incuban con los anticuerpos secundarios correspondientes acoplados a peroxidasa (Jackson IR) a una concentración de 1:20000 en TBS-T, durante 45-50 minutos a temperatura ambiente.

Para la detección de las bandas se utiliza el reactivo quimioluminiscente ECL-PLUS (Amersham Biosciencie) durante 5 minutos. Posteriormente las membranas se revelan en el luminómetro I.Q. LAS 4000 MINI GOLD, donde se obtienen imágenes en formato tiff que se analizan mediante el software libre "Image J" para su cuantificación.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: phospho-Erk1/2 y Erk1/2 total de Cell Signaling, anti α -tubulina (1:10000) y anti β -actina (1:10000) de Sigma Aldrich.

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: HRP-antimouse (1:2000) y HRP-antirabbit. (1:2000), ambos de Cell Signaling.

C.6. Cuantificación de la expresión de microRNAs

C.6.1. Manejo de las muestras de RNA.

Las muestras de tejido cardiaco procedentes del sistema Langendorff tras los diferentes protocolos realizados son inmediatamente sumergidas en abundante RNAlater (Qiagen) para la protección del RNA, y conservadas a 4°C durante un máximo de una semana hasta la extracción del RNA. En ese momento las muestras de tejido en RNAlater se estabilizan a temperatura ambiente, se elimina el sobrenadante dejando el tejido lo más seco posible. Se añade 1 ml de Trizol (Qiagen) y se homogeniza mediante un homogenizador "Polytron" durante varios pulsos que no duran más de 5 minutos. A continuación se procede a la extracción de RNA.

En el caso de cultivos celulares, estos se lavan en PBS frío e inmediatamente se homogenizan en 1ml de trizol y se procede con la extracción de RNA.

C.6.2. Extracción de RNA total.

Para la obtención del RNA total, incluyendo los pequeños RNAs, se utiliza un protocolo combinado de extracción con fenol-cloroformo seguido del paso por las columnas "miRNeasy de Qiagen". El homogenado en Trizol se deja incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos y se añaden 200 μ l de cloroformo procediéndose a su agitación en vortex durante 15 segundos. El homogenado se centrifuga a 12000g durante 15 minutos a 4°C. Se recupera la fase acuosa de unos 400 μ l, a los que se le añade 600 μ l de etanol 100% y se homogeniza pipeteando. A continuación este homogenado se procesa a través de dichas columnas miRNeasy de Qiagen como describe el protocolo, donde se realizan una serie de lavados que dan lugar a la obtención de un RNA total de alta pureza.

El RNA obtenido se cuantifica mediante Nanodrop, para verificar que todas las muestras cumplen valores de concentración de 200 y 600 ng/ μ l de RNA y con unos índices 260/230 y 260/280 mayores de 1,6 y próximos a 2 respectivamente.

C.6.3. Micro-Array de microRNAs.

Para el estudio de los perfiles de expresión diferencial de microRNAs en corazones sometidos a isquemia-reperfusión frente a corazones tratados con Ucn 10nM en postcondicionamiento, se utilizó el microarray "Rat microRNA Microarray" de Agilent. Este microarray presenta un formato de 8x15K, esto implica que un solo slide integra 8 arrays individuales impresos utilizando la tecnología "Agilent's 60-mer SurePrint technology" lo que permite realizar 8 ensayos distintos en un mismo cristal. En nuestro caso realizamos 4 ensayos para cada una de las 2 condiciones lo que nos permitió obtener resultados estadísticamente significativos.

Cada slide del array incluye aproximadamente 15 mil sondas diseñadas a partir de la información existente en la base de datos Sanger miRBase. Las sondas son oligonucleótidos de 60-mer directamente sintetizados sobre el slide. Este microarray detecta 350 microRNAs de rata, cada uno de ellos replicado 20 veces. 223 microRNAs son estudiados mediante 2 oligonucleótidos diferentes, 8 microRNAs mediante 3 oligonucleótidos y 116 microRNAs mediante 4 oligonucleótidos. Solo 3 microRNAs son

analizados mediante 1 sólo oligonucleótido. El resto de sondas son un conjunto de controles replicados varias veces, los cuales Agilent no recomienda que se utilicen para normalizar sino únicamente para evaluar la eficiencia del marcaje e hibridación.

Los datos de intensidad de fluorescencia de cada una de las sondas (oligonucleótidos), es decir Raw Data (*.gpr), se obtuvieron mediante el software GenePix pro 6.0. Los archivos *.gpr se transforman en *.txt mediante Excel. Posteriormente, se corrigió el background mediante normexp (Ritchie et al., 2007) y se realizó una normalización entre arrays para asegurar la correcta comparación de datos entre ellos con Quantile normalization (Bolstad, 2001).

El análisis estadístico del estudio de expresión diferencial se realizó mediante el test bayesiano denominado LIMMA (Linear Models for Microarray Analysis, Smyth, 2004) y los datos se corrigieron para test-múltiple mediante FDR (False Discovery Rate, Benjamini and Hochberg, 1995). Los principales valores estadísticos que se tuvieron en cuenta para filtrar los datos fueron:

M: Tasa de cambio o “Fold Change” en log₂ del ratio del tratamiento versus control. La correspondencia en cambio lineal (en valor absoluto) es la columna denominada “LINEAL Fold Change”.

p-value FDR: p-value ajustado por “False discovery rate” indica la tasa de falsos positivos respecto a una tasa hipotética calculada (índice de confianza), es decir, a menor p-value ajustado, mayor probabilidad de que la diferencia observada sea debido a un cambio de expresión y no a un cambio azaroso.

p-value sin ajustar: indica la probabilidad de que un cambio de expresión de una lista de genes significativos sea debido al azar. Es decir, es un índice de confianza cuyo mínimo debe ser establecido con la siguiente premisa: a menor p-value, mayor probabilidad de que la diferencia observada sea consecuencia de la condición experimental. Los dos p-value sirven para establecer un grado de confianza que permita decidir qué cambios son creíbles. En nuestro caso se utilizó el p-value sin ajustar para definir el grado de confianza de los cambios de expresión.

C.6.4. Retrotranscripción de microRNAs y mRNA.

Para la retrotranscripción de los microRNAs se usó la tecnología de Applied basada en “Stem-Loop RT primers” de tal manera que cada primer en forma de bucle se une específicamente a su microRNA diana, retrotranscribiéndose solamente el microRNA elegido. Por tanto se realizó una retrotranscripción por cada muestra y primer.

El stock de RNA, normalmente guardado a 200 ng/μl a -80°C se descongeló en hielo durante unos minutos, y se realizó una dilución seriada hasta obtener un RNA a 2 ng/μl. Para cada RT se usó 5 μl de este RNA lo que supone una cantidad total de 10 ng de RNA, 0,15 μl de dNTPs, 0,2 μl de RNase inhibitor, 0,1 μl de enzima retrotranscriptasa, 0,3 μl del “stem-loop primer” específico, y el resto de agua hasta completar 10 μl finales según el protocolo de “Taqman microRNA reverse Transcription kit” (Applied Biosystem, ref: 4366597). La reacción se llevó a cabo en un termociclador Mycycler de Biorad con el siguiente programa: 30 minutos a 16°C, 30 minutos a 42°C, 5 minutos a 85°C y mantenidos a 4°C. Los cDNAs se mantuvieron a -20°C hasta que se realizaron las qRT-PCRs.

En el caso de retrotranscribir mRNA se utiliza 1 μg de RNA que se pasa a cDNA mediante la enzima Superscript-III™ de Invitrogen y usando oligo-dT como cebador que se une específicamente a las colas poli-T de los RNA mensajeros. La reacción se lleva a cabo en un termociclador de Biorad, incubándose primero durante 5 minutos a 65°C para eliminar las posibles estructuras terciarias del RNA y se sigue con la fase de retrotranscripción propiamente dicha a 42°C durante 45 minutos. Las muestras se mantienen a 4°C hasta que se recogen del termociclador y se guardan a -20°C hasta que se realice la qRT-PCR.

C.6.5. Cuantificación relativa de la expresión génica o de la expresión de microRNAs mediante Taqman qRT-PCR.

Las qRT-PCRs se realizaron usando primers y sondas Taqman específicas de cada gen o microRNA validados por la marca Applied Biosystem. Cada reacción se realizó por triplicado y constó de 1μl de la mezcla de primers y sondas, 10 μl de master

mix, 8 µl de agua y 1 µl de cDNA, para un total de 20 µl finales. El programa de amplificación fue el estándar para sondas Taqman consistente en 10 minutos a 95°C y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C seguidos de 60 segundos a 60°C. En todos los casos el annealing y la síntesis de DNA se realizaron en el mismo paso a 60°C. Todas las qRT-PCRs y la toma de datos se realizaron en la máquina 7900HT de Applied Biosystem utilizando el software SDS 2.4 y el RQ Manager 1.2.1 para obtener los Cts. El análisis estadístico y la cuantificación relativa mediante el método del $2^{\Delta\Delta Ct}$ se realizó en el DataAssist v2.0 tomando como referencia para normalizar la expresión de los genes endógenos U87 para los microRNAs y beta-actina y gapdh para la expresión génica de mRNA.

C.7. PCR-array de apoptosis celular.

Se utilizó el panel de PCR “Rat Apoptosis RT² Profiler PCR Array” (Cat. PAHS-012) de SA Bioscience que permite el análisis de expresión de un panel de 84 genes involucrados en la muerte celular utilizando una PCR a tiempo real 7900HT de Applied. Obtuvimos el RNA de cardiomiocitos adultos de rata sometidos a I/R tratados y sin tratar con Ucn y fueron retrotranscritos utilizando el kit RT2 First Strand recomendado por SA Bioscience. El cDNA obtenido fue mezclado con la master mix RT2 SYBR Green qPCR de SA Bioscience y cargado por igual en todos los pocillos del array donde están pre-cargados los primers de cada ensayo. El experimento consistió en enfrentar los datos de amplificación de las muestras tratadas con Ucn contra el control sin tratar para poder realizar una cuantificación relativa de la expresión de los 84 genes de interés mediante el método $2^{\Delta\Delta Ct}$ descrito anteriormente para la qRT-PCR convencional.

Debido a la naturaleza del array, y para tratar de minimizar la variabilidad intrínseca de un experimento único, realizamos un pull de cDNAs mezclando equitativamente los cDNAs de cuatro experimentos independientes, lo que nos daba cierta garantía en los resultados obtenidos. No obstante los resultados obtenidos en el array fueron sometidos a validación mediante qRT-PCR para obtener datos estadísticamente significativos.

C.8. Detección de apoptosis y necrosis. Ensayo de Annexin V/ Ioduro de Propidio.

Para determinar el tipo de muerte celular involucrada en la protección por Ucn usamos el kit "Annexin V- FITC kit" (Cat. 4830-01-K. Trevigen) para detectar células en apoptosis y necrosis en cultivo de cardiomiocitos adultos de rata. Durante la apoptosis ocurre una rápida y ubicua exposición de fosfatidil-serina en la superficie celular que es susceptible de unirse a Annexin-FITC y ser detectado por fluorescencia. A su vez el ioduro de propidio (IP) es usado para determinar la población celular que ha perdido la integridad celular, lo que indica necrosis o apoptosis tardía.

Brevemente, cardiomiocitos adultos de rata fueron sembrados en una micro-placa de 6 canales "µ-Slide VI 0,4, de IBID". Las células fueron incubadas normalmente, se les realizó los tratamientos oportunos y el protocolo de I/R descrito anteriormente. Posteriormente las células fueron tratadas in vivo; Se incubaron con 100 µl del binding buffer proporcionado por el kit, con 1 µl de Annexin-FITC durante 1 hora. Entonces se añadió 1 µl de IP y se incubó durante 15 minutos más. Después de los lavados se procede a la toma de imágenes de fluorescencia en el microscopio confocal "Leica TCS SP2". Se tomaron 5 imágenes por condición y en 5 experimentos diferentes usando el objetivo HCX PI Apo CS 40x mediante proyección máxima en el eje z. Las imágenes fueron analizadas mediante el programa "Image J" para cuantificar el porcentaje respecto del total de células: i) sin marcaje (viables), ii) marcadas sólo con Annexin-FITC (apoptosis) y iii) marcadas con IP (necrosis).

C.9. Actividad de las Caspasas 3/7, 8 y 9.

Para determinar la actividad de las caspasas usamos el kit Caspase-Glo de Promega: i) TB323 para caspasas 3/7, ii) TB332 para caspasa 8, iii) TB333 para caspasa 9. El ensayo proporciona un sustrato sensible de cada caspasa con actividad luciferina al ser degradado, y una luciferasa termoestable. La actividad luciferasa es proporcional a la actividad de la caspasa de cada ensayo. Cultivos de cardiomiocitos tratados y sometidos al protocolo de I/R descrito fueron utilizados para extraer proteínas mediante lisado celular. Los extractos de proteínas fueron estabilizados en nitrógeno

líquido y conservados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento del ensayo. En una placa de 384 pocillos se cargó $10\text{ }\mu\text{l}$ de proteínas a $1,5\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ junto con $10\mu\text{l}$ del agente. Se cargaron 5 réplicas de cada condición, y se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente. La señal luminiscente fue detectada en el luminómetro “Luminoskan Ascent microplate Luminometer”(Thermo Scientific) cada 15 minutos. La cuantificación y análisis fue realizado con el programa Sigmaplot.

C.10. Ensayo de citotoxicidad por detección de LDH.

Como medida de la citotoxicidad o muerte celular de nuestros cultivos realizamos un ensayo de detección de los niveles de actividad de la enzima Lactato deshidrogenasa (LDH) presente en el medio extracelular. Esta enzima está presente normalmente en el citoplasma de las células vivas y se libera en el medio de cultivo celular al permeabilizarse la membrana de las células muertas. Para ello recogimos los medios de cultivo de cardiomiocitos sometidos al protocolo de I/R tratados y sin tratar con Ucn. Este medio fue centrifugado a 5000 rpm durante 5 minutos a 4°C para eliminar posibles restos celulares, y el sobrenadante obtenido fue congelado en nitrógeno líquido y guardado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la realización del ensayo. Para medir la actividad LDH utilizamos el kit “LDH cytotoxicity assay Kit (601170)” de Cayman según el protocolo: en una placa de 96 pocillos añadimos $50\text{ }\mu\text{l}$ de medio de cultivo y $50\text{ }\mu\text{l}$ de la mezcla de reacción del kit e incubamos durante 30 minutos. Posteriormente se procede a la lectura de la absorbancia a 490 nm. Después de sustraer los valores correspondientes al blanco cada valor fue referido al valor de máxima citotoxicidad y mostrado en porcentaje.

C.11. Búsqueda bioinformática de genes dianas para los microRNAs.

Para determinar las posibles dianas de los microRNAs que obtuvimos mediante el array de expresión realizamos un análisis bioinformático mediante software libre: miRBASE, DIANA, TargetScan, PicTar, miRanda.

Las predicciones se basan en los híbridos que se forman entre el microRNA y el mRNA. Estos híbridos se calculan mediante modelos termodinámicos “minimum free

energy algorithm” y donde se buscan algunas propiedades importantes como la energía libre, existencia de una región semilla (seed region), número de desemparejamientos, número de bucles, pero también la “accesibilidad” de la estructura secundaria y la interacción entre varias dianas en la misma 3’ UTR.

La predicción de dianas de microRNAs se basa fuertemente en la presencia de un “seed” (emparejamiento perfecto de los 7 primeros nucleótidos entre el extremo 5’ del microRNA y la región 3’ UTR) aunque se estima que aproximadamente el 40% de todas las dianas no tienen “seed” sino regiones compensatorias, es decir muchos emparejamientos entre el extremo 3’ del microRNA y la UTR 3’

Cada software tiene un algoritmo determinado donde se prima una u otra propiedad, y debido a la gran cantidad de variables en juego es habitual encontrar grandes diferencias entre los resultados de uno u otro programa. En nuestra búsqueda bioinformática realizamos el análisis con 5 softwares diferentes y elegimos aquellos genes diana que cumplieran los siguientes requisitos: i) que estuvieran dentro de los 15 primeros resultados de cada programa bioinformático. ii) que estuvieran presentes en al menos 2 algoritmos diferentes. iii) que el gen tuviera una descripción en la bibliografía científica que lo relacionara con alguna patología cardiovascular, preferentemente las relacionadas con daños por IAM o remodelado ventricular.

De esta manera obtuvimos una relación de genes candidatos a ser dianas de los microRNAs seleccionados. Para poder demostrar in-vivo que estos genes eran de verdad dianas de nuestros microRNAs analizamos la diferencia de expresión de dichos genes en cardiomiocitos neonatales de rata en los que sobre-expresábamos el microRNA de interés mediante un vector lentiviral.

C.12. Producción de lentivirus de sobreexpresión de microRNAs.

C.12.1. Construcción de los vectores pSD-lenti_125, pSD-lenti_139, pSD-lenti_324.

El vector pSD fue cedido por el grupo del Dr. Pintor-Toro del instituto de investigación Cabimer bajo la autorización de su creadora la Dra. Collins. El vector pSD tiene una zona de multiclonning-site con las dianas de restricción BamHI-NotI que utilizamos para clonar la secuencia pre-miRNA de unas 500 pb de nuestros microRNAs.

La secuencia de cada pre-miRNA fue obtenida de la web miRBase. Diseñamos primers de PCR para las regiones flanqueantes añadiéndole la secuencia de restricción BamHI en la región 3' y la secuencia NotI en la región 5'.

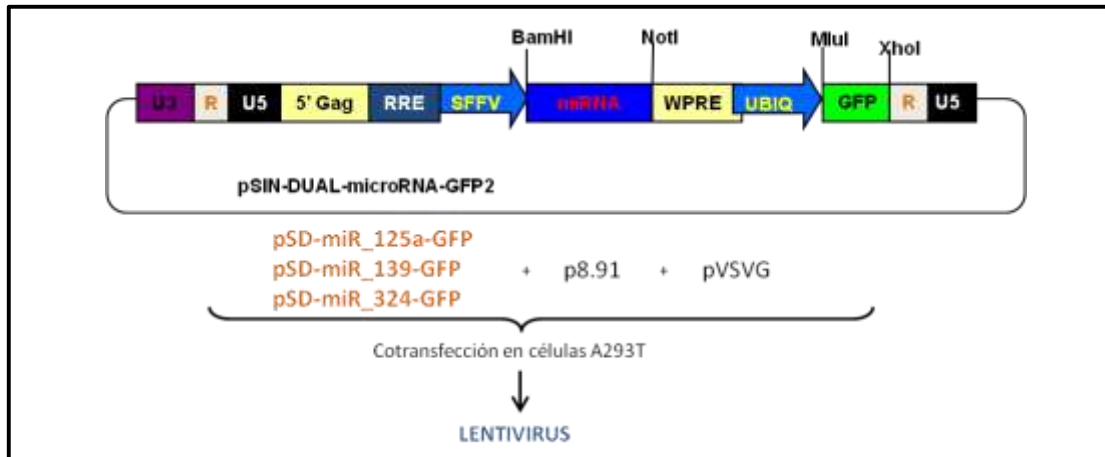


Figura C1. Esquema del plásmido de sobreexpresión de microRNAs pSIN-DUAL-microRNA-GFP2 para la producción de lentivirus.

Realizamos una PCR con dichos primers sobre DNA de rata extraído de la cola de rata mediante PCRTail (Viagen) para amplificar cada pre-miRNA clonado. El producto de PCR se utilizó directamente para ligar en el plásmido pGEM-T que está optimizado para clonar productos de PCR. Posteriormente procedimos a realizar las digestiones con las enzimas de restricción BamHI y NotI tanto en nuestras construcciones pGEM-T_lenti_(125, 324, 139) como en el vector pSD_GFP.

En ambos casos el corte con BamHI-NotI fue analizado por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% donde confirmamos la presencia de un inserto de unas 500 pb y una banda superior de 3Kb en el caso del pGEM-T y de unas 10Kb en el caso del pSD-GFP.

Tanto la banda de 500pb de nuestros pre-miRNAs como la banda de 10kb del pSD fueron aisladas del gel de agarosa y purificadas por el kit "QIAquick gel extraction kit" de Qiagen.

Realizamos una ligación de nuestros pre-miRNAs y el plásmido pSD con los extremos BamHI y NotI y obtuvimos una serie de clones positivos que fueron confirmados por la misma restricción en gel de agarosa y mediante secuenciación en "Secugen SL".

C.12.2. Producción de los virus.

Utilizamos un sistema lentiviral que consta de 3 plásmidos lentivirales:

- i) p8.91. Contiene los genes virales estructurales, de replicación, y regulación del virus.
- ii) pVSV-G. Expresa la envuelta glicoproteica del virus VSV desde un promotor de CMV, reemplazando el gen “env” del lentivirus.
- iii) pSD-lenti_(125, 139, 324). Plásmido de sobreexpresión donde se clona el pre-miR de interés y que además expresa GFP.

Estos tres plásmidos fueron cotransfectados en células HEK mediante CaCl₂ usando el kit CalPhos de Cultek. Se prepara una mezcla de transfección con 3 µg del plásmido p8.91, 6 µg del pVSV, y 9 µg del pSD-lenti, y 85 µl de la solución de Ca²⁺ 2M en 700 µl totales. Luego se añade gota a gota 700 µl de HBS (50 mM Hepes, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, pH 7) y se incuban 10 minutos a temperatura ambiente. Acto seguido se añade poco a poco sobre 10 ml de medio de cultivo directamente en la placa de cultivo de 15 cm y se dejan en el incubador toda la noche. A la mañana siguiente se cambia el medio y se deja de nuevo 48 horas en cultivo. En este momento se recoge el medio de cultivo y se ultracentrífuga a 50000 g durante 2 horas. El precipitado se resuspende en 100 µl de PBS con 1% de BSA y se procede al título de los virus.

Para titular los virus obtenidos se realizaron diluciones seriadas de partículas virales utilizadas para infectar un cultivo de cardiomiocitos neonatales de rata sembrados en una placa de 24 pocillos. A las 24 horas se analizó la expresión de GFP por microscopía fluorescente invertida hasta detectar la menor dilución de virus que consigue infectar el 100% de células, y extrapolando el tamaño del pocillo de la placa de 24 al que usaremos en los experimentos, placas de 6 pocillos, obtuvimos la cantidad de virus que tenemos que usar para cada construcción lentiviral.

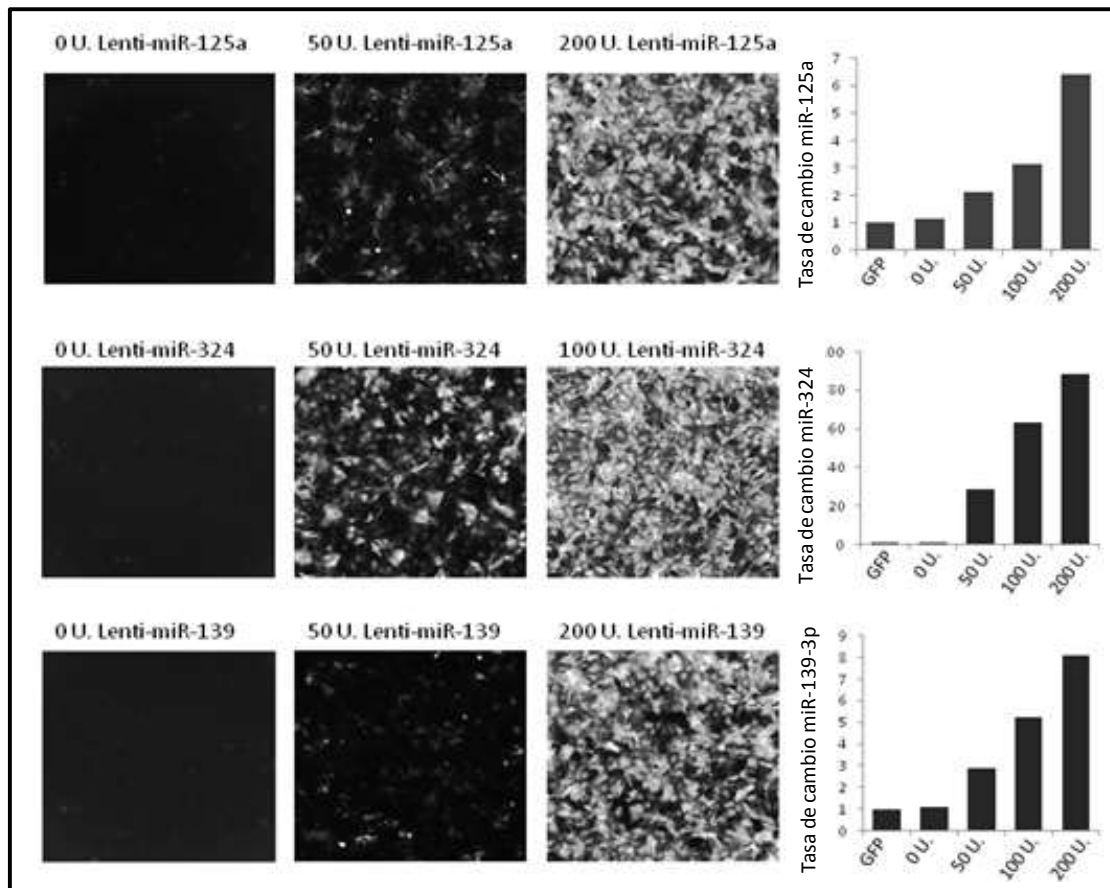


Figura C2. Imágenes de cultivos de cardiomiocitos neonatos de rata infectados con dosis crecientes de lentivirus de sobreexpresión de miR-125a, miR-139-3p y miR-324. Y gráficos de cuantificación de la expresión de dichos microRNAs respecto a células infectadas con el vector control.

En la figura C2 se muestran imágenes de microscopía de fluorescencia de cultivos de cardiomiocitos infectados con diferentes dosis de lentivirus donde puede verse cómo la gran mayoría de células del cultivo están marcadas en verde, debido a la proteína GFP que actúa como “reporter” en el vector lentiviral usado. Además se presenta un gráfico con la cuantificación de los niveles de cada microRNAs en los cultivos infectados con cada lentivirus. En todos los casos se consigue un aumento en la tasa de cambio de cada microRNA al menos seis veces mayor.

C.12.3. Infección de cardiomiocitos con lentivirus de sobreexpresión de microRNAs.

Aislamos y sembramos 1,8 millones de cardiomiocitos neonatales de rata por pocillo en placas de cultivo de 6 pocillos. A las 48h de la dispersión añadimos la cantidad estimada en el título de partículas virales sobre 1 ml de medio de cultivo. Se incubó durante 16h en el incubador de cultivo hasta la mañana siguiente, donde comprobamos por microscopio de fluorescencia invertido la calidad de infección de

nuestro cultivo. Y en el caso de haberse obtenido una alta eficiencia de infección se procede a la extracción de RNA.

C.13. Estudio de los microRNAs circulantes en pacientes con IAM reperfundido: estudio miR-IAM.

El estudio miRIAM es un estudio prospectivo longitudinal con seguimiento a un año, cuyo objetivo es determinar la cinética de liberación de los microRNAs en pacientes sometidos a angioplastia primaria (ACTP) tras infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST (STEMI) durante las primeras 48 h de ingreso. Y a largo plazo correlacionarlo con aparición de remodelado adverso e insuficiencia cardíaca, para lo cual se realiza un seguimiento clínico con técnicas de imagen de ecografía al alta, una prueba RMN a los 30 días del alta y una prueba ecocardiográfica un año después.

Los criterios de inclusión son lo suficientemente estrictos para obtener una cohorte muy homogénea, y donde la liberación de microRNAs sea debida exclusivamente a un proceso de I/R. Los criterios de inclusión fueron: Edad <75 años, IAM de localización anterior con menos de 6 horas de evolución en el momento de empezar la coronariografía, y flujo TIMI 0-1 en la arteria responsable del infarto. Y los criterios de exclusión: historia previa de cardiopatía isquémica, negativa a participar en el estudio por el paciente o insuficiencia renal con filtrado glomerular menor de 30 ml/min.

Como grupo control se incluyeron pacientes a los que se les realizó coronografía por dolor torácico que resultaron sin afectación de las arterias coronarias. En el momento de realizar estos experimentos contamos con una cohorte de 10 pacientes y 8 controles.

De forma más específica el objetivo del estudio era comparar los microRNAs presentes en el momento justo antes de realizar la intervención de ACTP, frente a las muestras obtenidas tras la reperfusión, de modo que podamos describir qué microRNAs son liberados específicamente por el proceso de reperfusión. El protocolo para la obtención de las muestras de sangre fue el siguiente: a cada paciente se le

extrajeron 2 muestras de sangre periférica en los siguientes momentos: 0h justo antes de empezar el cateterismo, y 3h, 12h, 24h y 48h después de la ACTP.

En cada punto temporal se extrajeron dos muestras de sangre: una dedicada a la obtención del suero (tubo “clot activator” con 9 ml de sangre) para el análisis de microRNAs en el laboratorio, y la otra (tubo “lithium heparin” con 4 ml de sangre) para las siguientes determinaciones bioquímicas realizadas en el laboratorio del hospital: CPK, Tn T ultrasensible, y NT-proBNP.

En el estudio miRIAM la determinación del perfil de expresión de los microRNAs presentes en el suero de pacientes se realizó mediante arrays de expresión, sin embargo en lo que concierne a esta tesis hicimos una determinación directa de los microRNAs miR-125a, miR-139-3p y miR-324, mediante qRT-PCR tal como se describió en el apartado correspondiente.

C.14. Análisis de datos.

Cada experimento ha sido repetido al menos 5 veces independientes a no ser que se indique expresamente lo contrario. Los datos fueron normalizados respecto al resultado en los controles no tratados designados como 100% en la mayoría de los casos. Todos los resultados han sido presentados como la media \pm desviación estándar. La comparación entre el grupo control y el grupo con tratamiento se llevó a cabo mediante el análisis por el test de t-Student si los datos se ajustan a una desviación normal o por el test de Mann-Whitney en caso contrario. Las medias entre diferentes grupos tratados se compararon mediante el análisis de la varianza (ANOVA).

D.
RESUL
TADOS

D. RESULTADOS

La Urocortina es un péptido con carácter cardioprotector, producido y liberado de manera endógena por las células cardíacas en una situación de estrés como es el caso de un infarto agudo de miocardio. Esta tesis se centra en el estudio de Urocortina-1 (Ucn), la cual administrada de forma exógena proporciona a diferentes niveles protección frente a los daños de I/R. Veremos primero cómo la aplicación de Ucn en un modelo animal de I/R in vivo produce una mejor recuperación de la contractilidad del corazón medida mediante la fracción de eyección por ecocardiografía. Esto se reproduce en corazón aislado en sistema Langendorff donde obtenemos una mejor recuperación de los parámetros hemodinámicos tras una I/R. Posteriormente nos centramos en los efectos a más largo plazo sobre la supervivencia y muerte celular de los cardiomiocitos, y tratamos de profundizar en los cambios de expresión génica y su regulación, incluyendo en este contexto la caracterización de nuevos microRNAs que participan en las vías de señalización de Ucn.

D.1. Estudio de Urocortina en un modelo animal de isquemia/reperfusión in vivo.

D.1.1. El daño por isquemia en un modelo animal aumenta los niveles de Urocortina en sangre y del receptor CRF-R2 en el miocardio.

A continuación se detallan una serie de resultados obtenidos en un modelo animal de I/R en rata que ha sido descrito en el apartado de materiales y métodos. El modelo fue validado como puede verse en la figura 1A mediante cálculo de la fracción de eyección (FE) por ecocardiografía 1 y 6 semanas después de realizar la intervención, parámetro indicativo de la contractilidad del corazón. Como se puede observar la FE en un corazón de rata sano se sitúa alrededor del 70%, valor obtenido siempre para cada animal antes de realizar la intervención (Pre). La FE en el grupo de ratas SHAM no varía en ningún momento tras la intervención, mientras que se ve significativamente reducida en las ratas con un IAM de 1 semana, y aún más reducida a las 6 semanas. En el grupo de I/R se ve una reducción significativa de la FE a 1 y 6 semanas, de igual amplitud. Por su parte la disminución de la FE es significativamente menor en el

modelo de I/R respecto al IAM. Es decir la reperfusión reduce el daño isquémico en el modelo animal.

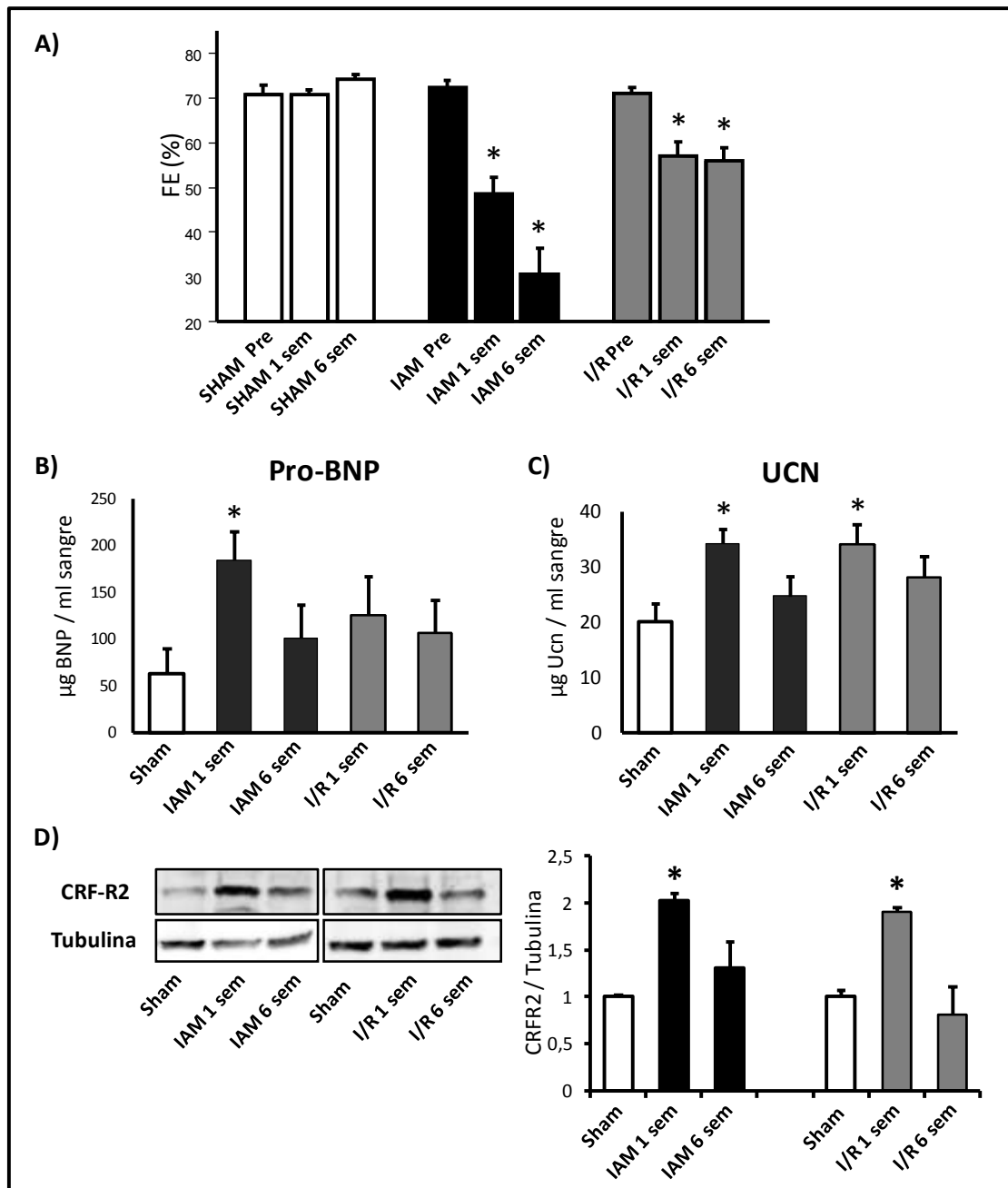


Figura 1. Estudio de los niveles de Ucn y su receptor CRF-R2 en un modelo animal de I/R. A) Estudio ecocardiográfico de la fracción de eyección para validar el modelo de infarto agudo de miocardio (IAM) y de I/R tanto a 1 como a 6 semanas. En ambos modelos se muestra una reducción de la capacidad contráctil, tanto en IAM como en I/R, respecto a ratas sham. B) y C) Niveles circulantes de los péptidos pro-BNP y Ucn respectivamente, en el modelo animal de IAM e I/R. D) Imágenes de Western-blot del receptor de Ucn (CRF-R2) en muestras de tejido cardiaco en un modelo de IAM e I/R en rata. Y gráfico con su cuantificación respecto a la tubulina endógena.

A partir de este modelo obtuvimos muestras de sangre de estos animales y analizamos la cantidad del precursor del péptido natriurético B (Pro-BNP) y de Ucn

presente en la fracción plasmática. En la figura 1B se observa un aumento significativo del nivel de pro-BNP en sangre en el grupo de ratas con IAM a 1 semana, lo que nos sirve de control de daño miocárdico, y posible aparición de remodelado o insuficiencia cardiaca en nuestro modelo. Sin embargo no encontramos mayores niveles de pro-BNP a las 6 semanas del IAM respecto al grupo sham. Por su parte tampoco en el modelo animal de I/R encontramos diferencias en el nivel de pro-BNP en sangre respecto al grupo sham, tanto a 1 como a 6 semanas.

En la figura 1C se observa un incremento significativo de la cantidad de Ucn en sangre 1 semana después de realizar la lesión tanto en el modelo de IAM como I/R. Sin embargo a las 6 semanas en ambos casos hay una recuperación a niveles basales, lo que da idea de que la liberación de Ucn es un proceso relativamente agudo tras una lesión isquémica.

Posteriormente analizamos la expresión del receptor de Ucn CRF-R2 en el tejido miocárdico de estos animales. En la figura 1D se muestra una imagen representativa de los WB para el receptor CRF-R2, donde se observa una mayor expresión en las muestras de IAM e I/R a 1 semana. Como se puede observar en el gráfico adjunto estos valores son estadísticamente significativos a 1 semana, mientras que no se encontraron diferencias entre las ratas sham y las lesionadas a las 6 semanas, dando idea de que tanto la liberación de Ucn como el proceso de señalización celular posterior ocurren a corto plazo tras una lesión isquémica, restableciéndose tiempo después.

D.1.2. Tratamiento con Urocortina en un modelo de isquemia/reperfusión in vivo.

A continuación mostramos los resultados de un protocolo de tratamiento cardioprotector con Ucn en el modelo animal de I/R in vivo. El tratamiento consistió en la administración intravenosa de 150 µg/Kg de Ucn 5 minutos antes de liberar la ligadura de la arteria coronaria, es decir momentos antes de la reperfusión. En la figura 2A mostramos imágenes representativas de ecocardiografías realizadas 1 semana después de realizar el modelo. Las imágenes de las ratas sham presentan una diferencia de amplitud entre sístole y diástole que refleja una contractilidad normal. La cual se ve claramente disminuida en I/R. Sin embargo el tratamiento con Ucn frente a

I/R mantiene una amplitud más parecida a las ratas sham, lo que indica una recuperación de la contractilidad del corazón después de la lesión por I/R. En la figura 2B se muestra un gráfico con el análisis cuantitativo de estas imágenes representando la FE. Las ratas sham muestran un valor de FE normal de aproximadamente el 70%. Dicha FE se ve significativamente reducida en las ratas que sufren una I/R, es decir la I/R reduce de manera clara la contractilidad del corazón. En las ratas tratadas con Ucn frente a I/R la contractilidad aunque no llega a los valores iniciales, es recuperada significativamente respecto al grupo I/R sin tratar.

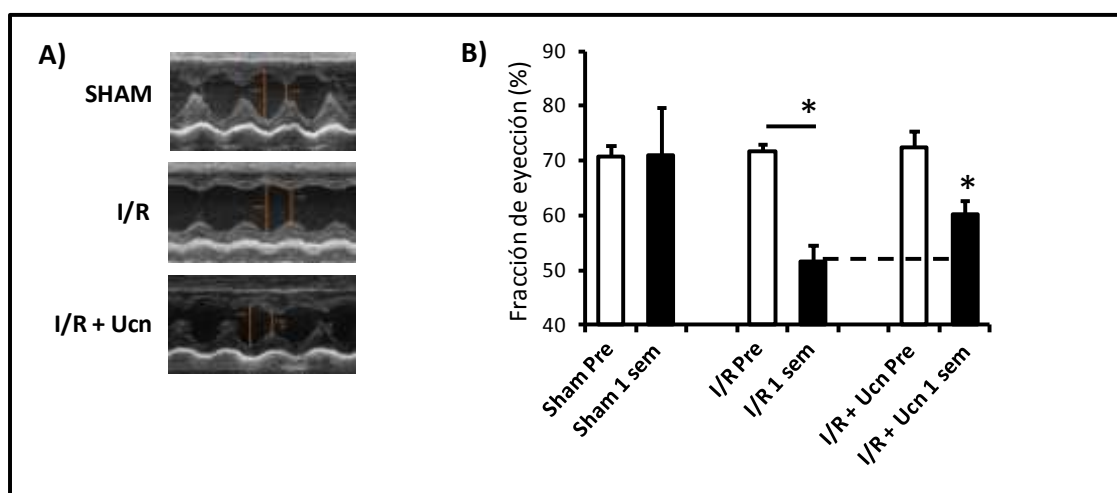


Figura 2. Estudio de la fracción de eyección en un modelo animal de I/R tratado con Ucn. A) Imágenes ecocardiográficas de secuencia continua donde se muestra la pérdida de contractilidad del corazón de una rata sometida a I/R con 1 semana de evolución respecto a otra sham, y como es recuperada en una rata a la que se le administró un bolo intravenoso de 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de Ucn. B) El gráfico muestra la cuantificación de la fracción de eyección en dichas condiciones.

D.2. Estudio hemodinámico en corazones de rata sometidos a isquemia/reperfusión en un sistema Langendorff ex vivo.

D.2.1. Urocortina mejora los parámetros hemodinámicos tras una isquemia/reperfusión.

Para evaluar el efecto cardioprotector de Ucn frente al daño por I/R sobre los parámetros hemodinámicos del corazón, utilizamos corazones de ratas aislados y perfundidos ex vivo en un sistema Langendorff. Aplicamos un protocolo de I/R que consistió en una isquemia de 40 minutos seguido de 1 hora de reperfusión. Como puede verse en la figura 3A los corazones sometidos a este protocolo de I/R ven reducida aproximadamente en un 40% su contractilidad después de I/R medida como

la derivada de la presión sistólica ejercida por el ventrículo izquierdo en relación al tiempo (+dP/dt). En estas mismas condiciones los corazones tratados con 10nM de Ucn durante todo el protocolo tienen una recuperación casi total de la contractilidad después de I/R. Además el tratamiento con Ucn produce una mejor recuperación del resto de parámetros hemodinámicos después de I/R. En las figuras 3B y 3C puede verse respectivamente una menor presión diastólica final (LVEDP) y menor resistencia vascular (RV) en los corazones tratados con Ucn frente a I/R sin tratar.

D.2.2. Urocortina realiza su acción cardioprotectora a través de las vías Erk1/2 y EPAC.

Ucn se une con gran afinidad al receptor CRF-R2 en el tejido cardiaco, receptor asociado a proteína G que incrementa los niveles de AMP cíclico. Dado que los principales efectores de AMP cíclico en corazón son la proteína kinasa A (PKA) y EPAC, quisimos evaluar la implicación de dichos efectores activados por AMP cíclico sobre la mejora de la contractilidad obtenida con Ucn frente a I/R en corazones aislados en sistema Langendorff. En la figura 4A puede observarse como la inhibición de PKA mediante la aplicación de 1 μ M de H89 durante el tratamiento de Ucn no altera la mejora de la contractilidad obtenida con Ucn. Sin embargo al inhibir EPAC mediante 20 μ M de Brefeldina-A (BFA) se reduce la recuperación de la contractilidad conseguida por Ucn tras I/R, demostrando la implicación de EPAC en dicho proceso.

Por otra parte se conoce que EPAC activa la vía de señalización Ras1-Erk1/2 (Keiper, 2004), vía que también participa en la señalización por Ucn. De modo que tratamos de determinar si esta vía de señalización está implicada en la protección cardiaca mediada por Ucn. En la figura 4B se puede observar cómo los corazones tratados con 10nM de Ucn donde además se inhibe Erk1/2 mediante la aplicación de 5 μ M de PD obtienen peores valores de contractilidad tras I/R. Esto demuestra que Ucn actúa a través de las MAPK-Erk1/2.

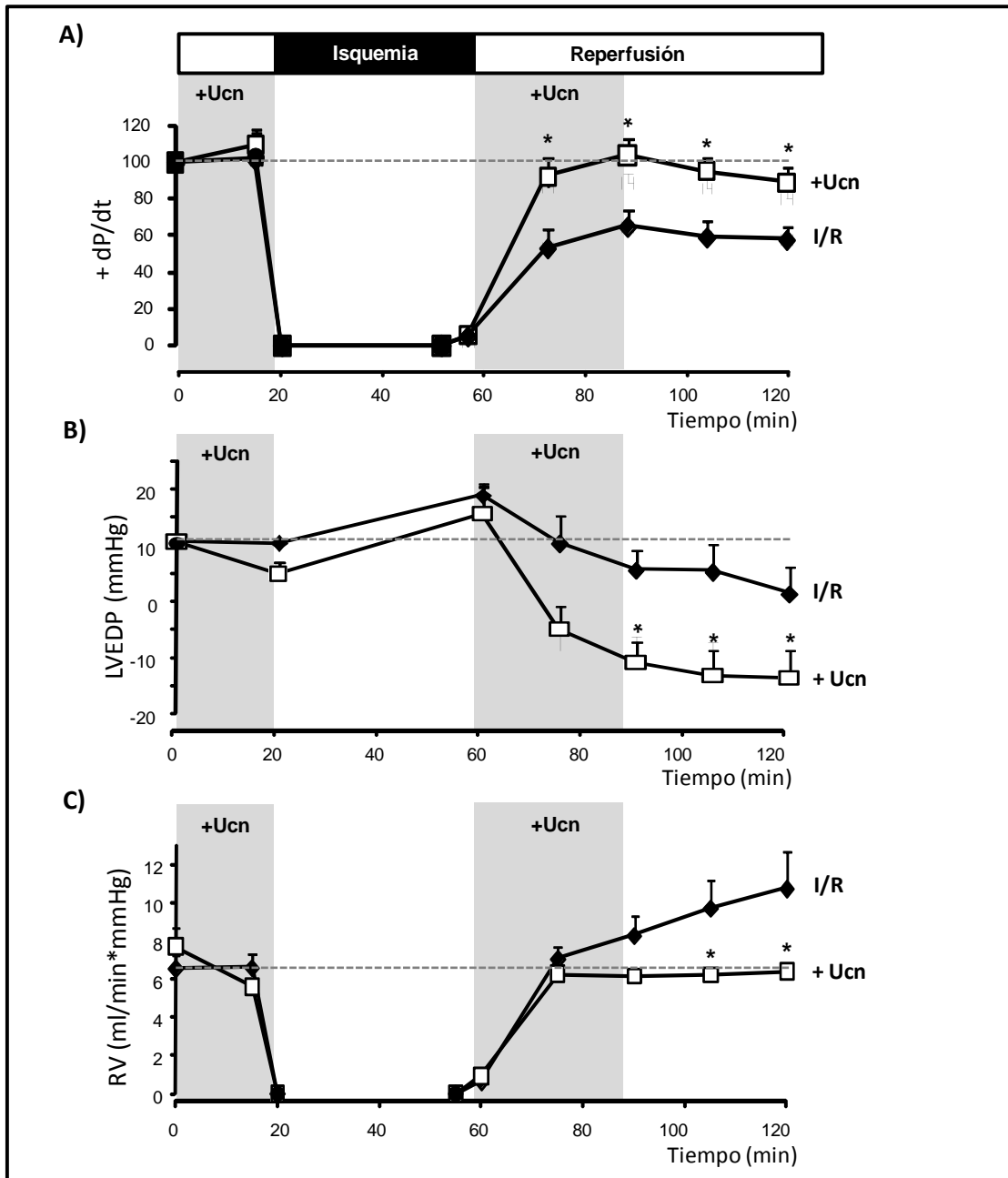


Figura 3. Registro hemodinámico de corazones de rata montados en un sistema Langendorff. Se realizó un protocolo de I/R global por cierre de la perfusión durante 40 minutos y posterior reperfusion. Los corazones tratados con 10nM de Ucn, A) recuperan significativamente la contractilidad tras una I/R reflejada como +dp/dt (derivada de la presión en el tiempo), B) tienen una menor presión diastólica final del ventrículo izquierdo (LVEDP), y C) menor resistencia vascular (RV).

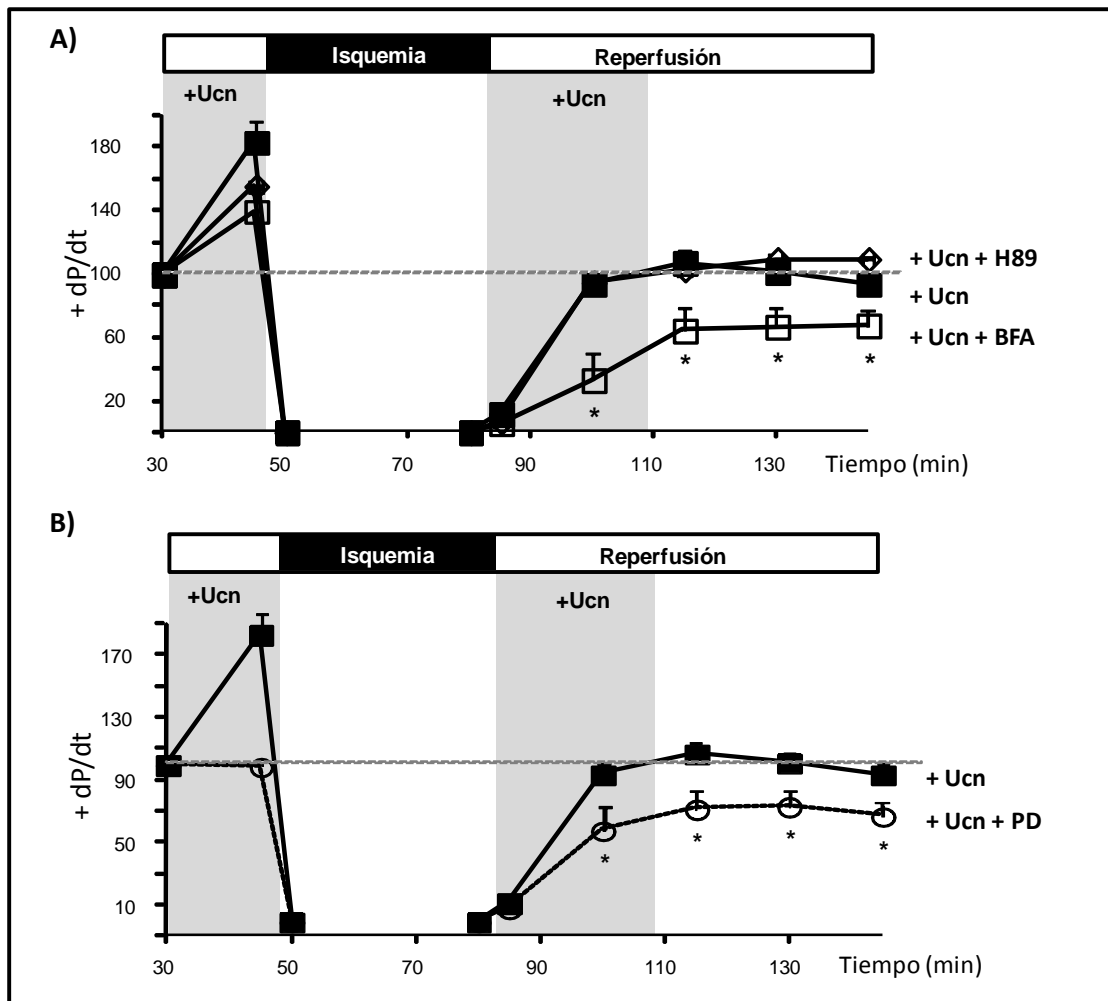


Figura 4. Registro de la contractilidad (+dp/dt) de corazones de rata montados en un sistema Langendorff a los que se les realizó un protocolo de I/R. A) La recuperación en la contractilidad con el tratamiento de Ucn se reduce significativamente con la administración de 20 μ M de BFA, inhibidor de EPAC, mientras que no se afecta por 1 μ M H89, inhibidor de PKA. B) El efecto protector de Ucn sobre la contractilidad se ve contrarrestado con 5 μ M de PD, inhibidor de Erk1/2.

D.2.3. Urocortina regula la vía MapK-Erk1/2 mediante la fosforilación de p42/p44.

Para profundizar en las vías de señalización implicadas y siendo Erk1/2 un elemento clave de la señalización celular, realizamos experimentos de Western-blot (WB) para cuantificar la cantidad de proteína Erk1/2 que estaba siendo fosforilada por Ucn, activando por tanto la vía de señalización dependiente de Erk1/2. Como puede verse en la figura 5 la aplicación de 10nM de Ucn en cultivo de cardiomiocitos adultos sometidos a I/R aumenta la cantidad de proteína fosforilada tanto de la subunidad p44, como de la p42, de Erk. Como cabe esperar, la aplicación en paralelo de Ucn con 5 μ M del inhibidor específico PD, impide dicha fosforilación de Erk1/2. Por tanto Ucn es

capaz de activar mediante fosforilación a Erk1/2, lo que promoverá la activación de toda la cascada de señalización dependiente de Erk1/2.

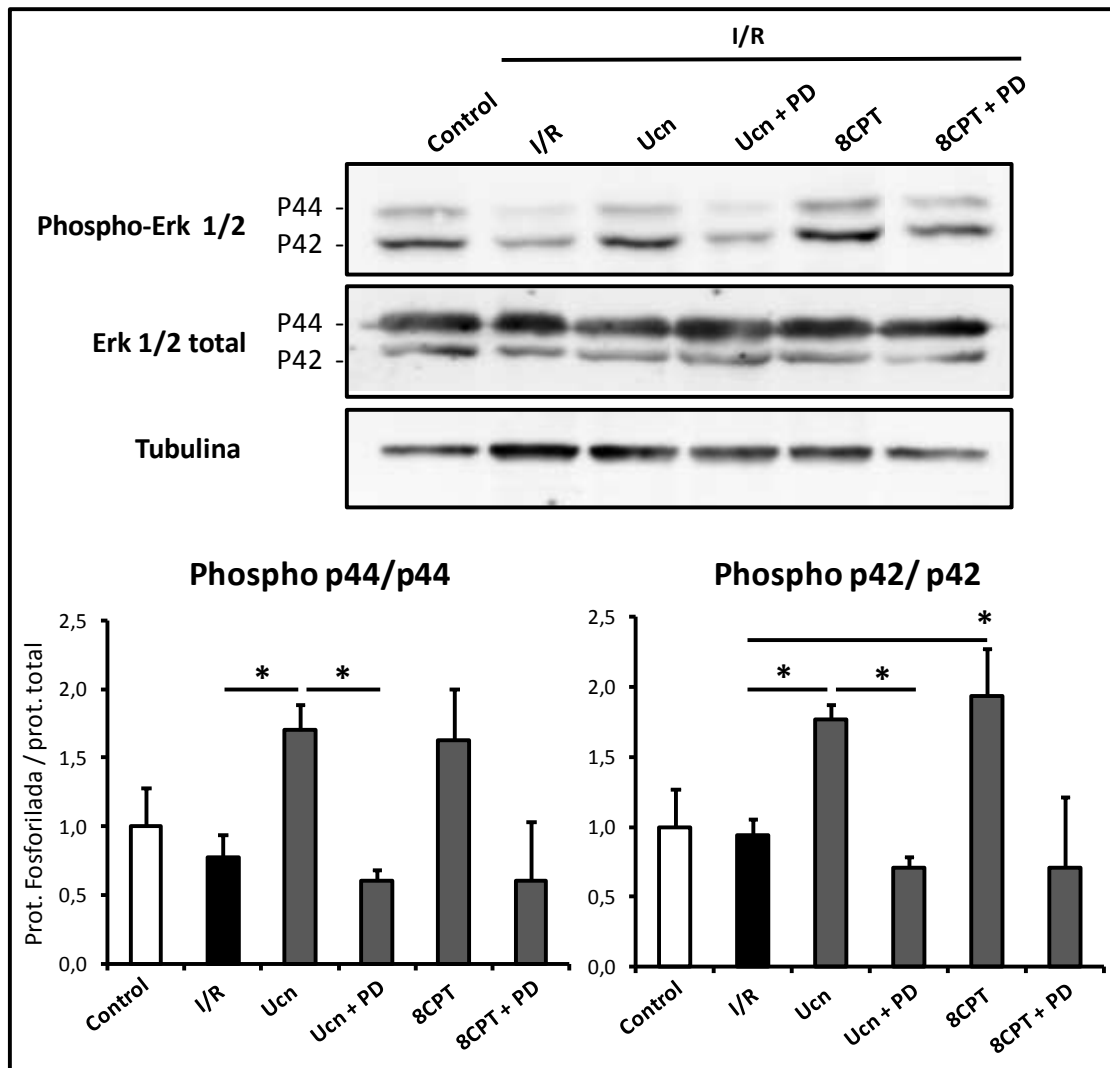


Figura 5. Arriba se muestran imágenes de western blot en cardiomiocitos adultos de rata sometidos a I/R en diferentes condiciones. Abajo la cuantificación de la fracción fosforilada (activa) de las proteínas Erk1/2; tanto p44 como p42, respecto a la cantidad total de erk1/2 (p44 y p42).

Por otra parte como habíamos visto indicios de que Ucn y EPAC estaban relacionados, quisimos determinar si la activación de EPAC era capaz de producir la fosforilación de Erk1/2. Para ello tratamos células sometidas a I/R con 10 μ M de 8CPT, un activador directo de EPAC. Se puede observar como la activación directa de EPAC tiene una tendencia a promover la fosforilación de Erk1/2. Como control usamos 5 μ M de PD para inhibir específicamente Erk1/2 en las células tratadas con 8CPT, y comprobamos como en estas condiciones no se producía dicha fosforilación de Erk1/2,

por tanto estos resultados parecen indicar que Ucn podría activar Erk1/2 al menos en parte también a través de EPAC.

D.3. Papel de Ucn sobre la supervivencia celular de los cardiomiocitos.

D.3.1. Urocortina previene la muerte de cardiomiocitos adultos sometidos a isquemia/reperfusión.

Como hemos visto hasta ahora la aplicación de Ucn tiene un efecto claro sobre la contractilidad del corazón sometido a I/R, y este se debe al menos en parte a la activación de una vía de señalización que incluye a EPAC y a Erk1/2. Pero además de los efectos en agudo sobre la contractilidad que tienen que ver principalmente con la mejora del manejo del Ca^{2+} intracelular (Calderón, 2011), nos interesaba profundizar en el efecto de Ucn sobre la supervivencia celular a más largo plazo, ya que la pérdida de contractilidad del corazón está asociada a la muerte celular de cardiomiocitos.

Para ello realizamos un ensayo de supervivencia celular mediante trypan blue sobre cultivos de cardiomiocitos adultos sometidos a un protocolo de I/R in vitro. En nuestros cultivos celulares de cardiomiocitos la aplicación de 10nM de Ucn previene la muerte celular de dichos cardiomiocitos tras una I/R. En la figura 6 se pueden observar imágenes de cultivos de cardiomiocitos sometidos a I/R tras 18 horas de reperfusión. Respecto a la situación control, el cultivo sometido a I/R presenta un número significativamente mayor de células no viables o muertas. Células morfológicamente identificables por un aspecto hipercontraído y que además incorporan Trypan blue debido al daño en sus membranas. Sin embargo cuando el cultivo de cardiomiocitos sometido a I/R es tratado con 10nM de Ucn se obtiene una mayor proporción de células viables y significativamente menor marcaje de Trypan blue. Como puede observarse en la gráfica de la misma figura 6 los inhibidores de Erk1/2 (PD) y EPAC (BFA) reducen el efecto beneficioso de Ucn sobre la supervivencia, volviendo a encontrarse un mayor número de células no viables marcadas con Trypan blue.

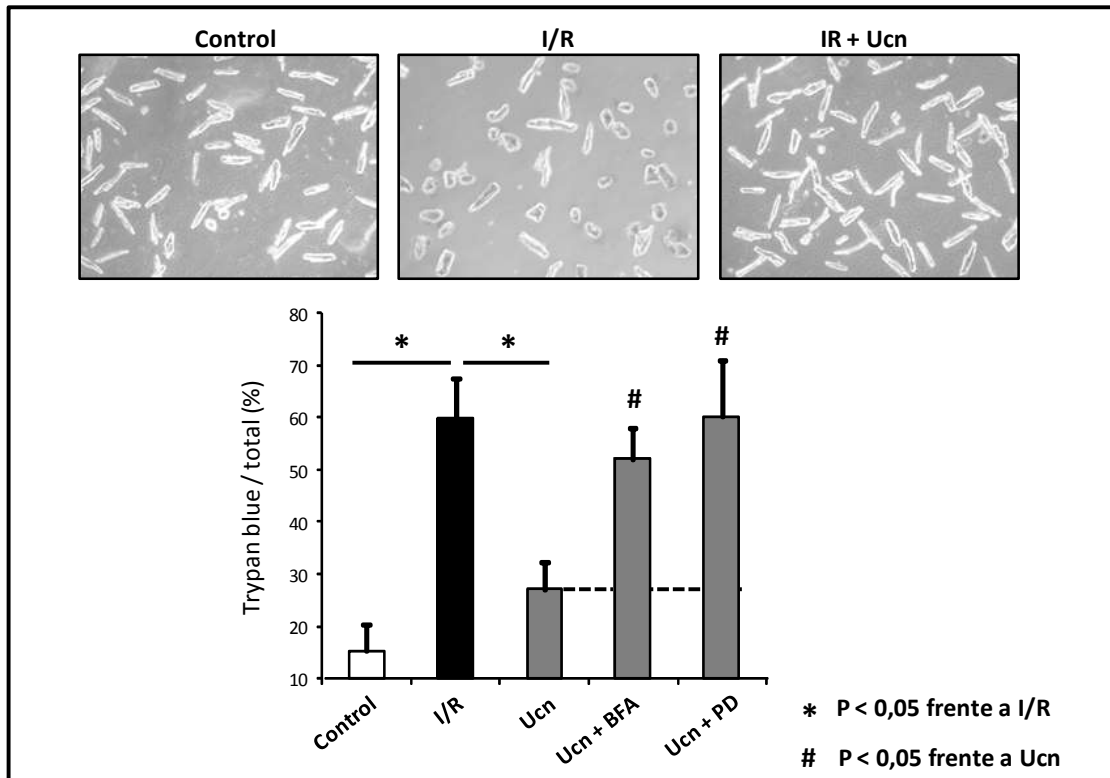


Figura 6. Arriba se muestran imágenes de cardiomiocitos adultos en cultivo en situación control, sometidos a I/R, y tratados con 10nM de Ucn. El tratamiento con Ucn mejora la supervivencia celular disminuyendo significativamente el porcentaje de células no viables. Abajo se muestra un gráfico con la cuantificación del porcentaje de células no viables marcadas con trypan blue respecto del total en diferentes tratamientos.

De forma paralela recogimos los sobrenadantes de estos mismos cultivos, y analizamos mediante un ELISA los valores de LDH liberado al medio de cultivo. Una mayor presencia de LDH en el medio es indicativa de mayor citotoxicidad o muerte celular, principalmente por necrosis, ya que implica rotura de la membrana plasmática. Consistentemente con los resultados anteriores, la figura 7 muestra como los sobrenadantes de cultivos sometidos a I/R tenían niveles significativamente mayores de LDH respecto a la condición control. Es decir el proceso de I/R tiene un claro efecto citotóxico produciendo un aumento en la mortalidad de los cardiomiocitos. El tratamiento con 10nM de Ucn frente a I/R reduce significativamente el nivel de LDH liberado al medio de cultivo, lo que sugiere que Ucn es capaz de proteger frente a I/R disminuyendo la muerte celular o citotoxicidad. Además cuando inhibimos Erk1/2 con 5µM de PD durante el tratamiento con Ucn, se produce de nuevo una mayor liberación de LDH, reduciendo significativamente el efecto citoprotector de Ucn frente a I/R.

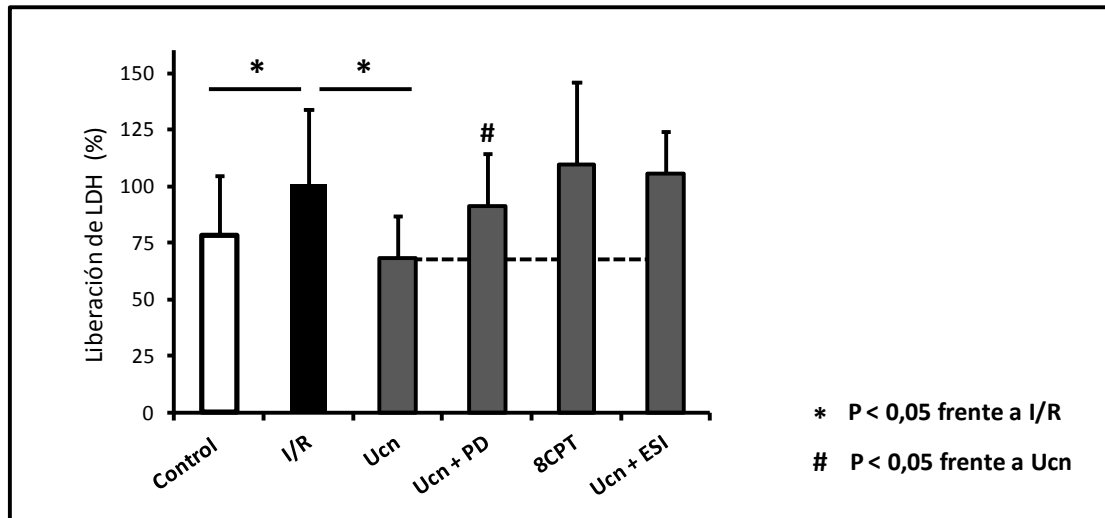


Figura 7. Ensayo de citotoxicidad tipo ELISA por detección de LDH en el sobrenadante de cultivos de cardiomiocitos adultos de rata sometidos a I/R. El tratamiento con 10nM de Ucn disminuye los niveles de LDH en el medio celular tras I/R, lo que implica una menor muerte celular.

Sin embargo no hemos podido demostrar la implicación de EPAC en la mejora de la muerte celular mediante el análisis de la liberación de LDH. La activación de EPAC directamente con 8CPT no provocó ningún cambio en la liberación de LDH respecto a la situación inicial de I/R. La inhibición de EPAC con un inhibidor específico llamado ESI-05 a 10 μ M no consiguió afectar de forma significativa la mejora conseguida en el tratamiento con 10 nM de Ucn sobre la disminución de los niveles de LDH, aunque los datos muestran una tendencia hacia una mayor presencia de LDH en el medio cuando se aplica ESI-05 junto con Ucn.

D.3.2. Urocortina provoca un cambio en el tipo de muerte celular disminuyendo la necrosis y aumentando la apoptosis.

Para profundizar en la acción de Ucn sobre el proceso de muerte celular tras I/R realizamos una serie de experimentos para evaluar el tipo de muerte celular que presentaban los cardiomiocitos después de I/R. Para ello sometimos a los cardiomiocitos al protocolo de I/R simulada con los diferentes tratamientos. A las 18h realizamos en vivo un marcaje con anexina-V para marcar los residuos de fosfatidilserina en la membrana plasmática de las células en apoptosis, y con IP para marcar las células que han muerto y por tanto ya no tienen integridad en sus membranas.

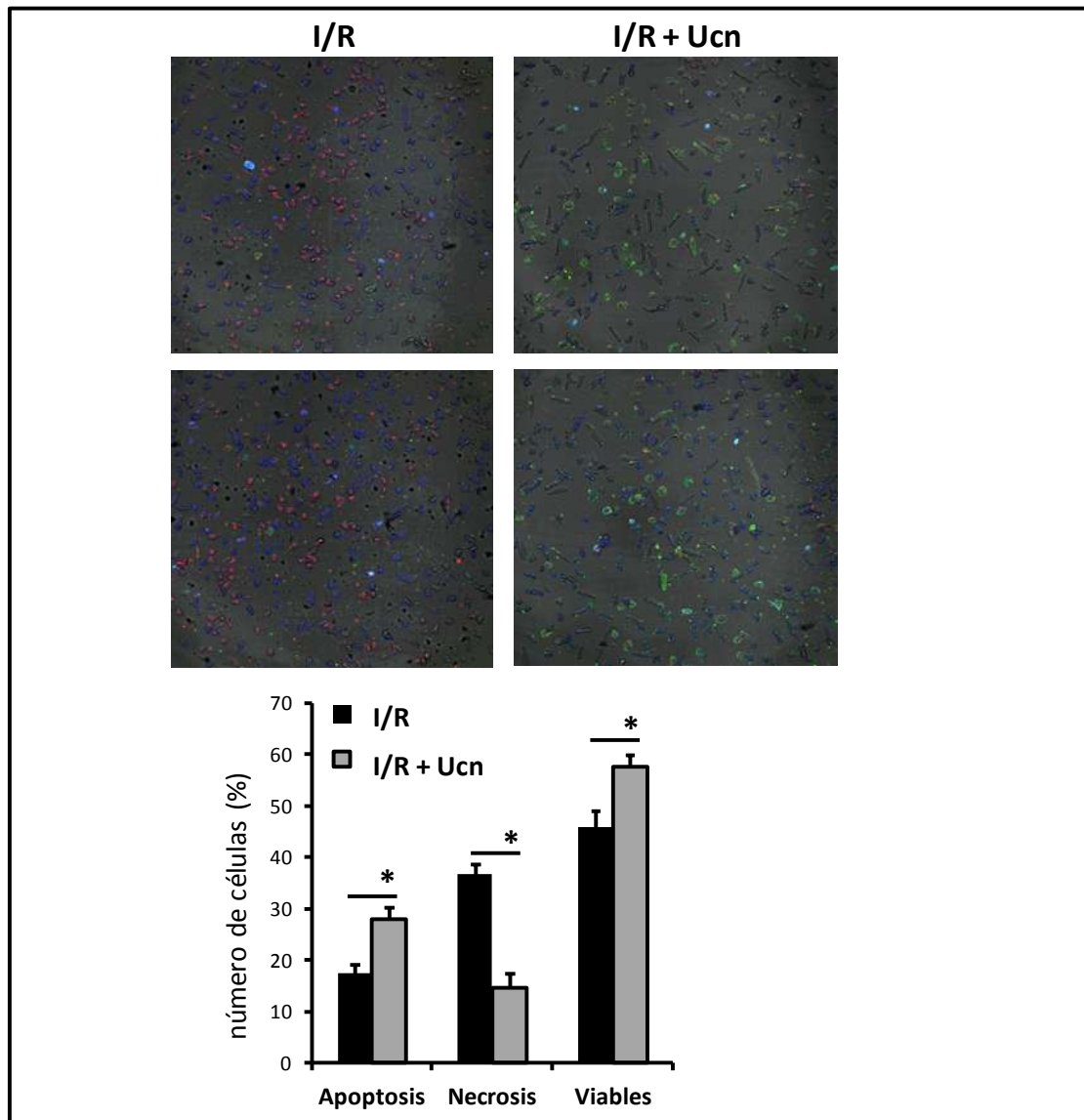


Figura 8. Ensayo de Anexina-V/IP en cultivos de cardiomiocitos adultos de rata sometidos a I/R. Las imágenes muestran dos cultivos de cardiomiocitos con marcaje de anexina-V en verde y yoduro de propidio (IP) en rojo, en situación de I/R, e I/R tratado con 10nM de Ucn. Abajo se muestra la cuantificación del número de células viables, apoptóticas y necróticas en cada condición.

Como puede verse en la figura 8 los cultivos sometidos a I/R tienen el 40% de sus células marcadas exclusivamente con IP, lo que significa que tras una I/R la mayoría de las células mueren por necrosis. Así el porcentaje de células con marcaje de anexina-V es menor al 20%. Sin embargo cuando las células son tratadas con 10nM de Ucn, tal y como esperabamos aumenta considerablemente el número de células viables, disminuyendo a la vez el porcentaje de células marcadas con IP que mueren por necrosis. Pero además de forma paralela, el tratamiento con Ucn aumenta sorprendentemente la cantidad de células que expresan Annexina-V como marcador de apoptosis. De modo que Ucn no sólo aumenta la supervivencia celular, sino que

además promueve que de ocurrir, la muerte celular ocurra mediante el proceso de apoptosis en lugar de necrosis, un mecanismo de muerte más fisiológico, y que genera menos daños secundarios al resto del tejido.

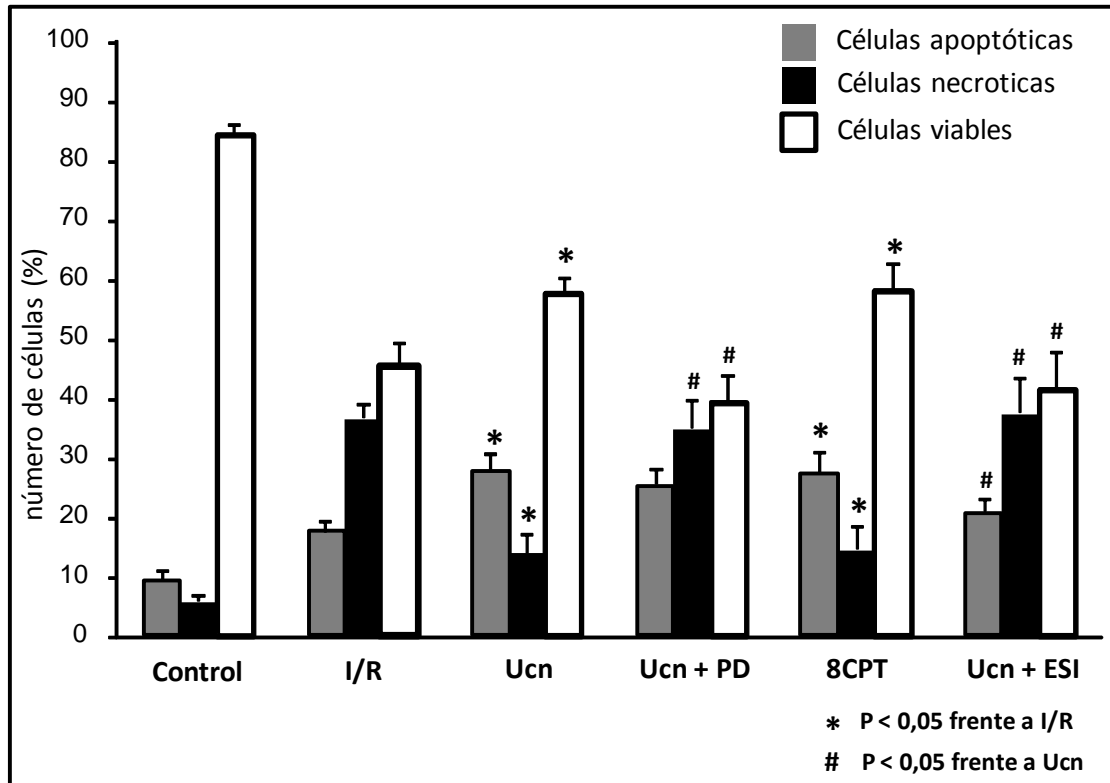


Figura 9. Cuantificación de los ensayos de Anexina-V/IP en cultivos de cardiomiocitos adultos de rata sometidos a I/R en diferentes tratamientos. La aplicación de 5 μ M PD o 10 μ M de ESI, junto con 10nM de Ucn disminuye la mejora en la supervivencia celular amentando significativamente el número de células en necrosis. La aplicación de 10 μ M de 8CPT recapitula el efecto protector de Ucn.

Posteriormente evaluamos la implicación de Erk1/2 y EPAC sobre los mecanismos de muerte celular. La figura 9 muestra un gráfico con el análisis cuantitativo de estos mismos experimentos de IP/Anexina-V en cardiomiocitos adultos sometidos a I/R en diferentes condiciones. El tratamiento con 5 μ M de PD para inhibir la actividad de Erk1/2 en células protegidas con 10nM de Ucn reduce significativamente la mejora en la viabilidad respecto al tratamiento normal con Ucn. Además el tratamiento con PD aumenta significativamente la cantidad de células que mueren por necrosis respecto al tratamiento con Ucn, mientras que no hay diferencias en el número de células marcadas con anexina-V. Estos resultados parecen indicar que Ucn necesita de la actividad de Erk1/2 para mejorar la supervivencia celular, pero no interviene en el cambio de muerte de necrosis por apoptosis. Por tanto el aumento de

la supervivencia de los cardiomiocitos y el cambio en el tipo de muerte celular tras una I/R parecen ser dos mecanismos independientes.

De igual manera evaluamos el papel de EPAC sobre el tipo de muerte celular en el proceso de I/R. En la figura 9 se muestra cómo al utilizar 10 μ M de ESI-05 para inhibir EPAC durante el tratamiento con Ucn se produce una disminución de la viabilidad celular respecto al tratamiento normal con Ucn, que se acompaña además de un aumento del número de células necróticas. Sin embargo mientras que PD no parecía tener efecto sobre la apoptosis, ESI-05 sí reduce significativamente el número de células con marcaje de anexina-V. Según estos datos EPAC parece estar implicada en el efecto protector de Ucn sobre la supervivencia celular y la inducción de apoptosis. De hecho cuando realizamos un tratamiento con 8CPT en células sometidas a I/R, la activación directa de EPAC consigue una clara mejora de la supervivencia celular, además de disminuir el grado de necrosis, aumentando la apoptosis, realizando un efecto similar al observado durante el tratamiento con Ucn.

D.3.3. Urocortina provoca un aumento en la actividad de las caspasas 3/7 y 9, pero no sobre la caspasa 8.

Con el objetivo de profundizar en la posible función de Ucn sobre la inducción de la apoptosis realizamos una serie de experimentos para cuantificar la actividad de las caspasas como proteínas efectoras en el proceso de apoptosis. Realizamos un ensayo de actividad de las caspasas 3/7, 8 y 9 en cultivos de cardiomiocitos sometidos a I/R. Como puede verse en la figura 10 la aplicación de 10nM de Ucn resulta en un incremento estadísticamente significativo de la actividad tanto de las caspasas 3/7, como de la caspasa 9. Sin embargo no se observan cambios significativos en la actividad de la caspasa 8.

Además el incremento en la actividad de las caspasas 3/7 y la caspasa 9 durante el tratamiento con Ucn se ve significativamente inhibido con la aplicación de 5 μ M de PD, el inhibidor de Erk1/2. Por su parte no obtuvimos resultados significativos sobre el papel de EPAC en la actividad de las caspasas, ni al activar directamente EPAC con 8CPT, ni al inhibirlo con ESI-05 durante el tratamiento con Ucn.

En resumen Ucn estaría protegiendo el corazón tras un proceso de I/R mediante un incremento de la supervivencia celular a 2 niveles: por un lado Ucn evita que las células mueran, reduciendo el número de células que mueren por necrosis tras una I/R, y por otro lado en aquellas células con un daño irreparable que no pueden evitar la muerte, Ucn favorece la entrada en un proceso de muerte más fisiológico, como es la apoptosis.

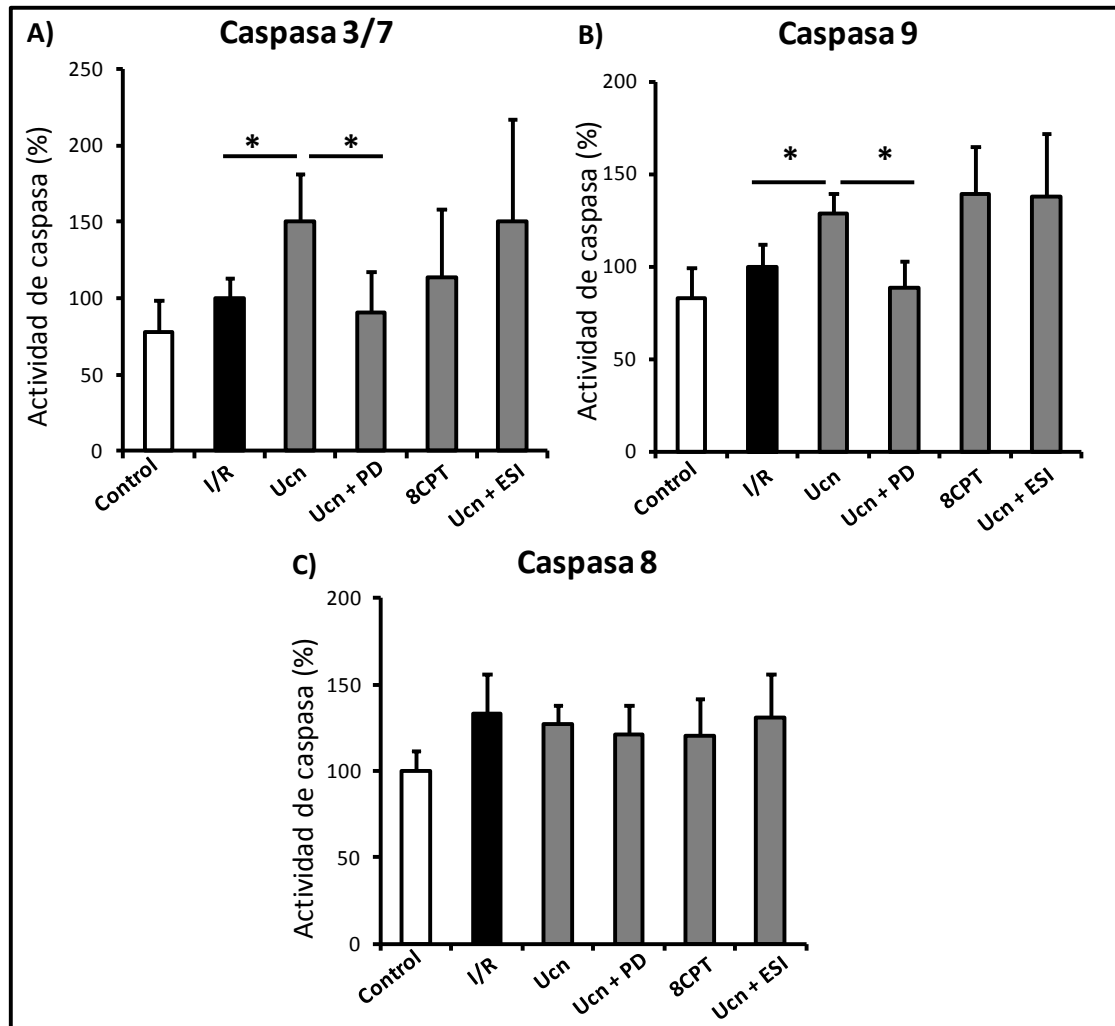


Figura 10. Ensayo de actividad de caspasas en cultivo de cardiomiocitos adultos de rata sometidos a I/R. A) La aplicación de 10nM de Ucn sobre células sometidas a I/R aumenta la actividad de las caspasas 3/7, y B) caspasa 9. C) Ucn no modifica la actividad de caspasa 8.

La protección miocárdica mediada por Ucn a través del aumento de la supervivencia de los cardiomiocitos tras I/R puede explicarse por ejemplo por el mejor manejo del Ca^{2+} intracelular después de I/R. Sin embargo el mecanismo por el que se favorece la inducción de otro tipo de muerte celular, en este caso programada, como es la apoptosis, implica necesariamente otro tipo de mecanismos celulares que tienen

que ver con cambios de expresión génica, regulación postranscripcional, etc. Y sobre este proceso trataremos de profundizar de aquí en adelante en esta tesis.

D.4. Urocortina desencadena una compleja regulación transcripcional.

D.4.1. Urocortina actúa sobre la expresión de genes involucrados en el proceso de muerte por apoptosis.

En base a los resultados anteriores realizamos una serie de experimentos para tratar de descubrir si la aplicación de Ucn estaba actuando a más largo plazo sobre la supervivencia celular mediante la regulación transcripcional de genes implicados en el proceso de muerte celular por apoptosis.

Realizamos un semi-array de expresión génica mediante placas prediseñadas para cuantificar la expresión de una batería de genes relacionados con la apoptosis. Utilizamos un pool de RNAs procedentes de 4 cultivos diferentes de cardiomiocitos adultos de rata sometidos al protocolo de I/R y lo enfrentamos a otro pool equivalente de cultivos sometidos al mismo protocolo de I/R, pero tratados con 10nM de Ucn. Realizamos una cuantificación relativa de la expresión de dichos genes mediante qRT-PCR y de este modo determinamos cuánto cambia la expresión de cada gen debido al tratamiento con Ucn. En la figura 11 se presenta la tasa de cambio positiva o negativa para cada gen en el tratamiento con Ucn frente a I/R. Los genes CD40-Lg, Bad, Dffb, Casp14 y Lta, con un cambio de expresión mayor al doble (0,3 en escala logarítmica) fueron considerados para una posterior validación por qRT-PCR.

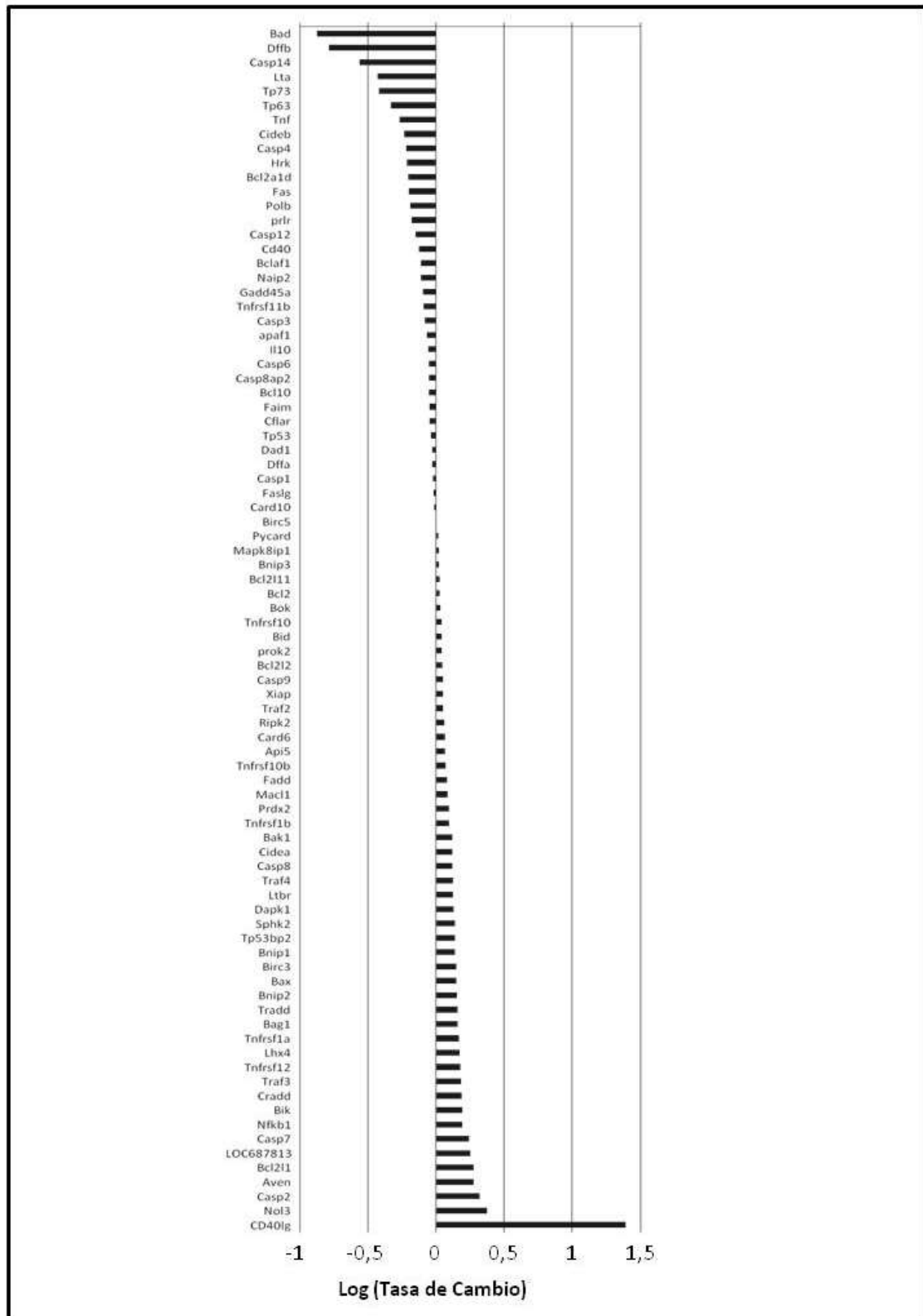


Figura 11. Semi-array de expresión de genes involucrados en el proceso de muerte celular por apoptosis en cardiomiocitos adultos de rata sometidos a I/R. Se muestra la tasa de cambio en escala logarítmica en cardiomiocitos tratados con Ucn durante I/R frente a no tratados.

D.4.2. Urocortina aumenta la expresión de CD40-Lg, XIAP y BAD a nivel de mRNA y proteína.

Para validar los datos obtenidos en el anterior array, realizamos una tanda de experimentos sobre 7 cultivos de cardiomiocitos adultos sometidos a I/R donde se realizó el tratamiento habitual de 10nM de Ucn para determinar mediante ensayos individuales de qRT-PCR la expresión de los genes CD40-Lg, Dffb, Casp14, Lta y Bad.

Como puede verse en la figura 12A y la figura 13A, el tratamiento con 10nM de Ucn aumenta significativamente la expresión de CD40-Lg y BAD respectivamente, validando para estos dos genes los resultados del array mostrado anteriormente. Por su parte no encontramos diferencias significativas en la expresión de Dffb, Casp14 y Lta.

Al estudiar la función de CD40-Lg encontramos que su expresión estaba posiblemente ligada a otro gen llamado XIAP. Ambos genes se encuentran en la misma localización cromosómica, de forma consecutiva y con muy poco espacio de separación, de modo que algunos autores proponen que ambos genes pueden estar regulados por el mismo promotor (Malarstig, 2006). XIAP además es un gen bien caracterizado con una función antiapoptótica bien establecida, y que casualmente había salido señalado en un array previo realizado por el grupo de Barry, 2010, en un tratamiento con Ucn. De modo que aunque en nuestro análisis previo XIAP no había tenido un cambio de expresión importante, decidimos cuantificarlo de forma individual. Efectivamente en la figura 12B se puede observar como el tratamiento con 10nM de Ucn aumenta significativamente la expresión de XIAP en cardiomiocitos adultos sometidos a I/R.

Para corroborar los resultados anteriores se realizaron experimentos de WB para cuantificar la expresión de estos genes a nivel de proteína. Como puede verse en las imágenes de la figura 12C, y en la cuantificación gráfica de la figura 12D y 12E, el tratamiento con 10nM de Ucn aumenta la expresión a nivel de proteína tanto de CD40-Lg como de XIAP respecto a I/R tomando como control endógeno la expresión de la proteína GAPDH.

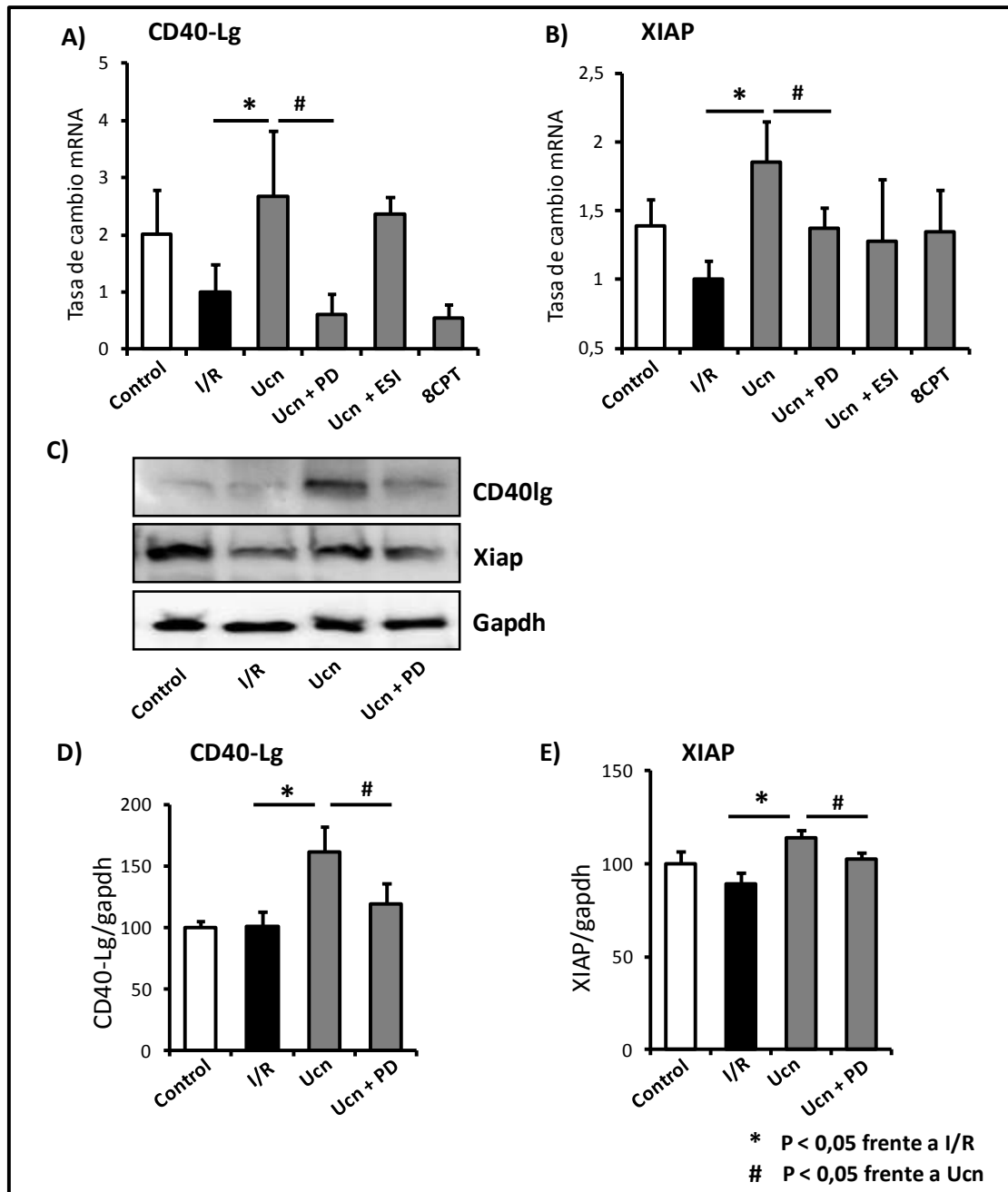


Figura 12. Ucn regula la expresión de XIAP, CD40-Lg en cultivo de cardiomiocitos adultos de rata sometidos a I/R. A) Cuantificación de la expresión mediante qRT-PCR del mRNA de CD40-LG, y B) XIAP. C) Imágenes de WB de los niveles de las proteínas XIAP y CD40-Lg. D) Cuantificación mediante WB del nivel de la proteína XIAP. E) Cuantificación mediante WB del nivel de la proteína CD40-Lg.

Para analizar la expresión de BAD a nivel de proteína se cuantificó la fracción total de BAD y la fracción fosforilada, en este caso inactiva, frente a la proteína endógena GAPDH. Como se observa en la figura 13B el tratamiento con 10nM de Ucn aumenta significativamente la fracción total de la proteína BAD, mientras que la fracción fosforilada (inactiva) no cambió en ninguna de las condiciones (figura 13C). Estos resultados demuestran que el tratamiento con 10nM de Ucn aumenta la

expresión de BAD, ya que hay una mayor cantidad de mRNA que se corresponde con una mayor cantidad de la proteína total. Y además, como se observa en la figura 13D este aumento de expresión se refleja en una mayor cantidad de la fracción de proteína libre activa.

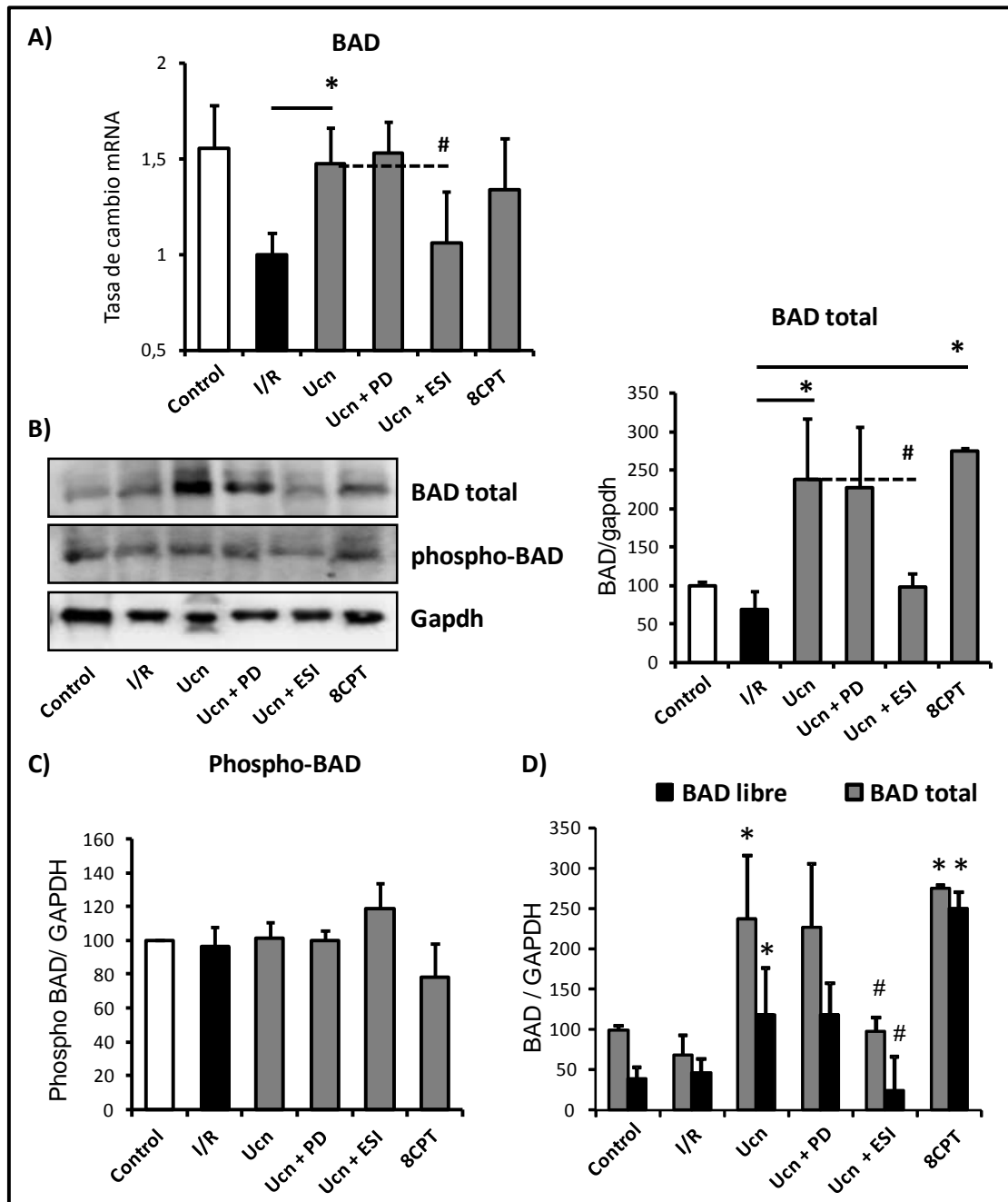


Figura 13. Ucn regula la expresión de BAD en cultivo de cardiomiocitos adultos de rata sometidos a I/R. A) Cuantificación de la expresión mediante qRT-PCR. Ucn aumenta los niveles de mRNA de BAD. B) Imágenes de WB de los niveles de las proteínas BAD y phospho-BAD y cuantificación de BAD total. C) Cuantificación mediante WB del nivel de la forma fosforilada de BAD. D) Cuantificación mediante WB del nivel de la proteína BAD libre sin fosforilar.

Para analizar la posible implicación de Erk1/2 y EPAC cómo las vías de señalización que estaban regulando dichos cambios de expresión, realizamos los mismos experimentos utilizando inhibidores específicos. Como puede verse en la figura 12A y 12B, tanto en qRT-PCR como en WB, ambas proteínas XIAP y CD40-Lg eran sensibles al tratamiento con 5 μ M de PD, el inhibidor de Erk1/2. De modo que Ucn necesita de la vía de señalización de Erk1/2 para realizar el cambio de expresión sobre XIAP y CD40-Lg. Sin embargo el proceso de regulación génica de XIAP y CD40-Lg parece ser independiente de EPAC, ya que no hay cambios significativos en la expresión de XIAP y CD40-Lg, ni por activación de EPAC con 10 μ M de 8CPT, ni con su inhibición mediante 10 μ M de ESI-05 durante el tratamiento con Ucn.

En cuanto a la regulación génica de BAD la figura 13 muestra como el tratamiento con 5 μ M de PD, inhibidor de Erk1/2, no produce cambios sobre la expresión de BAD a nivel de mRNA, ni proteína durante el tratamiento con Ucn. Mientras que el aumento de expresión de BAD por 10 nM de Ucn, tanto a nivel de mRNA, como de proteína total, fue inhibido significativamente por 10 μ M de ESI-05, el inhibidor específico de EPAC. Además el tratamiento con 10 μ M de 8CPT que produce la activación de EPAC fue capaz de mimetizar el aumento de expresión de la proteína BAD total producido por Ucn frente a una I/R. Por tanto Ucn parece estar regulando la expresión génica de BAD, y aumentando la cantidad de proteína BAD activa, a través de la vía de señalización de EPAC, y de manera independiente de Erk1/2.

D.5. Papel de los microRNAs en la regulación transcripcional mediada por Urocortina tras isquemia/reperfusión.

D.5.1. El tratamiento con Urocortina provoca cambios en el perfil de expresión de microRNAs en el corazón sometido a isquemia/reperfusión.

Desde hace unos años ha crecido exponencialmente el interés por los microRNAs hasta convertirse hoy en día en un área de especial relevancia en el estudio de múltiples patologías. Como hemos visto en el apartado de introducción los microRNAs juegan un papel clave en la fisiopatología isquémica del IAM, así como en el desarrollo de los daños por I/R. En nuestro grupo nos interesó conocer si los microRNAs estaban participando en el amplio espectro de regulación transcripcional

que desencadena la aplicación de Ucn sobre un tejido miocárdico dañado tras un proceso de I/R.

Para ello realizamos en primer lugar un micro-array de expresión de microRNAs sobre muestras de tejido miocárdico de corazones aislados y perfundidos en sistema Langendorff. En la figura 14 se muestran los registros hemodinámicos de los corazones utilizados para este array de microRNAs. Por una parte los corazones sometidos a 40 minutos de isquemia y posterior perfusión de 2 horas (I/R), y por otra parte los corazones sometidos al mismo protocolo de I/R pero tratados con 10 nM de Ucn durante la perfusión (Ucn post). En la figura 14A se puede observar como el tratamiento de Ucn durante la perfusión mejora la contractilidad mostrada como la derivada de la presión sistólica del ventrículo izquierdo (+dP/dt), respecto a la situación control de I/R. En esta figura puede observarse como este tratamiento con Ucn solamente durante la perfusión tiene un efecto similar al tratamiento que hemos estado viendo anteriormente utilizando Ucn tanto antes de la isquemia como después de la perfusión (Ucn pre y post). Por otra parte ambas formas de utilizar Ucn frente a I/R mejoran significativamente la presión diastólica final (Figura 14B) y la resistencia vascular (Figura 14C) de estos corazones.

Obtuvimos el RNA total de las muestras de miocardio de 4 corazones diferentes sometidos a un protocolo de I/R y otros 4 sometidos a I/R y tratados con 10nM de Ucn en post. Mediante un chip de microRNAs de Agilent que permite correr 8 muestras diferentes analizamos la expresión de 784 microRNAs y realizamos una cuantificación relativa de cada microRNA en la condición de tratamiento con Ucn frente a la situación de I/R. Se realizó un análisis con diferentes controles para su normalización y obtuvimos unos resultados de tasa de cambio "Ucn frente a I/R".

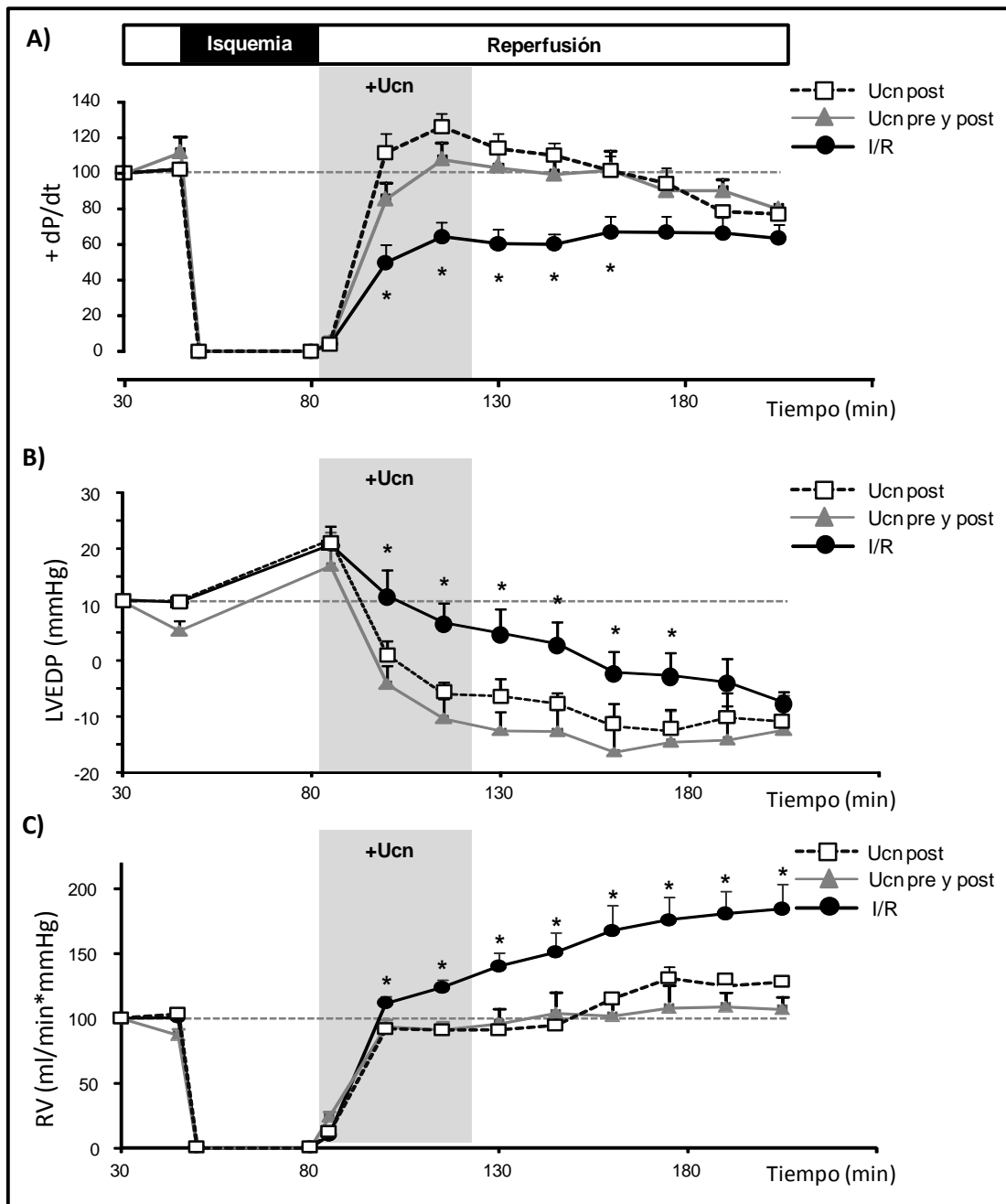


Figura 14. Registro hemodinámico de corazones de rata montados en un sistema Langendorff comparando el tratamiento con 10nM de Ucn antes de la isquemia (pre y post), y el tratamiento solamente durante la reperfusion (post). Se realizó un protocolo de I/R global por cierre de la perfusión durante 40 minutos y posterior reperfusion durante 2 horas. Ambos tratamientos con 10nM de Ucn, A) recuperan significativamente la contractilidad tras una I/R reflejada como +dp/dt (derivada de la presión en el tiempo), B) tienen una menor presión diastólica final del ventrículo izquierdo (LVEDP), y C) menor resistencia vascular (RV).

Los resultados del array pueden verse en la figura 15 donde se muestra un gráfico con los microRNAs ordenados por el nivel de tasa de cambio relativa del tratamiento con "Ucn frente a I/R". La aplicación de 10nM de Ucn resultó en un cambio apreciable en el perfil de expresión de microRNAs frente a I/R, encontrándose en los corazones tratados con Ucn 159 microRNAs sobre-expresados (mostrados en

verde) y 122 sub-expresados (mostrados en rojo). En la figura 16 se muestra una tabla completa con los datos en crudo de cada muestra (4 muestras de I/R y 4 muestras de I/R tratadas con Ucn), el valor de tasa de cambio, y su correspondiente p-Value. Se muestran sombreados los microRNAs con una tasa de cambio mayor a 1,50 y cuyo p-value es menor a 0,05. Estos fueron los microRNAs candidatos que analizamos posteriormente en el proceso de validación de los resultados del array.

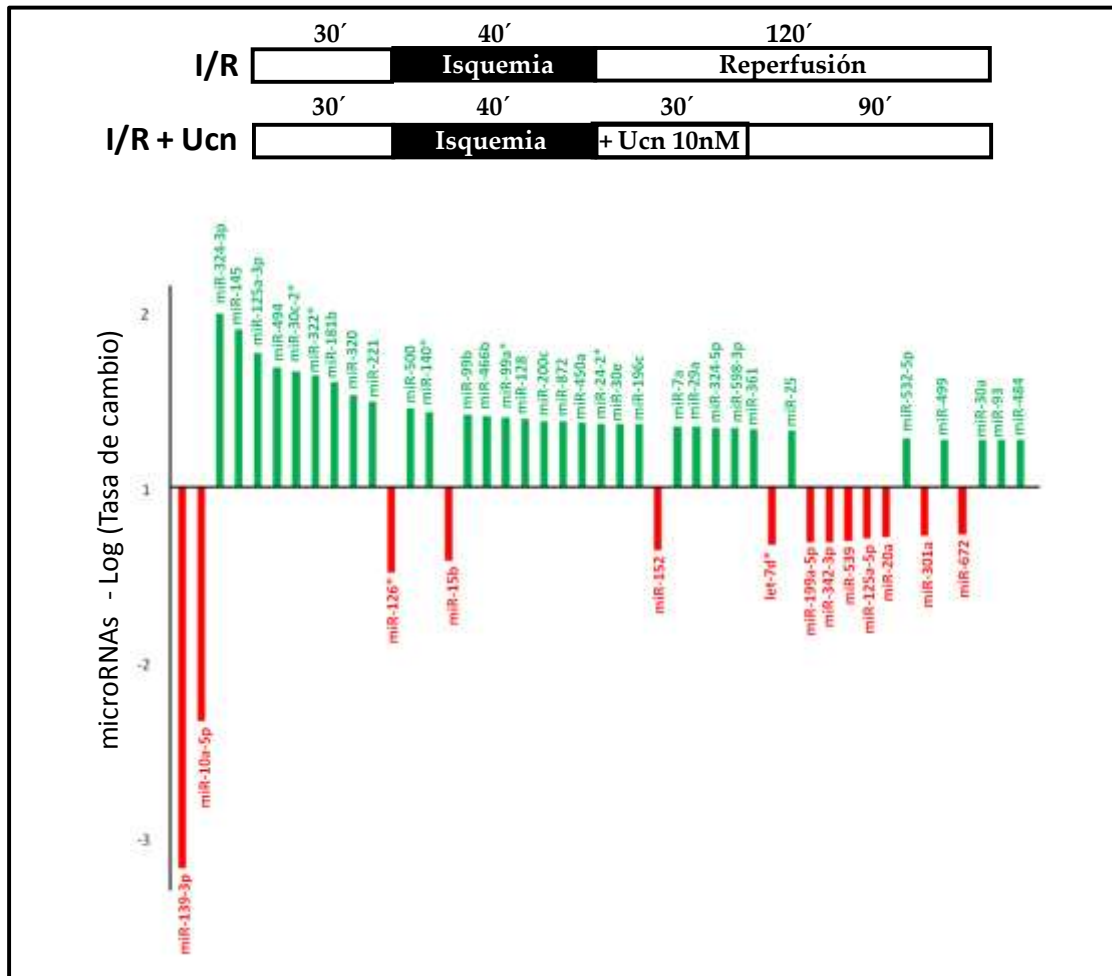


Figura 15. Array de expresión de microRNAs en corazones de rata sometidos a I/R en sistema Langendorff. Se presenta la tasa de cambio en escala logarítmica de la expresión de cada microRNA en cardiomiocitos tratados con 10nM de Ucn, frente a no tratados. En rojo se presentan los microRNAs con valores de tasa de cambio negativos cuya expresión disminuye con Ucn, y en verde aquellos cuyos valores de tasa de cambio son positivos y su expresión aumenta.

NOMBRES (gene ID)	miRNA1_Ucn277	miRNA2_Ucn265	miRNA3_Ucn166	miRNA4_Ucn077	miRNA5_IR255	miRNA6_IR076	miRNA7_IR106	miRNA8_IR197	Fold Change	P-Value
rno-miR-139-3p	9,91	9,59	8,76	8,69	10,36	10,00	11,44	11,65	-3,09	0,003
rno-miR-10a-5p	12,32	11,14	8,50	11,40	12,37	11,49	12,24	12,03	-2,28	0,110
rno-miR-324-3p	10,74	10,77	11,80	9,96	10,17	9,58	9,64	9,99	1,96	0,016
rno-miR-145	8,34	8,02	11,06	8,40	8,08	7,94	8,03	8,15	1,88	0,144
rno-miR-125a-3p	8,53	9,18	10,40	8,61	8,47	8,16	8,48	8,40	1,75	0,050
rno-miR-494	10,19	10,87	11,40	8,81	9,95	8,52	10,82	9,05	1,66	0,256
rno-miR-30c-2*	10,47	10,40	10,73	9,86	10,14	10,12	8,89	9,44	1,64	0,035
rno-miR-322*	9,47	9,90	9,57	8,85	9,07	8,93	8,49	8,51	1,62	0,013
rno-miR-181b	10,59	10,12	10,67	9,54	9,96	9,59	9,65	9,06	1,58	0,036
rno-miR-320	10,15	9,60	9,91	9,47	9,05	9,59	9,26	8,83	1,51	0,014
rno-miR-221	10,47	10,28	10,92	10,27	10,62	9,85	10,12	9,12	1,47	0,085
rno-miR-126*	11,06	10,88	8,80	10,67	10,77	10,96	10,88	11,01	-1,47	0,224
rno-miR-500	10,56	10,36	10,70	10,14	10,46	9,85	9,79	9,58	1,44	0,027
rno-miR-140*	11,30	11,01	11,81	10,74	11,22	9,87	11,12	10,64	1,42	0,146
rno-miR-15b	12,21	11,76	10,90	11,89	12,34	11,77	12,40	12,23	-1,41	0,092
rno-miR-99b	10,55	10,09	10,86	9,77	10,30	10,22	9,53	9,30	1,40	0,127
rno-miR-466b	9,89	8,87	9,92	8,68	9,46	8,46	8,82	8,69	1,40	0,167
rno-miR-99a*	9,89	9,90	9,14	9,68	9,00	9,02	9,59	9,10	1,39	0,042
rno-miR-128	10,84	10,56	9,63	10,33	10,56	10,32	9,64	8,97	1,38	0,226
rno-miR-200c	8,10	8,68	8,77	8,64	8,02	8,35	7,93	8,11	1,36	0,023
rno-miR-872	9,09	9,63	8,06	9,00	8,65	8,48	8,44	8,43	1,36	0,138
rno-miR-450a	9,03	9,50	8,49	8,74	8,59	8,81	8,58	8,01	1,36	0,092
rno-miR-24-2*	8,38	8,85	8,80	9,46	8,47	8,64	8,11	8,53	1,35	0,076
rno-miR-30e	13,43	13,31	14,21	13,32	13,17	13,11	13,25	13,02	1,35	0,053
rno-miR-196c	8,46	9,18	8,16	8,77	8,37	7,99	8,35	8,14	1,35	0,067
rno-miR-152	10,46	9,89	8,55	9,87	10,10	10,54	10,00	9,85	-1,35	0,253
rno-miR-7a	9,06	9,00	8,71	8,53	8,44	8,38	8,38	8,41	1,34	0,010
rno-miR-29a	14,92	14,68	15,06	14,62	14,35	14,35	14,59	14,32	1,34	0,010
rno-miR-324-5p	10,58	10,39	9,83	10,02	10,26	9,92	9,63	9,37	1,33	0,097
rno-miR-598-3p	8,72	8,93	7,90	8,37	8,23	7,97	8,15	7,95	1,33	0,079
rno-miR-361	10,69	10,45	10,82	10,36	10,27	10,23	10,18	10,04	1,32	0,011
rno-let-7d*	9,64	10,07	8,23	9,81	9,10	10,08	10,13	10,02	-1,31	0,338
rno-miR-25	11,34	11,05	11,09	10,96	11,04	10,55	11,12	10,16	1,31	0,093
rno-miR-199a-5p	11,13	10,83	9,03	10,96	11,19	10,54	10,92	10,84	-1,30	0,378
rno-miR-342-3p	10,49	10,54	9,60	10,40	10,75	10,45	10,82	10,53	-1,30	0,097
rno-miR-539	8,24	8,19	8,00	8,11	8,75	7,96	8,74	8,58	-1,30	0,064
rno-miR-125a-5p	11,58	11,66	10,73	11,37	11,68	11,53	12,15	11,40	-1,28	0,155
rno-miR-20a	12,32	11,94	10,21	11,77	11,94	11,73	12,09	11,90	-1,28	0,380
rno-miR-532-5p	9,30	9,25	8,94	8,62	9,20	8,58	8,45	8,50	1,27	0,125
rno-miR-301a	11,02	10,97	9,80	10,85	10,79	11,17	10,97	11,07	-1,27	0,211
rno-miR-499	13,01	13,04	12,80	13,08	12,54	12,72	12,53	12,79	1,26	0,015
rno-miR-672	8,85	8,92	8,32	8,67	9,49	8,97	8,41	9,24	-1,26	0,175
rno-miR-30a	13,24	13,39	14,13	13,21	13,25	13,17	13,27	12,93	1,26	0,132
rno-miR-93	10,33	9,19	8,39	9,62	9,34	9,37	9,02	8,46	1,26	0,391
rno-miR-484	9,72	8,18	9,12	8,95	8,75	9,46	8,12	8,32	1,26	0,373

Figura 16. Array de expresión de microRNAs en corazones de rata sometidos a I/R en sistema Langendorff. microRNAs ordenados por mayor tasa de cambio en el tratamiento con Ucn frente a la I/R sin tratar. Se presentan marcados los microRNAs con mayor tasa de cambio que además tienen un pValue menor a 0,05 los cuales fueron elegidos para realizar la posterior validación mediante qRT-PCR.

D.5.2. Urocortina modifica significativamente la expresión de miR-125a, miR-139-3p y miR-324.

Para la validación de los resultados del array se cuantificó la expresión individual de cada microRNA mediante ensayos Taqman qRT-PCR. Se obtuvieron muestras de tejido miocárdico de 5 corazones de rata aislados y perfundidos en el sistema Langendorff a los que se sometió al protocolo de I/R y otros 5 con el tratamiento descrito previamente de 10 nM de Ucn en reperfusión. De cada corazón se obtuvieron 3 muestras diferentes de tejido y se realizó una extracción de RNA total, de modo que obtuvimos 15 replicas de RNA de cada condición. Se realizó una cuantificación relativa de la expresión de miR-30c, miR-29a, miR125a, miR139-3p, miR320 y miR-324 en el miocardio tratado con Ucn frente a I/R, utilizando el gen U87 como control endógeno.

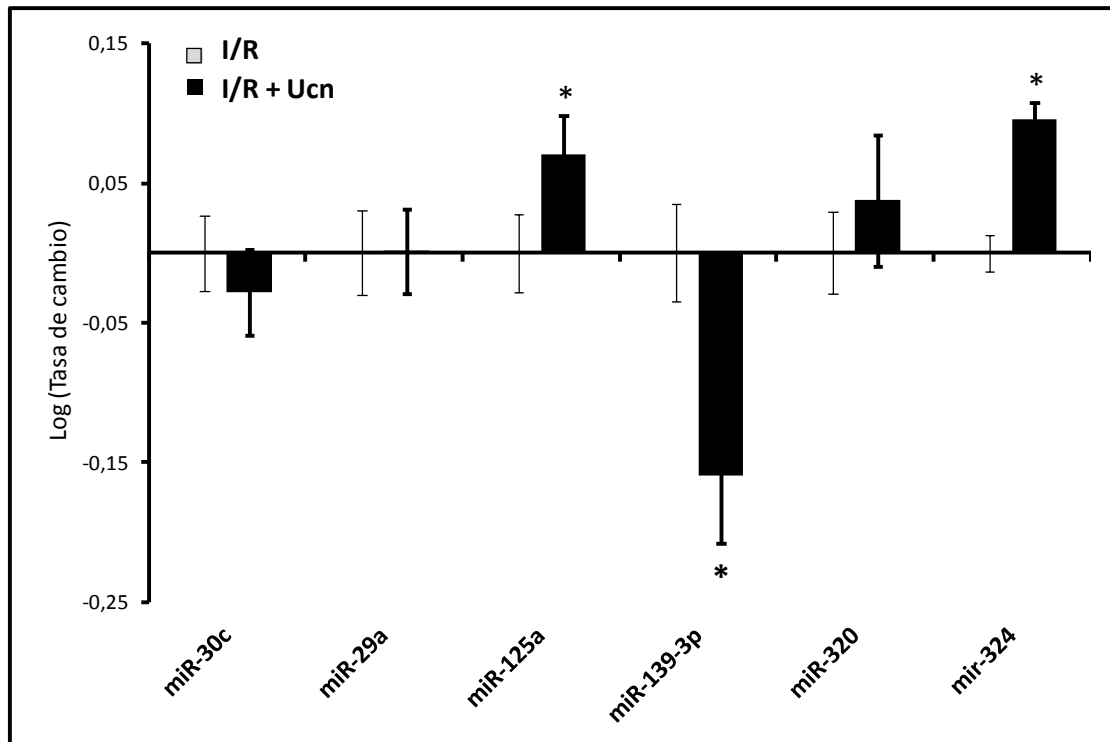


Figura 17. Nivel de expresión de ImicroRNAs cuantificados mediante qRT-PCR en corazones de rata sometidos a I/R en sistema Langendorff. Se presenta la tasa de cambio en escala logarítmica de la expresión de cada microRNA en los corazones tratados con 10nM de Ucn, frente a los no tratados.

En la figura 17 se muestran los niveles de expresión de dichos microRNAs en el tratamiento con Ucn frente al valor basal de I/R. La aplicación de 10nM de Ucn aumenta significativamente la expresión de miR-125a y miR-324 frente a I/R, mientras

que inhibe la de miR-139-3p. Por su parte los microRNAs miR-30c, miR-29a, y miR-320 no muestran cambios significativos.

Posteriormente realizamos una cuantificación de estos microRNAs sobre cultivos de cardiomiocitos adultos de rata tratados con dosis crecientes de Ucn para comprobar por una parte que dichos microRNAs son expresados específicamente por los cardiomiocitos, y por otra parte que de forma aislada Ucn era capaz de modificar su expresión. Se realizó una cuantificación relativa de cada dosis de Ucn frente a la situación basal o control sin Ucn mediante Taqman qRT-PCR.

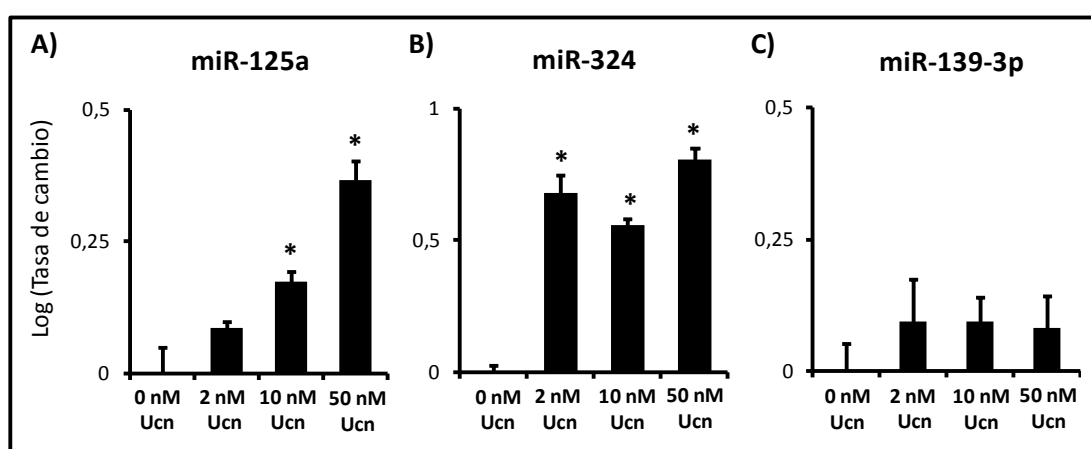


Figura 18. Nivel de expresión de mir125a, mir324 y miR-139-3p en cultivo de cardiomiocitos adultos de rata tratados con dosis crecientes de Ucn, cuantificados mediante qRT-PCR.

Como se observa en la figura 18A la aplicación de 10nM de Ucn consigue aumentar significativamente los niveles de miR-125a en los cardiomiocitos, produciéndose un mayor aumento con la aplicación de 50nM. Por su parte en la figura 18B se muestra cómo la expresión de miR-324 se ve aumentada significativamente desde concentraciones tan bajas como 2nM de Ucn, produciendo el mismo efecto las dosis de 10 y 50 nM. En cuanto a miR-139-3p, en la figura 18C se muestra cómo Ucn no provoca cambios significativos de expresión sobre los cardiomiocitos en situación control.

D.5.3. Urocortina revierte los cambios en la expresión de miR-125a, miR-139-3p, y miR-324 tras I/R.

Para profundizar en el conocimiento de estos microRNAs en el proceso de cardioprotección de Ucn frente a I/R realizamos cultivos de cardiomiocitos adultos que

sometimos al protocolo de I/R. Y analizamos la expresión de miR-125a, miR-324, y miR-139-3p mediante Taqman qRT-PCR durante el tratamiento con 10nM de Ucn, que es la dosis mínima cardioprotectora usada generalmente. Además utilizamos los inhibidores específicos de Erk1/2 y EPAC para evaluar si los cambios de expresión en los microRNAs producidos por Ucn necesitaban de dichas vías de señalización.

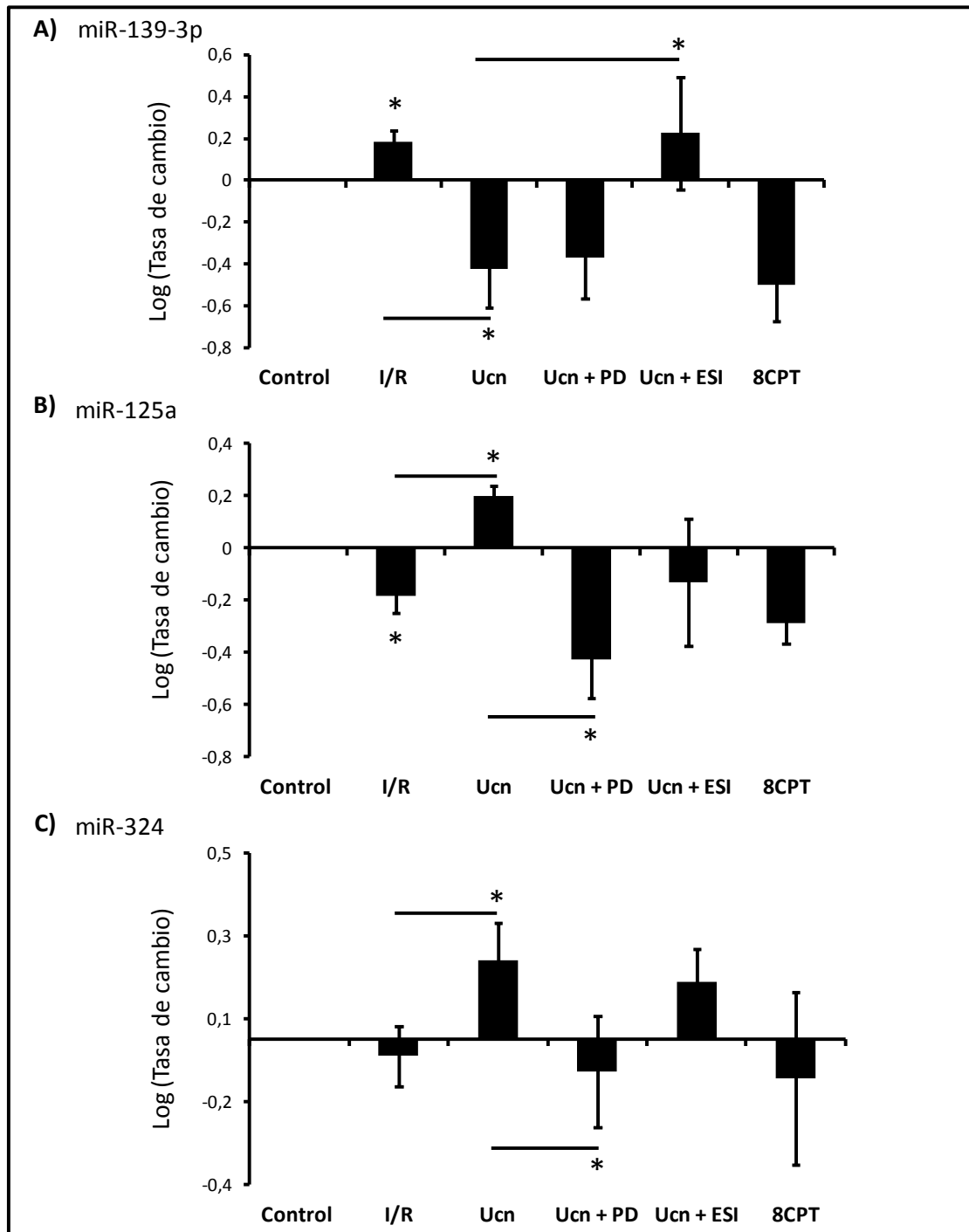


Figura 19. Nivel de expresión de microRNAs cuantificados mediante qRT-PCR en cultivo de cardiomiocitos adultos de rata sometidos a I/R. A) El tratamiento con 10nM de Ucn disminuye significativamente los niveles de mir139-3p, efecto inhibido con 10µM de ESI. B) y C) El tratamiento con Ucn aumenta los niveles de mir125a y mir324, efecto inhibido con 5µM de PD.

En la figura 19A se muestra cómo el proceso de I/R aumenta significativamente la expresión de miR-139-3p, situación que se revierte cuando aplicamos 10nM de Ucn, de modo que Ucn disminuye significativamente el nivel de expresión de miR-139-3p respecto a la situación de I/R. Además Ucn necesita de EPAC para modificar la expresión de miR-139-3p ya que el tratamiento con el inhibidor de EPAC, ESI-05, elimina el efecto de Ucn sobre miR-139-3p. Y aunque no resulte estadísticamente significativo el tratamiento con 8CPT, que activa EPAC directamente, parece que realiza el mismo efecto que el tratamiento con Ucn, ya que hay una tendencia a reducir el nivel de expresión de miR-139-3p. Sin embargo en estas condiciones el tratamiento con PD no afecta al resultado de Ucn sobre miR-139-3p. De modo que Ucn reduce los niveles de miR-139-3p, que habían sido elevados tras I/R, y lo hace de manera dependiente de EPAC.

Por su parte los niveles de miR-125a (figura 19B) y miR-324 (figura 19C) se encuentran significativamente reducidos tras I/R, y la aplicación de 10nM de Ucn recupera la expresión tanto de miR-125a como de miR-324, contrarrestando el efecto de la I/R. En ambos casos la aplicación de PD para inhibir específicamente a Erk1/2 junto con la aplicación de Ucn impide la recuperación de los niveles de miR-125a y miR-324 tras I/R. Por tanto Ucn recupera los niveles de expresión de miR-125a y miR-324 tras I/R de una manera dependiente de Erk1/2.

Sin embargo no parece que EPAC esté implicado en la regulación de la expresión de miR-125a ni de miR-324, ya que no hay cambios significativos ni al activar EPAC con 8CPT en I/R, ni al inhibirlo con ESI-05 durante el tratamiento con Ucn.

D.5.4. Urocortina modula in vivo los niveles de miR-139-3p después de I/R.

A continuación se muestran una serie de resultados sobre el modelo animal de I/R in vivo que hemos visto en apartados anteriores. El objetivo de estos experimentos fue estudiar el comportamiento de los microRNAs miR-139-3p, miR-125a y miR-324 descritos anteriormente, en el modelo animal de I/R y evaluar si el tratamiento experimental con Ucn era capaz de regular la expresión de estos microRNAs en el miocardio in vivo.

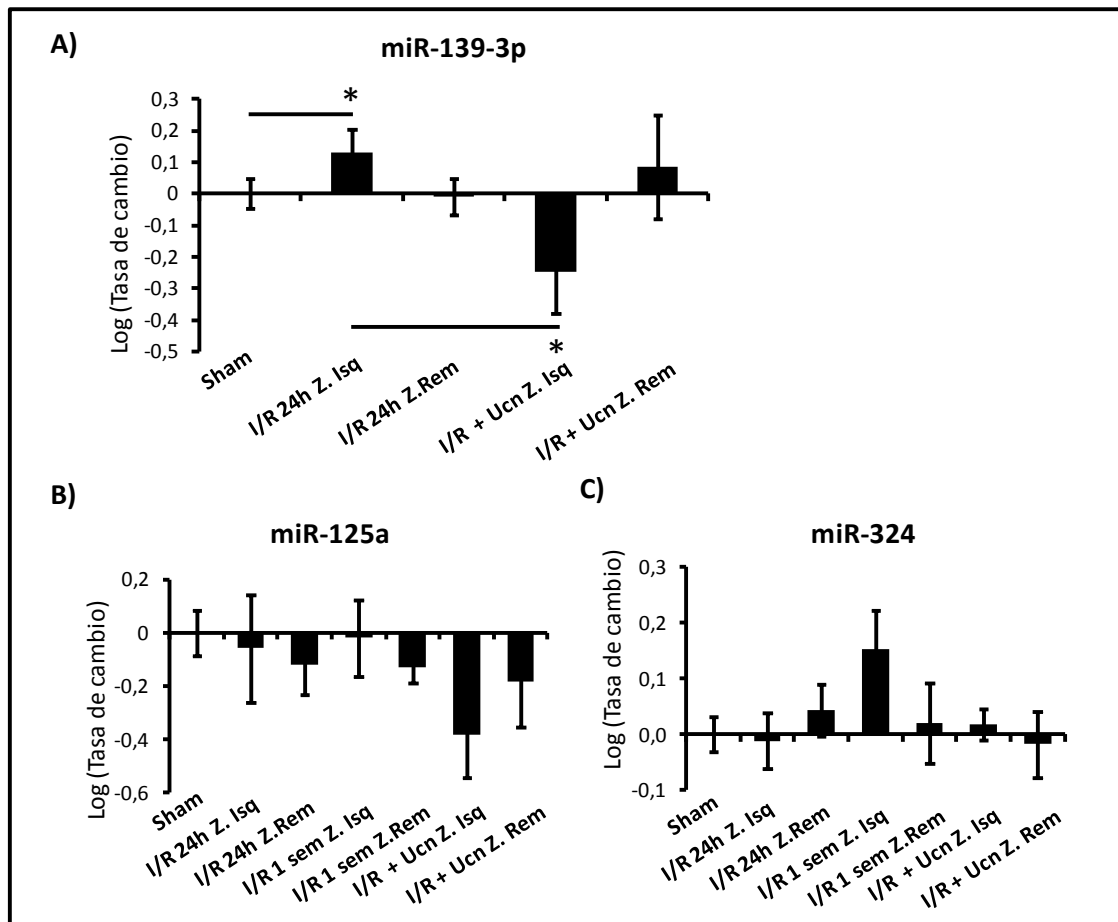


Figura 20. Estudio de microRNAs en un modelo in vivo de I/R en rata. A) Nivel de expresión de mir139-3p en muestras de miocardio del modelo de I/R en rata. mir139-3p se encuentra aumentado en la zona infartada a las 24h de I/R respecto a las sham. Mientras que la administración de 150 µg/Kg de Ucn produce su disminución significativa respecto a I/R. B y C) No hay diferencias significativas en los niveles de expresión de miR-125a y miR-324 en las mismas muestras de miocardio del modelo de I/R.

Como vimos en la figura 2 del apartado 1.2 de los resultados, la I/R in vivo provoca una reducción de la contractilidad del corazón del 40% medida por la FE, la cual es recuperada significativamente con el tratamiento de 150 µg/kg de Ucn. En estos animales obtuvimos muestras de RNA total procedente de tejido miocárdico, tanto de la zona isquémica o zona en riesgo, situada por debajo de la ligadura usada para producir el infarto en el modelo, como de una zona remota o anterior a dicha ligadura.

Mediante Taqman qRT-PCR cuantificamos la expresión de miR-125a, miR-139-3p, y miR-324, en la zona infartada y la zona remota del miocardio de corazones sometidos al modelo de I/R, tratados y sin tratar con Ucn, de forma relativa respecto al grupo de ratas sham o control.

En la figura 20A se muestra cómo el nivel de expresión de miR-139-3p está significativamente elevado en la zona isquémica de los corazones del modelo de I/R a las 24h de haber realizado el modelo, comparado con el miocardio de las ratas sham. En las ratas tratadas con Ucn el nivel de miR-139-3p en la zona isquémica del corazón descendía significativamente respecto a la zona isquémica de las ratas con I/R sin tratar. De hecho haciendo análisis pareado entre las diferentes zonas del mismo corazón, la expresión de miR-139-3p era significativamente menor en la zona isquémica comparado con la zona remota de los mismos corazones tratados con Ucn. Hay que destacar que esta situación reproduce exactamente lo que ocurre en el modelo ex vivo realizado en el sistema Langendorff (figura 17) y en el modelo in vitro realizado en cardiomiocitos adultos aislados en cultivo (figura 18). Por otra parte estos cambios de expresión de miR-139-3p descritos anteriormente se producen de forma aguda a las 24h de la I/R, sin embargo no hemos encontrado diferencias significativas en el modelo animal 1 semana después.

Por otra parte, como se observa en las figuras 20B y 20C, no encontramos diferencias significativas en la expresión de miR-125a ni de miR-324 en ninguno de los puntos estudiados del modelo animal de I/R.

D.5.5. Búsqueda de función de los microRNAs miR-125a, miR-139-3p y miR-324

Los microRNAs tienen una función moduladora de la expresión génica y actúan controlando a nivel post-transcripcional la expresión de sus genes diana. Con objeto de profundizar en la red transcripcional regulada en última instancia por Ucn, en adelante trataremos de describir los posibles genes diana de los microRNAs regulados por Ucn: miR-125a, miR-139-3p y miR-324.

Como se ha descrito en el apartado de introducción los microRNAs son capaces de unirse a la región 3' UTR del mRNA de sus genes diana para reprimir su transcripción a proteína. Las propiedades de unión entre microRNAs y su mRNA diana es un tema altamente complejo y cuando se trata de hacer una búsqueda bioinformática hay varios programas que utilizan diferentes algoritmos matemáticos para calcular probabilidades de unión entre ambas moléculas de RNA. Entre las muchas variables que se barajan podemos destacar: i) homología entre la secuencia "seed" del

microRNA y la región 5'UTR del mRNA, y ii) número de regiones dentro del mismo mRNA que tiene cierta homología con la secuencia "seed" del microRNA. Por otra parte debido a la propia naturaleza de los microRNAs cuya secuencia seed de unión a mRNA nunca es totalmente homóloga a dicho mRNA, sino que solamente 6 ó 7 residuos de los 8 son complementarios, hace que un mismo microRNA tenga múltiples dianas de mRNAs potenciales, y de hecho un mismo microRNA puede tener realmente varios mRNA diana, sobre los cuales está ejerciendo su función de regulación génica. De modo que el análisis de posibles genes diana para un determinado microRNA no es tarea fácil. Por lo general cada programa con su algoritmo suele dar unos resultados únicos, consistentes en un listado de cientos de posibles mRNA dianas ordenados según la probabilidad que su algoritmo da a la posible unión con la secuencia seed del microRNA concreto que estemos analizando.

	Símbolo	nombre completo	Ref Seq
miR-125a	Mtfr1	mitochondrial fission regulator 1	NM_001100977.1
	Igf2	insulin-like growth factor 2	NM_001190162.1
	Map3k12	mitogen activated protein kinase kinase kinase 12	NM_013055.1
	Brca1	breast cancer 1, early onset	NM_012514.1
	Xbp1	X-box binding protein 1	NM_001004210.2
	Map2k7	mitogen activated protein kinase kinase 7	NM_001025425.1
	Cpt2	carnitine palmitoyltransferase 2	NM_012930.1
	Taz	tafazzin	NM_001025748.1
	Rgs4	regulator of G-protein signaling 4	NM_017214.1
	Smad4	SMAD family member 4	NM_019275.2
	Nrg1	neuregulin 1	NM_001271130.1
miR-139-3p	Igf1r	insulin-like growth factor 1 receptor	NM_052807.2
	Foxo1	forkhead box O1	NM_001191846.2
	CxcR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	NM_022205.3
	Pde4A	phosphodiesterase 4A, cAMP-specific	NM_013101.3
	Gnb1	guanine nucleotide binding protein, beta polypeptide 1	NM_030987.2
	Col5a2	collagen, type V, alpha 2	NM_053488.1
	Camta2	calmodulin binding transcription activator 2	NM_001105801.2
miR-324	Crebbp	CREB binding protein	NM_133381.3
	STAT2	signal transducer and activator of transcription 2	NM_001011905.1
	Bcl2l11 (Bim)	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	NM_022612.1
	Dnajb6	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 6	NM_001013209.1
	Nfat5	nuclear factor of activated T-cells 5, tonicity-responsive	NM_001107425.1
	Dag1	dystroglycan 1 (dystrophin-associated glycoprotein 1)	NM_053697.1
	Casq1	calsequestrin 1 (fast-twitch, skeletal muscle)	NM_001159594.1

Figura 21. Lista de posibles genes dianas para mir125a, mir139-3p, y mir324 obtenida mediante análisis bioinformático en las plataformas de software online PicTar, TargetScan, y miRBase.

Realizamos un análisis bioinformático para detectar posibles mRNAs diana para miR-125a, miR-139-3p y miR-324 utilizando las plataformas de software PicTar, TargetScan y miRBase para obtener una lista de genes con diferentes puntuaciones y probabilidades. Seguimos dos criterios para la selección de dianas potenciales; por un lado que el transcrito en cuestión apareciera como posible diana en las tres plataformas de análisis, y que además dicho gen tuviera alguna función conocida que pudiera ser relacionada con nuestro ambiente fisiológico; esto es protección miocárdica, daños por reperfusión, remodelado ventricular, procesos celulares de interés como fibrosis, apoptosis, etc. El resultado puede verse en la figura 21, donde se muestran posibles genes diana para miR-125a, miR-139-3p y miR-324 de acuerdo a lo antes expuesto, es decir que aparecieran con alta probabilidad de unión a la secuencia seed de cada microRNA en las 3 plataformas de software utilizadas.

Posteriormente se procedió a validar estas dianas con una estrategia basada en la sobre-expresión de dichos microRNAs en cultivo de cardiomiocitos neonatos de rata mediante vectores lentivirales, y el análisis cuantitativo de la expresión de sus posibles mRNAs diana mediante Taqman qRT-PCR. Lo que esperamos al sobre-expresar de manera global un microRNA en cultivo es encontrar que la expresión de los posibles genes diana se vea reducida significativamente. Para obtener una sobre-expresión lo bastante alta y homogénea en el cultivo primario de cardiomiocitos, decidimos realizar construcciones lentivirales de sobre-expresión para cada microRNA (pSD-lenti-microRNA-GFP). En la figuras C1 y C2 de materiales y métodos se presentó la construcción y validación de los vectores lentivirales usados para sobre-expresar cada microRNA. Finalmente obtuvimos muestras de RNA total de los cultivos de cardiomiocitos infectados con lentivirus donde se había sobre-expresado cada microRNA y realizamos una cuantificación de la expresión mediante Taqman qRT-PCR de los potenciales genes diana presentados en la figura 21.

Como puede verse en la figura 22A la sobre-expresión de miR-125a resultó en una disminución significativa en los niveles de mRNA de los genes BcrA1 (gen supresor de tumores que actúa a través de p53), Cpt2 (carnitina palmitoil transferasa) y Taz (taffazin).

En la figura 22B la sobre-expresión de miR-139-3p redujo significativamente el nivel de mRNA del gen *Pde4a*, una fosfodiesterasa específica de cAMP.

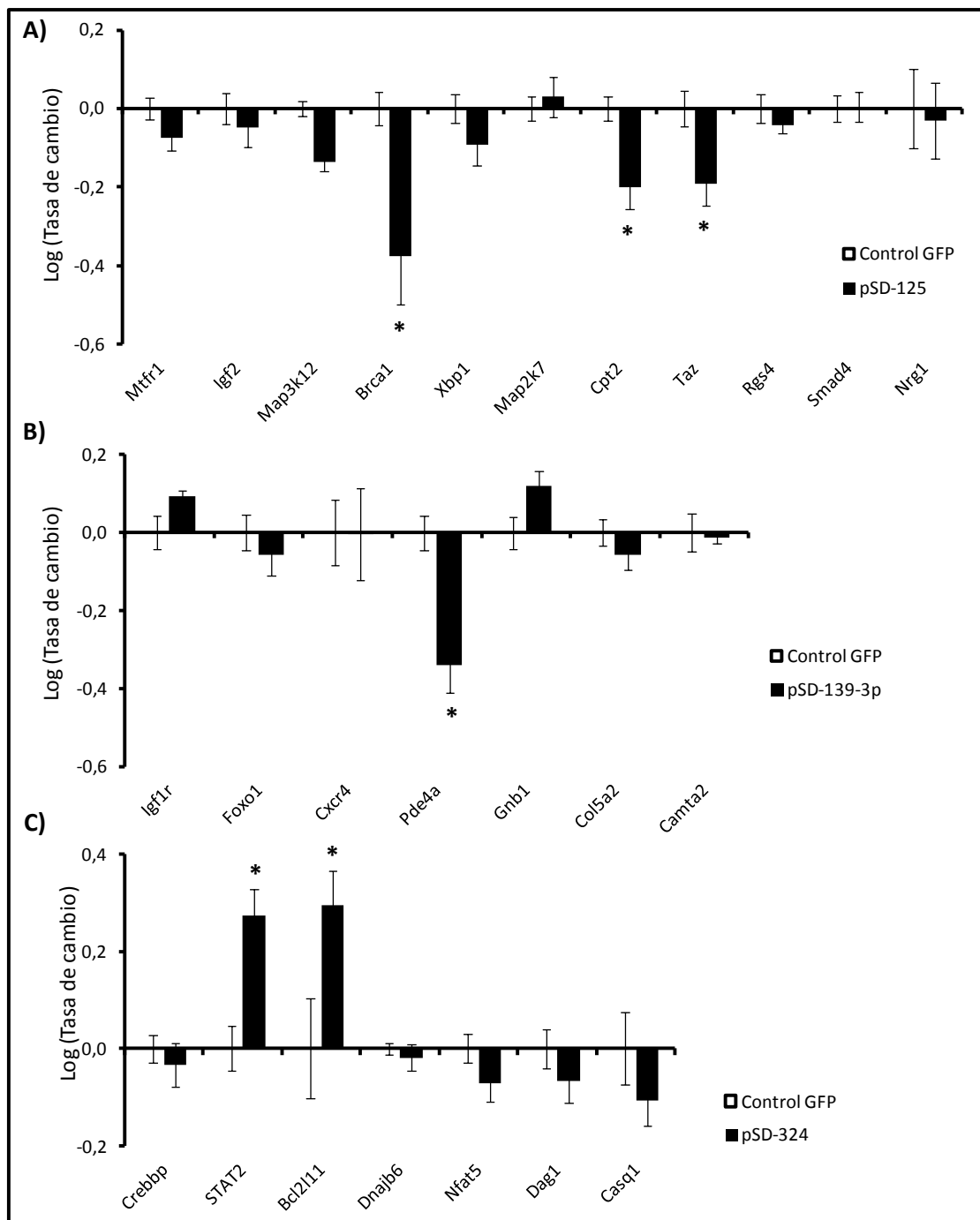


Figura 22. Cuantificación de la expresión de mRNA mediante qRT-PCR de los genes diana de los microRNAs mir125a, mir139 y mir324. Se muestra la tasa de cambio en escala logarítmica de cardiomiocitos neonatos de rata infectados con lentivirus de sobreexpresión de miR-125a (A), miR-139-3p (B) y miR-324 (C) respecto a células infectadas con el vector GFP.

Por su parte en la figura 22C se muestra como la sobreexpresión de miR-324 sorprendentemente aumentó de forma significativa los niveles de mRNA de *Stat2* (gen transductor de señales perteneciente a la familia Stat) y *Bcl2l11* (Bcl2 like 11, gen con

carácter proapoptótico). Aunque es una situación poco frecuente se ha documentado en ocasiones que algunos microRNAs pueden producir sobreexpresión de sus genes diana en lugar de represión, y como veremos en el apartado de discusión, parece que miR-324 puede ser uno de esos microRNAs.

De modo que en esta primera aproximación experimental para describir posibles dianas de los microRNAs regulados por Ucn podemos decir que: i) Ucn aumenta los niveles de miR-125a, inhibiendo post-transcripcionalmente a BrcA1, Cpt2 y Taz, ii) Ucn disminuye los niveles de miR-139-3p, lo que resultaría en una menor inhibición de la expresión de Pde4A y iii) Ucn aumenta los niveles de miR-324, que a su vez favorece la expresión de Stat2 y Bcl2_11.

D.5.6. microRNAs circulantes en pacientes STEMI tras angioplastia primaria.

Los resultados mostrados a continuación son sólo una parte de un proyecto que se está desarrollando actualmente en nuestro laboratorio llamado miR-IAM, cuyo objetivo es describir el perfil de microRNAs circulantes en muestras de sangre de pacientes que han sufrido un IAM con elevación del segmento ST (STEMI) tratados mediante angioplastia primaria en la unidad de hemodinámica de los hospitales Virgen del Rocío de Sevilla y Virgen de la Victoria en Málaga.

Los criterios de inclusión de pacientes, descritos en la sección de materiales y métodos, fueron tan selectivos que nos permitiera obtener un grupo muy concreto de pacientes para tratar de aislar todo lo posible el factor debido a los daños de la propia I/R, frente a un grupo de pacientes control con dolor torácico, pero que tras el cateterismo no se encontraron lesiones vasculares.

El esquema de actuación puede verse en la figura 23A, y consistió en la toma de una muestra de sangre del paciente con IAM una vez llega a la unidad de hemodinámica justo antes de realizar el cateterismo (0h), y otras 4 muestras 3h, 12, 24h y 48h después de realizada la intervención de revascularización o reperfusión. Dichas muestras de sangre fueron procesadas para obtener el suero y este guardado a -80°C hasta su análisis en nuestro laboratorio. Al margen de otros estudios que no pertenecen al objetivo de esta tesis, realizamos una cuantificación mediante qRT-PCR

de los niveles de miR-125, miR-139-3p y miR-324 en el suero procedente de las muestras de sangre mencionadas anteriormente.

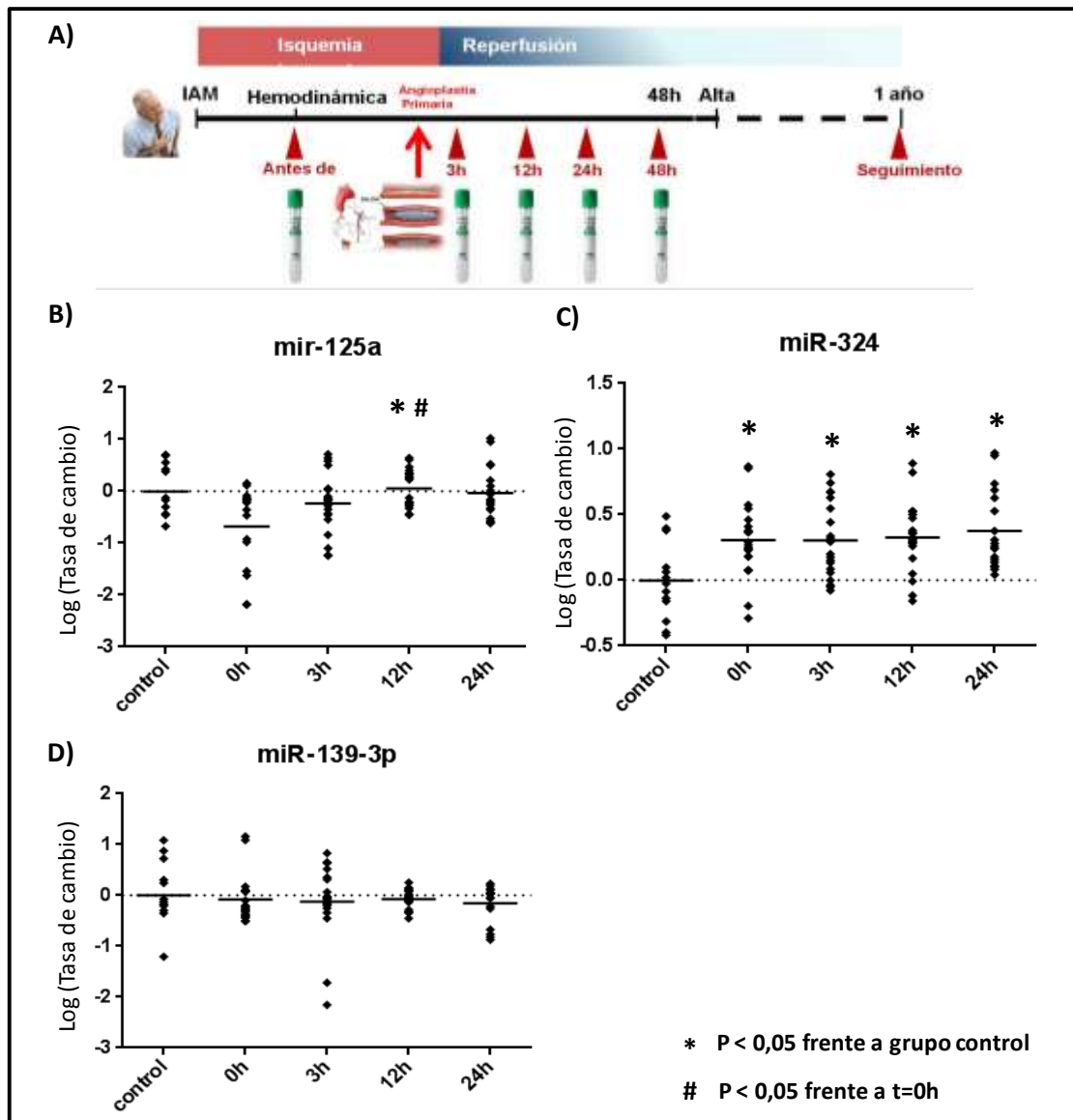


Figura 23. microRNAs circulantes en pacientes con STEMI tratados mediante angioplastia primaria. A) Esquema de actuación del estudio miRIAM. B) Nivel de expresión de mir125, mir139-3p y mir324 en muestras de sangre de pacientes con infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST sometidos a angioplastia primaria en el momento antes de la intervención (t=0h) y 3h, 12h y 24h después de la angioplastia.

Como se observa en la figura 23B los niveles de miR-125a se ven elevados de forma significativa 12h después de la ACTP respecto al tiempo 0 justo antes de que se hubiera abierto el vaso, realizando un análisis pareado entre los valores de cada paciente. Mientras los pacientes están en isquemia (0h) los niveles de miR-125a no varían significativamente respecto al grupo de pacientes control, aunque el nivel de expresión tiende a ser menor. Posteriormente parece que la reperfusion provoca la

liberación de miR-125a, siendo a las 12h significativamente mayor que a las 0h haciendo un análisis pareado entre las dos muestras de cada paciente. Este resultado unido a los mostrados previamente en otros modelos experimentales, como son los corazones ex vivo y el cultivo de cardiomiocitos adultos nos hace pensar que miR-125a podría estar relacionado con los daños por reperfusión.

Por su parte en la figura 23C se muestran los datos de miR-324 circulante. El nivel de expresión de miR-324 está significativamente elevado en toda la curva temporal de los pacientes con IAM, desde el tiempo 0 antes de abrir el vaso, hasta los puntos 3h, 12h y 24h después de la ACP, cuantificados de forma relativa respecto al grupo de pacientes control. Sin embargo no hay diferencias entre los puntos 3h, 12h y 24h después de la ACP, respecto al tiempo 0 de cada paciente, por lo que parece que miR-324 es liberado al torrente sanguíneo por la propia lesión isquémica, y podría tener potencial uso como biomarcador de daño cardíaco.

Para terminar no se han encontrado hallazgos significativos respecto a miR-139-3p de forma circulante en este estudio.

E.
DISCU
SIÓN

E. DISCUSIÓN

E.1. Protección miocárdica en el IAM.

Según el último informe del Sistema Nacional de Salud (2011) la enfermedad isquémica del corazón supuso en 2007 el 9,65% de todas las muertes en nuestro país. El infarto agudo de miocardio (IAM) produce en España aproximadamente 140.000 muertes al año y 5 millones de hospitalizaciones, lo que supone un coste sanitario del 15% del gasto total. A pesar del avance en el tratamiento del IAM, a día de hoy sigue siendo de primera importancia la búsqueda de nuevas estrategias de cardioprotección tanto para reducir el número de muertes directas, como para reducir la probabilidad de que los pacientes que sobreviven a un IAM sufran nuevos eventos cardiovasculares. Sirva como dato que el 20% de estos pacientes reingresan por nuevos eventos isquémicos durante el primer año y más del 50% en los siguientes 7 años. Además la carga de enfermedad de la patología cardiovascular supone un 12,5% del total, debido a la alta mortalidad y a la pérdida de calidad de vida por discapacidad, en gran medida consecuencia de la aparición de insuficiencia cardiaca (IC) después de un IAM (Eva Andrés, 2012).

Durante las primeras 12 horas de un IAM el porcentaje de miocardio isquémico recuperable se reduce de forma progresiva. La implementación de estrategias de reperfusión ha hecho que se produzca una reducción marcada de la mortalidad intrahospitalaria en los países desarrollados, disminuyendo desde un 20% en los años 80 a aproximadamente un 5 % en la actualidad (Eapen, 2012). Paradójicamente, esta reducción de la mortalidad ha provocado un aumento de la incidencia de insuficiencia cardiaca posterior. De hecho, la disfunción ventricular post-infarto es una de las principales causas de insuficiencia cardiaca en la actualidad (Callender, 2014). Dado que la necrosis irreversible del miocardio dependiente de la arteria coronaria ocluida es un proceso que transcurre en horas, el manejo del síndrome coronario agudo con elevación del segmento ST se basa en un diagnóstico precoz, y en unas medidas que permitan restaurar lo antes posible el flujo coronario de la arteria ocluida, dentro de las primeras 12 horas del comienzo de los síntomas. La reperfusión, ya sea mediante angioplastia primaria o mediante fibrinólisis, es el tratamiento estándar del IAM con

elevación del segmento ST. La restauración rápida del flujo coronario reduce el tamaño del infarto y la mortalidad, sin embargo paradójicamente, esta restauración del flujo sobre células previamente isquémicas y la reactivación del metabolismo celular en unas condiciones no fisiológicas puede producir un daño adicional y complicaciones secundarias. Este fenómeno se conoce como daño por reperfusión, y es más frecuente cuanto más se demora la apertura del vaso. Antes de la muerte celular hay un período en el que los cardiomiocitos aunque viables, son muy vulnerables, de tal manera que la restauración del flujo produce un daño celular adicional, que puede desencadenar procesos celulares adversos e incluso ocasionar muerte celular en una segunda ventana temporal.

Existe un continuo interés en encontrar nuevas dianas terapéuticas que puedan potencialmente proteger al corazón de los daños por I/R y cada vez más de las complicaciones posteriores (Chambers, 2010). Gracias a los programas de angioplastia primaria se ha reducido tanto el tiempo de infarto que el tamaño del infarto es por regla general lo suficientemente pequeño para no provocar la muerte del paciente. Sin embargo el hecho de haber sido sometido a una pronta y exitosa reperfusión no significa que el corazón no haya sido dañado. Aún con tiempos de infarto cortos, y por consiguiente tamaños de infarto pequeños, los daños producidos en el miocardio por la I/R acarrearán una serie de problemas secundarios cuyo máximo exponente es la aparición de remodelado ventricular adverso e IC. Por tanto la puerta para investigar nuevas terapias cardioprotectoras sigue abierta (Ovice, 2010).

E.2. Urocortina como péptido protector tras isquemia/reperfusión.

Diferentes estrategias se han utilizado para tratar de mejorar la eficacia de las intervenciones coronarias mediante tratamientos cardioprotectores. Las clásicas estrategias de pre- y post-condicionamiento isquémico, las cuales han demostrado proteger de manera efectiva el corazón reduciendo el tamaño del infarto, fueron el inicio y la base sobre la que se apoyaron multitud de estudios que buscaban utilizar moléculas o potenciar mecanismos que sucedían en el condicionamiento isquémico (Heusch, 2015). Se ha intentado por ejemplo la inhibición de la MPTP mediante

ciclosporina intravenosa (Cung, 2015), o el uso de adenosina con resultados esperanzadores en modelos animales (García-Dorado, 2014), pero escaso éxito en la práctica clínica.

Una de las moléculas presentes durante el condicionamiento isquémico con importantes propiedades cardioprotectoras, consideradas por tanto como un cardioprotector endógeno, es la Ucn. En un principio se propuso que la expresión de Ucn era producida por el sistema nervioso central, sin embargo actualmente hay consenso en que Ucn es expresada y liberada directamente por el corazón después de un daño isquémico (Knight, 2008). Nuestros resultados muestran como tanto en un modelo animal de IAM como de I/R los niveles de Ucn en sangre aumentan significativamente. Además analizamos la expresión de su receptor CRF-R2 en muestras de tejido miocárdico en el modelo de IAM e I/R, y mostramos como los niveles de CRF-R2 aumentan en el tejido miocárdico en ambos modelos respecto al grupo control. En ambos casos y consistentemente con los niveles elevados de Ucn en sangre, el aumento de expresión del receptor CRF-R2 ocurre 1 semana después de la lesión, y parece restablecerse tiempo después, volviendo a los valores basales a las 6 semanas de realizar el modelo.

Un buen número de investigaciones han colocado a la Ucn como un agente con gran potencial terapéutico debido a sus propiedades cardioprotectoras, sobre todo en trabajos sobre corazones montados ex vivo en sistema Langendorff, frente a los daños por IAM e I/R. Sin embargo no hay tantas evidencias en modelos animales in vivo. De hecho según nuestro conocimiento es la primera vez que se muestra un efecto cardioprotector de Ucn en un modelo animal de I/R in vivo. En la figura 2 hemos mostrado como en un modelo animal de I/R el tratamiento con 150 µg/Kg de Ucn durante los primeros minutos de la reperfusión mejora la recuperación de la contractilidad del corazón 1 semana después de haber realizado la intervención, estimada por la fracción de eyección mediante ecocardiografía.

E.2.1. Urocortina mejora la función hemodinámica del corazón tras I/R

Así como el papel de Ucn en la protección del miocardio después de un IAM está bastante bien estudiado, no ocurre lo mismo en un infarto reperfundido. Se

conoce mucho menos sobre el efecto protector que pueda tener Ucn sobre los daños por reperfusión. En este sentido hay que señalar que las propiedades cardioprotectoras de Ucn envuelven mecanismos de protección a diferentes niveles: i) Por inducción de la relajación a nivel vascular periférico lo que entre otras cosas disminuye la presión arterial media, ii) Por su efecto inotrópico positivo sobre el miocardio mejorando los parámetros hemodinámicos, y iii) y por la activación de mecanismos de supervivencia celular.

i) Los efectos beneficiosos de Ucn sobre los vasos sanguíneos se deben principalmente al control de la entrada de Ca^{2+} . Pero además de provocar una vasodilatación sistémica que conlleva una reducción de la presión arterial media, Ucn es capaz de inducir relajación de los vasos del propio corazón, favoreciendo la circulación, datos que han sido publicados anteriormente en nuestro grupo sobre un modelo ex vivo en arteria coronaria de rata (Smani, 2007), y humana (Smani, 2011). Nuestros resultados muestran cómo en corazón aislado y perfundido en sistema Langendorff la aplicación de 10 nM de Ucn disminuye la presión diastólica final y mantiene reducida las resistencias vasculares, disminuyendo la presión coronaria intracardiaca después de una I/R. Estos datos suponen en si mismo una menor carga de trabajo para el corazón, y podrían prevenir la llamada hipercontractura isquémica o rigor, ayudando a la recuperación hemodinámica del corazón, como veremos a continuación.

ii) Nuestros datos sobre corazones de rata montados ex vivo en el sistema Langendorff y sometidos a un protocolo de I/R muestran cómo el tratamiento con 10 nM de Ucn produce una recuperación significativamente mejor de la contractilidad. De tal modo que Ucn es capaz de preservar la función hemodinámica del corazón y lo protege de los daños producidos por una I/R. De hecho hemos mostrado y comparado dos formas de aplicar Ucn: por una parte un pre condicionamiento clásico, aplicando Ucn durante todo el protocolo de I/R (Ucn pre y post), y por otra parte un post condicionamiento aplicando Ucn solamente durante los primeros minutos de la reperfusión (Ucn post). En ambos casos la aplicación de Ucn permite recuperar la contractilidad después de I/R de forma equivalente. El hecho de que los efectos beneficiosos de Ucn se mantengan aplicándose en la reperfusión aumenta la

relevancia del posible uso clínico de Ucn como agente terapéutico en el tratamiento del IAM, donde no hay posibilidad de aplicar el tratamiento antes de que ocurra.

Generalmente la recuperación de la contractilidad en reperfusión se asocia a una disminución del tamaño del infarto y mejora del control del Ca^{2+} intracelular (Scarabelli, 2002). De hecho en este sentido nuestro grupo ha descrito recientemente un nuevo mecanismo de modulación de la Ucn sobre los canales voltaje dependientes tipo L en cardiomiocitos adultos. La Ucn provoca un aumento en la densidad de la corriente I_{CaL} a través de su receptor CRF-R2 que implica a las proteínas PKC y ERK1/2 (Smani, 2010).

iii) Y finalmente el grado de disfunción cardíaca después de un daño isquémico es un reflejo de la gravedad de la lesión a nivel celular, que en último término significa la muerte de los cardiomiocitos, y la formación de una escara o cicatriz en el tejido. Esto se relaciona posteriormente con la aparición de remodelado ventricular adverso, insuficiencia cardíaca y un peor pronóstico de esos corazones a largo plazo. Desde un principio aparecieron en la literatura artículos relacionando el uso de Ucn en I/R con un efecto citoprotector en los cardiomiocitos, tanto por prevención del daño mitocondrial (Lawrence, 2004), como por reducción de la muerte celular (Knight, 2008).

Sin embargo Ucn no sólo mejora a corto plazo el manejo del Ca^{2+} intracelular y reduce el daño mitocondrial, como hemos determinado en nuestro grupo previamente, (Calderón-Sánchez, 2011), sino que activa vías de señalización complejas que promueven protección celular a más largo plazo mediante procesos de regulación de la expresión génica. Prueba de ello son los trabajos que describen como Ucn aumenta los niveles de expresión de proteínas con propiedades cardioprotectoras conocidas como son Hsp90 (Brar, 2002) y Cardiotrofina-1 (Janjua, 2003). A día de hoy no se ha profundizado mucho más en esta vía de estudio, siendo precisamente la complejidad de la regulación génica detrás de Ucn el aspecto en el que profundizaremos a continuación. Veremos la importancia que pueden tener estos mecanismos de regulación génica sobre la supervivencia celular a largo plazo, y el posible remodelado ventricular adverso posterior.

E.2.2. Urocortina mejora la supervivencia celular tras I/R

Nuestros resultados muestran cómo Ucn proporciona diferentes efectos citoprotectores frente a los daños por I/R. Hemos mostrado como la aplicación de 10 nM de Ucn mejora la supervivencia celular de cardiomiocitos adultos aislados en cultivo después de una I/R, dando lugar a un mayor número de células viables, morfológicamente en buen estado, y con un menor porcentaje de células marcadas con Trypan Blue, indicativo de células muertas donde la membrana plasmática está dañada. Esto ha sido corroborado por una menor presencia de LDH en el medio extracelular en los cultivos de cardiomiocitos tratados con Ucn, reflejando una menor tasa de muerte celular por necrosis.

Por otra parte hemos visto cómo la aplicación de Ucn no sólo disminuye el número de células que mueren tras una I/R, además las que mueren lo hacen en mayor medida mediante un proceso de muerte celular programada y que supone un menor impacto en el ambiente celular adyacente (Scarabelli, 2006). Nuestros resultados apoyan la idea de que en conjunto Ucn actúa modulando los mecanismos de muerte celular mediante un cambio en la forma en la que mueren los cardiomiocitos: disminuyendo el número de células que mueren por necrosis, y pasando a hacerlo de manera activa y controlada a través del proceso de apoptosis.

Durante mucho tiempo se cuestionó la importancia de la muerte celular por apoptosis frente a la muerte por necrosis en el corazón isquémico. No fue hasta 1994 cuando se relacionó por primera vez la apoptosis con los daños por I/R (Gottlieb, 1994). Sin embargo más allá de ser dos formas de muerte excluyentes hay indicios de que ambos mecanismos pudieran estar conectados. En el inicio de la apoptosis la liberación del citocromo-c mitocondrial desencadena la activación de la cascada de caspasas, pero también produce la pérdida de fosforilación oxidativa y reduce la síntesis de ATP, poniendo en peligro el desarrollo de la propia apoptosis (Krippner, 1996). También se ha visto relación entre las calpaínas que dan lugar a necrosis y la activación de las caspasas que van a producir apoptosis (Nakagawa, 2000). La producción de radicales libres, el aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular y el resto de alteraciones ocurridas durante un periodo de isquemia pueden promover el

inicio de apoptosis. No obstante el proceso de apoptosis es dependiente de energía, por lo que aun no está claro si la isquemia en si misma puede disparar la apoptosis, o es necesario que se produzca la reperfusión. Parece claro que si la isquemia que se produce es severa y reduce las reservas de ATP por debajo del 70% es imposible que tenga lugar un proceso apoptótico (Leist, 1997). Durante la isquemia se podrían iniciar las primeras etapas de la apoptosis, pero se necesita la recuperación energética tras la reperfusión para que se complete el proceso apoptótico (Freude, 2000).

Por tanto cada vez está más aceptado que sobre todo el daño por reperfusión es capaz de provocar este tipo de muerte celular, y puede ser de gran importancia para la recuperación o el fitness de los corazones infartados a largo plazo (Scarabelli, 2006). El hecho de que un grupo grande de células en un evento lesivo más o menos agudo como es un infarto reperfundido mueran mayoritariamente por necrosis o apoptosis puede tener consecuencias muy diferentes fisiológicamente hablando para el resto del tejido sano. Una muerte masiva de células por necrosis provoca a nivel local una gran liberación de contenido celular que entre otras cosas va a provocar una fuerte respuesta inflamatoria y daños secundarios a las células que permanecen con vida. De hecho ya se ha propuesto anteriormente que conseguir cambiar la necrosis por apoptosis es en si mismo una potente acción cardioprotectora (Chen-Scarabelli, 2004). Nuestros datos confirman que dentro de la acción cardioprotectora de Ucn se encuentra el promover mecanismos celulares que favorecen el cambio del tipo de muerte celular de los cardiomiocitos después de una I/R.

A pesar de que en un principio se propuso que Ucn podía ejercer su función cardioprotectora mediante la disminución de la apoptosis de los cardiomiocitos (Scarabelli, 2002; Valentim, 2006) hay suficiente conocimiento que hace plausible el hecho de que Ucn favorezca el tipo de muerte celular por apoptosis frente a la necrosis:

i) Ucn aumenta la supervivencia de los cardiomiocitos tras I/R, y aunque separar ambos tipos de muerte celular es difícil, la disminución de la apoptosis no es en si misma una acción cardioprotectora, que depende más bien del balance necrosis/apoptosis.

ii) Los trabajos que describen reducción de los niveles de apoptosis en cardiomiocitos se basan en infartos no reperfundidos, donde ya hay de por sí bajos niveles de apoptosis.

iii) La muerte por apoptosis necesita mecanismos activos y tiene un coste energético, por lo que es necesario que la célula tenga unas condiciones fisiológicas lo suficientemente mantenidas como para desencadenar los procesos celulares que conlleva la muerte por apoptosis. Y de hecho hay consenso en que Ucn favorece la mejora bioenergética de la célula, y mejora el ratio ATP/ADP, en gran medida por la protección de la mitocondria (Lawerence, 2004), por lo tanto la aplicación de Ucn tras una I/R favorecería que se dieran las condiciones necesarias para que la célula pudiera activar los mecanismos de apoptosis.

iv) Previamente ha sido descrito por Takatani-Nakase que la acción cardioprotectora ejercida por Ucn se debía a una disminución de la muerte celular independiente de las caspasas y que se debía en gran medida a una reducción en los niveles de la fosfolipasa iPLA₂ (Takatani-Nakase, 2010). De hecho en nuestro grupo ya describimos como Ucn era capaz de reducir, no solo la actividad de dicha iPLA₂, sino también disminuir su expresión (Smani, 2007).

Es decir, tal como apoyan nuestros resultados, Ucn mejora la supervivencia celular de los cardiomiocitos tras I/R. La mejora en la homeostasis del Ca²⁺ intracelular, la protección de la mitocondria y la mejora de la bioenergética celular, crea unas condiciones citoprotectoras que logran rescatar un número elevado de células que de lo contrario morirían. Ucn reduce el número de células que mueren por necrosis, y por otra parte crea las condiciones necesarias para que un buen número de células con daño irreversible en vez de morir por necrosis, sean capaces de activar el programa de muerte celular controlada, la apoptosis.

La activación del programa de muerte celular por apoptosis tiene dos formas de producirse, a través de receptores de muerte en la membrana celular, o a través de la mitocondria. Pero en ambos casos es necesaria la activación secuencial de una cascada de caspasas que en último término van a llevar a cabo los procesos proteolíticos que desencadenan el proceso de muerte propiamente dicha. Nuestros resultados

muestran cómo el tratamiento con Ucn es capaz de aumentar significativamente la actividad de las caspasas efectoras 3/7. Por otra parte hemos mostrado cómo Ucn produce un aumento de la actividad de la caspasa 9 perteneciente a la vía apoptótica mitocondrial, mientras que no encontramos cambios en la caspasa 8 perteneciente a la vía apoptótica de los receptores de muerte, resultado esperable dado el número de referencias donde Ucn se relaciona con la mitocondria.

E.3. Urocortina desencadena cambios de expresión génica que inducen cardioprotección.

E.3.1. Urocortina aumenta la expresión de la proteína proapoptótica BAD.

Dentro del cambio en el tipo de muerte celular, Ucn puede crear en agudo condiciones que favorecen la recuperación fisiológica celular. De hecho esta mejora en las condiciones celulares alarga la escala de tiempo en la que se desencadenan los siguientes mecanismos. Evidentemente tal cantidad de eventos celulares y metabólicos dan lugar al disparo de múltiples cascadas de señalización que desembocan en cambios de expresión génica, en un intento celular de adaptarse a las condiciones fisiológicas sufridas. De hecho en el proceso de apoptosis es muy importante la regulación de los procesos de expresión génica sobre una amplia batería de genes involucrados. Nuestros resultados del array de expresión génica y nuestros experimentos de qRT-PCR confirmaron que hay una importante regulación génica desencadenada por el tratamiento con Ucn. Hemos demostrado que Ucn es capaz de aumentar la expresión de BAD, una proteína de la familia Bcl-2 que promueve o favorece la entrada en apoptosis al liberar a la proteína Bax de la unión con Bcl-XL y Bcl-2 (Yang, 1995). Nuestros resultados confirman que Ucn aumenta no sólo los niveles de mRNA de BAD, sino también la cantidad de proteína total analizada mediante experimentos de WB. Estos resultados pueden explicar al menos parcialmente que Ucn aumente el nivel de apoptosis en los cardiomiocitos tras una I/R.

La actividad de la proteína BAD es regulada mediante un sistema de fosforilación, de tal modo que cuando las serinas 112 y 136 están fosforiladas, la proteína se encuentra secuestrada en el citoplasma. Para poder realizar su función BAD tiene que estar en su forma defosforilada de modo que sea capaz de translocarse

al núcleo, donde como hemos visto anteriormente, es capaz de unirse a Bcl-2, liberando a Bax de la unión con la misma Bcl-2, de modo que pueda promover la entrada en apoptosis. Por el contrario la cascada de señalización inhibitoria conduce a una fosforilación en los residuos de serina 112 y 136 mediante la proteína AKT, inactivando a la proteína BAD, cuya fosforilación le impide entrar al núcleo y realizar su función (Datta, 1997). Nuestros resultados muestran cómo la mayor cantidad de proteína total obtenida en cardiomiocitos tratados con Ucn se corresponde con una mayor cantidad de la fracción libre de la proteína, es decir activa, lo que dispara la entrada en apoptosis a través de la proteína Bax. La liberación de Bax aumenta la permeabilidad de la membrana mitocondrial, produciéndose una mayor liberación del citocromo-c, que da lugar finalmente a la activación de la caspasa 9 y desencadena el proceso de apoptosis (Marzo, 1998). Estos datos concuerdan con los resultados mostrados anteriormente donde Ucn aumenta significativamente la actividad de caspasa 9.

Es importante señalar que existe un trabajo anterior donde se describe un mecanismo proapoptótico inducido por Ucn a través del receptor CRF-R2 en macrófagos, lo que conlleva un efecto antiinflamatorio sobre el sistema inmune (Tsatsanis, 2005). Por tanto es plausible que Ucn ejerza protección miocárdica disminuyendo la respuesta inflamatoria tras una I/R en dos niveles diferentes a través del mismo mecanismo celular: i) Ucn podría aumentar la expresión de BAD y promover la apoptosis de los cardiomiocitos tras I/R, entonces los cuerpos apoptóticos serían fagocitados por los macrófagos sin estimular respuesta inflamatoria, ii) donde al mismo tiempo Ucn estaría promoviendo la apoptosis de dichos macrófagos a través de BAD. Esto daría lugar a una menor respuesta inflamatoria, más eficaz, y con una resolución más rápida del proceso.

E.3.2. Urocortina aumenta la expresión de las proteínas antiapoptóticas CD40-Lg y XIAP.

Nuestros resultados de array de expresión y qRT-PCR muestran como Ucn regula la expresión de otros 2 genes con importante función en los mecanismos de apoptosis celular. Ucn sobre-expresa los genes CD40-Lg y XIAP después de I/R, lo que

resultaría en un estímulo anti-apoptótico, ya que ambas proteínas actúan inhibiendo directamente a las caspasas efectoras finales. Nuestros resultados muestran cómo la I/R reduce significativamente los niveles de expresión de CD40-Lg y XIAP, niveles que son preservados con la aplicación de 10 nM de Ucn. De hecho la expresión de CD40-Lg y XIAP parece estar íntimamente relacionada. Ambos genes se encuentran en la misma localización cromosómica y según parece bajo la acción del mismo promotor (Malarstig, 2006).

XIAP pertenece a la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP: Inhibitor Apoptosis Protein). La acción inhibitoria de XIAP sobre la apoptosis se debe a una inhibición directa sobre las caspasas efectoras finales: caspasa-3 y -7 (Bergmann 2001). De la acción de CD40-Lg se sabe realmente poco, pero hay trabajos previos donde parece que CD40-Lg estaría actuando de manera sinérgica a XIAP sobre las caspasas efectoras, como inhibidores de la apoptosis (Rigaud, 2011).

Previamente Barry y colaboradores habían realizado un estudio de expresión génica en un modelo de oclusión de la arteria coronaria in vivo y observaron cambio de expresión en 66 y 144 genes al alza y baja respectivamente. De hecho el análisis del array mostraba como el mayor conjunto de genes regulados por Ucn tenían que ver con el proceso de muerte celular. Al estudiar en detalle el grupo de genes regulados por Ucn encontramos que uno de los genes con mayor tasa de cambio fue el propio XIAP (Barry, 2010), datos que no fueron validados ni contrastados. Desde nuestro conocimiento esta es la primera vez que se describe la regulación de Ucn sobre XIAP y CD40-Lg, y su efecto sobre la citoprotección, trabajo que acabamos de publicar (Calderón-Sánchez, 2016).

Nuestros resultados indican que Ucn regula la expresión de BAD por una parte y de CD40-Lg y XIAP por otra, lo que serían efectos antagónicos. ¿Cómo se explica que Ucn tenga efectos pro- y anti-apoptóticos a la vez? En primer lugar no es extraño pensar que en un escenario tan complejo como una I/R se generen gran variedad de estímulos que activen diferentes vías de señalización, con efectos variados e incluso contrarios. La homeostasis celular depende en gran medida de un balance equilibrado entre diferentes estímulos que en su conjunto dan lugar a un determinado estado

fisiológico en la célula. Cuando aparece un nuevo estímulo en la célula se producen procesos de señalización empujando en una u otra dirección, determinando en su conjunto una determinada respuesta celular según predominen unos estímulos sobre otros. Además la convivencia de estímulos opuestos no es extraña en los sistemas biológicos, de hecho L. Jin describió que el péptido CRF y la Ucn2 tenían efectos antagónicos en las mismas células procedentes de cáncer de próstata. En dicho estudio se describe cómo CRF promueve apoptosis reduciendo la expresión de Bcl-2, activando Bax, e hiperpolarizando la membrana mitocondrial, lo que acaba activando la caspasa 9. Mientras que Ucn2 actúa inhibiendo la apoptosis, mediante un aumento de la expresión de Bcl2, y disminución de Bax (Jin, 2011). Dentro de este balance pro- y anti-apoptótico, en nuestros cultivos de cardiomiocitos adultos hemos visto que en la aplicación de Ucn frente a I/R predomina el efecto pro-apotótico. En este escenario tendría más peso la sobreexpresión, y mayor actividad de BAD, sobre la activación del proceso de apoptosis por la caspasa 9.

Sin embargo otra posible explicación a esta contradicción en los resultados puede explicarse por la propia naturaleza de los experimentos, donde el análisis de expresión o de actividad es una media de un conjunto de células en cultivo. Sin embargo tal como podría ocurrir a nivel de órgano completo, en nuestros cultivos de cardiomiocitos podrían estar coexistiendo dos grupos de células en dos estados fisiológicos diferentes. Aunque en nuestras muestras encontramos mayor actividad de caspasa 3, esto no quiere decir que todas las células tengan activa la caspasa 3. Quizás esta aparente contradicción de los resultados esté dejando entrever que pueda haber un grupo de células donde el aumento de expresión de XIAP y CD40-Lg esté frenando la apoptosis. Ya que la apoptosis es un proceso reversible, en algunas células donde se haya activado XIAP y CD40-Lg, se pueda estar dando marcha atrás al proceso de apoptosis, lo que podría conducir a un incremento en la supervivencia celular de forma secundaria en ese grupo de células. El proceso de apoptosis es en cierto punto reversible, y no es desdeñable la posibilidad de que células que empiezan a expresar marcadores de apoptosis puedan revertir el proceso, evitando la muerte si las condiciones ambientales o fisiológicas después de la restauración del flujo sanguíneo lo permiten (Masri, 2008). Podríamos decir que entrar en apoptosis también es una

manera de retrasar la muerte, lo que permite la esperanza de que mejore el ambiente celular en tiempo suficiente para hacer reversible dicho proceso.

E.3.4. Vías de señalización implicadas en la cardioprotección con Urocortina.

Además de la descripción de nuevos mecanismos celulares de protección por Ucn, en este trabajo hemos descrito cómo Ucn necesita de Erk1/2 y EPAC para llevar a cabo la mayoría de sus mecanismos cardioprotectores.

El papel de las MAPK y Erk1/2 en la vía de supervivencia celular activada por Ucn está bien descrito en cardiomiocitos (Scarabelli, 2002; Lawrence 2005). Sin embargo hay menos evidencia de su importancia en el fenómeno de la reperfusión (Brar, 2004). Nuestros resultados demuestran cómo después de una I/R la aplicación de Ucn es capaz de activar significativamente las dos isoformas de Erk, mediante fosforilación en los residuos Thr202 y Tyr204. Además en consonancia con algunos trabajos previos (Schulman, 2002) hemos comprobado como el papel cardioprotector de Ucn necesita de la actividad de Erk1/2. En este sentido hemos comprobado como el tratamiento con el inhibidor específico de Erk1/2 reduce significativamente tanto la mejora de los parámetros hemodinámicos tras I/R en órgano completo (figura 4B), como a nivel celular, donde después de I/R se pierde la mejora en la supervivencia (figura 6), y aumenta la cantidad de LDH en el medio (figura 7), es decir la muerte celular. De hecho el papel de Erk1/2 sobre la supervivencia celular y el proceso de muerte por apoptosis ha sido ampliamente estudiado (Lu, 2006). En este sentido hemos demostrado que la inhibición de Erk1/2 revierte el incremento de actividad de las caspasas 3/7 y 9 por Ucn, resultado en línea con el conocimiento previo de que la actividad de Erk1/2 resulta en un incremento en la actividad de caspasa 9 (Park, 2013).

Hemos demostrado también que Ucn necesita la vía de señalización de Erk1/2 para realizar al menos una parte de la regulación génica descrita previamente. Al inhibir Erk1/2 con PD durante el tratamiento con Ucn, se impide el cambio de expresión de los genes CD40-Lg y XIAP. Estos resultados siguen la línea de trabajos anteriores donde se demuestra que la activación de Erk1/2 por el óxido nítrico aumenta la expresión de XIAP (Abkhezr, 2010; Yuan, 2012).

La importancia de EPAC y el cAMP en el corazón y en la protección cardiaca ha sido descrito recientemente (Markovic, 2011). Nuestro grupo ha sido de los primeros en estudiar el papel de EPAC sobre el efecto inotrópico de Ucn en el corazón (Calderón-Sánchez, 2011). Pero hay escasa evidencia de su papel en los procesos de cardioprotección. Nuestros resultados demuestran la implicación de Epac en los procesos cardioprotectores de Ucn. Nuestros resultados muestran cómo corazones de rata sometidos a I/R en Langendorff tratados con Ucn a los que se les administra BFA para inhibir Epac no consiguen mejorar los parámetros hemodinámicos tal como ocurre al tratar con Ucn. Además la inhibición de Epac en cultivos celulares sometidos a I/R y tratados con Ucn bloquea el efecto citoprotector observado con Ucn en los experimentos de supervivencia celular y liberación de LDH.

Además la inhibición de EPAC tiene efecto sobre la regulación génica de la proteína pro-apoptótica BAD, de tal modo que Ucn no es capaz de aumentar los niveles de expresión de BAD ni a nivel de mRNA ni de proteína activa. Consistentemente los cultivos de cardiomiocitos tratados con Ucn donde se inhibe EPAC tienen significativamente menor nivel de apoptosis que los tratados con Ucn. Recientemente hemos tenido conocimiento de algunos trabajos donde se estudia el papel de EPAC en el proceso de apoptosis (Wu, 2014; Mangmool, 2015). Nuestros resultados apoyan la idea de que EPAC es importante en la protección frente a I/R mediada por Ucn, lo que concuerda con trabajos recientes donde EPAC parece tener un papel relevante en la fisiología del corazón (Morel, 2005; Pereira, 2007; Ruiz-Hurtado, 2012; Ruiz-Hurtado, 2013).

Recientemente se ha descrito el papel cardioprotector de una vía de señalización beta adrenérgica formada por cAMP/Epac/Rap1/Rac/Erk donde la activación de Epac parecía proteger a los cardiomiocitos de la apoptosis inducida por óxido nítrico (Kwak, 2008; Zhang, 2013). EPAC como intercambiador de GTP activa la GTPasa Rap1, catalizando la formación de Rap1-GTP, y por tanto la activación de Erk1/2. Nuestros resultados demuestran que la activación de EPAC mediante 8CTP es capaz de activar por fosforilación a Erk1/2 de la misma manera que cuando lo hacemos mediante Ucn. Lo que indica que EPAC se sitúa aguas arriba de Erk en la vía de señalización activada por Ucn.

En resumen hemos demostrado como la administración de Ucn produce un efecto cardioprotector a corto plazo sobre los parámetros hemodinámicos después de I/R, a lo que hay que sumar la activación de procesos de regulación génica que aumentan la supervivencia celular y favorece la apoptosis frente a la necrosis, que a largo plazo puede beneficiar al fitness de los corazones infartados, y todo ello mediado por las vías de señalización de EPAC y Erk1/2.

E.4. Urocortina y la regulación por microRNAs.

Como hemos visto, además del efecto inotrópico positivo que protege al corazón de los daños por I/R, Ucn parece desencadenar una respuesta celular basada en la regulación de la expresión de nuevos genes que van a desencadenar procesos celulares de supervivencia y muerte celular involucrados en una protección a más largo plazo. Hemos demostrado como Ucn regula la expresión de los genes CD40-Lg, XIAP y BAD a través de las vías de señalización de Erk1/2 y EPAC.

Dentro de los procesos de regulación de la expresión génica últimamente ha cobrado gran importancia el papel de los microRNAs como moduladores de la expresión génica a nivel post-transcripcional. El descubrimiento de los microRNAs ha supuesto una pequeña revolución científica. El hecho de encontrar microRNAs jugando un papel importante en diferentes patologías humanas, sumado a la posibilidad real de poder controlar la expresión de un determinado microRNA in vivo, ha convertido a los microRNAs en una herramienta terapéutica con un gran potencial. Los llamados antagomiRs son moléculas análogas de RNA, complementaria al microRNA diana que se pretende inhibir, y modificada con un residuo de colesterol que permite su transfección in-vivo (Kruzfeldt, 2005). De hecho ya hay un estudio clínico en fase 1 (Akdin, 2010) con "mipomersen", un antagomiR que inhibe la síntesis de la apolipoproteína B relacionada con la hipercolesterolemia, y que mostró mejores resultados que cualquier otra droga usada hasta el momento para este tipo de pacientes (Visser, 2010).

La importancia de los microRNAs en la patología isquémica del corazón, y especialmente en los procesos de supervivencia celular y apoptosis, relacionados con procesos de regulación génica está fuera de toda duda. Los primeros trabajos al

respecto describieron cómo miR-210 participa en la mejora de la función cardíaca después de un infarto de miocardio mediante la inhibición de la apoptosis celular en el miocardio (Mutharasan, 2011). Por otra parte se ha demostrado que la sobreexpresión de miR-499, un microRNA específico de miocardio que se encuentra inhibido después de un IAM, era capaz de proteger el corazón del daño por isquemia, reduciendo la fragmentación de las mitocondrias de los cardiomiocitos y mejorando la supervivencia del miocardio (Wang, 2011).

El uso de microRNAs como herramienta terapéutica en el tratamiento de la patología isquémica se ha visto reforzado por un trabajo dónde se realiza una administración intravenosa de oligonucleótidos anti sentido para modular miR-208 in vivo, de modo que se consiguió reducir la expresión de miR-208 en el corazón, mejorando la función cardíaca de animales sometidos a IAM (Montgomery 2011).

La intervención con moléculas estables que mimetizan y/o inhiben a determinados microRNAs, parece emerger como una potente herramienta terapéutica para la protección del miocardio en la cardiopatía isquémica. Según Rakesch et al 2011 las perspectivas futuras en este campo han de centrarse en: i) identificar nuevos microRNAs y sus dianas, que regulen procesos patológicos y que ayuden a entender los mecanismos de muerte celular tras el daño por I/R, ii) identificar microRNAs importantes en los primeros instantes tras un evento isquémico que permita usarlos como marcador diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la enfermedad, y iii) optimizar el uso farmacológico de los microRNAs y sus inhibidores para reducir el daño por I/R.

Teniendo en cuenta todo esto nos preguntamos por qué hasta ahora no se había estudiado el papel de los microRNAs en la cardioprotección mediada por Ucn. Solo un artículo en 2012 mostró en otro tejido como es la pituitaria que Ucn-2 podría estar regulando la expresión de miR-325-3p (Nemoto, 2012).

Los microRNAs son capaces de modificar la expresión de uno o varios genes diana a nivel de su mRNA, de tal modo que se forman redes de regulación complejas que podrían explicar, al menos en parte, la observación de estímulos contradictorios

sobre los genes XIAP y CD40-Lg con función anti-apoptótica, frente al gen pro-apoptótico BAD.

Nuestros resultados del array de expresión de microRNAs en corazones completos sometidos a I/R muestran cómo el tratamiento con 10 nM de Ucn es capaz de producir una modificación de la expresión de una amplia batería de microRNAs. Tras su validación por qRT-PCR, y después de la batería de experimentos en diferentes modelos como son el cultivo de cardiomiocitos adultos, a nivel de corazón completo en el sistema Langendorff y el modelo animal de I/R, hemos demostrado que el tratamiento con Ucn frente a I/R regula la expresión de miR-139-3p, miR-125a y miR-324.

E.4.1. Urocortina disminuye la expresión de miR-139-3p.

Nuestros resultados muestran cómo el tratamiento con 10nM de Ucn en corazones sometidos a I/R en el sistema Langendorff reduce el nivel de expresión de miR-139-3p. Hemos demostrado cómo el nivel de miR-139-3p aumenta significativamente en cardiomiocitos aislados cuando son sometidos a I/R. De hecho el nivel de miR-139-3p en situación control es ya tan reducido que en estas condiciones control la aplicación de diferentes dosis de Ucn no produce ninguna modificación en los niveles de expresión de miR-139-3p. Es en dicha situación de I/R cuando la aplicación de 10 nM de Ucn es capaz de reducir el nivel de miR-139-3p de forma significativa, volviendo a los niveles basales de la situación control. Por otra parte al igual que en cultivo de cardiomiocitos, en el modelo animal de I/R in vivo los niveles de miR-139-3p en la zona isquémica son significativamente mayores que en los animales control. En esta situación el tratamiento con Ucn también es capaz de reducir significativamente el nivel de miR-139-3p en la zona isquémica.

Existe poca información sobre miR-139-3p, sin embargo recientemente se ha descrito que la cadena miR-139-5p reduce el estrés oxidativo en cardiomiocitos sometidos a hipoxia, reduce el nivel de caspasa 3 y el grado de apoptosis a través de una vía que implica a AKT y GSK-3 β (Li, 2015). Nuestros resultados indican que Ucn reduce la expresión de miR-139-3p, que si asumimos que tuviera el mismo efecto que la cadena -5p, resultaría en un estímulo pro-apotótico.

El proceso por el cual se regula la expresión de microRNAs es un tema aún no resuelto del todo, sin embargo hemos demostrado que Ucn necesita de la vía de señalización de EPAC para regular la expresión de miR-139-3p, ya que si inhibimos EPAC con el inhibidor ESI-05, se impide el efecto de Ucn sobre la expresión de miR-139-3p. De hecho la activación directa de EPAC mediante 8CPT consigue reducir el nivel de expresión de miR-139-3p en cardiomiocitos sometidos a I/R, reproduciendo el efecto de Ucn.

La importancia del cAMP en la regulación de los microRNAs ha sido descrita anteriormente. EPAC es capaz de regular la transcripción de miR-124 en cerebro (Yang, 2012). El cAMP y Epac2 incrementan la expresión de la conexina Cx43 y de miR-451 (Mostafavi, 2014). Recientemente se ha visto como la proteína PGE2, situada aguas abajo en la cascada de señalización de EPAC es capaz de regular a miR-21 en macrófagos, donde estaría regulando la polarización e inflamación a través su diana Stat3 (Wang, 2015).

Para tratar de encontrar sentido fisiológico o funcional, realizamos un estudio bioinformático en busca de posibles genes diana de miR-139-3p. Después de testear la batería de genes obtenida por el análisis bioinformático, mostramos cómo la sobreexpresión de miR-139-3p reduce significativamente los niveles de PDE4A, una fosfodiesterasa específica de cAMP. De hecho hay algunos trabajos apuntando a que PDE4A pueda tener algún papel en procesos patológicos del corazón, como son arritmias o hipertrofia (Kostic, 1997; Abi-Gerges, 2009). La función de PDE4A es potenciar a través de PKA las vías de señalización del cAMP por lo que no se puede descartar su relación con EPAC (Moon, 2012). Estos datos van en consonancia con nuestros resultados que muestran como la regulación de Ucn sobre miR-139-3p depende de EPAC, lo que indicaría la presencia de una red de regulación génica que implicaría al cAMP, EPAC, miR-139-3p, y PDE4A entre otros posibles genes diana. Hay que tener en cuenta que nuestros resultados muestran cómo Ucn reduce el nivel de expresión de miR-139-3p, de tal manera que se estaría perdiendo parte de la inhibición de miR-139-3p sobre PDE4A. Por tanto la aplicación de Ucn resultaría en un estímulo que favorece la expresión de PDE4A.

E.4.2. Urocortina aumenta la expresión de miR-125a.

Nuestros resultados muestran cómo el tratamiento con 10nM de Ucn en corazones sometidos a I/R en el sistema Langendorff aumenta significativamente la expresión de miR-125a. La aplicación de dosis crecientes de Ucn en cultivo de cardiomiocitos adultos resulta en un incremento de la expresión de miR-125a. Hemos mostrado cómo el proceso de I/R en cultivo de cardiomiocitos disminuye significativamente el nivel de expresión de miR-125a. En esta situación la aplicación de 10 nM de Ucn aumenta y recupera el nivel de miR-125a.

En el proceso de regulación de la transcripción de miR-125a por Ucn hemos demostrado que necesita de la vía de Erk1/2. El inhibidor de Erk1/2 PD impide que Ucn recupere la expresión de miR-125a tras I/R. En consonancia con nuestros resultados hay varios trabajos donde se describe la importancia de Erk1/2 como regulador de la expresión de microRNAs. Por ejemplo Erk1/2 es capaz de transactivar a miR-133 regulando en cardiomiocitos la expresión de las caspasa-3 y -9 (Wang, 2014). Y de hecho recientemente se ha descrito una relación entre miR-125a y Erk1/2, aunque en este caso es miR-125a quien estaría promoviendo adipogénesis a través de la inhibición de la ruta RhoA/Rock1/Erk1/2 (Chen, 2015).

En cuanto a la función de miR-125a realizamos una búsqueda bioinformática de posibles genes diana que fueron testeados posteriormente mediante análisis de su expresión por qRT-PCR. En la figura 23A se muestra como la sobreexpresión de miR-125a reduce significativamente los niveles de BrcA1, Cpt2 y Taz:

i) BrcA1 es un gen supresor de tumores con función muy bien conocida en cáncer a través de p53. Sin embargo su papel reparador del daño en el ADN no está bien explorado en otros tejidos. Se ha demostrado que BrcA1 juega un papel importante como regulador de la función cardíaca después de un IAM. De tal modo que la pérdida de función de BrcA1 resulta en remodelado ventricular adverso, peor función ventricular, y mayor tasa de mortalidad de los cardiomiocitos tras una lesión isquémica (Shukla, 2011). BrcA1 es por tanto una proteína importante para la respuesta adaptativa de los cardiomiocitos al daño en el ADN, y está relacionada con el metabolismo energético celular, la apoptosis y una peor función cardíaca (Singh,

2013). Recientemente se ha descrito que BrcA1 puede estar regulado post-transcripcionalmente por microRNAs (Quann, 2015).

En relación con lo anterior se ha propuesto que miR-125a junto a miR125b pueda estar inhibiendo la apoptosis precisamente a través de p53 (Chen, 2015), lo que iría en línea el papel de BrcA1 sobre p53. De hecho en corazón miR-125b podría estar protegiendo de la misma manera el miocardio de los daños por I/R (Wang, 2014). Sin embargo existen varios trabajos donde miR-125a se describe en sentido contrario como promotor de apoptosis junto a otros miembros de la familia let-7, a través de posibles genes diana como la proteína HuR (Guo, 2009), Bcl2, Bcl2L12 y Mcl1 (Tong, 2015), y reprimiendo la expresión de Stat3 (Wang, 2015). No hay duda de que hay que seguir investigando al respecto, pero hay datos que apoyan la importante relación de miR-125a con la supervivencia celular y la apoptosis, lo que apoya nuestros resultados sobre la regulación génica de Ucn sobre los procesos celulares de protección frente a I/R.

ii) Hemos mostrado que miR-125a inhibe la expresión del gen Taz (Tafazzin), relacionado con el síndrome de Barth, una miocardiopatía genética dilatada ligada al cromosoma X. Este gen no ha sido descrito nunca en un proceso isquémico, sin embargo sí que se ha relacionado la inhibición de la expresión de Taz con una pérdida del correcto metabolismo energético y la señalización mitocondrial de la apoptosis (Ikou, 2015).

iii) Por último miR-125a atenúa la expresión de Cpt2 (carnitina palmitoil-transferasa), una proteína de la membrana mitocondrial encargada de la oxidación de ácidos grasos de cadena larga, y cuya pérdida se ha visto asociada a una peor recuperación del corazón tras un IAM (Sena, 2009). No se han descrito microRNAs que regulen Cpt2, sin embargo la isoforma Cpt1- α sí que es regulada por microRNAs (Iliopoulos, 2010).

E.4.3. Urocortina aumenta la expresión de miR-324.

Nuestros resultados muestran cómo el tratamiento con 10 nM de Ucn aumenta significativamente la expresión de miR-324 en corazones sometidos a I/R en el sistema Langendorff. La aplicación de dosis crecientes de Ucn en cultivo de cardiomiocitos

adultos resulta en un incremento de la expresión de miR-324. Hemos descrito cómo el proceso de I/R en cultivo de cardiomiocitos, al igual que con miR-125a, disminuye significativamente el nivel de expresión de miR-324. En estas condiciones el uso de 10 nM de Ucn recupera el nivel de miR-324, aumentando su expresión. Este efecto se ve contrarrestado al inhibir Erk1/2 mediante PD, de modo que Ucn necesita de la vía Erk 1/2 para regular la expresión de miR-324.

En la búsqueda de función de miR-324 a través de sus posibles genes diana mostramos como la sobreexpresión de miR-324 aumenta significativamente los niveles de Stat2 y Bcl2L11. Aunque la función principal de los microRNAs es reprimir la transcripción, y en ocasiones se asume que esa es exclusivamente su función fisiológica, algunos microRNAs pueden actuar en sentido contrario favoreciendo la expresión de sus genes diana (Plaze, 2008; Valinezhad, 2014). Incluso un mismo microRNA puede inhibir o favorecer la expresión de un determinado gen según las condiciones fisiológicas del momento (Saraiya, 2013). De hecho en consonancia con nuestros resultados se ha descrito que miR-324 induce la expresión del gen RelA a través de su promotor aumentando el nivel de mRNA y proteína de RelA, lo que aumenta el nivel de caspasa 3 activa (Dharap, 2013).

Stat2 es un miembro un tanto minoritario dentro de la familia de proteínas STAT. Las proteínas STAT responden a estímulos externos de diferentes citoquinas y factores de crecimiento actuando como transductores de señal, y activando otros genes a nivel nuclear. La importancia de la vía JAK/STAT sobre el proceso de cardioprotección en el preconditionamiento isquémico se conoce desde hace tiempo (Xuan, 2001). Posteriormente la vía se amplió a JAK/ERK/STAT y se describieron varias propiedades cardioprotectoras, entre ellas la reducción de la inflamación local tras una I/R, y un menor tamaño del infarto (Ottani, 2013). En cualquier caso Stat3 es el miembro más estudiado de la familia, y de hecho se ha descrito recientemente que varias de las propiedades cardioprotectoras de Ucn están mediadas por la vía SRC/STAT3 (Chen-Scarabelli, 2013). Nuestros resultados sobre el aumento de expresión de miR-324 por Ucn indicarían que tal vez parte del efecto cardioprotector estaría potenciándose a través de la mayor expresión de Stat2, otro miembro de la familia STAT.

Por último hemos mostrado como miR-324 favorece la expresión de Bcl2L11 (Bcl2-like-11), gen perteneciente a la familia de Bcl2, con propiedades pro-apoptóticas o facilitadoras del proceso de apoptosis. De hecho se ha descrito que Bcl2L11 es diana de miR-24 en cardiomiocitos, y tiene un importante papel protector frente a un IAM (Li, 2013). Nuestros datos indican que Ucn podría favorecer el proceso de apoptosis frente a necrosis tras una I/R, y según lo que acabamos de ver la mayor expresión de miR-324 podría estar apoyando este estímulo a través de Bcl2L11.

E.5. miR125a y miR324 como microRNAs circulantes en IAM.

El uso potencial de microRNAs como biomarcadores de enfermedad, en este caso de daño miocárdico, está siendo ampliamente estudiado. La importancia de encontrar microRNAs específicos de forma circulante en la sangre de pacientes que han sufrido un IAM, y la posibilidad de que estos predigan la evolución a largo plazo, aparición de complicaciones, insuficiencia cardiaca, etc., ha hecho que se realicen múltiples estudios de investigación.

En este sentido hay que destacar los prometedores resultados sobre miR-1, miR-133a, miR-133b y miR-208 , los cuales se han encontrado elevados en pacientes que han sufrido un IAM consistentemente en diferentes estudios (D'Alessandra, 2010; Widera, 2011; Wang, 2014; Li, 2014). Especial relevancia tiene miR-499, el cual parece estar correlacionado con la aparición y gravedad de insuficiencia cardiaca posterior (Corsten, 2010).

Sin embargo a pesar de todos los avances y de algunos resultados alentadores sobre el uso de microRNAs circulantes como futuros biomarcadores, todavía es necesario resolver algunas cuestiones. La extracción de microRNAs extracelulares no es una tarea fácil, ya que se encuentran en cantidades relativamente bajas en la sangre y la falta de normalizadores endógenos fiables dificulta la cuantificación específica de microRNAs circulantes. De momento, no existe un consenso en cuanto a la metodología a seguir, la obtención y preparación de las muestras y el método de cuantificación y normalización de los resultados. Por tanto, es necesaria la estandarización de protocolos para el desarrollo de microRNAs circulantes como nuevos biomarcadores.

Nuestros resultados sobre el nivel circulante de microRNAs presente en la sangre de pacientes que han sufrido un IAM tratado mediante angioplastia primaria; es decir, una I/R, muestran datos relevantes para miR-125a y miR-324:

i) En la figura 20B se puede observar como el nivel de miR-125a en sangre es significativamente mayor 12h después de la intervención coronaria respecto al tiempo 0h, momento antes de realizar la intervención de reperfusión, analizando la expresión de forma pareada entre las muestras del mismo paciente. Comparando el nivel de miR-125a antes y después de abrir el vaso, comprobamos como hay una liberación de miR-125a al torrente sanguíneo debido a la propia reperfusión, ya que el nivel de miR-125a no varía entre el grupo de pacientes control y las muestras de pacientes en isquemia (tiempo 0h). En relación a nuestros resultados recientemente se ha publicado un estudio donde han encontrado niveles elevados de miR-125a-5p en pacientes que sufrían insuficiencia cardiaca con reducción de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (Wong, 2015), hecho que apoya el papel de miR-125a, no sólo como biomarcador, sino en relación a la propia patología isquémica.

ii) En la figura 20C se muestra como el nivel de miR-324 es significativamente mayor en todas las muestras de los pacientes con IAM, desde el tiempo 0h en situación de isquemia, hasta las 3h, 12h y 24h después de abrir el vaso, comparado con el grupo de pacientes control. Estos resultados indican que es la isquemia producida durante el IAM lo que provoca la liberación de miR-324, cuyo nivel de expresión se mantiene significativamente elevado al menos 24h después de la intervención. Esto es una buena característica para su potencial uso como biomarcador de daño miocárdico pues sería un marcador más estable, con una ventana amplia para su detección. Esto es relevante porque la mayoría de microRNAs suelen tener curvas temporales muy marcadas con picos de liberación entre 1-3 horas desde la lesión, cayendo rápidamente su nivel en sangre (D'Alessandra, 2010; Wang, 2010).

Actualmente no podemos concluir nada definitivo sobre el papel de miR125a y miR-324 en la sangre de pacientes con IAM, y es necesario ampliar el estudio para poder determinar su usabilidad como biomarcadores. Sin embargo estos resultados demuestran que ambos microRNAs son relevantes a nivel cardiaco y deben estar

ejerciendo algún papel en el proceso de I/R, apoyando los experimentos mostrados en otros modelos experimentales. A pesar de que todo nuestro trabajo de investigación básica está realizado en un modelo animal en rata, hay indicios suficientes para pensar que los resultados puedan ser extrapolables al ser humano. De hecho los microRNAs están muy conservados y la mayoría de secuencias de microRNAs son similares entre humanos y roedores. De hecho las secuencias de 22 nucleótidos de miR125a, miR-139-3p y miR-324 son idénticas en rata y humano.

Nuestros resultados en conjunto apoyan la idea de que Ucn es una molécula de carácter cardioprotector cuyos efectos van más allá del inotropismo positivo en el corazón sometido a I/R. Ucn es un potente regulador de la expresión génica que desencadena una respuesta celular de supervivencia y muerte celular por apoptosis bajo la que subyacen mecanismos moleculares que forman un complicado circuito de regulación génica. Hemos descrito como Ucn regula la expresión de los genes CD40-Lg, XIAP, y BAD, además de 3 nuevos microRNAs como miR-139-3p, miR-125a y miR-324. Estos cambios de expresión génica y regulación pos-transcripcional por microRNAs resultan en diferentes estímulos pro- y anti-apoptóticos que en suma están aumentando la supervivencia de los cardiomiocitos tras una I/R y favoreciendo la apoptosis frente a la necrosis como un mecanismo de muerte celular más fisiológico.

F.
CONC
LUSIO
NES

F. CONCLUSIONES

i. La aplicación terapéutica de Urocortina al inicio de la reperfusión mejora la contractilidad del corazón en un modelo animal de I/R.

ii. Urocortina mejora los parámetros hemodinámicos de contractilidad, presión diastólica final, y resistencia vascular en un modelo de I/R en corazón perfundido en sistema Langendorff, cuando es aplicada tanto en pre- como en post-condicionamiento. Este efecto cardioprotector necesita de la actividad de Erk1/2 y EPAC.

iii. La aplicación de Urocortina mejora la supervivencia celular de los cardiomiocitos sometidos a isquemia/reperfusión in vitro y favorece la muerte celular por apoptosis frente a la necrosis.

iv. Urocortina produce sobre-expresión de la proteína BAD con efecto pro-apotótico a nivel de mRNA y proteína, para lo cual necesita de la activación de EPAC.

v. Urocortina promueve la sobre-expresión de los genes anti-apoptóticos CD40-Lg y XIAP a nivel de mRNA y proteína, para lo cual necesita de la vía de Erk1/2.

vi. La aplicación de Ucn produce un cambio en el perfil de microRNAs del miocardio después del proceso de revascularización.

vii. Urocortina reduce el nivel de expresión de miR-139-3p que se ve incrementado después de I/R en diferentes modelos experimentales. Urocortina necesita de EPAC para regular el nivel de expresión de miR-139-3p.

viii. La sobreexpresión de miR139-3p inhibe la expresión de la fosfodiesterasa específica de cAMP, PDE4A, como posible gen diana involucrado en procesos patológicos del corazón.

ix. Urocortina modula la expresión de los microRNAs miR-125a, y miR-324, aumentando y revertiendo su nivel de expresión después de I/R. Urocortina necesita de Erk1/2 para regular el nivel de expresión de miR-125a y miR-324.

- x. La sobreexpresión de miR-125a inhibe la expresión de BrcA1, Taz y Cpt2 como posibles genes diana, relacionados con el metabolismo energético celular y la apoptosis.
- xi. La sobreexpresión de miR324 aumenta la expresión de Bcl2L11, con efecto pro-apoptótico y Stat2, como posibles genes diana.
- xii. En pacientes con IAM reperfundido mediante angioplastia primaria el nivel circulante de miR-125a en suero es elevado significativamente a las 12h de la intervención respecto a la situación de isquemia previa a la intervención.
- xiii. En pacientes con IAM reperfundido mediante angioplastia primaria el nivel circulante de miR-324 en suero es significativamente mayor que el nivel de expresión en pacientes control desde la situación de isquemia hasta al menos 24h después de la intervención de reperfusión.

G.
BIBLI
OGRA
FÍA

G. BIBLIOGRAFÍA

Abi-Gerges A, Richter W, Lefebvre F, Mateo P, Varin A, Heymes C, Samuel JL, Lugnier C, Conti M, Fischmeister R, Vandecasteele G. Decreased expression and activity of cAMP phosphodiesterases in cardiac hypertrophy and its impact on beta-adrenergic cAMP signals. *Circ Res*. 2009 Oct 9;105(8):784-92. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.197947. Epub 2009 Sep 10.

Abkhezr M, Keramati AR, Ostad SN, Davoodi J, Ghahremani MH. The time course of Akt and ERK activation on XIAP expression in HEK 293 cell line. *Mol Biol Rep*. 2010 Apr;37(4):2037-42.

Albuquerque CP, Gerstenblith G, Weiss RG. Myocardial buffering capacity in ischemia preconditioned rat hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 1995 Feb;27(2):777-81.

Anversa P. Myocyte apoptosis and heart failure. *Eur Heart J*. 1998 Mar;19(3):359-60

Bagga S, Bracht J, Hunter S, Massirer K, Holtz J, Eachus R, Pasquinelli AE. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* 2005; 122, 553-563.

Bale TL, Hoshijima M, Gu Y, Dalton N, Anderson KR, Lee KF, Rivier J, Chien KR, Vale WW, Peterson KL. The cardiovascular physiologic actions of urocortin II: acute effects in murine heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(10): 3697-702.

José R Banegasa, Fernando Villara, Auxiliadora Graciana, Fernando Rodríguez-Artalejoa. Epidemiología de las enfermedades cardiovasculares en España. *Rev Esp Cardiol Supl* 2006; 6:3G-12G.

Barry SP, Lawrence KM, McCormick J, Soond SM, Hubank M, Eaton S, Sivarajah A, Scarabelli TM, Knight RA, Thiemermann C, Latchman DS, Townsend PA, Stephanou A. New targets of urocortin-mediated cardioprotection. *J Mol Endocrinol*. 2010 Aug;45(2):69-85. doi: 10.1677/JME-09-0148. Epub 2010 May 25.

Bartel DP. microRNAs: genomics, biogenesis mechanism and function. *Cell* 2004; 116, 281-297.

Berridge MJ1, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000 Oct;1(1):11-21.

Bartling B, Holtz J, Darmer D. Contribution of myocyte apoptosis to myocardial infarction? *Basic Res Cardiol*. 1998 Apr;93(2):71-84.

Bergmann MW1, Loser P, Dietz R, von Harsdorf R. Effect of NF-kappa B Inhibition on TNF-alpha-induced apoptosis and downstream pathways in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2001 Jun;33(6):1223-32.

Bersohn MM1. Sodium pump inhibition in sarcolemma from ischemic hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 1995 Aug;27(8):1483-9.

Black BL, Olson EN: Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998, 14:167-196.

Bluemke, JAC, Lima MD. Assessment of myocardial fibrosis with cardiovascular magnetic resonance. *JACC* 2011; 57:891–903.

Bolognese L, Neskovic AN, Parodi G, Cerisano G, Buonamici P, Santoro GM, Antoniucci D. Left ventricular remodeling after primary coronary angioplasty: patterns of left ventricular dilation and long-term prognostic implications. *Circulation* 2002; 106: 2351-2357.

Bonni A, Brunet A, West AE, et al. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 1999; 286(5443): 1358-62.

Brar BK, Jonassen AK, Stephanou A, Santilli G, Railson J, Knight RA, Yellon DM, Latchman DS. Urocortin protects against ischemic and reperfusion injury via MAPK-dependent pathway. *Journal of biological chemistry* 2000. 275:8508-8514.

Brar BK, Stephanou A, Knight R, Latchman DS. Activation of protein kinase B/Akt by urocortin is essential for its ability to protect cardiac cells against hypoxia/reoxygenation-induced cell death. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34(4): 483-92.

Brar BK, Railson J, Stephanou A, Knight RA, Latchman DS. Urocortin increases the expression of heat shock protein 90 in rat cardiac myocytes in a MEK1/2-dependent manner. *J Endocrinol* 2002; 172(2): 283-93.

Brar BK, Jonassen AK, Egorina EM, Chen A, Negro A, Perrin MH, Mjøs OD, Latchman DS, Lee KF, Vale W. Urocortin II and urocortin III are cardioprotective against ischemia reperfusion injury: an essential endogenous cardioprotective role for corticotropin releasing factor receptor type 2 in the murine heart. *Endocrinology* 2003; 145:24-35.

Bronnum H, Andersen DC, Schneider M, Sandberg MB, Eskildsen T, Nielsen SB, Kalluri R, Sheikh SP. miR-21 promotes fibrogenic epithelial-to-mesenchymal transition of epicardial mesothelial cells involving Programmed Cell Death 4 and Sprouty-1. *PLoS ONE* 2013; 8:e56280.

Calderón-Sánchez E, Delgado C, Ruiz-Hurtado G, Domínguez-Rodríguez A, Cachafeiro V, Rodríguez-Moyano M, Gomez AM, Ordóñez A, Smani T. Urocortin induces positive inotropic effect in rat heart. *Cardiovasc Res* 2009; 83(4): 717-25.

Calderón-Sánchez EM, Ruiz-Hurtado G, Smani T, Delgado C, Benitah JP, Gómez AM, Ordóñez A. Cardioprotective action of urocortin in postconditioning involves recovery of intracellular calcium handling. *Cell Calcium* 2011; 50(1):84-90.

Calderón-Sánchez E, Díaz I, Ordóñez A, Smani T. Urocortin-1 Mediated Cardioprotection Involves XIAP and CD40-Ligand Recovery: Role of EPAC2 and ERK1/2. *PLoS One*. 2016 Feb 3;11(2):e0147375.

Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N.Engl.J.Med.* 2005; 353, 1793-1801.

Callender T, Woodward M, Roth G, Farzadfar F, Lemarie JC, Gicquel S, Atherton J, Rahimzadeh S, Ghaziani M, Shaikh M, Bennett D, Patel A, Lam CS, Sliwa K, Barretto A, Siswanto BB, Diaz A, Herpin D, Krum H, Elias T, Forbes A, Kiszely A, Khosla R, Petrinic T, Praveen D, Shrivastava R, Xin D, MacMahon S, McMurray J, Rahimi K. Heart failure care in low- and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. *PLoS medicine*. 2014;11(8):e1001699.

Carè A, Catalucci D, Felicetti F, Bonci D, Addario A, Gallo P, Bang ML, Segnalini P, Gu Y, Dalton ND, Elia L, Latronico MV, Høydal M, Autore C, Russo MA, Dorn GW 2nd, Ellingsen O, Ruiz-Lozano P, Peterson KL,

- Croce CM, Peschle C, Condorelli G. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med.* 2007; 13(5):613-618.
- Chambers DJ, Fallouh HB. Cardioplegia and cardiac surgery: pharmacological arrest and cardioprotection during global ischemia and reperfusion. *Pharmacology & therapeutics.* 2010. 127:41-52.
- Chanalaris A, Lawrence KM, Stephanou A, Knight RD, Hsu SY, Hsueh AJ, Latchman DS. Protective effects of the urocortin homologues stresscopin (SCP) and stresscopin-related peptide (SRP) against hypoxia/reoxygenation injury in rat neonatal cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2003 Oct;35(10):1295-305.
- Chen A, Blount A, Vaughan J, Brar B, Vale W. Urocortin II gene is highly expressed in mouse skin and skeletal muscle tissues: localization, basal expression in corticotropin-releasing factor receptor (CRFR) 1- and CRFR2-null mice, and regulation by glucocorticoids. *Endocrinology* 2004; 145(5), 2445-57.
- Chen J, Tao J, Zhang R, Xu Y, Soong T, Li S. Urocortin inhibits mesenteric arterial remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Peptides* 2009; 30(6): 1117-23.
- Chen JJ, Liu SX, Chen MZ, Zhao ZY. Has-miR125a and 125b are induced by treatment with cisplatin in nasopharyngeal carcinoma and inhibit apoptosis in a p53-dependent manner by targeting p53 mRNA. *Mol Med Rep.* 2015 Sep;12(3):3569-74. doi: 10.3892/mmr.2015.3863. Epub 2015 May 27.
- Chen K, He H, Xie Y, Zhao L, Zhao S, Wan X, Yang W, Mo Z. miR-125a-3p and miR-483-5p promote adipogenesis via suppressing the RhoA/ROCK1/ERK1/2 pathway in multiple symmetric lipomatosis. *Sci Rep.* 2015 Jul 7;5:11909. doi: 10.1038/srep11909.
- Chen Z, Chua CC, Ho YS, Hamdy RC, Chua BH. Overexpression of Bcl-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial I/R injury in transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001 May;280(5):H2313-20.
- Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, Conlon FL, Wang DZ. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat. Genet.* 2006; 38:228-233.
- Chen-Scarabelli C, Scarabelli TM. Turning necrosis into apoptosis: The exacting task that can enhance survival. *American heart journal* 2004. 148:196-199.
- Chen-Scarabelli C, Saravolatz li L, McCaukey R, Scarabelli G, Di Rezze J, Mohanty B, Barry S, Latchman D, Georgiadis V, McCormick J, Saravolatz L, Knight R, Faggian G, Narula J, Stephanou A, Scarabelli TM. The cardioprotective effects of urocortin are mediated via activation of the Src tyrosine kinase-STAT3 pathway. *JAKSTAT.* 2013 Jul 1;2(3):e24812.
- Cheng Y, Zhu P, Yang J, Liu X, Dong S, Wang X, Chun B, Zhuang J, Zhang C. Ischaemic preconditioning-regulated miR-21 protects heart against ischaemia/reperfusion injury via anti-apoptosis through its target PDCD4. *Circ Res* 2010; Aug 1;87(3):431-9.
- Cook C, Cole G, Asaria P, Jabbour R, Francis DP. The annual global economic burden of heart failure. *International Journal of Cardiology* 2014; 171:368-76.
- Chu CP, Qiu DL, Kato K, Kunitake T, Watanabe S, Yu NS, Nakazato M, Kannan H. Central stresscopin modulates cardiovascular function through the adrenal medulla in conscious rats. *Regul Pept* 2004; Jun 15;119(1-2):53-9.

Condorelli G, Roncarati R, Ross J Jr, Pisani A, Stassi G, Todaro M, Trocha S, Drusco A, Gu Y, Russo MA, Frati G, Jones SP, Lefer DJ, Napoli C, Croce CM. Heart-targeted overexpression of caspase3 in mice increases infarct size and depresses cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Aug 14;98(17):9977-82.

Cordes KR, Sheehy NT, White MP, Berry EC, Morton SU, Muth AN, Lee TH, Miano JM, Ivey KN, Srivastava D. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature*. 2009 Aug 6;460(7256):705-10.

Corsten MF, Dennert R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, Hofstra L, Wagner DR, Staessen JA, Heymans S, Schroen B. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010 Dec;3(6):499-506.

Cummings BS, McHowat J, Schnellmann RG. Phospholipase A(2)s in cell injury and death. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000 Sep;294(3):793-9.

Cung TT, Morel O, Cayla G, Rioufol G, Garcia-Dorado D, Angoulvant D, Bonnefoy-Cudraz E, Guérin P, Elbaz M, Delarche N, Coste P, Vanzetto G, Metge M, Aupetit JF, Jouve B, Motreff P, Tron C, Labeque JN, Steg PG, Cottin Y, Range G, Clerc J, Claeys MJ, Coussement P, Prunier F, Moulin F, Roth O, Belle L, Dubois P, Barragan P, Gilard M, Piot C, Colin P, De Poli F, Morice MC, Ider O, Dubois-Randé JL, Untersee T, Le Breton H, Béard T, Blanchard D, Grollier G, Malquarti V, Staat P, Sudre A, Elmer E, Hansson MJ, Bergerot C, Boussaha I, Jossan C, Derumeaux G, Mewton N, Ovize M. Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction. *New England Journal of Medicine*. 2015; 373:1021-1031.

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 1997 Oct 17;91(2):231-41.

Davis ME, Pemberton CJ, Yandle TG, Lainchbury JG, Rademaker MT, Nicholls MG, Frampton CM, Richards AM. Urocortin-1 infusion in normal humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 1402-9.

Davis ME, Pemberton CJ, Yandle TG, Fisher SF, Lainchbury JG, Frampton CM, Rademaker MT, Richards AM. Urocortin 2 infusion in healthy humans: hemodynamic, neurohormonal, and renal responses. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49: 461-71.

Davis-Dusenbery, M.C. Chan, K.E. Reno, A.S. Weisman, M.D. Layne, G. Lagna, A. Hata. Down-regulation of Kruppel-like factor-4 (KLF4) by microRNA-143/145 is critical for modulation of vascular smooth muscle cell phenotype by transforming growth factor- β and bone morphogenetic protein 4. *J. Biol. Chem*. 2011; 286, 28097–28110.

Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the microprocessor complex. *Nature* 2004; 432, 231-235.

Devaux Y, Vausort M, Goretti E, Nazarov PV, Azuaje F, Gilson G, Corsten MF, Schroen B, Lair ML, Heymans S, Wagner DR. Use of circulating microRNAs to diagnose acute myocardial infarction. *Clin Chem*. 2012 Mar;58(3):559-67.

Devaux Y1, Mueller M, Haaf P, Goretti E, Twerenbold R, Zangrando J, Vausort M, Reichlin T, Wildi K, Moehring B, Wagner DR, Mueller C. Diagnostic and prognostic value of circulating microRNAs in patients with acute chest pain. *J Intern Med*. 2015 Feb;277(2):260-71.

Dharap A1, Pokrzywa C, Murali S, Pandi G, Vemuganti R. MicroRNA miR-324-3p induces promoter-mediated expression of RelA gene. *PLoS One*. 2013 Nov 12;8(11):e79467. doi: 10.1371/journal.pone.0079467. eCollection 2013.

- Doench JG & Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes & Development* 2004; 18, 504-511.
- Donaldson CJ, Sutton SW, Perrin MH, Corrigan AZ, Lewis KA, Rivier JE, Vaughan JM, Vale WW. Cloning and characterization of human urocortin. *Endocrinology* 1996; 137:2167-70.
- Duisters RF, Tijssen AJ, Schroen B, Leenders JJ, Lentink V, van der Made I, Herias V, van Leeuwen RE, Schellings MW, Barenbrug P, Maessen JG, Heymans S, Pinto YM, Creemers EE. miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor Implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling. *Circ Res* 2009; 104:170–178.
- D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F, Straino S, Di Carlo A, Brambilla PG, Rubino M, Carena MC, Spazzafumo L, De Simone M, Micheli B, Biglioli P, Achilli F, Martelli F, Maggolini S, Marenzi G, Pompilio G, Capogrossi MC. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *European heart journal*. 2010;31(22):2765-73.
- Eapen ZJ, Tang WH, Felker GM, Hernandez AF, Mahaffey KW, Lincoff AM, Roe MT. Defining heart failure end points in ST-segment elevation myocardial infarction trials: integrating past experiences to chart a path forward. *Circulation Cardiovascular quality and outcomes*. 2012;5(4):594-600.
- Ely SW, Mentzer RM Jr, Lasley RD, Lee BK, Berne RM. Functional and metabolic evidence of enhanced myocardial tolerance to ischemia and reperfusion with adenosine. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1985 Oct;90(4):549-56.
- Eva Andrés, Alberto Cordero, Purificación Magán, Eduardo Alegría, Montserrat León, Emilio Luengo, Rosa Magallón Botaya, Luis García Ortiz, José A. Casanovas. Mortalidad a largo plazo y reingreso hospitalario tras infarto agudo de miocardio, un estudio de seguimiento de ocho años. *Rev Esp Cardiol*. 2012;65:414-20. - Vol. 65 Núm.05.
- Freude B, Masters TN, Robicsek F, Fokin A, Kostin S, Zimmermann R, Ullmann C, Lorenz-Meyer S, Schaper J. Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*. 2000 Feb;32(2):197-208.
- Fuster V. Cardiovascular disease in the elderly: a challenge for science and clinical care. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2005; Nov;2 (11):549.
- Gabrielsen A, Lawler PR, Yongzhong W, Steinbrüchel D, Blagoja D, Paulsson-Berne G, Kastrup J, Hansson GK. Gene expression signals involved in ischemic injury, extracellular matrix composition and fibrosis defined by global mRNA profiling of the human left ventricular myocardium. *J Mol Cell Card*. 2007; 42:870–883.
- Ganote CE, Vander Heide RS. Irreversible injury of isolated adult rat myocytes. Osmotic fragility during metabolic inhibition. *Am J Pathol*. 1988 Aug;132(2):212-22.
- Ganote CE. Contraction band necrosis and irreversible myocardial injury. *J Mol Cell Cardiol*. 1983 Feb;15(2):67-73.
- García-Dorado D, Théroux P, Duran JM, Solares J, Alonso J, Sanz E, Muñoz R, Elizaga J, Botas J, Fernandez-Avilés F. Selective inhibition of the contractile apparatus. A new approach to modification of infarct size, infarct composition, and infarct geometry during coronary artery occlusion and reperfusion. *Circulation*. 1992 Mar;85(3):1160-74.

García-Dorado D, García-del-Blanco B, Otaegui I, Rodríguez-Palomares J, Pineda V, Gimeno F, Ruiz-Salmerón R, Elizaga J, Evangelista A, Fernández-Avilés F, San-Román A, Ferreira-González I. Intracoronary injection of adenosine before reperfusion in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: a randomized controlled clinical trial. *International journal of cardiology*. 2014;177(3):935-41.

Gottlieb RA, Bursleson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest*. 1994 Oct;94(4):1621-8.

Griffiths EJ, Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J*. 1995 Apr 1;307 (Pt 1):93-8.

Guo X, Wu Y, Hartley RS. MicroRNA-125a represses cell growth by targeting HuR in breast cancer. *RNA Biol* 2009; 6:575 – 83.

Guo C, Deng Y, Liu J, Qian L. Cardiomyocyte-specific role of miR-24 in promoting cell survival. *J Cell Mol Med*. 2015 Jan;19(1):103-12.

Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, Woodfield KY. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Aug 10;1366(1-2):79-94.

Halkin A, Singh M, Nikolsky E, Grines CL, Tchong JE, Garcia E, Cox DA, Turco M, Stuckey TD, Na Y, Lansky AJ, Gersh BJ, O'Neill WW, Mehran R, Stone GW. Prediction of mortality after primary percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction. The CADILLAC Risk Score. *JACC* 2005; 45:1397–405.

Haussecker D, Kay MA. miR-122 Continues to Blaze the Trail for MicroRNA Therapeutics. *Molecular Therapy* (2010) 18 2, 240–242. doi:10.1038/mt.2009.313.

Heusch G. Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circulation research* 2015. 116:674-699.

Hillhouse EW, Grammatopoulos DK. The molecular mechanism underlying the regulation of the biological activity of corticotrophin-releasing hormone receptors: implications for physiology and pathophysiology. *Endocr Rev* 2006; 27: 260-86.

Hori H, Nishida K. Oxidative stress and left ventricular remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2009; 81: 457–464.

Huang Y, Chan FL, Lau CW, Tsang SY, He GW, Chen ZY, Yao X. Urocortin-induced endothelium-dependent relaxation of rat coronary artery: role of nitric oxide and K⁺ channels. *Br J Pharmacol* 2002; 135: 1467-76.

Huang Y, Chan FL, Lau CW, Tsang SY, Chen ZY, He GW, Yao X. Roles of cyclic AMP and Ca²⁺-activated K⁺ channels in endothelium-independent relaxation by urocortin in the rat coronary artery. *Cardiovasc Res* 2003; 57: 824–33.

Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 2001; 293: 834-838.

Inserte J, García-Dorado D, Hernando V, Soler-Soler J. Calpain-mediated impairment of Na⁺/K⁺-ATPase activity during early reperfusion contributes to cell death after myocardial ischemia. *Circ Res*. 2005; 97:465-73.

Ikon N1, Su B1, Hsu FF2, Forte TM1, Ryan RO3. Exogenous cardiolipin localizes to mitochondria and prevents TAZ knockdown-induced apoptosis in myeloid progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Aug 21;464(2):580-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.07.012. Epub 2015 Jul 9.

Iliopoulos D, Drosatos K, Hiyama Y, Goldberg IJ, Zannis VI. MicroRNA-370 controls the expression of microRNA-122 and Cpt1alpha and affects lipid metabolism. *J Lipid Res*. 2010 Jun;51(6):1513-23.

Janjua S, Lawrence KM, Ng LL, Latchman DS. The cardioprotective agent urocortin induces expression of CT-1. *Cardiovasc Toxicol* 2003; 3(3): 255-62.

Jin Tao and Shengnan Li. Urocortin: A cardiac protective peptide? *Biochemical and biophysical research communications*. 2005.

Jin L1, Zhang Q, Guo R, Wang L, Wang J, Wan R, Zhang R, Xu Y, Li S. Different effects of corticotropin-releasing factor and urocortin 2 on apoptosis of prostate cancer cells in vitro. *J Mol Endocrinol*. 2011 Sep 7;47(2):219-27.

Karakikes I, Chaanine AH, Kang S, Mukete BN, Jeong D, Zhang S, Hajjar RJ, Lebeche D. Therapeutic cardiac-targeted delivery of miR-1 reverses pressure overload-induced cardiac hypertrophy and attenuates pathological remodeling. *J Am Heart Assoc* 2013; 2:e000078.

Kato M. Cardio-miRNAs and onco-miRNAs: circulating miRNA-based diagnostics for non-cancerous and cancerous diseases. *Front Cell Dev Biol*. 2014 Oct 16;2:61.

Keiper M, Stope MB, Szatwowski D, Bohm A, Tysack K, vom Dorp F, Saur O, Oude Weernink PA, Evellin S, Jakobs KH, Schmidt M. Epac- and Ca²⁺ controlled activation of Ras and extracellular signal-regulated kinases by Gs-coupled receptors. *Journal of biological chemistry*. 2004; 279:46497-46508.

Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNA and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 2003; 115, 209-216.

Kim VN & Nam JW. Genomic of microRNA. 2006, *Trends in Genetics* 22, 165-173.

Kimura Y, Takahashi K, Totsune K, Muramatsu Y, Kaneko C, Darnel AD, Suzuki T, Ebina M, Nukiwa T, Sasano H. Expression of urocortin and corticotropin-releasing factor receptor subtypes in the human heart. *J. Clin. Endocrinol Metab* 2002; 87, 340-6.

Kittleson MM, Minhas KM, Irizarry RA, Ye SQ, Edness G, Breton E, Conte JV, Tomaselli G, Garcia JG, Hare JM. Gene expression analysis of ischemic and non ischemic cardiomyopathy: shared and distinct genes in the development of heart failure. *Physiol Genomics* 2005; 21:299–307.

Knight RA, Chen-Scarabelli C, Yuan Z, McCauley RB, Di Rezze J, Scarabelli GM, Townsend PA, Latchman D, Saravolatz L, Faggian G, Mazzucco A, Chowdrey HS, Stephanou A, Scarabelli TM. Cardiac release of urocortin precedes the occurrence of irreversible myocardial damage in the rat heart exposed to ischemia/reperfusion injury. *FEBS Lett* 2008; 582(6): 984-90.

Kong, H. Yang, L. He, J.-J. Zhao, D. Coppola, W.S. Dalton, J.Q. Cheng MicroRNA-155 is Regulated by the Transforming Growth Factor β /Smad Pathway and Contributes to Epithelial Cell Plasticity by Targeting RhoA. 2008 *Mol. Cell. Biol.*, 28 6773–6784.

Kostic MM1, Erdogan S, Rena G, Borchert G, Hoch B, Bartel S, Scotland G, Huston E, Houslay MD, Krause EG. Altered expression of PDE1 and PDE4 cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms in 7-oxo-prostacyclin-preconditioned rat heart. *J Mol Cell Cardiol*. 1997 Nov;29(11):3135-46.

- Krippner A, Matsuno-Yagi A, Gottlieb RA, Babior BM. Loss of function of cytochrome c in Jurkat cells undergoing fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* 1996 Aug 30;271(35):21629-36.
- Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. Silencing of microRNAs in vivo with "antagomiRs". *Nature* 2005; 438:685-689.
- Kuehbachner A, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S: Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ Res* 2007, 101:59-68.
- Kuwabara Y, Ono K, Horie T, Nishi H, Nagao K, Kinoshita M, Watanabe S, Baba O, Kojima Y, Shizuta S, Imai M, Tamura T, Kita T, Kimura T. Increased microRNA-1 and microRNA-133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage. *Circ Cardiovasc Genet.* 2011 Aug 1;4(4):446-54.
- Kwak HJ, Park KM, Choi HE, Chung KS, Lim HJ, Park HY. PDE4 inhibitor roflumilast protects cardiomyocytes against NO induced apoptosis via activation of PKA and EPAC dual pathways. *Cellular signalling* 2008; 20:803-814.
- Laun NC, Lim LP, WEintein EG, Bartel DP. An abundant class os tiny RNAs with probable regulatory roles in *C. Elegans*. *Science* 2001; 294, 858-862.
- Lawrence KM, Chanalaris A, Scarabelli T, Hubank M, Pasini E, Townsend PA, Comini L, Ferrari R, Tinker A, Stephanou A, Knight RA, Latchman DS. K(ATP) channel gene expression is induced by urocortin and mediates its cardioprotective effect. *Circulation* 2002; 106(12): 1556-62.
- Lawrence KM, Scarabelli TM, Turtle L, Chanalaris A, Townsend PA, Carroll CJ, Hubank M, Stephanou A, Knight RA, Latchman DS. Urocortin protects cardiac myocytes from ischemia/reperfusion injury by attenuating calcium-sensitive phospholipase A2 gene expression. *FASEB J* 2003; 17(15): 2313-5.
- Lawrence KM, Townsend PA, Davidson SM, Carroll CJ, Eaton S, Hubank M, Knight RA, Stephanou A, Latchman DS. The cardioprotective effect of urocortin during ischaemia/reperfusion involves the prevention of mitochondrial damage. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 321(2): 479-86.
- Lawrence KM, Kabir AM, Bellahcene M, Davidson S, Cao XB, McCormick J, Mesquita RA, Carroll CJ, Chanalaris A, Townsend PA, Hubank M, Stephanou A, Knight RA, Marber MS, Latchman DS. Cardioprotection mediated by Urocortin is dependent on PKC-epsilon activation. *FASEB J* 2005; 19(7): 831-3.
- Lawson CS, Downey JM. Preconditioning: state of the art myocardial protection. *Cardiovasc Res.* 1993 Apr;27(4):542-5.
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003; 425, 415-419.
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. microRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo Journal* 2004; 23, 4051-60.
- Leist M, Single B, Castoldi AF, Kühnle S, Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med.* 1997 Apr 21;185(8):1481-6.
- Lewis K, Li C, Perrin MH, Blount A, Kunitake K, Donaldson C, Vaughan J, Reyes TM, Gulyas J, Fischer W, Bilezikjian L, Rivier J, Sawchenko PE, Vale WW. Identification of urocortin III, an additional member of

the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 7570-5.

Li DF, Tian J, Guo X, Huang LM, Xu Y, Wang CC, Wang JF, Ren AJ, Yuan WJ, Lin L. Induction of microRNA-24 by HIF-1 protects against ischemic injury in rat cardiomyocytes. *Physiol Res* 2012; 61:555–565.

Li LM, Cai WB, Ye Q, Liu JM, Li X, Liao XX. Comparison of plasma microRNA-1 and cardiac troponin T in early diagnosis of patients with acute myocardial infarction. *World journal of emergency medicine*. 2014;5(3):182-6.

Li P. MicroRNAs in cardiac apoptosis. *J Cardiovasc Transl Res*. 2010 Jun;3(3):219-24.

Li T1, Liang S, Zhang Y, Chen Y. Effects of microRNA-139 on myocardial cell injury induced by oxidative stress. *Int J Clin Exp Med*. 2015 Nov 15;8(11):19994-20001. eCollection 2015.

Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 2005; 433:769–773.

Lino K, Sasano H, Oki Y, Andoh N, Shin RW, Kitamoto T, Takahashi K, Suzuki H, Tezuka F, Yoshimi T, Nagura H. Urocortin expression in the human central nervous system. *Clin Endocrinol* 1999; 50, 107-14.

Lovenberg TW, Liaw CW, Grigoriadis DE, Clevenger W, Chalmers DT, De Souza EB, Oltersdorf T. Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 836-40.

Lu Z, Xu S. ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB Life*. 2006 Nov;58(11):621-31.

Lubomirov L, Gagov H, Petkova-Kirova P, Duridanova D, Kalentchuk VU, Schubert R. Urocortin relaxes rat tail arteries by a PKA-mediated reduction of the sensitivity of the contractile apparatus for calcium. *Br J Pharmacol* 2001; 134: 1564–70.

Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 2004; 303, 95-98.

Malarstig A, Lindahl B, Wallentin L, Siegbahn A. Soluble cd40L levels are regulated by the -3459 A>G polymorphism and predict myocardial infarction and the efficacy of antithrombotic treatment in non-ST elevation acute coronary syndrome. *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology* 2006. 26:1667-1673.

Mangmool S, Hemplueksa P, Parichatikanond W, Chattipakorn N. Epac is required for GLP-1R-mediated inhibition of oxidative stress and apoptosis in cardiomyocytes. *Mol Endocrinol*. 2015 Apr;29(4):583-96.

Markovic D, Punn A, Lehnert H, Grammatopoulos DK. Molecular determinants and feedback circuits regulating type 2 CRH receptor signal integration. *Biochim Biophys Acta*. 2011 May;1813(5):896-907.

Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jürgensmeier JM, Susin SA, Vieira HL, Prévost MC, Xie Z, Matsuyama S, Reed JC, Kroemer G. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science*. 1998 Sep 25;281(5385):2027-31.

Masri C, Chandrashekar Y. Apoptosis: a potentially reversible, meta-stable state of the heart. *Heart Fail Rev*. 2008 Jun;13(2):175-9.

- Matkovich SJ, Hu Y, Dorn GW. Regulation of cardiac microRNAs by cardiac microRNAs. *Circ Res*. 2013; 113:62-71.
- Matkovich SJ, Van Booven DJ, Youker KA, Torre-Amione G, Diwan A, Eschenbacher WH, Dorn LE, Watson MA, Margulies KB, Dorn GW. Reciprocal regulation of myocardial microRNAs and messenger RNA in human cardiomyopathy and reversal of the microRNA signature by biomechanical support. *Circulation* 2009; 119:1263–1271.
- Matthew T. Blahna, Akiko Hata. Smad-mediated regulation of microRNA biosynthesis. *FEBS Letters* 2012, 586;14:1906-1912.
- McKay RG, Pfeffer MA, Pasternak RC, Markis JE, Come PC, Nakao S,. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: A corollary to infarct expansion. *Circulation*. 1986; 74:693-702.
- Mendell JT, Olson EN. MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell* 2012; 148:1172–1187.
- Ministerio de Sanidad 2011. Estrategia en Cardiopatía Isquémica del Sistema Nacional de Salud. Actualización aprobada por el Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud el 22 de octubre de 2009.
- Montgomery RL, Hullinger TG, Semus HM, Dickinson BA, Seto AG, Lynch JM, Stack C, Latimer PA, Olson EN, van Rooij E. Therapeutic inhibition of miR-208a improves cardiac function and survival during heart failure. *Circulation*. 2011 Oct 4;124(14):1537-47.
- Moon EY1, Lee GH, Lee MS, Kim HM, Lee JW. Phosphodiesterase inhibitors control A172 human glioblastoma cell death through cAMP-mediated activation of protein kinase A and Epac1/Rap1 pathways. *Life Sci*. 2012 Feb 27;90(9-10):373-80.
- Morel E, Marcantoni A, Gastineau M, Birkedal R, Rochais F, Garnier A, Lompré AM, Vandecasteele G, Lezoualc'h F. cAMP-binding protein Epac induces cardiomyocyte hypertrophy. *Circulation research* 2005; 9;97:1296-1304.
- Mostafavi H, Khaksarian M, Joghataei MT, Soleimani M, Hassanzadeh G, Eftekhari S, Soleimani M, Mousavizadeh K, Estiri H, Ahmadi S, Hadjighassem MR. Selective β_2 adrenergic agonist increases Cx43 and miR-451 expression via cAMP-Epac. *Mol Med Rep*. 2014 Jun;9(6):2405-10.
- Mullane K. Acadesine: the prototype adenosine regulating agent for reducing myocardial ischaemic injury. *Cardiovasc Res*. 1993 Jan;27(1):43-7.
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986 Nov;74(5):1124-36.
- 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. Epub 2011 Aug 12.
- Nakagawa T, Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol*. 2000 Aug 21;150(4):887-94.
- Neely JR, Grotyohann LW. Role of glycolytic products in damage to ischemic myocardium. Dissociation of adenosine triphosphate levels and recovery of function of reperfused ischemic hearts. *Circ Res*. 1984 Dec;55(6):816-24.

Nemoto T, Mano A, Shibasaki T. Increased expression of miR-325-3p by urocortin 2 and its involvement in stress-induced suppression of LH secretion in rat pituitary. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012 Apr 1;302(7):E781-7.

Nishikimi T, Miyata A, Horio T, Yoshihara F, Nagaya N, Takishita S, Yutani C, Matsuo H, Matsuoka H, Kangawa K. Urocortin, a member of the corticotropin-releasing factor family, in normal and diseased heart. *Am. J. Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279, H3031-9.

Okada M, Yamawaki H, Hara Y. Angiotensin II enhances interleukin-1 beta-induced MMP-9 secretion in adult rat cardiac fibroblasts. *J Vet Med Sci.* 2010; 72:735-9.

Ottani A, Galantucci M, Ardimento E, Neri L, Canalini F, Calevro A, Zaffe D, Novellino E, Grieco P, Giuliani D, Guarini S. Modulation of the JAK/ERK/STAT signaling in melanocortin-induced inhibition of local and systemic responses to myocardial ischemia/reperfusion. *Pharmacol Res.* 2013 Jun;72:1-8. doi: 10.1016/j.phrs.2013.03.005. Epub 2013 Mar 25.

Ovice M, Baxter GF, Di Lisa F, Ferdinandy P, Garcia-Dorado D, Hausenloy DJ, Heusch G, Vinten-Johansen J, Yellon DM, Schulz R. Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position paper from the working group of cellular biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res.* 2010 Aug 1;87(3):406-23.

Park GB, Choi Y, Kim YS, Lee HK, Kim D, Hur DY. ROS and ERK1/2-mediated caspase-9 activation increases XAF1 expression in dexamethasone-induced apoptosis of EBV-transformed B cells. *Int J Oncol.* 2013 Jul;43(1):29-38.

Parkes DG, Vaughan J, Rivier J, Vale W, May CN. Cardiac inotropic actions of urocortins in conscious sheep. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1997; 272: H2115-22.

Pan L, Huang BJ, Ma XE, Wang SY, Feng J, Lv F, Liu Y, Liu Y, Li CM, Liang DD, Li J, Xu L, Chen YH. MiR-25 Protects Cardiomyocytes against Oxidative Damage by Targeting the Mitochondrial Calcium Uniporter. *Int J Mol Sci.* 2015 Mar 10;16(3):5420-33.

Parker R, Song HW. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* 2004; 11:121-127.

Patrick T, O'Gara PT, Kushner FG, Ascheim DD, Casey DE Jr, Chung MK, de Lemos JA, Ettinger SM, Fang JC, Fesmire FM, Franklin BA, Granger CB, Krumholz HM, Linderbaum JA, Morrow DA, Newby LK, Ornato JP, Ou N, Radford MJ, Tamis-Holland JE, Tommaso CL, Tracy CM, Woo YJ, Zhao DX, Anderson JL, Jacobs AK, Halperin JL, Albert NM, Brindis RG, Creager MA, DeMets D, Guyton RA, Hochman JS, Kovacs RJ, Kushner FG, Ohman EM, Stevenson WG, Yancy CW. 2013 ACCF/AHA Guideline for the management of ST-Elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2013 Jan 29;61(4):485-510.

Pereira L, Métrich M, Fernández-Velasco M, Lucas A, Leroy J, Perrier R, Morel E, Fischmeister R, Richard S, Bénitah JP, Lezoualc'h F, Gómez AM. The cAMP binding protein Epac modulates Ca²⁺ sparks by Ca²⁺/calmodulin kinase signalling pathway in rat cardiac myocytes. *The journal of physiology* 2007; 583:685-694.

Perrin M, Donaldson C, Chen R, Blount A, Berggren T, Bilezikjian L, Sawchenko P, Vale W. Identification of a second corticotropin-releasing factor receptor gene and characterization of a cDNA expressed in heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 2969-73.

Piccoli MT1, Gupta SK2, Thum T3. Noncoding RNAs as regulators of cardiomyocyte proliferation and death. *J Mol Cell Cardiol.* 2015 Dec;89(Pt A):59-67.

Pike MM1, Luo CS, Clark MD, Kirk KA, Kitakaze M, Madden MC, Cragoe EJ Jr, Pohost GM. NMR measurements of Na⁺ and cellular energy in ischemic rat heart: role of Na⁽⁺⁾-H⁺ exchange. *Am J Physiol.* 1993 Dec;265 (6 Pt 2):H2017-26.

Piper HM, García-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 1998 May;38(2):291-300.

Piper HM, Abdallah Y, Schäfer C. The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovasc Res.* 2004 Feb 15;61(3):365-71.

Place RF, Li LC, Pookot D, Noonan EJ, Dahiya R. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008 Feb 5;105(5):1608-13.

Prescimone T, Lionetti V, Cabiati M, Caselli C, Aquaro GD, Matteucci M, Del Ry S, Giannessi D. Apoptotic transcriptional profile remains activated in late remodeled left ventricle after myocardial infarction in swine infarcted hearts with preserved ejection fraction. *Pharmacol Res.* 2013 Apr; 70:41-9. 37.

Prat-Vidal C, Gálvez-Montón C, Nonell L, Puigdecamet E, Astier L, Solé F, Bayes-Genis A. Identification of temporal and region-specific myocardial gene expression patterns in response to infarction in swine. *PLoS ONE* 2013; 8:e54785.

Quann K1, Jing Y1, Rigoutsos I1. Post-transcriptional regulation of BRCA1 through its coding sequence by the miR-15/107 group of miRNAs. *Front Genet.* 2015 Jul 24;6:242. doi: 10.3389/fgene.2015.00242. eCollection 2015.

Rademaker MT, Cameron VA, Charles CJ, Richards AM. Urocortin 3: haemodynamic, hormonal, and renal effects in experimental heart failure. *Eur Heart J* 2006; 27: 2088 -98.

Rademaker MT, Charles CJ, Ellmers LJ, Lewis LK, Nicholls MG, Richards AM. Prolonged urocortin 2 administration in experimental heart failure: sustained hemodynamic, endocrine, and renal effects. *Hypertension* 2011; 57:1136-1144.

Ramachandran V, Chen X: Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in Arabidopsis. *Science* 2008, 321:1490-1492.

Rane S, He M, Sayed D, Vashistha H, Malhotra A, Sadoshima J, Vatner DE, Vatner SF, Abdellatif M: Downregulation of miR-199a derepresses hypoxia-inducible factor-1alpha and Sirtuin 1 and recapitulates hypoxia preconditioning in cardiac myocytes. *Circ Res* 2009, 104:879-886.

Ren XP, Wu J, Wang X, Sartor MA, Qian J, Jones K, Nicolaou P, Pritchard TJ, Fan GC. MicroRNA-320 is involved in the regulation of cardiac ischemia/reperfusion injury by targeting heat-shock protein 20. *Circulation* 2009; 119:2357-2366.

Reyes TM, Lewis K, Perrin MH, Kunitake KS, Vaughan J, Arias CA, Hogenesch JB, Gulyas J, Rivier J, Vale WW, Sawchenko PE. Urocortin II: a member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 2843-8.

Reutenauer-Patte J, Boittin FX, Patthey-Vuadens O, Ruegg UT, Dorchies OM. Urocortin improve dystrophic skeletal muscle structure and function through both PKA- and EPAC-dependent pathways. *The american journal of pathology* 2012; 180:749-762.

Rigaud S, Lopez-Granados E, Sibénil S, Gloire G, Lambert N, Lenoir C, Synaeve C, Stacey M, Fugger L, Stephan JL, Fischer A, Picard C, Durandy A, Chapel H, Latour S. Human X-linked variable

immunodeficiency caused by a hypomorphic mutation in XIAP in association with a rare polymorphism in CD40LG. *Blood*. 2011 Jul 14;118(2):252-61.

Rodríguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Research* 2004; 14, 1902-1910.

Roy S, Khanna S, Hussain SR, Biswas S, Azad A, Rink C, Gnyawali S, Shilo S, Nuovo GJ, Sen CK. MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR-21 regulates fibroblast metalloprotease-2 via phosphatase and tensin homologue. *Cardiovasc Res* 2009; 82:21–29.

Ruiz-Hurtado G, Domínguez-Rodríguez A, Pereira L, Fernández-Velasco M, Cassan C, Lezoualc'h F, Benitah JP, Gómez AM. Sustained Epac activation induces calmodulin dependent positive inotropic effect in adult cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2012 Nov;53(5):617-25.

Ruiz-Hurtado G, Morel E, Domínguez-Rodríguez A, Llach A, Lezoualc'h F, Benitah JP, Gomez AM. Epac in cardiac calcium signaling. *J Mol Cell Cardiol*. 2013 May;58:162-71.

Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, Coetzee GA, Jones PA. Specific activation of miR-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* 2006; 9, 435-443.

Saraiya AA, Li W, Wang CC. Transition of a microRNA from repressing to activating translation depending on the extent of base pairing with the target. *PLoS One*. 2013;8(2):e55672.

Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res*. 2000 Feb;45(3):528-37.

Saxena A1, Tabin CJ. miRNA-processing enzyme Dicer is necessary for cardiac outflow tract alignment and chamber septation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jan 5;107(1):87-91.

Sayago-Silva Inés, Fernando García-López, Javier Segovia-Cubero. Epidemiología de la insuficiencia cardiaca en España en los últimos 20 años. *Rev Esp Cardiol*. 2013; 66:649–656.

Savoye C, Equine O, Tricot O, Nugue O, Segrestin B, Sautière K, Elkohen M, Pretorian EM, Taghipour K, Philias A, Aumégeat V, Decoulx E, Ennezat PV, Bauters C; REmodelage VEentriculaire study group. Left ventricular remodeling after anterior wall acute myocardial infarction in modern clinical practice from the remodelage ventriculaire [REVE] study group. *Am J Cardiol* 2006; 98:1144–1149.

Scarabelli TM, Pasini E, Stephanou A, Comini L, Curello S, Raddino R, Ferrari R, Knight R, Latchman DS. Urocortin promotes hemodynamic and bioenergetics recovery and improves cell survival in the isolated rat heart exposed to ischemia/reperfusion. *J AM Coll Cardiol* 2002; 40: 155-161.

Scarabelli TM, Knight R, Stephanou A, Townsend P, Chen-Scarabelli C, Lawrence K, Gottlieb R, Latchman D, Narula J. Clinical implications of apoptosis in ischemic myocardium. *Current Problems in cardiology* 2006. 31:181-264.

Shan ZX, Lin QX, Fu YH, Deng CY, Zhou ZL, Zhu JN, Liu XY, Zhang YY, Li Y, Lin SG, Yu XY. Upregulated expression of miR-1/miR-206 in a rat model of myocardial infarction. *Biochem Bioph Res Co* 2009; 381:597–601.

Schilling L, Kanzler C, Schmiedek P, Ehrenreich H. Characterization of the relaxant action of urocortin, a new peptide related to corticotropin-releasing factor in the rat isolated basilar artery. *Br J Pharmacol* 1998; 125: 1164-71.

- Schlesinger J, Schueler M, Grunert M, Fischer JJ, Zhang Q, Krueger T, Lange M, Tönjes M, Dunkel I, Sperling SR. The cardiac transcription network modulated by Gata4, Mef2a, Nkx2.5, Srf, histone modifications, and microRNAs. *PLoS Genet.* 2011 Feb;7(2):e1001313.
- Schott RJ, Rohmann S, Braun ER, Schaper W. Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. *Circ Res.* 1990 Apr;66(4):1133-42.
- Schulman D, Latchman DS, Yellon DM. Urocortin protects the heart from reperfusion injury via upregulation of p42/p44 MAPK signaling pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002 Oct;283(4):H1481-8. Epub 2002 Jun 13.
- Sena S, Hu P, Zhang D, Wang X, Wayment B, Olsen C, Avelar E, Abel ED, Litwin SE. Impaired insulin signaling accelerates cardiac mitochondrial dysfunction after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 2009 Jun;46(6):910-8.
- Shukla PC1, Singh KK, Quan A, Al-Omran M, Teoh H, Lovren F, Cao L, Rovira II, Pan Y, Brezden-Masley C, Yanagawa B, Gupta A, Deng CX, Coles JG, Leong-Poi H, Stanford WL, Parker TG, Schneider MD, Finkel T, Verma S. BRCA1 is an essential regulator of heart function and survival following myocardial infarction. *Nat Commun.* 2011 Dec 20;2:593.
- Siegmund B, Koop A, Kliez T, Schwartz P, Piper HM. Sarcolemmal integrity and metabolic competence of cardiomyocytes under anoxia-reoxygenation. *Am J Physiol.* 1990 Feb;258 (2 Pt 2):H285-91.
- Siegmund B, Zude R, Piper HM. Recovery of anoxic reoxygenated cardiomyocytes from severe calcium overload. *Am J Physiol.* 1992;263:H1262-9.
- Siegmund B, Ladilov YV, Piper HM. Importance of sodium for recovery of calcium control in reoxygenated cardiomyocytes. *Am J Physiol.* 1994 Aug;267(2 Pt 2):H506-13.
- Simonis G, Honold J, Schwarz K, Braun MU, Strasser RH. Regulation of the isozymes of protein kinase C in the surviving rat myocardium after myocardial infarction: distinct modulation for PKC-alpha and for PKC-delta. *Basis Res Cardiol* 2002; 97(3): 223-31.
- Singh KK, Shukla PC, Yanagawa B, Quan A, Lovren F, Pan Y, Wagg CS, Teoh H, Lopaschuk GD, Verma S. Regulating cardiac energy metabolism and bioenergetics by targeting the DNA damage repair protein BRCA1. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2013 Sep;146(3):702-9. doi: 10.1016/j.jtcvs.2012.12.046. Epub 2013 Jan 12.
- Smani T, Domínguez-Rodríguez A, Hmadcha A, Calderón-Sánchez E, Horrillo-Ledesma A, Ordóñez A. Role of Ca²⁺-independent phospholipase A2 and store-operated pathway in urocortin-induced vasodilatation of rat coronary artery. *Circ Res* 2007; 101: 1194-203.
- Smani T, Calderón-Sánchez E, Gómez-Hurtado N, Fernández-Velasco M, Cachofeiro V, Lahera V, Ordoñez A, Delgado C. Mechanisms underlying the activation of L-type calcium channels by urocortin in rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 2010; 87(3): 459-66
- Smani T, Calderon E, Rodriguez-Moyano M, Dominguez-Rodriguez A, Diaz I, Ordóñez A. Urocortin-2 induces vasorelaxation of coronary arteries isolated from patients with heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2011; 38(1): 71-6.
- Steer SA, Wirsig KC, Creer MH, Ford DA, McHowat J. Regulation of membrane associated iPLA2 activity by a novel PKC isoform in ventricular myocytes. *AM J Physiol Cell Physiol* 2001; 283(6): C1621-6.

Steenbergen C, Murphy E, Levy L, London RE. Elevation in cytosolic free calcium concentration early in myocardial ischemia in perfused rat heart. *Circ Res.* 1987 May;60(5):700-7.

Takatani-Nakase T, Takahashi K. Cardioprotective activity of urocortin by preventing caspase-independent, non-apoptotic death in cultured neonatal rat cardiomyocytes exposed to ischemia. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Nov 12;402(2):216-21. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.10.001. Epub 2010 Oct 8.

Terui K, Higashiyama A, Horiba N, Furukawa KI, Motomura S, Suda T. Coronary vasodilation and positive inotropism by urocortin in the isolated rat heart. *J Endocrinol.* 2001 Apr;169(1):177-83.

Thibault H, Gomez L, Donal E, Pontier G, Scherrer-Crosbie M, Ovize M, Derumeaux G. Acute myocardial infarction in mice: assessment of transmural extent by strain rate imaging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293:H496-502.

Thum T, Galuppo P, Wolf C, Fiedler J, Kneitz S, van Laake LW, Doevendans PA, Mummery CL, Borlak J, Haverich A, Gross C, Engelhardt S, Ertl G, Bauersachs J. MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation* 2007; Jul 17;116(3):258-67.

Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S, Castoldi M, Soutschek J, Koteliensky V, Rosenwald A, Basson MA, Licht JD, Pena JT, Rouhanifard SH, Muckenthaler MU, Tuschl T, Martin GR, Bauersachs J, Engelhardt S. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* 2008; 18:456(7224):980-4.

Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S, Castoldi M, Soutschek J, Koteliensky V, Rosenwald A, Basson MA, Licht JD, Pena JT, Rouhanifard SH, Muckenthaler MU, Tuschl T, Martin GR, Bauersachs J, Engelhardt S. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signaling in fibroblasts. *Nature* 2009; 456:980–984.

Tong Z, Liu N, Lin L, Guo X, Yang D, Zhang Q. miR-125a-5p inhibits cell proliferation and induces apoptosis in colon cancer via targeting BCL2, BCL2L1 and MCL1. *Biomed Pharmacother.* 2015 Oct;75:129-36.

Townsend PA, Davidson SM, Clarke SJ, Khaliulin I, Carroll CJ, Scarabelli TM, Knight RA, Stephanou A, Latchman DS, Halestrap AP. Urocortin prevents mitochondrial permeability transition in response to reperfusion injury indirectly by reducing oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293(2): H928-38.

Townsend N, Wickramasinghe K, Bhatnagar P, Smolina K, Nichols M, Leal J, Luengo-Fernandez R, Rayner M. Coronary heart disease statistics. A compendium of health statistics 2012. British Heart Foundation Health Promotion Research Group. University of Oxford Edition British Heart Foundation. October 2012.

Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 1981; 213: 1394-7.

Valentim L, Laurence KM, Townsend PA, Carroll CJ, Soond S, Scarabelli TM, Knight RA, Latchman DS, Stephanou A. Urocortin inhibits Beclin1-mediated autophagic cell death in cardiac myocytes exposed to ischaemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* 2006 Jun;40(6):846-52. Epub 2006 May 12.

Valinezhad Orang A, Safaralizadeh R, Kazemzadeh-Bavili M. Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation. *Int J Genomics.* 2014; 2014:970607.

Van Belle H. Nucleoside transport inhibition: a therapeutic approach to cardioprotection via adenosine? *Cardiovasc Res.* 1993 Jan;27(1):68-76.

Van Pett K, Viau V, Bittencourt JC, Chan RK, Li HY, Arias C, Prins GS, Perrin M, Vale W, Sawchenko PE. Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *J Comp Neurol* 2000; 428: 191-212.

Van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, Richardson JA, Olson EN. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci.* 2006; Nov 28;103(48):18255-60.

Van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J, Olson EN: Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science* 2007, 316:575-579.

Van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, Hill JA, Olson EN. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008.105:13027–13032.

Van Wylen DG, Willis J, Sodhi J, Weiss RJ, Lasley RD, Mentzer RM Jr. Cardiac microdialysis to estimate interstitial adenosine and coronary blood flow. *Am J Physiol.* 1990 Jun;258(6 Pt 2):H1642-9.

Vaughan J, Donaldson C, Bittencourt J, Perrin MH, Lewis K, Sutton S, Chan R, Turnbull AV, Lovejoy D, Rivier C. Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature* 1995; 378:287-92.

Verma S, Maitland A, Weisel RD, Fedak PW, Pomroy NC, Li SH, Mickle DA, Li RK, Rao V. Novel cardioprotective effects of tetrahydrobiopterin after anoxia and reoxygenation: Identifying cellular targets for pharmacologic manipulation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2002 Jun;123(6):1074-83.

Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol.* 2011; 13:423-33.

Viereck J, Bang C, Foinquinos A, Thum T. Regulatory RNAs and paracrine networks in the heart. *Cardiov. Res.* 2014; 102:290-301.

Wada T, Penninger JM. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* 2004; 23(16): 2838-49.

Wang C1, Li D, Zhang S, Xing Y, Gao Y, Wu J. MicroRNA-125a-5p induces mouse granulosa cell apoptosis by targeting signal transducer and activator of transcription 3. *Menopause.* 2015 Jul 6.

Wang F, Long G, Zhao C, Li H, Chaugai S, Wang Y, Chen C, Wang DW. Atherosclerosis-related circulating miRNAs as novel and sensitive predictors for acute myocardial infarction. *PloS one.* 2014;9(9):e105734.

Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, Li Q, Li Y, He J, Qin YW, Jing Q. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J.* 2010;31:659–666.

Wang JX, Jiao JQ, Li Q, Long B, Wang K, Liu JP, Li YR, Li PF. miR-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1. *Nat Med.* 2011 Jan;17(1):71-8.

Wang L, Li X, Zhou Y, Shi H, Xu C, He H, Wang S, Xiong X, Zhang Y, Du Z, Zhang R, Lu Y, Yang B, Shan H. Downregulation of miR-133 via MAPK/ERK signaling pathway involved in nicotine-induced cardiomyocyte apoptosis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2014 Feb;387(2):197-206.

- Wang S, Aurora AB, Johnson BA, Qi X, McAnally J, Hill JA, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev. Cell.* 2008; 15:261-271.
- Wang JX, Jiao JQ, Li Q, Long B, Wang K, Liu JP, Li YR, Li PF. miR-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1. *Nat Med* 2011; 17:71–78.
- Wang X, Ha T, Zou J, Ren D, Liu L, Zhang X, Kalbfleisch J, Gao X, Williams D, Li C. MicroRNA-125b protects against myocardial ischaemia/reperfusion injury via targeting p53-mediated apoptotic signalling and TRAF6. *Cardiovasc Res.* 2014 Jun 1;102(3):385-95.
- Wang YS, Li SH, Guo J, Mihic A, Wu J, Sun L, Davis K, Weisel RD, Li RK. Role of miR-145 in cardiac myofibroblast differentiation. *J Mol Cell Cardiol.* 2014 Jan;66:94-105.
- Wang Z, Brandt S, Medeiros A, Wang S, Wu H, Dent A, Serezani CH. MicroRNA 21 is a homeostatic regulator of macrophage polarization and prevents prostaglandin E2-mediated M2 generation. *PLoS One.* 2015 Feb 23;10(2):e0115855.
- Wenk JF, Klepach D, Lee LC, Zhang Z, Ge L, Tseng EE, Martin A, Kozerke S, Gorman JH 3rd, Gorman RC, Guccione JM. First evidence of depressed contractility in the border zone of a human myocardial infarction. *Ann Thorac Surg.* 2012; 93:1188-93.
- Widera C, Gupta SK, Lorenzen JM, Bang C, Bauersachs J, Bethmann K, et al. Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary syndrome. *Journal of molecular and cellular cardiology.* 2011;51(5):872-5.
- Wiley KE, Davenport AP. CRF2 receptors are highly expressed in the human cardiovascular system and their cognate ligands urocortins 2 and 3 are potent vasodilators. *Br J Pharmacol* 2004; 143: 508–14.
- Wong LL1, Arumugam A, Sepramaniam S, Karolina DS, Lim KY, Lim JY, Chong JP, Ng JY, Chen YT, Chan MM, Chen Z, Yeo PS, Ng TP, Ling LH, Sim D, Leong KT, Ong HY, Jaufeerally F, Wong R, Chai P, Low AF, Lam CS, Jeyaseelan K, Richards AM. Circulating microRNAs in heart failure with reduced and preserved left ventricular ejection fraction. *Eur J Heart Fail.* 2015 Apr;17(4):393-404.
- Wu XM, Ou QY, Zhao W, Liu J, Zhang H. The GLP-1 analogue liraglutide protects cardiomyocytes from high glucose-induced apoptosis by activating the Epac-1/Akt pathway. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2014 Nov;122(10):608-14.
- Xuan YT1, Guo Y, Han H, Zhu Y, Bolli R. An essential role of the JAK-STAT pathway in ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jul 31;98(16):9050-5.
- Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell.* 1995 Jan 27;80(2):285-91.
- Yang LZ, Kockskämper J, Heinzel FR, Hauber M, Walther S, Spiess J, Pieske B. Urocortin II enhances contractility in rabbit ventricular myocytes via CRF(2) receptor-mediated stimulation of protein kinase A. *Cardiovasc Res* 2006; 69(2): 402-11.
- Yang LZ, Kockskämper J, Khan S, Suarez J, Walther S, Doleschal B, Unterer G, Khafaga M, Mächler H, Heinzel FR, Dillmann WH, Pieske B, Spiess J. cAMP- and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases mediate inotropic, lusitropic and arrhythmogenic effects of urocortin 2 in mouse ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* 2011; 162(2): 544-56.

Yang Q, Yang K, Li A. microRNA-21 protects against ischemia-reperfusion and hypoxia-reperfusion-induced cardiocyte apoptosis via the phosphatase and tensin homolog/Akt-dependent mechanism. *Mol Med Rep.* 2014 Jun; 9(6):2213-20.

Yang Y, Shu X, Liu D, Shang Y, Wu Y, Pei L, Xu X, Tian Q, Zhang J, Qian K, Wang YX, Petralia RS, Tu W, Zhu LQ, Wang JZ, Lu Y. EPAC null mutation impairs learning and social interactions via aberrant regulation of miR-124 and Zif268 translation. *Neuron.* 2012 Feb 23;73(4):774-88.

Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, Maruyama Y. Apoptosis in relevant clinical situations: contribution of apoptosis in myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2000 Feb;45(3):630-41.

Yellon DM, Alkhulaifi AM, Browne EE, Pugsley WB. Ischaemic preconditioning limits infarct size in the rat heart. *Cardiovasc Res.* 1992 Oct; 26(10):983-7.

Yellon DM, Baxter GF, Garcia-Dorado D, Heusch G, Sumeray MS. Ischaemic preconditioning: present position and future directions. *Cardiovasc Res.* 1998 Jan;37(1):21-33.

Yin C, Salloum FN, Kukreja RC. A novel role of microRNA in late preconditioning: upregulation of endothelial nitric oxide synthase and heat shock protein 70. *Cir. Res.* 2009; 104:572-575.

Ying SY & Lin SL. Intronic microRNAs. *Biochemical and biophysical research communications.* 2005; 326, 515-520.

Yoo AS, Greenwald I. LIN-12/Notch activation leads to microRNA mediated down-regulation of Vav in *C. elegans*. 2005 *Science* 310, 1330-1333.

Yuan H, Yan B, Wang HH, Hua S, Hu A. Nitric oxide preserves XIAP and reduces hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocytes apoptosis via ERK1/2 activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Apr 27;421(1):134-9.

Yumei Ye, Hu Z, Lin Y, Zhang C, Perez-Polo JR. Downregulation of microRNA-29 by antisense inhibitors and a PPAR-g agonist protects against myocardial ischaemia–reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2010 Aug 1;87(3):535-44.

Zhang X, Szeto C, Gao E, Tang M, Jin J, Fu Q, Makarewich C, Ai X, Li Y, Tang A, Wang J, Gao H, Wang F, Ge XJ, Kunapuli SP, Zhou L, Zeng C, Xiang KY, Chen X. Cardiotoxic and cardioprotective features of chronic beta-adrenergic signaling. *Circ Res.* 2013 Feb 1;112(3):498-509.

Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* 2005; 436:214-220.

Zeng, Y. Principles of microRNA production and maturation. *Oncogene* 2006; 2, 6156-62.

Zhu H, Fan GC. Extracellular/circulating microRNAs and their potential role in cardiovascular disease. *Am J Cardiovasc. Dis.* 2011; 30:1:138-149.