



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Potencial diagnóstico de los miRNAs en patología inflamatoria vascular (preeclampsia e ictus)

Abduljalil Farwati

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



IDIBELL  **UNIVERSITAT DE BARCELONA**
Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

INSTITUTO DE INVESTIGACION BIOMEDICA DE BELLVITGE (IDIBELL)

LABORATORIO DE GENÉTICA MOLECULAR HUMANA

***Potencial diagnóstico de los miRNAs en patología
inflamatoria vascular (preeclampsia e ictus)***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

ABDULJALIL FARWATI

Director: Dr. JOSEP M^a ARAN PERRAMON

Tutor: Dr. CARLES J CIUDAD GOMEZ

BARCELONA – 2017



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE ALIMENTACIÓN

TESIS DOCTORAL

***Potencial diagnóstico de los miRNAs
en patología inflamatoria vascular
(preeclampsia e ictus)***

ABDULJALIL FARWATI

BARCELONA – 2017



IDIBELL  **UNIVERSITAT DE BARCELONA**
Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE ALIMENTACIÓN

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

LABORATORIO DE GENÉTICA MOLECULAR HUMANA

***Potencial diagnóstico de los miRNAs en patología inflamatoria
vascular (preeclampsia e ictus)***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

ABDULJALIL FARWATI

Director: Dr. JOSEP M^a ARAN PERRAMON

Tutor: Dr. CARLES J CIUDAD GOMEZ

BARCELONA – 2017



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE ALIMENTACIÓN

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

INSTITUTO DE INVESTIGACION BIOMEDICA DE BELLVITGE (IDIBELL)

LABORATORIO DE GENÉTICA MOLECULAR HUMANA

Memoria presentada por el Licenciado en Farmacia Abduljalil Farwati, para optar al grado de Doctor en Biomedicina que otorga la Universidad de Barcelona.

La presente tesis doctoral "*Potencial diagnóstico de los miRNAs en patología inflamatoria vascular (preeclampsia e ictus)*", se ha realizado en el Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL), en el grupo de Procesos Inmunoinflamatorios y Terapia Génica, bajo la dirección del Dr. Josep M^a Aran Perramon, y actuando como tutor el Dr. Carles J Ciudad Gómez (Universidad de Barcelona).

El Director

Dr. Josep M^a Aran Perramon

El Tutor

Dr. Carles J Ciudad Gómez

El Doctorando

Abduljalil Farwati

Barcelona-2017

Dedicatoria

A mi familia (Lubna, Fares y Talia)

A mis padres

ÍNDICE

Índice

Resumen	21
Abreviaturas	25
1. Introducción	33
1.1 El proceso inmune-inflamatorio.....	33
1.1.1 La inflamación aguda.....	34
1.1.2 La inflamación crónica.....	34
1.2 La disfunción vascular	35
1.2.1 Funciones fisiológicas del endotelio.....	35
1.3 Enfermedades no transmisibles.....	39
1.3.1 Trastornos hipertensivos durante el embarazo	39
1.3.2 Preeclampsia	41
1.3.3 Proceso inmune-inflamatorio, PE y patología vascular.....	49
1.3.4 Las enfermedades Cardiovasculares	51
1.3.5 Enfermedades Cerebrovasculares.....	54
1.3.6 Aterosclerosis	60
1.3.7 Relación entre ictus y PE	70
1.4 Biomarcadores para diagnóstico/pronóstico precoz	74
1.4.1 Utilidad de los biomarcadores	74
1.4.2 Características de un buen biomarcador	74
1.4.3 Nuevas tecnologías aplicadas en la detección precoz	75

1.4.4	El transcriptoma humano.....	76
1.4.5	RNAs no codificantes.....	77
1.5	Los microRNAs.....	78
1.5.1	Métodos bioinformáticos de identificación de dianas.....	80
1.5.2	Biogénesis y funciones de los miRNAs	80
1.5.3	miRNAs circulantes (extracelulares).....	83
1.5.4	miRNAs circulantes como biomarcadores	84
1.5.5	miRNAs circulantes y accidentes cerebrovasculares	84
1.5.6	miRNAs en aterosclerosis carotidea.....	85
1.5.7	Los miRNAs como biomarcadores en PE.....	86
2.	Objetivos	92
2.1	Objetivo General	92
2.2	Objetivos específicos.....	92
3.	Material y métodos	96
3.1	Estudio 1: preeclampsia temprana	96
3.1.1	Diseño y población de estudio	96
3.1.2	Pacientes y recogida de muestras de sangre	96
3.1.3	Criterios de inclusión.....	97
3.1.4	Criterios de exclusión	97
3.2	Estudio 2: Aterosclerosis carotidea avanzada.....	97
3.2.1	Población de Estudio	97
3.2.2	Seguimiento de aterosclerosis carotidea avanzada.....	98

3.2.3	Herramientas de predicción bioinformática de genes diana de hsa-miR-638, asociados con accidente cerebrovascular.....	98
3.2.4	Recogida de muestras de sangre	99
3.3	Aislamiento de RNA total de suero	99
3.3.1	Cel-miR-54 (spiked-in) como normalizador.....	100
3.3.2	Cuantificación y determinación de la pureza por espectrofotometría.....	100
3.4	Caracterización del perfil global de expresión de microRNAs circulantes en suero humano mediante la técnica TaqMan®OpenArray®Human MicroRNA.	101
3.4.1	Transcripción reversa (RT) y Pre-aplicación de cDNA (pre-amp)	102
3.4.2	qPCR TaqMan® OpenArray® MicroRNA Panels.....	104
3.5	Análisis de expresión.....	104
3.6	Validación individual de miRNAs expresados diferencialmente en muestras de suero humano mediante RT-qPCR TaqMan.....	104
3.6.1	Aislamiento de RNA total de suero	105
3.6.2	Transcripción reversa TaqMan (RT-TaqMan).....	106
3.6.3	Pre-amplificación (Pre-amp)	107
3.6.4	Amplificación qPCR-TaqMan.....	108
3.7	Análisis de expresión.....	110
3.8	Análisis estadísticos.....	110
3.9	Cultivo primario celular	111
3.9.1	Estimulación de HUVEC con estímulos pro-inflamatorios	112
4.	Resultados	116

4.1	Estudio 1: Potencial de los miRNAs circulantes como biomarcadores de preeclampsia temprana.	117
4.1.1	Estudio descriptivo de preeclampsia temprana (PE):	117
4.1.2	Caracterización y descripción de los grupos del estudio	117
4.1.3	Antecedentes epidemiológicos	119
4.1.4	Variables clínicas materno-fetales	120
4.1.5	Perfilado global diferencial de miRNAs circulantes en pacientes PE (primer trimestre) versus embarazos no complicados mediante la técnica OpenArray.....	122
4.1.6	Validación de la abundancia de los miRNA circulantes candidatos a biomarcadores de PE.....	125
4.1.7	Comparación de la abundancia diferencial de los miRNAs séricos candidatos a biomarcadores de PE determinados mediante las plataformas OpenArray y RT-qPCR TaqMan	128
4.1.8	Correlación entre la expresión de los miRNAs y las variables clínicas de PE. ...	129
4.2	Estudio 2: miR-638 como biomarcador diagnóstico/pronóstico de placa aterosclerótica carotidea vulnerable.....	132
4.2.1	Caracterización de la población total del estudio	132
4.2.2	Aterosclerosis carotidea avanzada sintomática.....	134
4.2.3	Aterosclerosis carotidea avanzada asintomática.....	138
4.2.4	Seguimiento a largo plazo de pacientes CEA con aterosclerosis carotidea avanzada.....	140
4.2.5	Implicación de miR-638 en patología vascular: modelo celular.....	141

4.2.6	Herramientas de predicción bioinformática de genes diana del hsa-miR-638 asociados con accidente cerebrovascular.....	142
4.2.7	Análisis de asociación (FatiGO) para genes diana de miR-638.....	145
4.2.8	Expresión de miR-638 circulante en pacientes CEA sintomáticos.....	147
4.3	Expresión de mir-638 circulante en pacientes CEA asintomáticos.....	149
4.3.1	La evaluación sistemática del riesgo coronario (SCORE) aumenta la precisión de miR-638 circulante para la predicción vulnerable de la placa carotidea en individuos de alto riesgo cardiovascular.....	153
4.3.2	Validación del miR-638 circulante como biomarcador pronóstico en pacientes CEA de seguimiento a largo plazo.....	155
5.	Discusión	158
5.1	Discusión del estudio 1:.....	158
5.2	Discusión del estudio 2:.....	166
6.	Conclusiones	174
7.	Bibliografía	178
8.	Anexos	218
8.1	Anexo 1:.....	218
8.2	Anexo 2:.....	228

Resumen

Resumen

Durante las últimas décadas, una de las principales aspiraciones de la investigación biomédica ha constituido el diagnóstico precoz de diferentes enfermedades de alta tasa de mortalidad. La posibilidad de detección en fase temprana o, mejor dicho, en la etapa asintomática, del desarrollo de la enfermedad ha impulsado la búsqueda de nuevos biomarcadores. Los biomarcadores convencionales, por lo general, se han identificado a partir de mecanismos de acción ya conocidos. Por otro lado, las nuevas tecnologías “-ómicas” emergentes permiten el descubrimiento y caracterización no sesgada de las variaciones genéticas y epigenéticas asociadas con predisposición a la enfermedad.

Los microRNAs (miRNAs) juegan un importante papel en diferentes patologías gracias a su capacidad de influir tanto en procesos fisiológicos: diferenciación celular, proliferación, crecimiento, apoptosis, angiogénesis, e inmuno-inflamatorios, y en la comunicación celular, como en multitud de patologías: el cáncer, las enfermedades autoinmunes y las patologías de origen vascular, como el ictus y la preeclampsia (PE).

Según la OMS, el accidente cerebrovascular es la tercera causa más común de muerte en los países desarrollados, sólo superada por las enfermedades coronarias y el cáncer. A nivel mundial, cada año 15 millones de personas en todo el mundo sufren un accidente cerebrovascular. De éstos, 5,5 millones mueren y otros 5 millones quedan discapacitados de forma permanente, lo cual supone una carga familiar y comunitaria. La PE es un trastorno multisistémico que complica 5%-8% de los embarazos en los países occidentales, y constituye una fuente importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Es responsable de aproximadamente 76.000 muertes maternas y 500.000 muertes infantiles por año en todo el mundo.

El objetivo principal del presente estudio ha sido la evaluación de los miRNAs circulantes como biomarcadores no-invasivos para el diagnóstico/pronóstico de dos patologías inflamatorias de origen vascular: preeclampsia e ictus.

Para evaluar la utilidad de los miRNAs circulantes como biomarcadores moleculares no invasivos para la predicción precoz de la PE, se realizó un análisis de perfilado molecular diferencial utilizando la plataforma OpenArray. El cribado de 754 miRNAs ha confirmado la presencia de 63 de ellos en el suero de mujeres gestantes de primer trimestre, aunque sólo 7 miRNAs parecen estar diferencialmente, aunque modestamente (rango FC: 0.4-1.4), presentes cuando se comparan gestantes con PE y gestantes con embarazos no complicados. Sin embargo, no hemos podido confirmar la expresión diferencial de estos 7 miRNAs en muestras individuales mediante RT-qPCR TaqMan.

Los resultados obtenidos muestran que los miRNAs del suero materno durante el primer trimestre de la gestación no parecen tener ningún valor diagnóstico para PE temprana.

En el segundo estudio de esta Tesis se sugiere, según análisis bioinformáticos utilizando bases de datos, proponemos que la expresión alertada de miR-638 podría modular la cascada de expresión de diferentes genes diana que desempeñan un papel importante en la respuesta inflamatoria de la isquemia.

La inflamación juega un papel crucial en la iniciación y progresión de la aterosclerosis. Hemos verificado la presencia y la participación del miR-638 en el proceso inflamatorio en células endoteliales HUVEC inducidas por estímulos pro-inflamatorios (TNF α y IFN γ), observando una regulación que concuerda con los resultados obtenidos en suero humano

Por primera vez, hemos sugerido que los niveles séricos de miR-638 pueden constituir un biomarcador no invasivo prometedor asociado con placa aterosclerótica carotídea vulnerable e ictus isquémico, particularmente en individuos con elevado riesgo cardiovascular. Asimismo, el miR-638 sérico podría resultar útil como biomarcador pronóstico, para monitorizar la efectividad del tratamiento médico y/o la aparición de reestenosis en pacientes revascularizados.

Palabras clave: microRNAs, preeclampsia, ictus, biomarcadores, diagnóstico, RT-qPCR, patologías inflamatorias vasculares.

ABREVIATURAS

Abreviaturas

ACAS: Estenosis asintomática de la arteria carótida

ACOG: Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos

AGO: Proteína Argonauta

AHA: Asociación Americana del Corazón

AIT: Accidente Isquémico Transitorio

Ang II: Angiotensina II

AngioRM: Angio Resonancia Magnética

AT1: receptor de angiotensina II, tipo 1

AUt: Arterias Uterinas.

β-hCG: Gonadotropina coriónica humana subunidad beta

C. elegans: Caenorhabditis elegans

CAD: Enfermedad de las arterias coronarias

CHAMPS: Combinación de Hemoterapia y Prevención de la Mortalidad

CAS: Estenosis sintomática de la arteria carótida

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario

CEA: Endarterectomía carotidea

CRP: Proteína C Reactiva

Ct: Cycle threshold

CT: Tomografía computarizada

Dicer: Ribonucleasa tipo III Dicer 1 (Dicer 1, ribonuclease type III).

DM: Diabetes Mellitus

DNA: Acido desoxirribonucleico

dNTP: Desoxinucleótidos trifosfato

Doppler AUt: Doppler de las arterias uterinas.

dTTP: Desoxitimidina trifosfato

ECCV: Enfermedades cardiocerebrovasculares

ECM: Matriz extracelular

ECs: Células endoteliales

ECV: Enfermedad cardiovascular

EDTA: Ácido etilendiamino tetraacético

eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial.

ENT: Enfermedades Crónicas no Transmisibles

EPC: Células progenitoras endoteliales

ESR: Tasa de sedimentación eritrocítica

EVP: Enfermedad vascular periférica;

FBS: Suero fetal bovino

FGF Factor de crecimiento de fibroblastos

Flt-1: Fms-like tyrosine kinase 1.

g: Gramo

h: Hora

H₂O: Agua

HDL: Lipoproteína de alta densidad

HELLP: Hemolisis, Enzimas Hepáticas elevadas y conteo de Plaquetas Bajo.

Hg: Mercurio

HTA: Hipertensión arterial

HTG: Hipertensión gestacional

HUVEC: Células endoteliales de la vena de cordón umbilical humano

IC: Intervalo de Confianza.

IC-95%: Intervalo de Confianza del 95%.

ICAM-1: Molécula de Adhesión Intercelular 1.

IFN- γ : Interferón gamma.

IGF1: Factor de crecimiento insulínico tipo 1.

IL: Interleuquina.

IMC: Índice de Masa Corporal.

INE: Instituto Nacional de Estadística.

ISSHP: Sociedad Internacional para el Estudio de la Hipertensión en el Embarazo

kg: Kilogramo.

LDL: Lipoproteína de Baja Densidad.

let-7: Precursor de miRNA let-7.

lin-14: Proteína LIN-14.

mg: Miligramo.

min: Minuto

miRNA: MicroRNA

mL: Mililitro

mM: Concentración milimolar

mm: Milímetro

mmHg: Milímetros de mercurio.

MMP: Metaloproteínas de matriz

mRNA: RNA mensajero

NF-kappaB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

ng : Nanogramos

NICE: Instituto Nacional de Excelencia Clínica

NK: Células asesinas (Natural killer cells)

NO: Óxido nítrico

OMS: Organización Mundial de la Salud

OR: odds ratio

oxLDL: Lipoproteína de baja densidad oxidada

PAPP-A: proteína plasmática A asociada al embarazo.

pb: Pares de bases

PBS: Tampón fosfato salino.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PE: Preeclampsia.

PEG: Pequeño para la edad gestacional.

PEt: Preeclampsia temprana

pH: Medida de acidez o alcalinidad de una solución

PIGF: Factor de crecimiento placentario

PP13: Proteína placentaria 13

PPAR: Receptor activado por proliferadores de peroxisomas

pre-miRNA : Precursor de miRNA

pri-miRNA: miRNA primario

qRT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa en tiempo real cuantitativa.

RCIU: Crecimiento Intrauterino Restringido.

RISC: Complejo de silenciamiento inducido por RNA

RM: Resonancia magnética

RNA: Ácido ribonucleico

ROC: Curvas de rendimiento diagnóstico

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

rpm: Revoluciones por minuto

SBP: Presión arterial sistólica

SD: Desviaciones estándar

sEng: Endoglina soluble.

sFlt-1: Forma soluble del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular

siRNA: RNA pequeño de interferencia

SOLiD: Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection

Taq: *Thermus aquaticus*

TG: Triglicéridos

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta

Th1: Linfocitos T colaboradores de tipo 1

TLR: Receptor de tipo Toll

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa

UI: Unidades Internacionales

UTR: Región no traducida

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular

VSMC: Células musculares lisas vasculares

WBC: Recuento de leucocitos

μg : Microgramo

μl : Microlitro

$^{\circ}\text{C}$: Grados centígrados

μM : Micromolar

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1 El proceso inmune-inflamatorio

El proceso inmune-inflamatorio se podría considerar como una combinación de interacciones entre tres sistemas fisiológicos (el sistema inmunitario, el sistema nervioso y el sistema endocrino) que son pilares en la autorregulación, protección y coordinación, con el fin de mantener la homeostasia del cuerpo humano. El sistema nervioso procesa las informaciones recibidas por el entorno, controlando las acciones mediante mensajeros neurotransmisores que se unen a los receptores celulares; el endocrino regula, modula mediante hormonas y, por último, el sistema inmunitario ejecuta y protege.

La inflamación, es una palabra derivada del latín "inflammare", que significa encender, hacer fuego. La inflamación es una parte del sistema de defensa del huésped que contrarresta daños incurridos por estímulos internos o externos, y los signos clínicos típicos incluyen enrojecimiento, calor, hinchazón, dolor y pérdida de función. La inflamación no es perjudicial en su esencia, y es necesaria para la eliminación de los desafíos que enfrenta el organismo y la consiguiente restauración de la homeostasis. De hecho, la capacidad de respuesta inflamatoria debe ser vista como parte de los mecanismos fisiológicos que operan para responder al estrés experimentado por las células, tejidos y órganos (1).

La inflamación puede ser clasificada como aguda o crónica. Los procesos inflamatorios crónicos y agudos tradicionalmente se consideraban que estaban motivados por diferentes causas a través de las actividades de las diferentes células y mediadores, dando lugar a diferentes respuestas. Sin embargo, una visión más moderna indica que los procesos están conectados con el fin de dotar a los organismos la capacidad de hacer frente a los distintos daños de una manera robusta y flexible, regulando así las funciones homeostáticas claves (1,2).

1.1.1 La inflamación aguda

La inflamación aguda es una respuesta inmediata del cuerpo y es necesaria para eliminar los patógenos perjudiciales. Frente a la infección o al daño tisular repentino, el huésped sufre una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos conocidos como respuesta de la fase aguda. Este proceso implica una cascada de reacciones y está mediada por varias células distintas y moléculas que localizan los patógenos o tejido dañado, reclutando otras células y moléculas con el fin de eliminar los agentes nocivos y finalmente restaurar el equilibrio del cuerpo. En una respuesta inflamatoria normal, la lesión tisular induce la liberación en la zona circundante de mediadores proinflamatorios, tales como factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucinas (IL)-1 β , IL-6, histamina, leucotrienos, y prostaglandinas, por los mastocitos y/o los macrófagos residentes, lo que resulta en vasodilatación e infiltración leucocitaria a través de los vasos sanguíneos (1,3).

Las proteínas plasmáticas del complemento se activan y reclutan a las células fagocíticas (es decir, monocitos y neutrófilos) a la zona para eliminar el tejido necrótico, la invasión de bacterias y residuos. La etapa final de la inflamación es la desactivación del sistema inmunitario, y se produce debido a la conversión de prostaglandinas y leucotrienos en lipoxinas inducidas por neutrófilos y plaquetas, iniciando así la secuencia de terminación, así como la producción y liberación de factores anti-inflamatorios, tales como factor de crecimiento transformante (TGF- β) e IL-10, por los macrófagos activados. Además, los neutrófilos y fibroblastos de reparación se infiltran en la zona, y liberan metaloproteinasas de la matriz (MMPs) para la remodelación de los tejidos y la producción de matriz extracelular (ECM) y colágeno. Cuando estos pasos se siguen fielmente, la inflamación aguda se resuelve sin daño tisular (1, 2,4).

1.1.2 La inflamación crónica

Cuando la inflamación persiste durante un tiempo más largo, las células en el sitio dañado sufren cambios, lo que lleva a la inflamación crónica, que es una respuesta retardada. La inflamación crónica es una inflamación aguda persistente debida a una fase de resolución desregulada, lo que podría ser el resultado de la incapacidad para eliminar el estímulo inflamatorio, una procesión incesante de leucocitos que son responsables de la producción de citoquinas proinflamatorias y especies reactivas de

oxígeno (ROS), que persistentemente causan la lesión y la remodelación del tejido, así como una condición que mantiene los leucocitos en el sitio de la inflamación (1, 2,5). Las enfermedades inflamatorias crónicas debidas a la inflamación persistente o desregulada) conforman una parte muy importante de la patología humana, con multitud de ejemplos que se pueden citar como: asma, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, prostatitis, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, cicatrización de heridas, lesión por reperfusión isquémica, sarcoidosis, rechazo en trasplantes, vasculitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, psoriasis, sepsis, cáncer, enfermedad de Alzheimer, obesidad , DM, aterosclerosis, o PE (1,6-9).

1.2 La disfunción vascular

La disfunción endotelial da lugar a cambios moleculares y celulares que incluyen la expresión de moléculas celulares de adhesión, disfunción mitocondrial, activación de macrófagos y desregulación inmune, ya sea mediante la reducción de la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO) (10), o aumentando los niveles de vasoconstrictor derivado del endotelio y los factores protrombóticos produciendo vasodilatación endotelial atenuada (11).

La función vascular alterada es una característica común en muchas enfermedades cardiovasculares (ECV) como la hipertensión arterial (HTA), la aterosclerosis, preeclampsia (PE) e ictus. Todas estas complicaciones se caracterizan por una disfunción endotelial, y una desregulación tanto inmunitaria como inflamatoria, dando lugar a la remodelación arterial y la inflamación vascular (12-20).

1.2.1 Funciones fisiológicas del endotelio

El endotelio forma una barrera entre células sanguíneas circulantes y macromoléculas séricas, y la pared de la arteria/vena subyacente. Su permeabilidad e integridad está regulada por mecanismos de permeabilidad transcelular y paracelular (20,21). La transcitosis se lleva a cabo a través de vesículas de transporte como las caveolas, que permiten el paso de la albúmina, lípidos, hormonas esteroideas y vitaminas liposolubles a través del endotelio. Las vesículas de transporte también pueden fusionarse en los canales que atraviesan las células individuales, lo que permite el

paso de leucocitos y solutos. Además de la función de barrera, el endotelio controla el mantenimiento de la homeostasis vascular (20,21).

Las funciones más importantes del endotelio son:

- La regulación del tono vascular.
- El control de la hemostasia y la trombosis.
- Las respuestas inflamatorias inmunes.
- La facilitación del crecimiento vascular, reparación y remodelación.

1.2.1.1 Composición estructural de la pared arterial

La pared arterial se compone de tres capas distintas, desde el interior y hacia el exterior (Figura 1):

- La túnica íntima (compuesta principalmente por las células endoteliales (ECs)).
- La túnica media (que se compone de células de músculo liso y el tejido elástico).
- La túnica adventicia (compuesta de tejido conectivo hecho por fibras de colágeno).

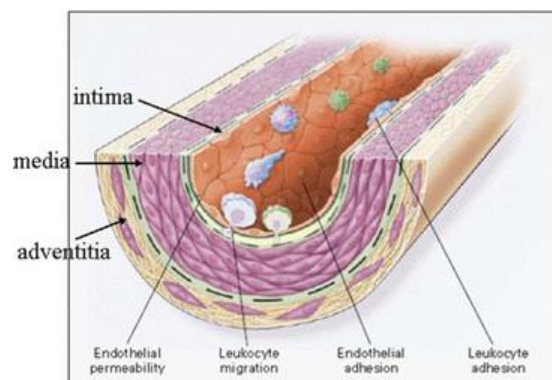


Figura 1: Anatomía de la pared vascular. Estructura de las capas que forman la pared arterial: Externa o Adventicia, capa de tejido conectivo (fibrosa). Media, capa gruesa de tejido elástico con fibras musculares lisas. Interna o Intima, formada por tejido conectivo revestido por una capa de células endoteliales. Adaptado de Ross et al (22).

Estas tres capas están conectadas por el sistema nervioso autónomo y participan en la modificación de la función arterial después de la propagación de la onda de pulso desde el corazón. El endotelio está en contacto directo con la corriente sanguínea que circula en el lumen arterial, y participa en la regulación de la vasodilatación y la vasoconstricción mediante la secreción de sustancias vasoactivas, tales como el NO y la endotelina, entre otros (23).

Con el envejecimiento, la función endotelial empieza a deteriorarse, y la producción de NO es alterada por la inducción de la Óxido nítrico Sintasa Endotelial (eNOS). Además, se produce un aumento gradual de la resistencia a la insulina endotelial (23,24).

Esto conducirá a una pérdida de la capacidad vasodilatadora inducida por la resistencia a insulina y, por lo tanto, a la vasoconstricción y la elevación de la presión arterial, otro mecanismo inductor de HTA (25). Además, la disfunción endotelial está asociada a la reducción de propiedades anticoagulantes, al aumento de la expresión de moléculas de adhesión, la liberación de quimioquinas y citoquinas, y ROS.

Ello conduce a una inflamación local, migración y proliferación de miofibroblastos en el interior del vaso, a menudo relacionada con la remodelación vascular. Incluso, la inflamación perivascular puede contribuir a la vasoregulación local. Estos factores juntos juegan un papel importante en el desarrollo precoz de la aterosclerosis, a partir de estrías grasas y depósitos de lípidos acumulados en la íntima (26), por ejemplo, con la hipercolesterolemia familiar.

El impacto de la disfunción vascular no sólo se limita a las ECs sino también a las VSMCs, que son el tipo celular predominante en la pared arterial y son esenciales para la integridad estructural y funcional de la reparación. La proliferación y migración anormal de las VSMCs han demostrado jugar un papel crítico en la patogénesis de la aterosclerosis (27). Se ha demostrado que la disfunción de las VSMCs desempeña un papel crítico en la patogénesis de ECV, incluyendo la aterosclerosis, el fallo del injerto de vena, reestenosis post angioplastia, y la HTA de la arteria pulmonar (28).

1.2.1.2 Remodelación vascular

La remodelación vascular, es un proceso de adaptación en respuesta a los cambios a largo plazo en el marco hemodinámico, que en última fase puede contribuir a trastornos vasculares y circulatorios.

Cuatro procesos principales han sido implicados en la remodelación (29):

- El crecimiento celular
- La muerte celular
- La migración celular
- La producción de matriz extracelular o su degradación

El tipo específico de remodelación depende del tipo de enfermedad vascular (29,30).

1.2.1.3 Reparación vascular

Durante la última década, la evidencia apoya la presencia de mecanismos de reparación y regeneración de las ECs dañadas por células derivadas de la médula ósea: las células progenitoras endoteliales (EPC) (31). Estas células inmaduras tienen la capacidad de mantener la integridad y la función endotelial mediante la diferenciación en ECs maduras, en sustitución de las ECs dañadas y el inicio de la neovascularización.

La lesión vascular moviliza a las EPC circulantes, que se localizan en el sitio del daño donde se dividen, proliferan y se adhieren al subendotelio para promover el crecimiento de un nuevo endotelio (32). El deterioro en la capacidad y la eficacia de los mecanismos de reparación del endotelio, es consecuencia importante de la presencia de factores de riesgo de ECV y PE (31-33).

El bajo grado de inflamación de la pared vascular se reconoce cada vez más como un importante contribuyente a la fisiopatología de las ECV y trastornos relacionados con el embarazo (34), a la iniciación y progresión de la aterosclerosis y al desarrollo de la HTA (35).

1.3 Enfermedades no transmisibles

Las enfermedades no transmisibles (ENT) matan a 40 millones de personas cada año, lo que equivale al 70% de las muertes que se producen en el mundo (36). La prevalencia global de enfermedades crónicas no transmisibles (ENT) entre ellas, las enfermedades cardiometabólicas, como las enfermedades cardiocerebrovasculares (ECCV) incluyendo a la HTA y sus subclases como la PE, la diabetes mellitus (DM) y el síndrome metabólico, se han incrementado notablemente durante las décadas anteriores (36,37) (Figura 2).

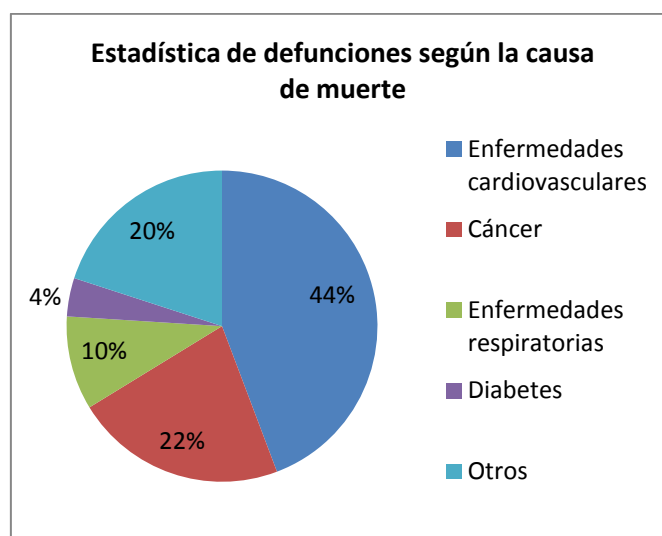


Figura 2: Las enfermedades no transmisibles (ENT) son la principal causa de mortalidad en todo el mundo. Las ECVs constituyen la mayoría de las muertes (17,7 millones cada año), seguidas del cáncer (8,8 millones), las enfermedades respiratorias (3,9 millones), la DM (1,6 millones) y otros factores. Datos adaptados de la Nota descriptiva publicada en el mes de Abril de 2017 por la OMS (36).

1.3.1 Trastornos hipertensivos durante el embarazo

Los trastornos hipertensivos asociados al embarazo son las principales causas de mortalidad materna y fetal. Las clasificaciones y características de los trastornos hipertensivos se muestran en la siguiente tabla (38,43).

Manifestación clínica	Diagnóstico diferencial
Hipertensión gestacional (HTG)	TA \geq 140/90 mm Hg. Aparece despues de la semana 20 de gestación. Aucencia de proteinuria criterioa de PE. Desaparce antes de 12 semanas posparto.
Preeclampsia agregada a la hipertensión crónica	Pacientes a las cuales se les diagnosticó HTA crónica y luego se complica con una preeclampsia-eclampsia depues de 20 semana. TA \geq 140/90 mm Hg. Presencia de proteinuria con criterioa de PE.
Hipertension Crónica	TA \geq 140/90 mm Hg. Aparece antes de la semana 20 de gestacion. Aucencia de proteinuria. Persiste despues de 12 semanas posparto.
PE no severa	TA \geq 140/90 mm Hg, se toma en dos ocasiones separadas, en un intervalo de cuatro horas. Proteinuria \geq 300 mg/24 horas sin criterios de gravedad, 2 + de proteínas en test labstick en dos ocasiones separadas, en un intervalo de cuatro horas.
PE severa	Tensión arterial \geq 160/110 mm Hg. Alteraciones de función renal (Creatinina sérica $>0,9$ mg /dL, Oliguria de <50 mL/hora). Alteraciones neurológicas (hiperreflexia, cefalea, hiperexcitabilidad, confusión). Alteraciones visuales (visión borrosa, escotomas centellantes, diplopía, fotofobia). Alteraciones hepáticas: Transaminasas elevadas. Recuento plaquetario $< 150.000/l$ Edema Agudo pulmonar (no atribuible a otras causas). Restricción del crecimiento intrauterino. Desprendimiento de placenta.
Eclampsia	Aparición de convulsiones o coma.

Tabla 1: Clasificación y características de los trastornos hipertensivos

1.3.2 Preeclampsia

La PE es un trastorno multisistémico que complica el 3% a 5 % de los embarazos en los países occidentales, y constituye una fuente importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Es conocida como "síndrome de las teorías". Varias hipótesis, por ejemplo, inmunológicas, isquemia placentaria, respuesta inflamatoria y genética, se han descrito para explicar su patogenia, pero aún siguen siendo poco conocidos los mecanismos responsables de la PE (39).

El riesgo de PE es de 2 a 5 veces mayor en las mujeres embarazadas con antecedentes maternos de este trastorno (40). En general, el 10-15% de las muertes maternas directas son atribuibles a la PE y a la eclampsia. El recién nacido también corre el riesgo de mortalidad a corto plazo y morbilidad significativa a largo plazo a partir de la PE, particularmente cuando se requiere un parto prematuro iatrogénico. El aumento de la morbilidad y mortalidad fetal y materna se debe:

- En la madre, la PE puede causar una enfermedad cardiovascular prematura, HTA crónica, enfermedad isquémica del corazón y accidente cerebrovascular (ACV).
- En el feto, los niños nacidos después de los embarazos con PE, son relativamente pequeños para su edad gestacional, tienen un mayor riesgo de ACV, enfermedad de arteria coronaria (CAD) y síndrome metabólico en la vida adulta (41,42).

En la actualidad se han planteado varias definiciones de diferentes sociedades, como la Sociedad Internacional para el Estudio de la HTA en el Embarazo (ISSHP), donde definen la PE como HTG de nueva aparición (*de novo*), que se manifiesta a partir de la semana 20 de la gestación en combinación con altos niveles de proteinuria (presión arterial sostenida $\geq 140/90$ mmHg y proteinuria ≥ 300 mg /dl durante 24 horas) (43,44).

Esta definición es consistente con las otras definiciones planteadas por el Instituto Nacional para la Salud y la Excelencia Clínica (NICE) y por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (45,46). En cambio, otras organizaciones, como el Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos (ACOG), han descartado la proteinuria como marcador

diferencial para el diagnóstico de PE al ser un marcador biológico no estable, variable según el método de validación (47).

Según la aparición se clasifica en dos formas diferentes en cuanto a las complicaciones clínicas y fisiopatología:

- PE temprana de aparición <34 semanas, se asocia con anomalías de origen placentario y eventos adversos maternos y fetales.
- PE tardía de aparición >34 semana, se asocia a factores de origen maternos con baja afectación fetal.

1.3.2.1 Epidemiología

Las complicaciones relacionadas con el embarazo se han convertido en un problema de salud materno-fetal grave por su alto índice de mortalidad, de casi el 15% de las embarazadas que presentan alguna complicación durante la gestación, como la diabetes mellitus gestacional (DMG), la PE y la restricción del crecimiento intrauterino (RCIU), en el parto o el postparto (42,48).

Lamentablemente cada día aproximadamente 830 mujeres pierden la vida a causa de complicaciones, en su mayoría evitables según la OMS. Las tasas más impactantes de fallecimientos, alrededor de 239 por cada 100.000 recién nacidos, se encuentran en países pobres del África subsahariana, de un tercio de Asia (49) y de algunos países de América Latina (50). El 99% de estas muertes ocurren en países de bajos y medianos ingresos económicos y por la falta de atención sanitaria adecuada (51,52).

1.3.2.2 Factores de riesgo relevantes relacionados con PE

Los factores de riesgo documentados en literatura médica, incluyen: historia clínica de la HTA crónica, enfermedad renal, DM, obesidad, edad ≥ 35 años, y algunas características del embarazo, como embarazo múltiple, PE previa, o anomalía congénita fetal (44,48,53) (Tabla 2).

Factores de Riesgo materno-fetal
Intervalo prolongado entre gestaciones
Exposición limitada a esperma
Nuliparidad o primipaternidad
Embarazos mediante fecundación in vitro
Pareja masculina cuya madre o pareja anterior tuvo PE
Antecedente de PE en un embarazo anterior
Obesidad materna y resistencia a la insulina
Edades maternas extremas (< 20 o > 35 años)
Bajo peso materno al nacer
Enfermedad renal crónica
DM pre-gestacional
Raza negra
Síndrome antifosfolipídico
Obesidad
Enfermedad autoinmune
HTA crónica
Infección del tracto urinario
Historial familiar de PE en primer grado
Historial familiar de ECV
Gestaciones múltiples

Tabla 2: Factores de riesgo comunes de preeclampsia/eclampsia.

1.3.2.3 Fisiopatología de la PE

La fisiopatología de la PE es multifactorial, y probablemente están implicados tanto factores maternos-fetales como placentarios (54). El papel fundamental de la placenta en la fisiopatología de la PE se respalda en datos epidemiológicos y experimentales que muestran que el tejido placentario es necesario para el desarrollo de esta

patología, de manera que las manifestaciones clínicas no desaparecerán hasta que la placenta sea expulsada de la gestante y se termine el embarazo.

Varios estudios han propuesto mecanismos causantes de PE, de hecho se conoce como "el trastorno de las teorías" (54,55) (Figura 3 a).

El paradigma predominante en la actualidad se resume en que hay un desequilibrio fundamental entre los factores proangiogénicos y antiangiogénicos, inducido por un daño endotelial placentario (56,57) (Figura 3 b).

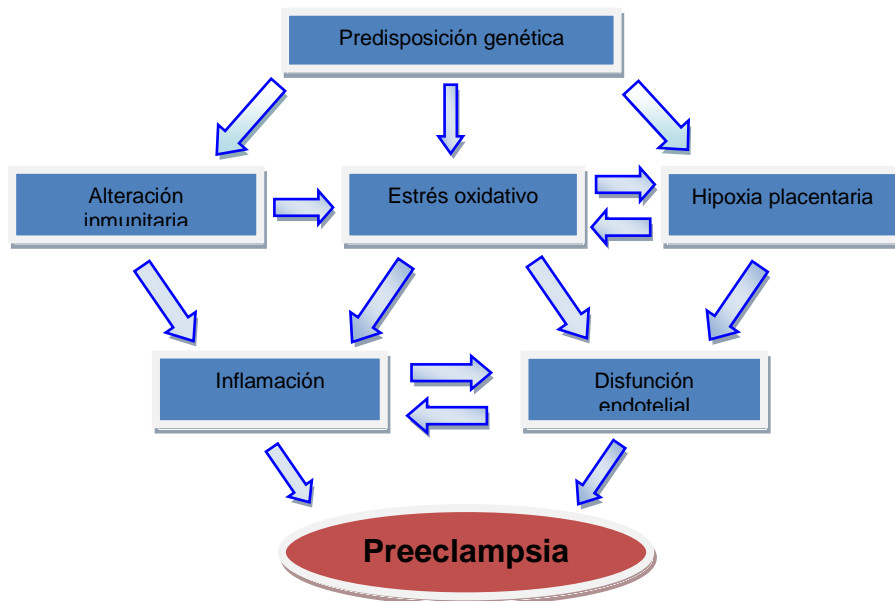


Figura 3 a: Propuesta fisiopatológica de la PE. Factores genéticos, ambientales e inmunológicos, inflamación, estrés oxidativo y disfunción endotelial influyen en el desarrollo de la PE. Modificado de Redman, C et al (54).

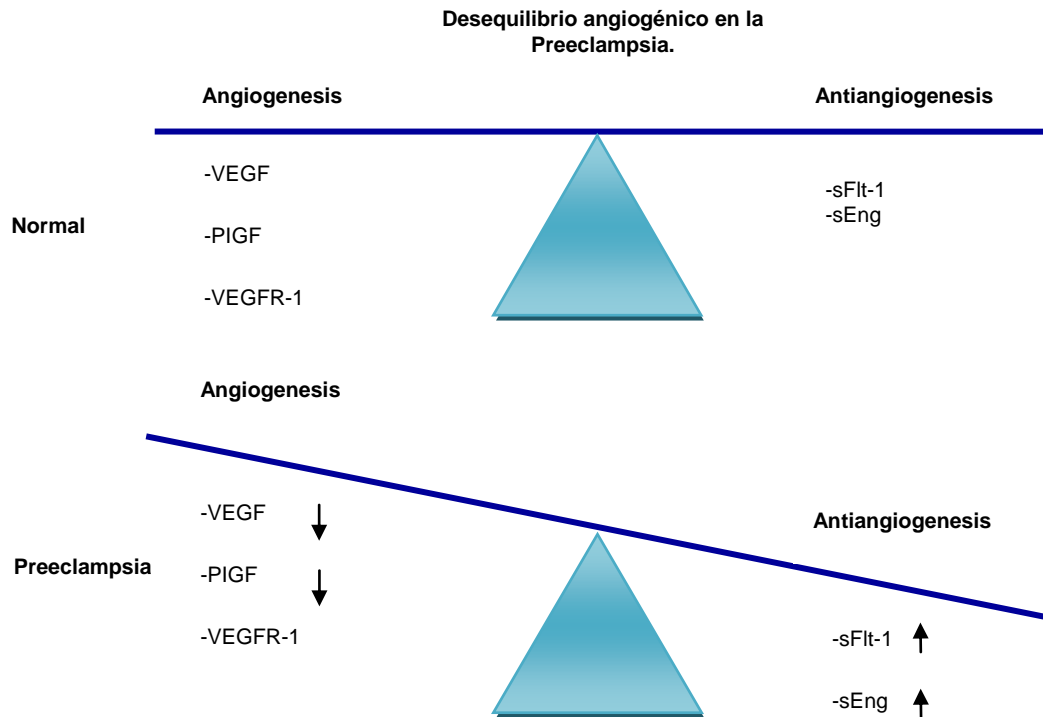


Figura b: Desbalance entre los factores antiangiogénicos, como el Flt1 soluble (sFlt1), la endoglina soluble (sEng) y los factores angiogénicos, como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y el factor de crecimiento plaquetario (PlGF).

La defectuosa invasión de los trofoblastos de las arterias espirales resultando en hipoperfusión de la placenta, se cree que es clave en la patología de la PE (Figura 4). La hipoperfusión / isquemia / hipoxia estimulan la liberación de muchos factores en la circulación materna, como factores antiangiogénicos (por ejemplo, sFlt, sEng), mediadores de la inflamación (por ejemplo, citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6), presencia de células inmunes (por ejemplo, neutrófilos, monocitos, células NK, células T), autoanticuerpos angiotensina-1 y lipoproteína de baja densidad oxidada (oxLDL). Estas moléculas circulantes causan una respuesta inflamatoria excesiva y un aumento de estrés oxidativo dentro de la vasculatura. (48,58).

La cascada de eventos induce la disfunción endotelial y activación caracterizada por un aumento de la vasoconstricción, disminución de la vasodilatación y angiogénesis alterada. Un desequilibrio hacia un fenotipo constrictivo aumenta la presión arterial materna y la resistencia vascular periférica en todos los órganos, incluyendo la placenta. Este aumento de la constricción de las arterias uterinas (AUt) / placenta proporciona un sistema de retroalimentación negativa (48, 55, 58-64).

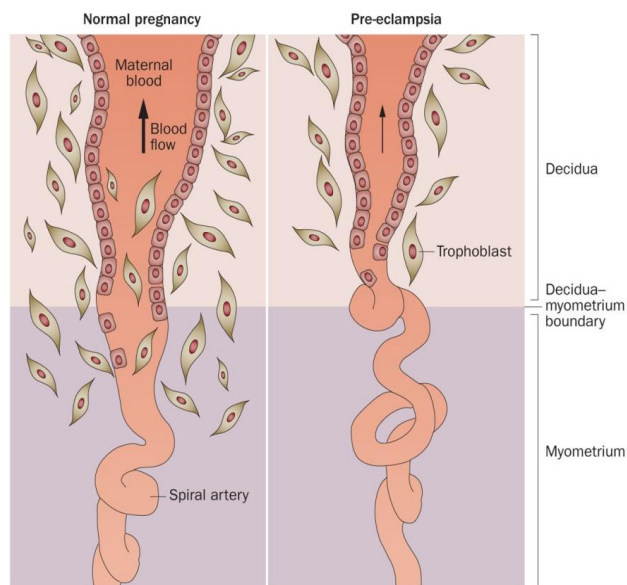


Figura 4: Placentación en un embarazo normal. Se produce la transformación fisiológica del segmento del miometrio de la arteria espiral. Las células del trofoblasto se extienden tanto en el segmento decidual como en el tercio del segmento del miometrio de la arteria espiral. En los embarazos afectados de PE, se produce la remodelación anormal de arterias espirales, característica clave de la falta de invasión de los trofoblastos en el segmento del miometrio de la arteria espiral. La consecuencia de la remodelación anormal es el estrechamiento de los vasos sanguíneos en las arterias espirales, la alteración de la dinámica de flujo sanguíneo y la reducción de la perfusión útero-placentaria. Adaptado de Chaiworapongsa, T et al (48).

1.3.2.4 Diagnóstico de la PE y cribado rutinario

➤ **Por métodos convencionales**

La medición de la presión arterial y las pruebas de proteinuria han sido el pilar de la detección de la PE durante décadas (65). Las mujeres que se consideran de alto riesgo de desarrollar PE tienen pruebas de presión arterial más frecuentes (Test de Gant) y pueden ser referidas para atención especializada; deben ser conscientes de los síntomas de la PE y de la necesidad de buscar la atención apropiada, si presentan estos síntomas (66).

➤ **Por métodos de ultrasonido**

La evaluación Doppler de las Resistencias en Arterias Uterinas (Doppler AUt), se puede realizar con edad gestacional entre 11 y 13 + 0 + 6 semanas a través de un abordaje transabdominal o transvaginal. El abordaje transabdominal es el método preferido, ya que es menos invasivo y presenta buena reproducibilidad entre observadores (67).

Varios estudios de detección por ultrasonidos Doppler, tanto en el primer como en el segundo trimestre del embarazo, han demostrado una asociación entre el aumento de la resistencia del flujo (indicado por curvas diastólicas en forma de onda de velocidad de flujo de la arteria uterina) y el posterior desarrollo de PE y restricción del crecimiento intrauterino (RCIU) (67,68).

Un estudio tipo meta-análisis demostró que la detección de resultados adversos del embarazo con el análisis Doppler AUt en el primer trimestre fue comparable al cribado basado solamente en los factores de riesgo maternos. A pesar de que se realizaron los estudios que evalúan la aparición temprana de la enfermedad en las mujeres que fueron consideradas de bajo riesgo, los autores no encontraron ningún cambio significativo en las estimaciones (69-71).

Además, una base de datos Cochrane de revisión sistemática de la gestación mediante Doppler AUt no mostró ninguna mejora predictiva (72). El uso de varios marcadores bioquímicos, tanto en aislamiento como en combinación, para la predicción de la PE ha sido revisado recientemente (73).

➤ **Por métodos bioquímicos**

Entre los marcadores circulantes propuestos para el diagnóstico precoz de la PE en el primer trimestre del embarazo, muchos de ellos representan manifestaciones de placentación inadecuada y del estado de hipoxia. Se destacan sFlt-1, PIGF, sEng, Inhibina y proteína placentaria 13 (PP13).

Estos marcadores se determinan mediante técnicas analíticas tipo ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) y electroquimioluminiscencia (ECLIA) tipo sandwich. Actualmente existen tests comerciales que combinan varias determinaciones (Tabla 3).

La sEng y sFlt-1 se han estudiado ampliamente y son particularmente útiles para la predicción de las mujeres en situación de riesgo de aparición temprana de la PE (74,75). Otros biomarcadores incluyen: Proteína plasmática A asociada al embarazo (PAPP-A), PP13, relación (sFlt-1/PIGF), cistatina C, y hemoglobina fetal libre, aunque se han estudiado muchos otros marcadores (76,77). En un estudio multicéntrico prospectivo reciente se han encontrado valores aumentados de sFlt- 1/PIGF en sueros de madres que desarrollan PE hasta cinco semanas antes de su establecimiento clínico.

El valor predictivo negativo (0,98 para la PE dentro de 14 días) superó al de otros biomarcadores estudiados hasta la fecha como útiles en el tratamiento de mujeres con riesgo de PE (78). La combinación de estas dos variables, sFlt-1: PIGF, se ha aprobado para el diagnóstico clínico con una relación ≤ 38 (79).

Un estudio ha demostrado que la combinación de parámetros referidos al índice de masa corporal (IMS) de la paciente, la presión arterial media y la PAPP-A, puede ser beneficiosa en la selección de individuos para una estrecha supervisión y para una intervención temprana durante el embarazo (80).

En la siguiente tabla se muestran los marcadores bioquímicos más relevantes descritos en la literatura médica (79-84).

Marcador	Aumentado/ Disminuido
Soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1)	Aumentado
Placental growth factor (PIGF)	Disminuido
Soluble endoglin (sEng)	Aumentado
Placental protein 13 (PP13)	Aumentado
Plasmatic protein A (PAPP-A)	Disminuido
C-reactive protein (CRP)	Aumentado
Adrenomedullin (ADM)	Aumentado
Inhibin A (Inh-A)	Aumentado
Activin-A (Act-A)	Aumentado
Leptin	Aumentado
Th1-related cytokines	Aumentado

Th2-related cytokines	Disminuido
Tregs-related cytokines	Disminuido
Th17-related cytokines	Aumentado
M1-related cytokines	Aumentado
M2-related cytokines	Disminuido

Tabla 3: Características de marcadores bioquímicos asociados con la predicción de PE

➤ **Por modelos combinados**

La actividad reciente en este campo ha consistido en modelos multivariados predictivos. Estos modelos incorporan una gran variedad de parámetros clínicos, ecográficos y bioquímicos, que invitan a reflexionar, pero que están a la altura de los criterios establecidos, y listos para su uso clínico (76, 82-84).

1.3.3 Proceso inmune-inflamatorio, PE y patología vascular

Como se mencionó anteriormente, en la fisiopatología de la PE también incluye anomalías en el sistema inmune y la inflamación (85). Se ha propuesto que los fragmentos que se desprenden de la superficie de la placenta incluyen proteínas proinflamatorias que pueden contribuir a la respuesta inflamatoria sistémica en el embarazo normal y a la respuesta inflamatoria exagerada en PE (86,87). Además, las citoquinas proinflamatorias, como IL-6 y TNF- α , se encuentran elevadas en las mujeres con PE y en modelos murinos de isquemia de la placenta. Por otra parte, la infusión de citoquinas proinflamatorias en animales gestantes produce elevaciones significativas en la presión arterial (88).

Los mecanismos de autorregulación en el sistema inmune materno también están implicados en la fisiopatología de la PE. Esta tolerancia inmune materna implica interacciones fundamentales entre las células T reguladoras CD4 + y NK uterinas que reconocen y aceptan los antígenos fetales y facilitan el crecimiento de la placenta (89).

Una mala placentación y la perfusión placentaria disfuncional inducen también la activación inmune crónica de la placenta. Las mujeres con PE tienen una disminución en la circulación de las células T CD4 + reguladoras. Por otra parte, las ratas con isquemia placentaria tienen una disminución del 47% en las células T CD4 + reguladoras en la circulación periférica en comparación con las ratas gestantes normales (90).

Mientras que estos datos apoyan la hipótesis de que la HTA en respuesta a la isquemia placentaria representa un cambio desde el estado anti-inflamatorio normal del embarazo a un estado pro-inflamatorio, la importancia cuantitativa de células T CD4 + y, particularmente, Th17 en la fisiopatología de la PE queda por determinar (85). Varios estudios recientes también han indicado que las mujeres con PE producen una serie de antagonistas de los receptores de la angiotensina II (ARA-II) (91) o del receptor AT1 (92).

La teoría que se propone para explicar el riesgo cardiovascular aumentado en mujeres con antecedentes de PE, es que el embarazo es complicado y el desarrollo de los trastornos hipertensivos durante el embarazo identifica a una mujer destinada a desarrollar la ECV. Esto se basa en amplios datos que revelan los factores de riesgo comunes para PE y ECV. Los trastornos de origen vascular, tanto la ECV como la PE, han compartido factores de riesgo incluyendo factores genéticos, DM, HTA, aumento de la resistencia a la insulina y aumento de la concentración de homocisteína, y también factores fisiopatológicos como disfunción endotelial, respuesta inmune-inflamatoria y estrés oxidativo (93).

Debido a este aumento importante del riesgo cardiovascular, la American Heart Association en 2011 reconoció a la PE y a la HTG como factores de riesgo cardiovascular (94). Los datos obtenidos que confirman la asociación entre la PE y un mayor riesgo de enfermedad vascular crónica en forma de HTA, ECVs, y enfermedades renales son cada vez mayores (37, 95,96).

La evidencia actual sugiere que los factores de riesgo previos al embarazo y la PE en sí, pueden contribuir al incremento del riesgo de ECV a largo plazo (97,98).

La amplia gama de complicaciones macrovasculares maternas de la PE, incluyendo la HTA, el ACV y la eclampsia, se cree que son secundarias a la disfunción endotelial arterial generalizada (64,99). Se sabe que las mujeres que desarrollan PE en el embarazo presentan un mayor riesgo de ECV a largo plazo (100,101), aunque no

queda claro si ello se debe a una tendencia subyacente de patología arterial, que predispone a PE y más tarde a ECV, o si el haber tenido PE es en sí mismo un factor causante de la enfermedad a largo plazo.

Las mujeres que tienen una enfermedad subyacente que predispone a una respuesta inflamatoria sistémica (por ejemplo, la obesidad, la enfermedad renal crónica o la HTA esencial) (102) son significativamente más susceptibles al desarrollo de la PE, e incluso una placentación normal o ligeramente anormal en estas mujeres más susceptibles puede ser suficiente para desarrollar los síntomas clínicos de la PE (103).

El riesgo posterior de ECV se relaciona con la gravedad de la PE (104). Asimismo, se ha observado que las mujeres que presentan PE severa asociada con la restricción del crecimiento intrauterino experimentan un aumento del riesgo de ECV siete veces por encima del de la población general (105). Se ha sugerido que el embarazo con PE tiene efectos duraderos sobre la inflamación de la pared arterial materna (106). Así, la función endotelial y los factores angiogénicos circulantes permanecen alterados durante más de 5 años después del parto en mujeres que han tenido PE (64,107). Algunos cambios en los marcadores circulantes de disfunción endotelial precoz podrían ser detectados incluso a los 10 años siguientes al embarazo (108).

Además, el riesgo de ACV después de un embarazo complicado con PE sigue siendo elevado al año después del parto (109). La persistencia de la disfunción arterial materna de la PE se debe a un aumento en el grosor de la íntima de la arteria carótida en las mujeres con PE varios años después del embarazo, en comparación con embarazos no complicados (110). Sin embargo, los mecanismos por los que persisten tales cambios siguen sin estar claros, y la capacidad de predecir con exactitud el subgrupo de mujeres que van a desarrollar ECV a largo plazo, todavía sigue siendo limitada.

1.3.4 Las enfermedades Cardiovasculares

El término “enfermedad cardiovascular” engloba en general todas las patologías que afectan al corazón y al sistema circulatorio, entre las que se incluyen (111):

- Enfermedades cerebrovasculares
- Arteriopatías periféricas

- Cardiopatía reumática
- Cardiopatías congénitas
- Trombosis venosas profundas y embolias pulmonares
- Cardiopatía isquémica

Siguiendo la clasificación del estudio “Global Burden of Disease” y de la OMS, las dos más destacadas son la cardiopatía isquémica, que ha sido responsable de la muerte de 7,4 millones de personas, y la ECV, que ha causado 6,7 millones de decesos. Por otra parte, la OMS predice que para el año 2030, 23,6 millones de personas podrían morir a causa de ECVs (112,113).

1.3.4.1 Datos epidemiológicos

A nivel mundial la OMS, según su última nota informativa en Enero de 2015, ha indicado que las ECVs siguen siendo una de las principales causas de muerte y discapacidad física en todo el mundo, a pesar de su notable decadencia comparada con años anteriores, de manera que cada año mueren más personas por ECV que por cualquier otra causa. Según el último informe la OMS, calcula que en 2012 murieron por este motivo 17,5 millones de personas de un total de 38 millones de defunciones a causa de las ENTs, lo cual representa un 42 %, aproximadamente, de todas las muertes registradas en el mundo. Entre ellas, aproximadamente un 82% de las defunciones por ECV se producen en los países con ingresos bajos y medios, según la misma nota informativa (114).

En Europa, los resultados estadísticos son parecidos al resto del mundo. La ECV sigue siendo la causa más común de muerte en Europa y es responsable del 45% de todas las muertes, lo que equivale a más de 4 millones de muertes al año. La CAD es la causa más común de muerte, lo que resulta en el 19% de las muertes en hombres y el 20% en las mujeres, mucho mayor que el cáncer de mama en las mujeres (2%) y que el cáncer de pulmón en los hombres (6%).

Aunque la proporción de muertes por CAD es similar entre ambos sexos, una mayor proporción de mujeres mueren a causa de accidentes cerebrovasculares (ACV) y otras enfermedades. Los ACVs representan el 49% de todas las muertes entre las mujeres y

el 40% de todas las muertes entre los hombres en Europa, considerablemente mayor que la proporción de muertes atribuidas al cáncer para ambos sexos (mujeres = 19% y hombres = 26%) (115).

En España, según los datos del Instituto Nacional de Estadística (INE), las enfermedades del sistema circulatorio se mantuvieron como la primera causa de muerte (con un tasa de 267,6 fallecidos por cada 100.000 habitantes, seguida de los tumores (240,0 fallecidos por cada 100.000) y de las enfermedades del sistema respiratorio (111,7 fallecidos por cada 100.000) para el conjunto de la población española. (Datos del INE 2015). Por su parte, las enfermedades del sistema circulatorio fueron la primera causa de mortalidad femenina (286,9 fallecidos por cada 100.000) y la segunda entre los varones (247,6 fallecidos por cada 100.000).

A nivel más detallado, dentro del grupo de enfermedades circulatorias, las ECV (infarto, angina de pecho...) y las ACV, volvieron a ocupar el primer y segundo lugar en número de defunciones. En ambos casos, se produjo un incremento de muertes respecto al año anterior (del 3,7% y 3,1%, respectivamente).

Por sexo, las ECV fueron la primera causa de muerte en los hombres, con un aumento del 2,4% respecto a 2014. Entre las mujeres fueron los ACV (que incrementaron el número de defunciones un 2,2%). Además, suponen un gasto sociosanitario muy elevado, que se estima va a incrementarse en los próximos años debido al envejecimiento de la población en España y a que el número de casos de ictus aumenta con la edad (116).

En Cataluña, a pesar de la disminución favorable de la tasa de mortalidad por ECV a niveles inferiores al 27% en el año 2009 (163 fallecidos por cada 100,000 habitantes) en comparación con los datos del año 2000 (224 fallecidos por cada 100,000 habitantes), sigue siendo la causa de la mitad de las defunciones en los hombres, siendo la segunda causa más frecuente (26,9%). En las mujeres, la primera causa son las enfermedades circulatorias (32,9%).

Por sexo y edad destaca la mortalidad por enfermedades del sistema circulatorio, que aparece en tercer lugar en las mujeres de 15 a 44 años, y en los hombres de 35 a 44

años. Son la segunda causa de muerte de los 45 a los 84 años para los hombres, y hasta los 74 años, para las mujeres. A partir de estas edades, pasan a ser la primera causa de muerte en ambos sexos (116,117).

Debido a su magnitud, en 2011 las ECV fueron incluidas en el programa de Objetivos de Desarrollo del Milenio de las Naciones Unidas, creado para hacer frente a los mayores desafíos de desarrollo global para las ENTs (118). Por otra parte, debido al envejecimiento de la población, la carga mundial de la aterosclerosis, y por lo tanto sus consecuencias clínicas, seguirán aumentando en las próximas décadas (119).

1.3.5 Enfermedades Cerebrovasculares

Las enfermedades cerebrovasculares son todas aquellas manifestaciones agudas que producen alteraciones encefálicas secundarias a un trastorno vascular. La enfermedad cerebrovascular es un término general que incluye todos los accidentes que causan daño al tejido cerebral por anomalías del suministro de sangre (120). Un suministro insuficiente de sangre al cerebro se define como (isquemia cerebral o ictus isquémico), el exceso anormal de sangre como (isquemia hemorrágica o ictus hemorrágico), o el drenaje venoso inadecuado de sangre cerebral (trombosis venosa cerebral) (120).

El ictus es un ataque de carácter súbito y violento. Las dos formas más predominantes son: ictus isquémico, que se presenta en un 85%, e ictus hemorrágico, en un 14% de los casos de ACV, respectivamente. El 1% restante se debe a etiologías poco frecuentes (121,122). El ictus isquémico puede ser resultado de aterotrombosis, cardioembolismo, hipoperfusión sistémica y otras causas desconocidas. La aterotrombosis es el tipo más común de ictus isquémico, y el cardioembolismo sigue siendo el segundo tipo más común (123-125).

1.3.5.1 Clasificación de lo ACVs según su naturaleza

El Grupo de Estudio de Enfermedades Cerebrovasculares de la Sociedad Española de Neurología (GEECV) clasifica la ECV tal y como se expone en la figura 5:

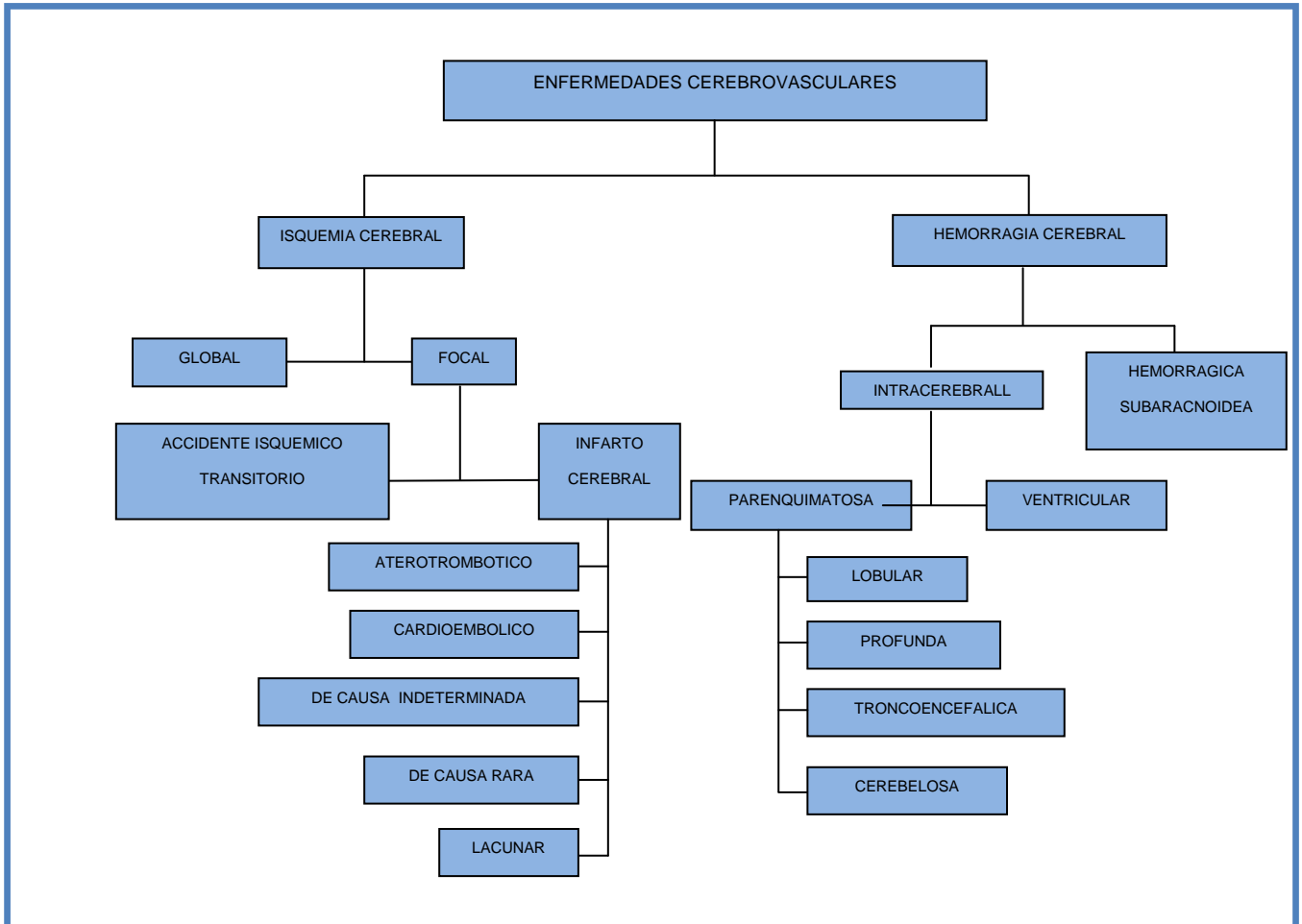


Figura 5: Clasificación de las ECVs según su naturaleza. Adaptada de Díez Tejedor E, et al (121)

1.3.5.2 Epidemiología de ACV

Según la OMS, el ACV es la tercera causa más común de muerte en los países desarrollados, sólo superada por las CADs y el cáncer. A nivel mundial, cada año, 15 millones de personas sufren un ACV. De éstos, 5,5 millones mueren y otros 5 millones

quedan discapacitados de forma permanente, lo cual supone una carga para la familia y la comunidad.

Cada año, aproximadamente 3 millones de mujeres y 2,5 millones de hombres mueren a causa de ACVs (126) (Figura 6).

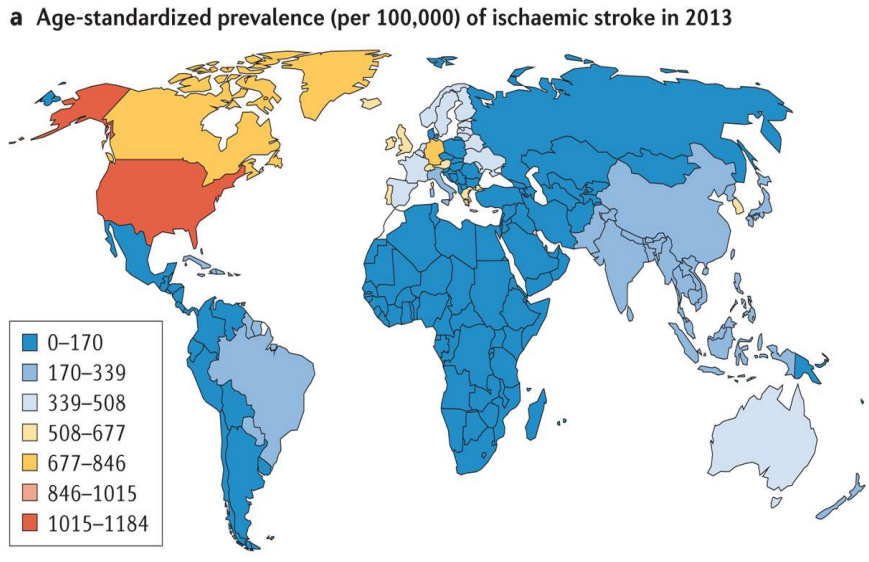


Figura 6: Mapa combinado de las muertes isquémicas y cerebrovasculares. Adaptada de Feigin, V. L. et al). (126)

1.3.5.3 Factores de riesgo del ictus isquémico

Los factores de riesgos relevantes que aparecen en la literatura implicados en el desarrollo de ictus isquémico (127) (Tabla 4) son:

No modificables	Modificables documentados	Poco Modificables documentados
Edad	HTA	Obesidad
Sexo	DM	Síndrome metabólico
Raza étnica	Tabaquismo	Alcoholismo y drogas
Antecedentes	Estenosis carotídea	Apnea obstructiva del sueño

familiares	
Dislipidemia	Anticonceptivos orales
Fibrilación auricular	Migraña
Otras cardiopatías	Infecciones
nutrición y estilo de vida	Hiperhomocisteinemia
Terapia hormonal	
Ictus isquémico o AIT previo	
Infarto miocárdico reciente	

Tabla 4: Factores de riesgo del ictus isquémico.

1.3.5.4 Diagnóstico y manejo del ictus isquémico

El objetivo general del diagnóstico del ictus isquémico agudo es la intervención precoz, para evitar o minimizar el daño cerebral irreversible causado por el déficit neurológico focal que es atribuido a un trastorno en la circulación del flujo sanguíneo en el encéfalo. Tras confirmar que efectivamente el paciente sufre un ictus, se deberán tomar las primeras medidas terapéuticas, algunas de ellas generales y otras específicas para determinadas situaciones.

El tiempo es esencial en la fase aguda del ictus isquémico; tanto para poder adoptar medidas terapéuticas como la trombolisis, como para aplicar métodos que garantizan la neuroprotección, reduciendo lo más posible los daños cerebrales. Eso sólo será eficaz si se aplica la guía de actuación durante las primeras 3 a 6 horas desde el inicio de los síntomas (128,129).

Se debe reducir al máximo el tiempo de llegada del paciente al hospital, la duración del proceso de diagnóstico inicial debe ser rápida. La calidad de actuación por parte de los servicios médicos de emergencia reside en confirmar los síntomas de ictus cerebral y saber diferenciar entre los síntomas del accidente cerebrovascular y otros síntomas neurológicos, descartando hipoglucemia, síncope, vértigo periférico, intoxicación por drogas, crisis epiléptica, crisis hipertensiva, encefalopatía hipertensiva, migraña con aura, brote de esclerosis múltiple, hematoma subdural, parálisis de Bell,

hiperventilación, encefalitis focal, tumor o traumatismo craneal, especialmente en los enfermos en estado comatoso (130,131). Hay que distinguir entre el ictus hemorrágico y el isquémico mediante el uso de tecnologías de diagnóstico por imagen, como la tomografía computerizada (CT) y/o la resonancia magnética (MR), ya que es una característica crucial para su tratamiento. Hay que buscar el tipo etiopatogénico de ictus isquémico y la topografía de la lesión arterial, y tomar la decisión oportuna (130,132). El cerebro es un órgano sumamente complejo y sensible, que controla todas las funciones del cuerpo.

La oclusión de la arteria cerebral focal detiene el suministro de la sangre de la región afectada y conduce a daños en los tejidos y a una deficiencia funcional. Por eso, un diagnóstico preciso y rápido de la isquemia cerebral es crucial a fin de proporcionar un tratamiento adecuado lo antes posible.

Además, la identificación precisa de la localización del ictus en el cerebro es igualmente valiosa para facilitar el tratamiento (132). El ictus isquémico, por lo general, requiere la siguiente información (128-132):

- Historia clínica, examen físico y neurológico.
- Análisis de parámetros clínicos de laboratorio.
- Electrocardiograma, electroencefalograma.
- Radiografía simple de tórax.
- Tomografía computerizada craneal sin contraste PET/ Resonancia. magnética craneal.
- Técnicas de Doppler AUt.

“Tiempo es cerebro”. En ictus isquémicos agudos se pierde un gran número de neuronas, sinapsis y fibras nerviosas si no se instaura un tratamiento. Tanto para los pacientes que lo sufren, como para quienes lo tratan, cada segundo cuenta (Tabla 5).

	Neuronas perdidas	Conexiones neuronales perdidas	Envejecimiento cerebral
Por un ictus	1,2 billones	8,3 trillones	38 años
Por una hora de isquemia	120 millones	830 billones	3,6 años
Por un minuto de isquemia	1,9 millones	14 billones	3,1 semanas
Por un segundo de isquemia	32.000	230 millones	8,7 horas

Tabla (5): Impacto del daño neurológico que podría causar un ictus isquémico. Adaptado de Saber j (133),

1.3.5.5 Manifestación clínica

Los síntomas iniciales se presentan de forma súbita y sorprendente. Por lo general, incluyen entumecimiento, debilidad o parálisis de las extremidades contralaterales y la cara, afasia, confusión, trastornos de la visión en uno o ambos ojos y mareo o pérdida del equilibrio y la coordinación (134).

La causa subyacente en la mayoría de los accidentes isquémicos cerebrales se divide en: embólica, debido a un trombo o coágulo procedente de la parte cardiaca, y tromboembólica, debido a una placa de ateroma inestable procedente de la aterosclerosis o disección arterial, que puede causar la estenosis. Otras causas son representadas por las enfermedades de vasos pequeños, como los cambios hemodinámicos en el caso de ictus hemorrágicos, debidos a la hipoperfusión, o causas menos frecuentes, como la inflamación de los vasos cerebrales.

La enfermedad aterosclerótica suele afectar a la arteria carótida interna extracraneal y también a las arterias vertebrales y basilares. Una vez que se ocluye una arteria cerebral, la perfusión de esa área cerebral se ve disminuida. La cantidad de déficit de perfusión está ligada a la extensión del daño (135,136). Si es leve, el daño avanza

lentamente. Por lo tanto, si la perfusión es un 40%, pueden transcurrir 3-6 h antes de que el tejido cerebral se pierda por completo. Sin embargo, si la isquemia (disminución de la perfusión) es grave y persiste más de 15-30 min, todo el tejido afectado se ve irreversiblemente dañado (136).

Si son tejidos isquémicos, pero aún no necróticos, la restauración inmediata del flujo de sangre puede reducir o revertir la lesión. La intervención rápida puede ser capaz de salvar las áreas moderadamente isquémicas (penumbras) que a menudo rodean las áreas de isquemia grave (existen estas áreas debido al flujo colateral). Durante la lesión isquémica, varios mecanismos patogénicos juegan un papel en la pérdida neuronal.

En primer lugar, el deterioro de energía produce edema citotóxico debido a la pérdida de la homeóstasis iónica (incluyendo la acumulación de Ca^{2+} intracelular). En segundo lugar, con la inflamación cerebral tiene lugar la liberación de mediadores (por ejemplo, IL-1, $\text{TNF}\alpha$) que contribuyen a la trombosis microvascular y los radicales libres, causando daño en la membrana celular. Por otra parte, las neurotoxinas excitadoras (por ejemplo, glutamato) y la muerte celular programada (apoptosis) contribuyen a la extensión de la lesión cerebral (137).

1.3.6 Aterosclerosis

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica en la que la pared arterial se endurece como consecuencia de la acumulación de colesterol, los macrófagos y VSMC, en última instancia, que restringen el flujo de sangre a través de la arteria (22). Es la principal condición patológica subyacente de la arteria coronaria y ECV que conduce a un ataque cardíaco y ACV, respectivamente. La aterosclerosis se clasifica como la principal causa de mortalidad y discapacidad en la enfermedad cardiovascular (ECV) y una causa importante de la enfermedad cerebrovascular (138). Epidemiológicamente, la cardiopatía isquémica y la isquemia cerebral representan la principal causa de muerte y discapacidad prematura en los países desarrollados (139).

1.3.6.1 Fisiopatología de la aterosclerosis

La aterosclerosis es un fenómeno complejo y el resultado de una combinación de procesos patológicos, incluyendo la inflamación y el daño endotelial. Se creía que la aterosclerosis estaba únicamente relacionada con el acumulo de lípidos, particularmente del colesterol. Más recientemente, un gran número de estudios han demostrado la participación del proceso inmune-inflamatorio: moléculas y células que han sido implicadas directamente en su fisiopatología, incluyendo monocitos (140), macrófagos (141), neutrófilos (142), células dendríticas (143), y quimioquinas, incluyendo (C-C motif) ligando 2 (CCL2) y (C-C motif) ligando 17 (CCL17) (144).

1.3.6.2 Factores de riesgo de la aterosclerosis

La identificación de los principales factores de riesgo de trastornos arteriales plantea el objetivo de desarrollar nuevas terapias y estrategias de salud pública para reducir la mortalidad y morbilidad cardiovascular.

1.3.6.2.1 Obesidad

La obesidad se ha convertido en una importante carga sanitaria global y en un síntoma de nuestro estilo de vida poco sana. En el contexto del síndrome metabólico, la obesidad a menudo coexiste con la HTA, la DM y el colesterol alto. Hay una compleja interacción entre los componentes del síndrome metabólico que es evidente a partir de datos celulares y epidemiológicos. Por ejemplo, aquellos con una circunferencia de cintura elevada son dos veces más propensos a tener elevada tensión arterial (145). La interacción entre el tejido adiposo y la vasculatura adyacente se ha estudiado en el contexto de tejido adiposo perivascular y adipoquinas con propiedades vasoactivas. Los adipocitos blancos son los principales constituyentes del tejido adiposo perivascular que rodea una gran proporción de los vasos sanguíneos en el cuerpo humano y secreta moléculas conocidas como adipoquinas.

1.3.6.2.2 Tabaquismo

El tabaquismo se cree que causa alrededor del 10% de las enfermedades cardiovasculares en todo el mundo (146). Dejar de fumar es muy eficaz en la

reducción de la mortalidad. En individuos con CAD, conduce a una reducción del 36% en el riesgo de mortalidad (147).

1.3.6.2.3 Edad avanzada

El envejecimiento mundial de la población es otro factor de riesgo para la enfermedad cardiovascular y no tiene tratamiento prescrito. Los países desarrollados y, en cierta medida, los países en desarrollo, han sido víctimas de su propio éxito económico. La mejor calidad de vida, la reducción de la natalidad y la mayor esperanza de vida han dado lugar a poblaciones cada vez mayores en los países desarrollados.

En 2010, al menos el 20% de las poblaciones de los países más industrializados eran mayores de 65 años y, en 2050, mil millones de personas serán mayores de 65 años en todo el mundo (148). Los cambios vasculares relacionados con el avance de la edad han sido bien documentados. Estos incluyen la vasodilatación luminal con engrosamiento de la pared, la rigidez arterial y disfunción endotelial.

La rigidez arterial reduce la capacidad de un vaso sanguíneo para dilatarse y contraerse en respuesta a cambios en la presión. Existe una relación lineal entre la edad y la rigidez, particularmente entre las edades de 50 y 60 años (149). La etiología de la disfunción endotelial en el envejecimiento es relevante e incluye una disminución de la actividad endotelial de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) que conduce a una reducción de la vasodilatación endotelial, así como a la disminución de la integridad del endotelio como barrera y a la pérdida de la capacidad de las ECs para proliferar y migrar después de la lesión del tejido (150).

1.3.6.2.4 Hipertensión

En 2008, alrededor del 40% de los adultos mostraba una tensión arterial elevada, (151) siendo ésta la responsable de casi el 13% de todas las muertes (7,5 millones) a nivel mundial (152). La HTA es un factor de riesgo clave para la enfermedad isquémica cardíaca y el ictus hemorrágico. El 54% de los ictus y el 47% de las isquemias cerebrales son debidas a la HTA (153). Además, los niveles de tensión arterial se ha demostrado que están relacionados con la CAD y el ACV (154). Esto pone de manifiesto la importancia de un control eficaz de la tensión arterial, que podría abordarse mediante una combinación de fármacos antihipertensivos, haciendo hincapié en la importancia del cumplimiento.

1.3.6.2.5 Dislipidemia

La dislipidemia es otro factor importante de riesgo cardiovascular. En 2008, el 39% de los adultos tenía los niveles de colesterol total elevado, y se estima que 2,6 millones de muertes fueron atribuidas únicamente a este factor de riesgo (152). Recientemente, la lipoproteína de baja densidad (LDL) se ha asociado de forma independiente con las enfermedades del corazón e isquemia cerebral (155).

1.3.6.2.6 Diabetes mellitus

La enfermedad cardiovascular es la principal causa de morbilidad y mortalidad en las personas con DM y contribuye significativamente al riesgo cardiovascular. En 2012, casi un 1.5 millones de fallecimientos fueron causados directamente por la DM (156). La DM aumenta el riesgo de cardiopatía y ACV. Según un estudio realizado en varios países, un 50% de los pacientes diabéticos muere de enfermedad cardiovascular (principalmente cardiopatía y ACV) (157).

En las últimas dos décadas, la diferencia en las complicaciones de la ECV entre personas con y sin DM se ha reducido sustancialmente. En 1990, las tasas de infarto agudo de miocardio y ACV eran de tres a cuatro veces mayores en las personas con DM en comparación con la población general. Sin embargo, en el año 2010, esta diferencia se había reducido a menos del doble que la de la población general (158). Por otra parte, desde la década de 1990, se ha producido un descenso del 3.5% en las tasas de infarto agudo de miocardio y mortalidad cardiovascular en los pacientes con DM (159). Esto podría ser el resultado de la detección temprana de la DM, así como del uso de medicamentos más eficaces y con menos efectos secundarios, y del apoyo educativo al paciente.

1.3.6.2.7 Estilo de vida y factores ambientales

La mega-urbanización ha sido el factor que más contribuye a la mortalidad cardiovascular creciente en todo el mundo. A partir de 2010, más de la mitad de la población mundial vive en ciudades. La reducción de la actividad física, el uso del transporte motorizado, la contaminación del aire, el trabajo en oficinas, el estrés laboral, el aumento de las tasas de tabaquismo y el fácil acceso a comida insalubre de alto contenido calórico y de sal, y de alimentos azucarados con bajo valor nutricional, contribuyen al aumento de la tensión arterial, la obesidad y el riesgo cardiovascular

(160). La contaminación del aire, en particular, se ha relacionado con una mayor incidencia de ACV (161).

1.3.6.3 El desarrollo de la lesión aterosclerótica

La enfermedad arterial se caracteriza por un desequilibrio en el metabolismo de lípidos, induciendo una respuesta inmune-inflamatoria desregulada que resulta en la retención de lipoproteínas en la capa sub-endotelial y en la activación endotelial por la migración de las VSMC e inmunes hacia la capa de la íntima inflamada (162). Ello conduce a la formación de ateromas con estenosis vascular crónica e isquemia tisular que a menudo se complica por eventos aterotrombóticos agudos como infarto de miocardio o ACV.

Las lesiones ateroscleróticas se desarrollan preferentemente en segmentos vasculares con un flujo sanguíneo ralentizado o perturbado, por ejemplo, bifurcaciones arteriales y sitios de ramificación (163,164). Este entorno arterial en combinación con factores de riesgo como la HTA, el tabaquismo, la DM u otros elementos patógenos (complejos inmunes, toxinas, virus y bacterias), favorecen la disfunción endotelial e incluso la respuesta inflamatoria a la lesión, con exposición de los proteoglicanos de la matriz y activación plaquetaria (165,166).

Las lesiones ateroscleróticas tempranas, también denominadas estrías grasas, se componen fundamentalmente de las deposiciones lípidicas, linfocitos T, monocitos/macrófagos y células espumosas cargadas de lípidos modificados (22). De hecho, casi cada subpoblación de leucocitos, desde linfocitos, monocitos y neutrófilos a células dendríticas o mastocitos, se puede encontrar en un número variable dentro de la lesión durante las diferentes etapas de desarrollo de la misma (167-169). Las ECs, la infiltración leucocitaria, la proliferación y la necrosis con acumulación de cristales, restos celulares y colesterol dan lugar al crecimiento de la lesión, y las estrías grasas se transforman gradualmente en placas estenóticas. (170,171).

Los altos niveles de LDL circulantes son otro factor de riesgo principal para el desarrollo y la progresión de las placas ateroscleróticas. Debido al aumento de la permeabilidad endotelial, las LDL se acumulan fácilmente en el espacio subendotelial (172). La oxidación de LDL se produce mediante ROS y/o enzimas tales como la

mieloperoxidasa o la lipoxigenasa liberada por las células inflamatorias circundantes (173).

Las oxLDL son captadas por macrófagos, contribuyendo así a la formación de células espumosas. Por otra parte las oxLDL, además de inhibir la salida de los macrófagos de la lesión, inducen la expresión de moléculas de adhesión o deposición de quimioquinas en las ECs activadas que acelera aún más el reclutamiento de leucocitos (174).

Estas placas fibrosas contienen un núcleo necrótico acelular que está cubierto por una capa fibrosa de tejido conectivo denso compuesto por colágeno, células del músculo liso de la íntima (VSMC) y macrófagos.

Por otra parte, debido al aumento de volumen de la placa, la monocapa endotelial se hace más estirada y permeable, incrementándose su vulnerabilidad e inestabilidad. El fibroateroma estable avanzado está cubierto por una capa fibrosa densa, resistente a la tensión, y contiene pocas células inflamatorias (175). Estas placas normalmente se asocian con isquemia tisular crónica, que puede ser parcialmente compensada por el crecimiento de vasos colaterales. Por el contrario, las placas vulnerables tienen una capa fibrosa fina e incluyen más células inflamatorias junto a VSMC y un núcleo necrótico. Estas placas son más propensas a la erosión o rotura, con complicaciones aterotrombóticas oclusivas posteriores.

1.3.6.4 Tipos de lesiones ateroscleróticas

La patogénesis de las lesiones ateroscleróticas se ha observado en diferentes etapas de la enfermedad y en diferentes grupos de edad. Hay muchas clasificaciones histológicas de las lesiones ateroscleróticas. Sin embargo, las documentadas y reconocidas se relacionan con la morfología y las manifestaciones clínicas en las siguientes etapas (176, 177,178) (Figura 7).

A. Engrosamiento adaptativo de la íntima: Se caracteriza por la acumulación de células de músculo liso en una matriz de proteoglicanos en ausencia de lípidos y células inflamatorias. Esto puede propiciar el desarrollo de lesiones, inicialmente en los puntos de ramificación, pero más tarde podría extenderse en partes adyacentes.

B. Xantoma de la íntima: también conocido como estría grasa: Se caracteriza por la acumulación de LDL en la íntima. Posteriormente, las partículas de LDL se modificarán y someterán a procesos de oxidación, y empezarán a actuar como estimuladores de la respuesta inmune crónica. Inducen a las ECs para expresar las moléculas de adhesión, que interactúan con receptores en la superficie de los monocitos y estimulan su adhesión y migración en la íntima. Los macrófagos pueden expresar varios fenotipos diferentes. Algunos de ellos son pro-inflamatorios (fenotipo M1), y los otros, que tienen un fenotipo M2, favorecen la resolución de la inflamación. Estos tipos de lesiones pueden ser completamente reversibles si los estímulos que los han motivado se disipan. Están ya presentes en la aorta de algunos lactantes en los primeros 6 meses, lo que probablemente refleja los factores de riesgo de las madres.

C. Engrosamiento intimal patológico: el engrosamiento patológico de la íntima es a veces reflejado en la literatura como una verdadera necrosis no aparente "lesión intermedia". La capa fibrosa que cubre las áreas de lípidos es rica en VSMC y proteoglicanos. Los macrófagos y los linfocitos también pueden estar presentes, aunque éstos son generalmente escasos.

D. Fibroateroma: corresponde a la formación del núcleo necrótico. Las células espumosas, macrófagos y VSMC de la íntima acumuladas en el tiempo podrían someterse a apoptosis y necrosis secundaria. La razón por la que la necrosis, pero no las otras lesiones, ocurre en algunas personas aún se desconoce. En esta etapa de la enfermedad la neovascularización y la hemorragia intraplaca están a menudo presentes.

E. Placas fibrocalcificadas: La calcificación es común en la aterosclerosis progresiva, y su contenido aumenta con la edad. Los componentes de la placa que se someten a la calcificación son: las células apoptóticas, la matriz extracelular (EMC) y el núcleo necrótico. A veces, estas estructuras se someten a la calcificación completa. Así, la calcificación puede constituir la mayor parte del volumen de la placa. Las dos últimas fases de la progresión de la enfermedad (D y E) pueden intercambiarse entre sí bajo diferentes factores internos y externos. Por ejemplo, la terapia con estatinas podría aumentar la composición fibrótica dentro de las placas blandas, y en dosis elevadas puede agravar la calcificación de la placa.

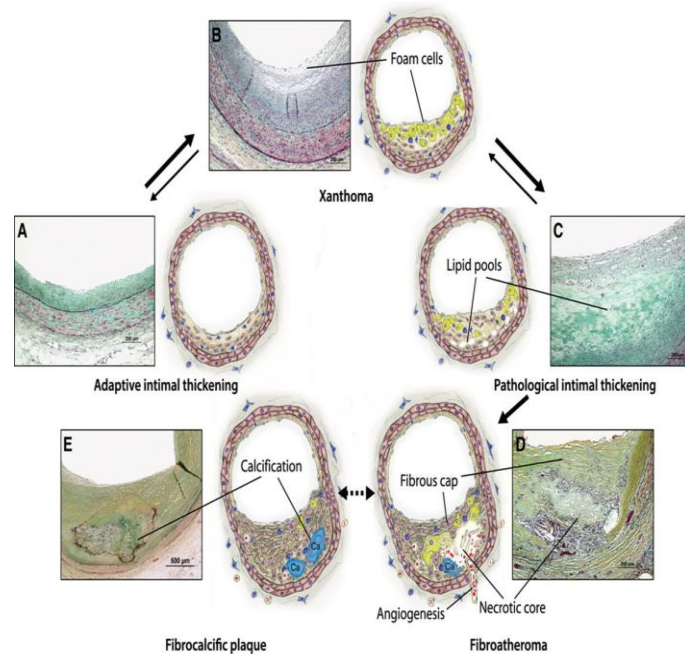


Figura 7: Tipos de lesiones ateroscleróticas y sus etapas de desarrollo. **A)** engrosamiento adaptativo de la íntima, caracterizado por la acumulación de células de músculo liso. **B)** xantoma de la íntima, correspondiente a la acumulación de macrófagos y células de espumosas. **C)** engrosamiento de la íntima por acumulación de de lípidos. **D)** fibroateroma con presencia de un núcleo necrótico. **E)** placa fibrocalcificada. Adaptado de Bentzon et al (177).

1.3.6.5 Estenosis asintomática de la arteria carótida

La estenosis asintomática de la arteria carótida (ACAS) se caracteriza por el estrechamiento de la arteria carótida, y como tal carece de síntomas. La prevalencia de un grado grave de estenosis asintomática de la arteria carotídea $\geq 70\%$ en la población general varía de 0% a 3% (179). La frecuencia anual de isquemia en pacientes ACAS varía de 1% hasta 3% (180). A pesar de que grandes ensayos aleatorios han demostrado que la endarterectomía carotídea (CEA) (Figura 8), es beneficiosa (181) en comparación con el mejor tratamiento médico, por sí sola la revascularización de la ACAS sigue siendo un tema de debate (182).

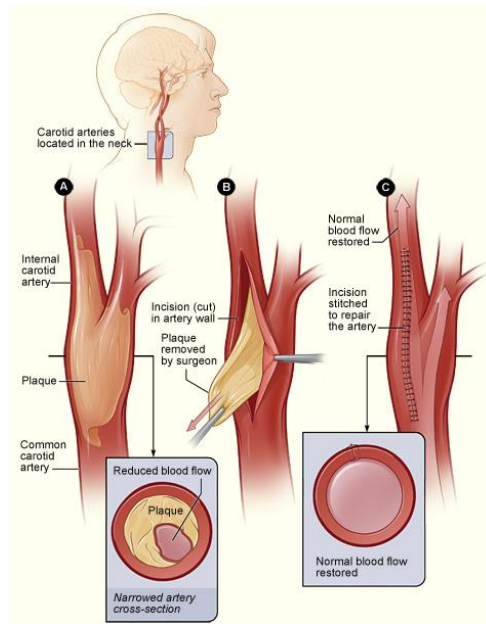


Figura 8: Intervención quirúrgica de endarterectomía carotídea en la estenosis de la arteria carótida con grado $\geq 70\%$. **A:** incisión en la arteria carotídea, **B:** Se extrae la placa, **C:** Se cierra la incisión en la arteria suturando un parche venoso o sintético. Adaptado de internet.

1.3.6.6 Estenosis sintomática de la arteria carótida

La estenosis sintomática de la arteria carótida (CAS) se define como la estenosis que causa síntomas, tales como ataques isquémicos transitorios (AIT), amaurosis fugaz (AFX) u otros tipos de ACV (179).

Para el grupo de pacientes que sufren de estenosis sintomática de la arteria carótida, varios ensayos grandes aleatorios han demostrado que CEA (Figura 8) es el tratamiento de elección en pacientes con una estenosis grave $\geq 70\%$ (183). Según el meta-análisis más reciente, la cirugía sigue siendo la mejor opción a pesar de varios estudios que investigan el beneficio de la colocación de endoprótesis vascular (Stent) en pacientes de CAS (184). En la literatura se describen varios factores que pueden influir en la selección a favor o en el resultado después de la CEA. Estos incluyen el grado de estenosis, la composición de la placa, el momento de la cirugía y los factores de riesgo anatómicos asumidos. Cada uno de ellos puede ser importante para la toma de decisiones clínicas (185).

1.3.6.7 Las placas vulnerables o inestables

Las características de las placas vulnerables o inestables son: rotura de capa fibrosa, núcleo lipídico grande, densa infiltración de macrófagos, hemorragia intraplaca o microvasos (179, 186,187). El mayor riesgo para un accidente neurológico es que vuelva a ocurrir dentro de los primeros 7 días después de la manifestación inicial y, por lo tanto, la necesidad de la intervención quirúrgica tan pronto como sea posible después del primer síntoma que necesite una atención especial (188).

La acumulación de placas de ateroma en las arterias carótidas afecta significativamente el suministro de sangre al cerebro, causando a los pacientes manifestaciones clínicas como desmayos, síncope y posiblemente un ictus isquémico (189). Basado en los datos del estudio de cohorte de Framingham, la prevalencia de aterosclerosis de la arteria carótida, definida como una estenosis > 50% evaluada por ecografía carotídea en la población estudiada, fue del 7% en las mujeres y del 9% en los hombres (190,191).

1.3.6.8 Diagnóstico de aterosclerosis carotídea mediante técnicas de imagen

El grado de estenosis de las arterias carótidas se puede evaluar mediante varios métodos no invasivos, como los siguientes (192-194):

- Ecografía en modo-B y ecografía doppler (parámetros como el grosor de la íntima-media (IMT), la calidad ecogénica y medición en 3D de características de la placa).
- Doppler transcraneal (detección de microembolias utilizado como un marcador de la inestabilidad de la placa, la detección de estenosis de la carótida intracraneal).
- Angiografía por tomografía computerizada (CTA) (evaluación de la estenosis arterial y las características básicas de la placa).
- Angiografía por resonancia magnética (RM) (evaluación de la hemorragia intraplaca y la presencia de una capa fibrosa. Ambos representan marcadores radiológicos de la vulnerabilidad de la placa).
- Tomografía por emisión de positrones (PET/TC) (Técnica de imagen utilizada para la evaluación de la inflamación de la pared vascular).

La evaluación periódica de la placa carotídea representa una herramienta clave para la monitorización de la evolución y su terapia.

1.3.6.9 Estrategias terapéuticas

La terapia para el ictus isquémico o el TIA se basa en un enfoque con múltiples pasos: (122, 195,196):

- La prevención primaria. De hecho, el tratamiento médico de los factores de riesgo modificables como la HTA, DM, dislipidemia, obesidad, tabaquismo, etc. desempeña un papel clave para la reducción de la incidencia del ACV.
- La prevención secundaria, teniendo en cuenta que la recaída no es rara.
- La rehabilitación. Otro de los pilares de la terapia de ACV.
- Estrategias de reperfusión (fibrinolíticos por vía intravenosa y / o, en casos seleccionados, la eliminación mecánica mediante tromboctomía o endarterectomía)
- El ingreso en una unidad de atención de ACV conectada con la red de Teleictus.
- Los agentes antiplaquetarios son una alternativa para los pacientes que no pueden optar a las estrategias de reperfusión.

1.3.7 Relación entre ictus y PE

Las anomalías cerebrovasculares desempeñan un papel importante en la patogénesis de PE y la eclampsia (197-199). Los síntomas neurológicos como dolores de cabeza, visión borrosa, náuseas, somnolencia y convulsiones son comúnmente reportados en pacientes con pre-eclampsia y eclampsia (200,201). Por otra parte, el riesgo de desarrollar un ACV durante el embarazo y el año después del parto se incrementa en mujeres con PE y eclampsia (202). Aproximadamente el 40% de todas las muertes por PE y eclampsia se deben a eventos cerebrovasculares con hemorragia cerebral que contribuye un 35%, edema cerebral un 3%, y la embolia cerebral un 1% de las muertes relacionadas con PE (203,204).

La hipótesis relaciona la PE con las enfermedades ECV como factor de riesgo, no sólo por la repercusión en la salud materno-fetal, sino también, por las complicaciones que

podrían aparecer después del parto que podría sufrir tanto la madre como su bebé (205). La PE y los ACVs comparten muchas características y factores de riesgo en común que han reportado diferentes estudios (CHAMPS), entre otros para el ACV relacionado con el embarazo que son: Edad materna mayor de 35 años, raza étnica Africana, estados hipertensivos, insuficiencia cardíaca y renal, DM I y II, tabaquismo, abuso de alcohol y drogas, lupus, anemia drepanocítica, migraña, parto por cesárea, edemas, retenciones de líquidos y trastornos electrolíticos, trombofilia, gestación múltiple, una mayor paridad y la infección posparto. Estos factores, entre otras complicaciones, podrían elevar las tasas de mortalidad a niveles superiores al 15%, lo que convierte a este síndrome como un problema grave de la salud (206-209).

Un estudio ha informado sobre la asociación entre antecedentes de complicaciones en el embarazo y el accidente miocárdico. Entre un grupo de 3909 mujeres de 50 años, en total, 199 (5,1%) mujeres manifestaron angina pecho, 79 (2,0%) informaron de un ataque al corazón, 44 (1,1%) reportaron insuficiencia cardíaca, y 642 (16,4%) informaron de arritmia cardíaca (210). El riesgo cardiovascular en mujeres con PE y parto prematuro era 2,71 veces mayor (1,99 a 3,68) al de las mujeres que no tenían PE y cuyos embarazos fueron normales. En particular, el riesgo de muerte por causas cardiovasculares entre las mujeres con PE y parto prematuro era 8,12 veces mayor (4,31-15,33). Además como conclusión se llegó a que los factores genéticos que aumentan el riesgo de enfermedades cardiovasculares también podrían estar relacionados con la PE (211).

En una revisión de 7 estudios a largo plazo, se demostró que la PE es un fuerte indicador de enfermedad cardiovascular futura, y una historia clínica de PE aumenta significativamente el riesgo de HTA en el futuro y, posteriormente, aumenta el riesgo de otros eventos cardiovasculares, en particular, la enfermedad isquémica del corazón y los ACVs (212). La insuficiencia cardíaca y la HTA esencial, fueron relacionadas como consecuencias después de haber sufrido PE a los dos años del parto, según varios estudios (213-215).

Otro estudio de cohorte basado en una población asiática entre los años 1999 y 2003, realizado en 1,132,064 de embarazadas, utilizando un conjunto de datos que une los certificados de nacimiento y datos de alta hospitalaria del Seguro Nacional de Salud, utilizaron los factores sociodemográficos y complicaciones obstétricas en los modelos de análisis de regresión logística multivariante para determinar los coeficientes de

riesgo ajustados de PE / eclampsia en riesgo de ECV y mortalidad durante el embarazo hasta el tercer año después del parto.

Las tasas de incidencia de ECV y la mortalidad materna en mujeres con PE / eclampsia fueron 16,21 y 40,38 por cada 100.000 pacientes por año, respectivamente. Las mujeres con PE /eclampsia tenían 13 veces mayor incidencia de infarto miocárdico, 8.3 veces mayor incidencia en insuficiencia cardíaca, 14,5 veces mayor incidencia de ACV, 12,6 veces mayor incidencia de ECV, y 6,4 veces mayor incidencia de muerte en general, que las mujeres sin PE /eclampsia. El estudio ha recomendado la importancia de la supervisión de las mujeres con PE / eclampsia que deben ser estrechamente monitorizadas durante el embarazo y durante un máximo de ≥ 3 años (216).

Otro estudio de amplia cohorte ha relacionado la vinculación de la PE con la demencia en mujeres mayores de 65 años que habían sufrido complicaciones gestacionales con eclampsia y PE durante sus embarazos. Se observó que la materia blanca cerebral había tenido más lesiones con respecto a los controles de mujeres normotensas durante su embarazo (217). Estos resultados fueron reconfirmados en otros estudios años más tarde por el mismo grupo. Esto propone una posible predisposición para desarrollar lesiones cerebrales en la sustancia blanca (WMLS) y se podría correlacionar con la cognición deteriorada y la demencia (218).

Un estudio global en los hospitales de EE.UU ha informado de una tasa creciente de los ingresos hospitalarios prenatales y postnatales a causa de ACVs durante el embarazo entre 1994 y 2007, que podría estar vinculada a un aumento de la edad materna y a una mayor frecuencia de trastornos hipertensivos (219).

Otros estudios anteriores también habían observado la frecuente relación de ictus isquémico e ictus hemorrágico durante el embarazo (220). Parece que los cambios fisiológicos y el aumento de los factores antitrombóticos en el embarazo favorece la aparición del ictus placentario y la coagulopatía debido a la disfunción placentaria. También la estasis venosa o reducción repentina en el volumen de sangre después del parto, exponen a las mujeres embarazadas a un mayor riesgo para desarrollar un ACV que puede ocurrir en cualquier etapa durante el embarazo, las 2 semanas del postparto tienen riesgo más alto debido a esta etapa (221).

Otro estudio retrospectivo desde 1984 hasta 2002 evaluó los factores de riesgo y las etiologías de isquemia cerebral en mujeres embarazadas en edad reproductiva. La trombosis venosa cerebral (TVC) era más común en los ictus relacionados con el

embarazo (39% frente al 7%, $P < 0,001$), y el 73% de estos casos se produjo después del parto. La PE era una causa importante de hemorragia cerebral periparto (37%), e isquemia cerebral (4%) (222,223).

Los riesgos multifactoriales durante el embarazo podrían ser una verdadera amenaza, según un estudio con 2.850 mujeres embarazadas, que incluyó un diagnóstico de ACV con una tasa de 34,2 por cada 100.000 partos. El riesgo de ACV aumenta con la edad, especialmente en edades de 35 años o más. Las mujeres afroamericanas tenían un riesgo más alto (224).

Otros estudios con niños que nacieron de madres que padecían PE, reportaron que el nivel de presión sanguínea estaba alterado en estos niños en edad escolar previamente expuestos a la PE, mostrando mayor presión arterial sistólica y diastólica ya a la edad de 8 años (225, 226). Además, se informó de que estos niños tienen corazones más pequeños, aumento del ritmo cardíaco y características de disfunción diastólica cardíaca (227). Otros estudios sugirieron, según historiales clínicos de madres de más de 65 años, que los descendientes con PE no mostraron un mayor riesgo de CAD, pero informaron una mayor incidencia de ACV como ictus isquémico (228).

El sistema renal es otro sistema afectado por la PE, dando lugar a altos niveles de proteinuria. Los niveles de proteinuria y creatinina se consideran directamente relacionados con el riesgo de complicaciones como PE y mayor riesgo de microalbuminuria persistente después de PE, y esto puede ser síndrome HELLP (229), a pesar de que otros estudios no consideran la proteinuria como marcador diferencial (230). La microalbuminuria es un marcador de la lesión endotelial renal como resultado del daño vascular local o sistémico que refleja la presencia de la enfermedad renal después de la PE (231). Los estudios revelaron que las mujeres con historia de PE han elevado la presión arterial, la disfunción endotelial, el aumento de peso y otros signos de perfil de riesgo cardiovascular adverso, tanto antes como después del embarazo preecláptico (232).

1.4 Biomarcadores para diagnóstico/pronóstico precoz

1.4.1 Utilidad de los biomarcadores

Durante las últimas décadas, una de las principales aspiraciones de la investigación biomédica, ha constituido el diagnóstico precoz de diferentes enfermedades de alta tasa de mortalidad (233). La posibilidad de detección en fase temprana o, mejor dicho, en la etapa asintomática del desarrollo de la enfermedad, ha impulsado la búsqueda de nuevos biomarcadores (234,235). Los biomarcadores proporcionan, además, información adicional en la comprensión de la patogénesis subyacente de las enfermedades (236-238). Los biomarcadores convencionales, por lo general, se han identificado a partir de mecanismos de acción ya conocidos. Por otro lado, las nuevas tecnologías "ómicas" emergentes permiten el descubrimiento y caracterización no sesgada de las variaciones genéticas y epigenéticas asociadas con predisposición a la enfermedad (239). Es evidente que la aplicación de biomarcadores moleculares implicados, por ejemplo, en la regulación génica post-transcripcional, podría facilitar la predicción precoz de las patologías (240).

1.4.2 Características de un buen biomarcador

Un biomarcador ideal de una enfermedad es un parámetro o una característica que puede ser medida y evaluada objetivamente en un paciente como un indicador de procesos patológicos, pero es indetectable o detectable a niveles significativamente diferentes en una persona sana (241).

Los biomarcadores pueden aplicarse ampliamente para mejorar la gestión de la salud a través de muchas facetas diferentes, tales como:

- La identificación precoz de los individuos de "alto riesgo".
- Diagnóstico precoz de la enfermedad.
- Estratificación de los pacientes en función de la gravedad de la enfermedad.
- Pronóstico de la enfermedad.
- Identificación en pacientes de "alto riesgo" de complicaciones a largo plazo después de la manifestación de una particular enfermedad.

Dicho diagnóstico/pronóstico preciso permitiría no sólo la prevención de muchas patologías, sino también la optimización de estrategias terapéuticas en fases más avanzadas de la enfermedad. Los biomarcadores se pueden encontrar en cualquier fluido biológico tal como suero, plasma, líquido cefálico, saliva, orina, y microvesículas circulantes. Pueden ser productos biológicos tales como metabolitos o marcadores genéticos (242-244).

1.4.3 Nuevas tecnologías aplicadas en la detección precoz

Los biomarcadores proporcionan un enfoque potente y dinámico en la comprensión de las patogénesis subyacentes de las enfermedades. El creciente desarrollo de estas herramientas analíticas facilita el descubrimiento y desarrollo de biomarcadores moleculares para aplicaciones en medicina, incluyendo su utilidad para la medicina individualizada, o la utilización de los fluidos biológicos como fuente de RNA para diagnóstico (245).

Aplicaciones importantes como la tecnología de transcriptasa inversa (RT) y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR), el desarrollo de las tecnologías de microarrays de alto rendimiento, la secuenciación masiva de última generación y el desarrollo de la bioinformática han proporcionado la capacidad de evaluar los niveles relativos de los transcritos individuales con una capacidad y un ritmo que era inimaginable hace sólo dos décadas (246).

Los microarrays permiten a un investigador acceder al comportamiento de miles de genes sin un conocimiento a priori acerca de qué genes podrían estar involucrados, lo cual podría ampliar el conocimiento de otras vías de señalización, mecanismos y dianas involucradas en la patogénesis de la enfermedad. Gracias a la tecnología de microarrays es posible identificar un panel de genes, en lugar de un solo gen, que cuando se usa junto con otros biomarcadores convencionales podría ofrecer un indicador más preciso y robusto de los resultados en los pacientes (247).

Los microarrays utilizados para examinar el conjunto de las transcripciones a nivel global, de genoma completo son, por lo tanto, herramientas poderosas para identificar nuevos biomarcadores que pueden indicar el estado de las distintas vías previamente desconocidas o previamente no ligadas, asociadas con la enfermedad bajo estudio (248).

Los microRNAs (miRNAs) se han convertido en un elemento prometedor para mejorar nuestra comprensión de la patología de las ECVs a nivel molecular y celular. La implicación potencial de microRNAs se ha descrito en la aterosclerosis (248-250), la función de las ECs (251) y la remodelación arterial (252), así como en trastornos como la enfermedad arterial periférica (253) el accidente cerebrovascular (254), la obesidad (255) y la enfermedad aórtica (256).

Una mejor comprensión del papel de los microRNAs en los trastornos cardiovasculares, sin duda, conducirá al desarrollo de futuras terapias (257). También tienen la capacidad de influir en los procesos tanto fisiológicos como patológicos que involucran la diferenciación celular, la proliferación/crecimiento, la apoptosis, la angiogénesis y la inflamación (258-260). Estudios recientes también han propuesto un papel para miRNAs en comunicación intercelular (261). Durante el embarazo el cuerpo sufre cambios dinámicos, en particular en la placenta, que se convierte en escenario de diferentes acciones fisiológicas celulares donde los miRNAs están involucrados (262).

1.4.4 El transcriptoma humano

En 2001 se terminó la secuenciación del genoma humano y se hizo evidente que sólo había una pequeña fracción del genoma codificante para la transcripción de proteínas (263,264). El análisis de genoma indica que hay aproximadamente 20.000 genes en el genoma humano, donde se estima que el 98% del transcriptoma corresponde a RNAs no codificantes (ncRNA), mientras que sólo el 2 % del genoma humano codifica para las proteínas (265), ahora se sabe que la gran mayoría >85%, del genoma se transcribe en ncRNA (266).

La última década ha cambiado nuestra opinión sobre la regulación del genoma, ya que más del 50% de los mRNA celulares son regulados mediante los ncRNAs que, a su vez, se encuentran alterados en diferentes procesos biológicos y patológicos (267-271).

1.4.5 RNAs no codificantes

Muchos ncRNA se transcriben y se reconocen como RNAs funcionales con diversos tamaños, estructuras y funciones biológicas. Basado en su tamaño, el ncRNA se puede dividir generalmente en dos subgrupos: el ncRNA pequeño (< 200 nucleótidos, incluyendo microRNAs) y el ncRNA largo (lncRNA >200 nucleótidos). El procesamiento de los ncRNAs presenta diferencias con respecto a los RNAs codificantes.

La mayoría son transcritos por la RNA polimerasa II, aunque hay otros que derivan de la actividad de la RNA polimerasa III, entre otras. La mayoría no contienen colas terminales de poli A, y se calcula que el número de transcritos poli A negativos son el doble respecto a los poli A positivos (272). En la Tabla 6 se describe los tipos y funciones de ncRNAs:

Tipo ncRNA	Tamaño(nt)	RNA pol	Función
rRNA	120-4700	I y III	Núcleo de ribosomas
tRNA	70-90	III	Adaptadores entre mRNA y aminoácidos durante la síntesis de proteínas
snRNA	100-200	II y III	Corte y empalme de pre-mRNA
snoRNA	60-300	II	Modificación de nucleótidos de RNA, corte de pre-rRNA, corte y empalme alternativo.
RNA telomerasa	148-1330	II	Replicación de telómero
piRNA	30	II	Controlan actividad de transposones
miRNA	20-23	II y III	Regulación de la traducción de mRNAs
lncRNA	>200	II y III	Regulación transcripcional y posttranscripcional

Tabla 6: Tipos y funciones de RNAs no codificantes. piRNA: RNA asociados a Piwi, RNAr: RNA ribosómicos, lncRNA: RNA largo no codificante, miRNA: microRNA, snoRNA: RNA nucleolar pequeño, RNA pol: RNA polimerasa.

1.5 Los microRNAs

Los miRNAs constituyen una de las familias más abundantes de genes, y se distribuyen ampliamente en animales, plantas, protistas y virus (273). Según la última versión de la base de datos de miRNAs (miRBase 21.0) se han catalogado más de 434 miRNAs en *Caenorhabditis elegans*, más de 466 miRNAs en *Drosophila melanogaster* y más de 2.588 miRNAs en los seres humanos. A pesar de la importancia funcional de muchas de estas anotaciones, queda mucho por determinar en los miRNAs (274).

Los miRNAs son una nueva clase de RNAs endógenos de reducido tamaño (19-24 nucleótidos de longitud) y no codificantes, que controlan la expresión génica mediante inhibición o degradación del mRNA diana (275).

El primer miRNA, lin-4, fue descubierto en 1993 y se encontró en los nematodos *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*). Se observó que el miRNA Lin-4, se une a la 3'UTR del gen lin 14 (276). En su momento, este descubrimiento fue considerado como un hecho aislado que ocurre en *C.elegans*, ya que la secuencia de lin-4 no está conservada en otras especies. Tuvieron que pasar otros siete años hasta el descubrimiento del segundo miRNA let-7, altamente conservado en muchas especies, que regula el desarrollo en *C.elegans* (277). Un miRNA puede regular la expresión de cientos de genes simultáneamente. Por el contrario varios miRNAs pueden regular un solo mRNA cooperativamente (278).

Desde entonces, los miRNAs se convirtieron en un objetivo importante para los investigadores y un nuevo mundo por descubrir. Desde el año 2001 hasta Marzo de 2017 más de 59.813 publicaciones aparecen en buscador de *Pubmed* sobre miRNAs, entre ellos 2.838 publicaciones sobre miRNAs circulantes en diferentes biofluidos biológicos (Figura 9).

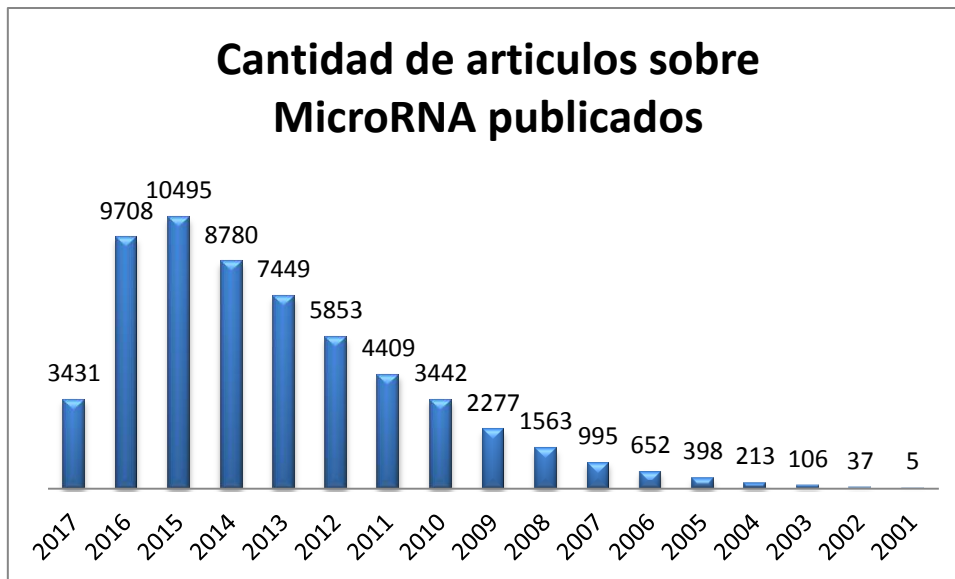


Figura 9: Numero de estudios de miRNAs publicados desde su descubrimiento hasta el primer trimestre de 2017..

Los miRNAs se encuentran en regiones genómicas (intrones y exones), así como en la región no traducida 3' (3'UTR) de los genes codificantes para proteínas (279,280). Un estudio realizado en mamíferos identificó 232 miRNAs, y encontró que 161 se solapan con 123 unidades transcripcionales. Se identificaron miRNAs dentro de intrones de 90 genes que codifican para proteínas con un amplio espectro de funciones moleculares, y en intrones y exones de 66 ncRNAs (280). En los últimos años, su biogénesis se ha explorado extensivamente (259, 281,282).

Esto coincide también con los resultados de un estudio sobre la base de predicciones bioinformáticas. Alrededor del 60% de los genes codificantes para proteínas humanas son dianas conservadas de miRNAs a través de apareamiento de bases entre la 3' UTR del mRNA y la región 5' del miRNA (283). El acoplamiento causa la inhibición de la traducción y / o la degradación de mRNA diana (259).

1.5.1 Métodos bioinformáticos de identificación de dianas

La versión actual de miRBase v 21 (<http://www.mirbase.org>), contiene 28.645 miRNA *loci* de 206 especies (30.424 miRNA maduros), incluyendo 1.872 precursores miRNA humanos que producen 2.578 miRNAs maduros (284).

Los algoritmos computacionales han sido adaptados para mejorar los enfoques experimentales dirigidos a la identificación y validación de nuevos miRNAs (285) (312). Las principales herramientas computacionales utilizadas para la búsqueda de genes diana para miRNAs (286) se describen a continuación y se muestran en la siguiente Tabla:

Herramientas bioinformáticas	Enlace URL http://
Miranda	www.microRNA.org
TargetScan	www.targetscan.org
miRTarBase	mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/index.php
miRWALK	www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/index.html
PicTar	www.pictar.mdc-berlin.de
miRDB	www.mirdb.org/miRDB/
Diana-microT	www.diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/
Mirgen	www.diana.pcbi.upenn.edu/miRGen.html
RegRNA.org	www.regRNA.mbc.nctu.edu.tw/html/prediction.html

Tabla 7: Principales métodos y fuentes para la predicción de genes diana de miRNA. Adaptado de Augustin, R et al (286).

1.5.2 Biogénesis y funciones de los miRNAs

Hay dos vías para generar miRNAs: la vía canónica y la vía no canónica. La mayoría de los miRNAs se producen a través de la vía canónica (287) y los miRNAs conservados generados mediante la vía no canónica se estiman en un ~1% en vertebrados (288). Los genes de miRNAs se transcriben mediante las RNA

polimerasas II y III en el núcleo, para generar moléculas de un tamaño entre 1 a 3 kilobases llamadas miRNAs primarios (pri-miRNAs) (289-291). Los pri-miRNAs son procesados por la RNasa nuclear III Drosha junto con su cofactor (síndrome de DiGeorge región crítica gen 8) DGCR8 (259,292).

Aproximadamente 70 nucleótidos (nt) de estructura en horquilla llamados miRNAs precursores (pre-miRNAs) son liberados después de la transformación iniciada por Drosha. La horquilla de pre-miRNA resultante es exportada a continuación desde el núcleo al citoplasma, mediante un complejo formado por exportina 5 y Ran-GTP (293-295).

En el citoplasma, la enzima RNasa III Dicer complejada con la proteína de TAR RNA (TRBP) escinde la horquilla pre-miRNA, dando lugar a un miRNA de doble hebra de ~21-nt de longitud (281,296). La cadena con un extremo 5' termodinámicamente menos estable, por lo general, actúa como efectora mientras que la otra cadena se degrada. En ciertos casos, ambas hebras son viables y se convierten en miRNAs funcionales.

A partir de entonces, la cadena efectora del miRNA maduro se incorpora a un complejo multiproteico conocido como Complejo de silenciamiento inducido por RNA de interferencia (RISC), que también contiene proteínas como Argonaute (AGO), para formar miRISC (259,297). Una vez que el miRISC está ensamblado, la cadena efectora de miRNA dirige el silenciamiento del mRNA diana mediante su escisión, la represión de su traducción o su desadenilación (268, 297,298) (Figura 10).

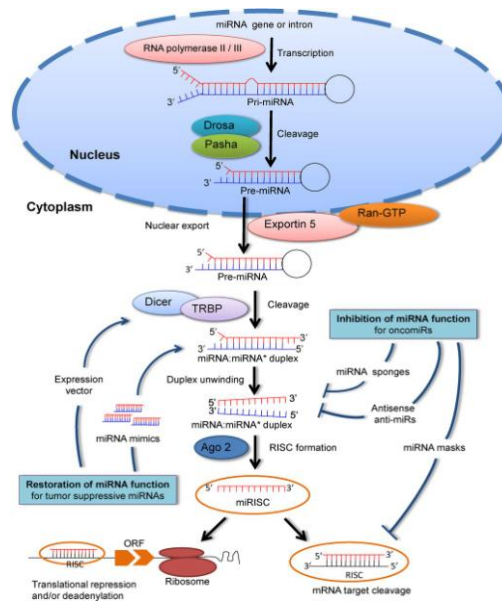


Figura 10: Biogénesis de los miRNAs y mecanismos de regulación de la expresión génica. Los miRNAs se generan a partir de un precursor (pre-miRNA), que a su vez se genera a partir de un transcrito primario (pri-miRNA). Los mecanismos utilizados por los miRNA para silenciar la expresión génica incluyen: inhibición al inicio de la traducción; represión traduccional pos-inicio. UTR: región no traducida; (RISC): complejo de silenciamiento inducido por RNA; AGO: proteína argonauta. HDL: lipoproteínas de alto peso molecular. Figura adaptada de Akhtar MM et al (285).

Los miRNAs pueden tener un efecto regulador negativo o positivo (299). En los seres humanos, por lo general, se unen mediante complementariedad parcial al extremo 3' de región no traducida (3'UTRs) de los mRNAs denominadas secuencias "semilla" o elementos de respuesta a miRNA, causando la represión de la traducción (300,301).

Un importante mecanismo de silenciamiento de miRNAs en los animales da lugar a la desestabilización del mRNA diana, lo que afecta a su nivel de transcripción (302,303). Un pequeño número de miRNAs también se unen directamente a las proteínas, como las proteínas de unión a RNA, inhibiendo la interacción con sus correspondientes RNAs diana (304). En algunos casos los miRNAs también regulan la expresión génica a nivel transcripcional, uniéndose directamente a elementos reguladores que en ciertos casos y tipos celulares pueden potenciar la traducción (305,306).

1.5.3 miRNAs circulantes (extracelulares)

Los miRNAs encontrados en los fluidos corporales extracelulares humanos, tales como suero, plasma, saliva y orina se conocen como miRNAs circulantes. Los miRNAs circulantes son resistentes a las RNAsas (307,308).

Dichos miRNAs se están considerando como biomarcadores potenciales, ya que se pueden recoger fácilmente mediante métodos no invasivos, son estables bajo diferentes condiciones de almacenamiento y experimentales, y se pueden detectar usando ensayos específicos, sensibles y reproducibles (309). Los estudios indican que los miRNAs intracelulares se liberan en la circulación y son protegidos de la degradación gracias a mecanismos de transporte extracelulares (310) (Figura 11):

- Microvesículas (MVs), exosomas (311) o cuerpos apoptóticos.
- Formación de complejos proteína-miRNA (312).
- Asociación con lipoproteínas de alta densidad (HDL) (313).

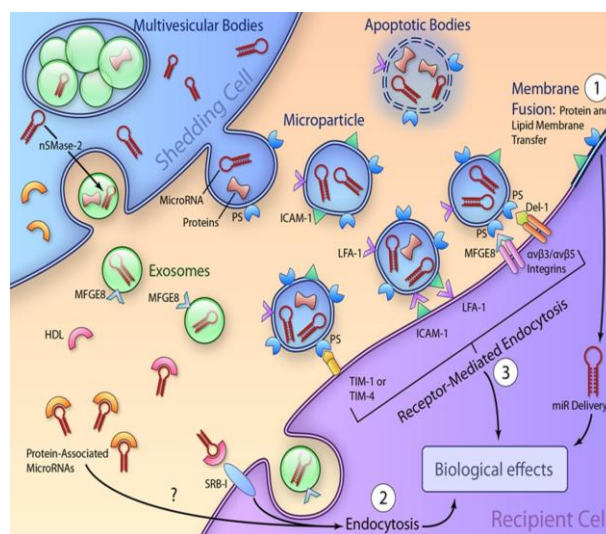


Figura 11: Mecanismos de transporte de los miRNAs al exterior celular, por los exosomas procedentes de los cuerpos multivesiculares (MVB.); proteína de unión a RNA fosfoproteína nucleolar B23 (NPM1); proteína Argonata 2 (Ago2). Una vez liberados, los exosomas, micropartículas, y cuerpos apoptóticos se dirigen a las células receptoras y son capaces de transferir información (microRNAs, proteínas, etc) por fusión con la membrana (1), mediante endocitosis (2), o endocitosis mediada por receptor (3). Adaptado de Loyer X et al (314).

1.5.4 miRNAs circulantes como biomarcadores

Los biomarcadores convencionales, por lo general, se han identificado como una extensión de vías de señalización conocidas, mientras que las nuevas tecnologías emergentes permiten el descubrimiento y caracterización imparcial de la regulación génica y la implicación de los procesamientos postranscripcionales del RNA asociados con predisposición a enfermedad (247,315). Por tanto, los miRNAs circulantes están teniendo interés como biomarcadores útiles para diferentes patologías como el cáncer y las enfermedades inmuno-inflamatorias (316-318). También han demostrado ser potentes mediadores en respuesta a señales metabólicas y estrés celular (319-321).

1.5.5 miRNAs circulantes y accidentes cerebrovasculares

Estudios recientes han demostrado que algunos miRNAs circulantes podrían llegar a ser potenciales biomarcadores para el accidente cerebrovascular. Así, los niveles de miR-145, son significativamente mayores en los pacientes con accidente cerebrovascular isquémico en comparación con los controles (322).

Dos estudios plantearon que el miR-210 podría ser un biomarcador prometedor para el diagnóstico y el pronóstico de los pacientes agudos cerebrales isquémicos (323,324). En 2009 se reportó en un análisis de 836 miRNAs circulantes mediante microarrays, en el que se estudiaron pacientes con accidente cerebrovascular de edades entre 18-49 años, 138 miRNAs sobreexpresados y 19 miRNAs infraexpresados, en tres subtipos de ictus (hemorragia cerebral de las grandes arterias, accidente cerebrovascular de pequeñas arterias; ictus cardioembólico). Los investigadores llegaron a la conclusión de que los patrones de expresión de miRNAs (miR-16, miR-126, miR-144, miR-21, miR-223 y miR-320a) podrían ser útiles para un pronóstico diferencial (325).

En estudios con animales, el miRNA circulante miR-290 se incrementa significativamente, mientras que let-7i se reduce en ratas con accidente cerebrovascular isquémico inducido por oclusión de la arteria cerebral media (326). Los niveles circulantes de miR-362-3p, miR-298, y miR-155, están sobreexpresados o infraexpresados más de dos veces después de un accidente cerebrovascular isquémico y hemorragia intracerebral en ratas, concomitantemente con los niveles

plasmáticos disminuidos de factor de crecimiento insulínico tipo1 (IGF1), una sustancia neuroprotectora (327).

El tratamiento con anti-miR-1, a las cuatro horas de un ictus isquémico, reduce significativamente el volumen del infarto cortical en ratas, mientras que anti-let-7F reduce significativamente tanto el número como el volumen de los infartos corticales y del cuerpo estriado, y conserva las funciones sensoriales y la integración neuronal interhemisférica. Estos resultados indican un enfoque terapéutico basado en la administración de miRNAs para la neuroprotección después del accidente cerebrovascular (328).

1.5.6 miRNAs en aterosclerosis carotidea

La implicación potencial de los microRNAs en aterosclerosis se ha informado en un nuevo término: "AteromiRs " (329). Diferentes estudios han demostrado la expresión de miRNAs en placas ateroscleróticas obtenidas de pacientes con estenosis carotídea durante el proceso de endarterectomía (330,331).

La comparación entre los miRNAs obtenidos en placas carotideas y los miRNAs presentes en arterias carótidas de personas sanas reveló un conjunto de miRNAs expresados diferencialmente y dentro de este conjunto se identificaron sobreexpresados los siguientes:miRNAs: miR-21, miR-34a, miR-146a, miR-146b-5p y miR-210 (332). Otro estudio mostró que cinco miRNAs (miR-100, miR-127, miR-145, miR-133a y miR-133b) fueron sobreexpresados después de un accidente cerebrovascular, en comparación con pacientes con placas pero sin accidente cerebrovascular. La predicción, por tanto, se asoció a placas inestables (331). Además, la expresión de miR-145 ha demostrado ser superior en las placas carotideas de los pacientes con HTA, que son más propensos a desarrollar ictus hemorrágico.

Los niveles circulantes elevados de miR-21 y miR-221, se mostraron mayoritariamente en pacientes con aterosclerosis carotidea y, además, miR-29b fue sobreexpresado en pacientes con DM2. Los tres miRNAs pueden ser útiles conjuntamente como posibles marcadores de aterosclerosis carotidea, reflejando la gravedad de la enfermedad (333,334).

1.5.7 Los miRNAs como biomarcadores en PE

Para identificar los miRNAs que se correlacionan con las complicaciones asociadas al embarazo en general, y a la PE en particular, los investigadores se centraron en la comparación de las concentraciones de miRNAs aisladas de placentas entre pacientes afectadas y pacientes sanas. Los estudios han demostrado que los miRNAs se producen en las células de la placenta humana y su expresión está regulada por factores ambientales como la hipoxia, vías de señalización, y modificaciones epigenéticas (335,336).

Los miRNAs candidatos con diferencias relacionadas con la enfermedad se pueden identificar en las placentas mediante microarrays de miRNA (337) o secuenciación de segunda generación (338) y luego son validados mediante RT-qPCR. La placenta humana es un órgano complejo compuesto por trofoblastos, células inmunes, células mesenquimales, ECs, y células madre hematopoyéticas (339). Como tal, la placenta tiene un transcriptoma particular, incluyendo muchas especies de mRNA y miRNAs no presentes en cualquier otro órgano humano.

Un estudio realizado en 24 mujeres embarazadas con PE ha demostrado una asociación entre los niveles elevados de sFlt-1 y miR-195-5p (340). En otro estudio realizado en muestras de plasma obtenidas de 9 mujeres gestantes con PE severa, se identificaron los siguientes 7 microRNAs expresados significativamente: miR-24, miR-26a, miR-103, miR-130b, miR-181a, miR-342-3p, miR-574-5p (341).

En un estudio realizado en 19 embarazadas con PE tardía se encontró que, en las muestras de plasma obtenidas, el miR-885-5p estaba expresado significativamente (FC= 5,0; $p < 0,05$), lo que fue confirmado en el posterior estudio de validación (FC= 4,5; $p < 0,05$).

El miR-885-5p se libera en la circulación principalmente en el interior de exosomas (342). Recientemente se realizó un estudio de muestras de plasma obtenidas de mujeres embarazadas con PE a las 16 y 28 semanas de gestación. La cohorte se componía de 19 mujeres que desarrollaron posteriormente PE (Casos) y 19 embarazos normotensos (Controles). Se encontró que el miR-206 mostraba niveles de variación ligeramente significativos (FC=1.4) en el plasma. Posteriormente este miRNA fue confirmado mediante análisis en muestras de placenta.

Muestras de placenta se obtuvieron de una cohorte independiente de 19 mujeres con PE, comparada con 19 mujeres con embarazos normotensos (343). El miR-885-5p extracelular circulante en plasma se ha mostrado aumentado en las 19 gestantes con PE en comparación con 14 mujeres embarazadas sanas. Además, se libera principalmente dentro de los exosomas (344).

Otro estudio de un grupo chino ha encontrado niveles elevados de miR-520g circulante en suero, obtenidos durante los controles rutinarios en el primer trimestre, de 19 gestantes que posteriormente fueron diagnosticadas con PE severa. Además se ha visto que el miR-520g podría desempeñar un papel en la remodelación defectuosa de la arteria espiral y, por lo tanto, contribuye a la fisiopatología de la PE mediante la supresión de la migración e invasión del trofoblasto por inhibición de la traducción de la metaloproteinasa de la matriz extracelular (MMP2) (345).

Otro estudio analizó el suero de mujeres embarazadas (12-14 semanas de gestación), que posteriormente desarrollaron PE severa en el tercer trimestre del embarazo (n=24), en comparación con mujeres presentando un embarazo normal (n = 24). MiR-1233 fue el más sobreexpresado (FC=5.4) en el suero de las mujeres que posteriormente desarrollaron PE severa (346).

Los miRNAs identificados mediante biopsia de la placenta presentan desventajas para el diagnóstico clínico rutinario, debido a la obtención invasiva de la muestra, mediante una metodología complicada. Además, no son necesariamente específicos, ya que el perfil de expresión diferencial de estos miRNAs puede reflejar los estados generales fisiológicos o patológicos relacionados tanto con el embarazo de la madre como con el mismo feto.

En la siguiente tabla se presentan los miRNAs más relevantes mencionados por varias publicaciones (346-349) (Tabla 8).

miRNA	Gen diana	Función
miR-17, miR-20^a, miR-20b	VEGA,EFNB2, EPHB4,MMP2, HIF1A	Angiogénesis, diferenciación de trofoblasto
miR-34a	PAI-1, Notch1, Jagged1	Inhibición de la invasión trofoblástica
miR-152	HLA-G	Induce a células NK
miR-155	Cyclin D1	Inhibe la proliferación celular
miR-195	Acvr2a,	Promueve la invasión trofoblástica
miR-210	ISCU, EFNA3, homeobox-A9	Inhibe la migración e invasión trofoblástica
miR-205	MED1	desconocido
miR-376c	ALK5	Induce la proliferación celular, la migración y la invasión
miR-378a-5p	Noda	Mejora la supervivencia celular, la proliferación, la migración y la invasión
miR-517b, miR- 519a	Desconocido	Inhibe la proliferación celular

Tabla 8: miRNAs relevantes descritos en la literatura médica, identificados mediante biopsia de la placenta (381-384).

OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

El objetivo principal del presente estudio ha sido la evaluación de los miRNAs circulantes como biomarcadores no-invasivos para el diagnóstico/pronóstico de dos patologías inflamatorias de origen vascular: preeclampsia e ictus.

2.2 Objetivos específicos

1. En preeclampsia se pretende analizar comparativamente, de manera no sesgada, el valor predictivo de los miRNAs presentes en suero materno extraído en el primer trimestre del embarazo de pacientes con preeclampsia y de embarazos no complicados utilizando arrays microfluídicos.

2. En accidente cerebrovascular se confirmará la asociación del miR-638 con patología aterosclerótica mediante análisis bioinformáticos y funcionales, y se examinará su potencial utilidad como biomarcador no-invasivo de placa aterosclerótica inestable para el diagnóstico/pronóstico del ictus isquémico.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. Material y métodos

3.1 Estudio 1: preeclampsia temprana (PEt)

3.1.1 Diseño y población de estudio

El primer estudio fué realizado con 75 muestras de suero facilitadas por el Dr. Eduard Gratacós, del Departamento Materno-Fetal del Hospital Clínico de Barcelona. Las muestras obtenidas forman parte de un estudio de cohorte prospectiva formado por 5.759 mujeres gestantes que controlaron su embarazo en dicha clínica y que acudieron a realizar los cribados correspondientes rutinarios para el primer trimestre entre los meses de Mayo de 2009 y Octubre de 2011.

Durante el progreso del embarazo, un grupo de mujeres cursaron con complicaciones en el embarazo, entre ellas la PE, objetivo del presente estudio. Se seleccionaron dos grupos: Casos (PEt) vs Controles (mujeres gestantes normotensas). A las embarazadas de los dos grupos se les realizó la ecografía del primer trimestre (semana 11-14 de gestación). Además, se determinaron los valores en suero materno (en el primer trimestre de gestación) de marcadores bioquímicos: PAAP-A, gonadotropina coriónica (β -HCG), CRP, péptido natriurético tipo B, ácido úrico, creatinina, cistatina C, colesterol y calcio, entre otras pruebas rutinarias.

3.1.2 Pacientes y recogida de muestras de sangre

El Departamento de Medicina Materno-fetal del Hospital Clínico nos proporcionó las muestras de suero congelado de pacientes embarazadas con PEt. La mayoría de dichas pacientes se han caracterizado previamente en cuanto al análisis de los factores de riesgo más comunes (edad, raza, altura, peso, tabaquismo, historia obstétrica,...) y otros parámetros relevantes (diabetes, hipertensión crónica,...). En todos los casos se les practicó también una ecografía Doppler AUt.

3.1.3 Criterios de inclusión

Con el objetivo de trabajar con una muestra poblacional lo más homogénea posible y precisar las variables que pudieran influir en los resultados, se seleccionaron los pacientes que cumplieran con los criterios de inclusión relacionados a continuación. Dichos criterios de inclusión se ha definido, de acuerdo con la Sociedad Internacional para el estudio de la Hipertensión en el Embarazo, como una presión sanguínea en reposo de $> 140/90$ mmHg en dos periodos separados al menos por 4 h, y la presencia de proteinuria ($> 0,3$ g/dl), posterior a las 20 semanas de embarazo en mujeres previamente normotensas (351).

3.1.4 Criterios de exclusión

Los criterios de exclusión en ambos grupos fueron embarazos con aneuploidías, anomalías fetales importantes que condujeron a la terminación del embarazo, aborto espontáneo o muerte fetal antes de las 24 semanas de gestación. La edad gestacional en todos los embarazos se calculó sobre la base de la longitud de la corona-nalga en el primer trimestre mediante ultrasonido (352). Se utilizaron registros médicos para obtener información sobre factores de riesgo, antecedentes de embarazo y resultados perinatales. También se registraron los datos de la presión arterial media (MAP) y el índice de pulsatilidad Doppler (IP) de la resistencia de la arteria uterina media (UtA), medidos en el cribado del primer trimestre, y se definieron los recién nacidos pequeños para la edad gestacional (SGA) con peso al nacer por debajo del 10º percentil.

3.2 Estudio 2: Aterosclerosis carotídea avanzada.

3.2.1 Población de Estudio

Las muestras de suero fueron facilitadas por el Dr. Jurek Krupinski y su grupo de la Unidad de Patología cerebrovascular del HUMT.

En este estudio piloto se reunieron prospectivamente muestras de suero de pacientes de raza blanca que sufrieron estenosis carotídea sintomática de alto grado y que fueron intervenidos mediante endarterectomía de la arteria carótida (CEA) (n=31) debido a una estenosis sintomática (ataque isquémico transitorio (TIA), amaurosis

fugaz o ictus ipsilateral) (n=22) o asintomática (ausencia de eventos cerebrovasculares) (n=9).

Estos pacientes mostraban un alto grado de estenosis carotídea ($\geq 60\%$ diagnosticado mediante tecnología de imágenes EcoDoppler vascular y confirmado por angiografía por resonancia magnética (angio-RM) o angiografía por tomografía computarizada (angio-TAC), de acuerdo con los criterios NASCET) (353).

A todos los pacientes sintomáticos se les practicó la CEA en un plazo de tres semanas desde el evento sintomático. De acuerdo con criterios morfológicos e histológicos, todas las placas extraídas mediante la CEA mostraron características de placas inestables (capa fibrosa fina, actividad inflamatoria, núcleo lipídico grande, ulceración visible, hemorragia intraplaca y/o ruptura).

Las muestras del grupo control (n= 36) pertenecían a pacientes emparejados por edad y sexo, que visitaron la unidad de emergencia del Hospital de Terrassa y no presentaban cuadros clínicos de accidente cerebrovascular o aterosclerosis carotídea (todos los pacientes presentaron $<30\%$ de estenosis carotídea, identificados mediante EcoDoppler). Todos aquellos pacientes que presentaron un historial conocido de trombosis arterial aguda o tromboembolismo venoso, infecciones activas, insuficiencia renal, enfermedad hepática, neoplasias, traumas o fueron sometidos a cirugía reciente fueron excluidos del estudio.

3.2.2 Seguimiento de aterosclerosis carotídea avanzada

El estudio de seguimiento fue realizado mediante muestras obtenidas de 9 pacientes antes de la intervención de CEA, y a los 5 años de la intervención.

3.2.3 Herramientas de predicción bioinformática de genes diana de hsa-miR-638, asociados con accidente cerebrovascular.

Se realizó un análisis bioinformático para predecir los genes potencialmente regulados por hsa-miR-638, utilizando diferentes algoritmos disponibles públicamente (354):

- miRWALK (<http://www.umm.uniheidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/index.html>).
- DIANA MicroT v5.0 (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT>).
- miRDB (<http://mirdb.org/miRDB>).
- miRanda-mirSVR (<http://www.microna.org>).
- TargetScan 6.2 (<http://www.targetscan.org>).
- TargetMiner (http://www.isical.ac.in/~bioinfo_miu/targetminer20.htm).
- miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/index.php>).

Finalmente, empleamos el programa FatiGO (<http://v4.babelomics.org/>), una herramienta web para encontrar asociaciones significativas de términos de ontología génica con grupos de genes, para desvelar posibles vías, procesos y funciones para analizar la implicación de miR-638 con el accidente cerebrovascular (355).

3.2.4 Recogida de muestras de sangre

Las fracciones de suero de pacientes de CEA y de controles se obtuvieron de acuerdo con protocolos estándar. Brevemente, se recogieron muestras de sangre en tubos que contienen EDTA justo antes de la CEA y, selectivamente en 9 pacientes adicionales, 5 años después de la CEA. Los pacientes control se les realizó la extracción de sangre en el momento del ingreso hospitalario. Todas las muestras de los individuos pacientes y controles fueron caracterizadas previamente en cuanto al análisis de los factores de riesgo, de acuerdo con el modelo Europeo Systematic Coronary Risk Evaluation (SCORE) y según la tabla de predicción calibrada para la población española (356) y otros parámetros analíticos relevantes (colesterol, fibrinógeno, recuento leucocitario, CRP).

3.3 Aislamiento de RNA total de suero

Todas las extracciones del RNA total fueron realizadas mediante el kit comercial miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands). Se siguieron las instrucciones del fabricante con alguna modificación, según la naturaleza de la muestra.

Para las muestras de suero humano, tanto para la identificación de miRNAs mediante la técnica OpenArray como para la validación individual de miRNAs utilizando ensayos

de TaqMan MicroRNA en el caso de PE, así como para el análisis de miR-638 en el suero de pacientes con aterosclerosis carotídea, y en sobrenadantes de cultivos primarios se realizó una centrifugación a 1.000 xg a 4°C durante 5 min para sedimentar los fragmentos y restos celulares. Las extracciones se iniciaron partiendo de 200 µl de muestra.

Para las muestras procedentes de cultivo primario de células endoteliales de la vena de cordón umbilical humano (HUVEC) con número aproximadamente de 7×10^5 células por muestra, se añaden 700 µl de QIAzol al *pellet*, 140 µl de cloroformo libre de RNasas y se precipita con 525 µl de Etanol absoluto libre de RNasa.

3.3.1 Cel-miR-54 (spiked-in) como normalizador

En el proceso de extracción de las muestras utilizadas para la validación individual se utilizó el miRNA sintético de *C.Elegans* cel-miR-54 (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA), que se introdujo como control al inicio del proceso de aislamiento del RNA (spiked-in) en la fase de extracción orgánica, para evitar su degradación. Dicho cel-miR-54 se emplea como referencia interna para normalizar las variaciones técnicas entre muestras en nuestro estudio. La cantidad introducida fue 5 µl en cada muestra, a una concentración de 5 fmol (307).

3.3.2 Cuantificación y determinación de la pureza por espectrofotometría.

Después de seguir las instrucciones del fabricante en ambas extracciones, el RNA total fue diluido en 50 µl de H₂O libre de nucleasas y guardado a - 80 °C. La cuantificación y determinación de la pureza del RNA total extraído de muestras procedentes de HUVEC fue realizado mediante espectrofotometría "Espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000" (NanoDrop Technologies, Wilmington, EE.UU.).

3.4 Caracterización del perfil global de expresión de microRNAs circulantes en suero humano mediante la técnica TaqMan®OpenArray®Human MicroRNA.

La plataforma TaqMan OpenArray Human MicroRNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) permite la amplificación masiva de miRNAs combinando la técnica de TaqMan® y la nanofluídica en un soporte o array dividido en 48 sub-arrays compuestos por 64 orificios. La innovadora técnica de paneles de nanolitros (nL) constituye una plataforma flexible, adaptable y se puede diseñar para realizar de forma simultánea 3.072 ensayos por muestra, hasta 16 ensayos para 144 muestras, según el objetivo. La capacidad de cuantificación de esta técnica, equivalente a 8 placas de 384 pocillos, en un corto período de tiempo de hasta 8 horas, la convierte en una tecnología de alto rendimiento, sensibilidad y especificidad, utilizando volúmenes de 33 nL por reacción. Aprovechando del amplio rango de miRNAs (Sanger miRBase v14) disponibles en el panel, permite una identificación global y un potente análisis cuantitativo de la expresión de 754 miRNAs (Figura 12).

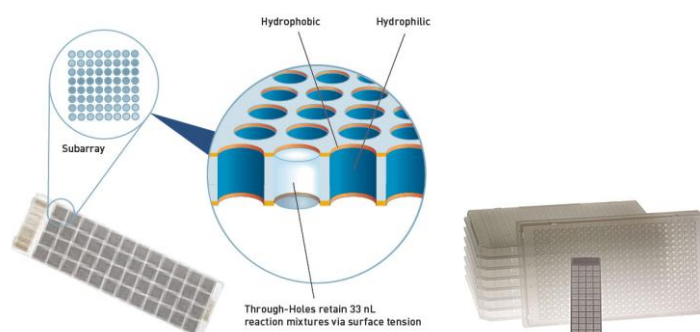


Figura 12: La tecnología OpenArray™ utiliza un chip de nanofluídica con 3.072 orificios. Cada placa contiene 48 subarrays, cada uno con 64 orificios. Cada orificio tiene un diámetro de 300 μm y una profundidad de 300 μm y se trata con recubrimientos hidrofílicos e hidrofóbicos. Los reactivos se mantienen en los orificios a través de la tensión superficial. Una placa OpenArray puede contener tantas muestras como las incluidas en ocho placas tradicionales de 384 pocillos.

En nuestro estudio se utilizaron 3 paneles, cada panel se dividió en 3 arrays, y en cada array se incluyó un pool de muestras (Figura 13). De esta manera, en cada panel se analizaron 2 pools de casos y uno de control (Paneles 1 y 3); o 2 pools controles y uno de casos (Panel 2). Casos = 5 pools, Controles = 4 pools.

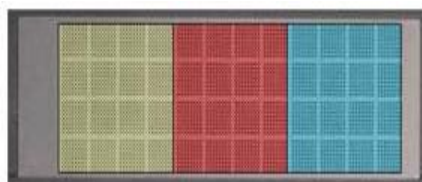


Figura 13: Distribución de los pools de muestras en las placas nanofluídicas. Cada color corresponde a un pool.

3.4.1 Transcripción reversa (RT) y Pre-amplificación de cDNA (pre-amp)

Se utilizó el kit Megaplex™ RT Primers, que contiene dos conjuntos de primers: Human Pool A v2.1 y Human Pool B v3.0 (Applied Biosystems). Siguiendo las instrucciones del fabricante, se utilizó una cantidad de 3 µl de RNA total para cada pool A y B. Debido a la baja cantidad de RNA presente en suero, para incrementar el número de copias de cDNA a fin de poder detectar los miRNAs analizados, se realizó una etapa adicional de pre-amplificación del producto de RT para cada pool A y B, utilizando TaqMan PreAmp Master Mix. Una vez acabada la pre-amplificación, los productos fueron diluidos (1:40) en 0,1x TE Buffer pH 8,0.

3.4.1.1 Condiciones de RT

En tubos de 0.2 ml, se preparó para cada muestra 2 mezclas RT: una para el pool A y otra para el pool B.

Componentes	Mix (1x) 7,5 ul/reacción
Nuclease-free water	0.36
10X RT Buffer	0.75
MultiScribe RT 50 U/µL	1.50
RNase Inhibitor, 20 U/µL	0.09
100mM dNTPs (with dTTP)	0.15
Megaplex RT Primer(10X) Pool A o Pool B	0.75
MgCl ₂ (25 mM)	0.90
Volumen final	4,5

Tabla 9: Componentes de la mezcla de reacción RT.

Se utilizó la placa de 96 pocillos MicroAmp® Reaction Plate 96 well (Applied Biosystems) en un Termociclador GeneAMP 9700 (Applied Biosystems) y las siguientes condiciones de reacción:

Ciclo	Temp	Tiempo
40 ciclos	16 °C	2 min
	42 °C	1 min
	50 °C	1 seg
Hold	85 °C	5 min
Hold	4 °C	∞

Tabla10: Condiciones programadas en el termociclador para la RT

3.4.1.2 Condiciones de Pre-amplificación

Composición	Master mix (1x) volumen 10 ul/reacción
TaqMan PreAmp Master Mix (2x)	20 ul
Megaplex Preamp Primers (10x) pool A o B	4 ul
Agua libre de nucleasas	8.5 ul
cDNA	7.5 ul

Tabla 11: Componentes de la reacciones de pre-amplificación

Ciclos	Temp	Tiempo
Hold	95°C	10 min
Hold	55 °C	2 min
Hold	72 °C	2min
16 ciclos	95 °C	15 seg
	60 °C	4 min
Hold	99,9 °C	10 min
Hold	4 °C	∞

Tabla 12: Condiciones programadas en el termociclador para la reacción de pre-amplificación

El producto pre-amplificado se diluyó en proporción 1:40 en una solución tampón de 0.1x TE.

3.4.2 qPCR TaqMan® OpenArray® MicroRNA Panels

En placa de 96 pocillos se añadió en uno de los pocillos 22,5 ul de TaqMan® OpenArray® Real-Time PCR Master Mix y 22,5 ul de cDNA pre-amplificado de Pool A y, en otro pocillo, 22,5 ul de TaqMan® OpenArray® Real-Time PCR Master Mix y 22,5 ul de cDNA pre-amplificado de Pool B. Para la amplificación y posterior análisis se prepararon las reacciones incluyendo TaqMan OpenArray Real-Time PCR Master Mix, y se cargó la mezcla en una placa de 384 pocillos. Un robot depositó las reacciones en los orificios del panel, colocando 33nL/orificio. Una vez acabado el proceso el panel se selló en una cámara de plástico y se introdujo en el termociclador. Esta avanzada técnica fue procesada en el servicio técnico de genómica de la Universidad Pompeu Fabra.

3.5 Análisis de expresión

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el programa DataAssist™ Software 3.1V (Applied Biosystems). El Ct (threshold cycle) de cada miRNA se determinó según el número de ciclos en los que la emisión de la intensidad del marcador fluorescente FAM se eleva por encima del umbral mínimo de detección, relativo al ruido de fondo asignado previamente, en la fase exponencial de la amplificación. Los valores de Ct obtenidos son inversamente proporcionales a la expresión de los mi-RNAs.

3.6 Validación individual de miRNAs expresados diferencialmente en muestras de suero humano mediante RT-qPCR TaqMan.

➤ **Casos:** 31 Muestras de suero de mujeres con embarazo complicado con PE temprana.

- **Controles:** 44 Muestras de suero de mujeres con embarazo no complicado.

Los resultados de expresión diferencial de los posibles 8 miRNA candidatos seleccionados anteriormente (Tabla 13) mediante la técnica OpenArray se validaron de manera individual mediante el uso de la plataforma 7900HT Fast Real-Time PCR empleando la tecnología TaqMan (Applied BioSystems), que permite la detección cuantitativa de secuencias de miRNAs específicos usando un análisis de fluorescencia a tiempo real durante la PCR (Figura 14).

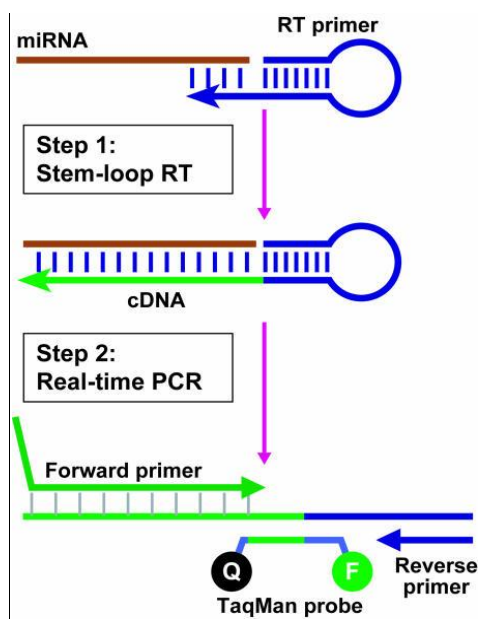


Figura 14: Representación esquemática de un ensayo de RT-PCR Taqman®, que utiliza sondas específicas con un fluorocromo en cada extremo (Reporter y Quencher). Cuando la Taq empieza a amplificar a partir del primer acoplado al cDNA diana, desplaza el extremo 5' de la sonda que es degradado por la actividad exonucleasa 5' → 3' de la Taq. Este proceso libera el fluoróforo al medio separándolo del quencher, lo que ocasiona un aumento irreversible de la fluorescencia detectada.

3.6.1 Aislamiento de RNA total de suero

Como se mencionó anteriormente, las extracciones del RNA total fueron realizadas mediante el kit comercial miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands). Se siguieron las instrucciones del fabricante con alguna modificación, según la naturaleza de la muestra.

En estas muestras se incluyó en cada extracción, en la fase orgánica, el normalizador cel-miR-54.

microRNA	Secuencia	Referencia ID	Función
has-miR-221	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC	000524	Target
has-miR-126*	CAUUAUUACUUUUGGUACGCG	000451	Target
has-miR-942	UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA	002187	Target
has-miR-125b	UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA	000449	Target
has-miR-143	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUCA	002249	Target
has-miR-127	UCGGAUCCGUCUGAGCUUGGCU	000452	Target
has-miR-192	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC	000491	Target
has-miR-484	UCAGGCUCAGUCCCCUCCCGAU	001821	Control endógeno
cel-mir-54	UACCCGUAAUCUUCAUAAUCCGAG	001361	Control spiked-in

Tabla 13: Secuencias de los cebadores (stem-loop) y sonda TaqMan utilizados en RT-qPCR.

3.6.2 Transcripción reversa TaqMan (RT-TaqMan)

La transcripción reversa se llevó a cabo mediante el TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Este kit contiene los cebadores específicos (miRNA-specific stem-loop primers, Applied BioSystems) para cada miRNA maduro. Dichos cebadores contienen un bucle (*stem-loop*) altamente específico que facilita la unión selectiva a los miRNAs maduros y, por lo tanto, evita la transcripción reversa de los pre-miRNAs.

Al no poder cuantificar las concentraciones de RNA total obtenidas en las muestras de suero se estableció el criterio de usar un volumen fijo de RNA total (5 µl) para cada reacción de RT siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones en cuanto al volumen de productos y volúmenes finales de mezclas adaptados a una escala pequeña. Cada reacción RT contiene 5 µl de master mix, y 5 µl de RNA total.

3.6.2.1 Condiciones de RT

Composición	Mix x 1/ 10 ul por reacción
Agua libre de nucleasas	1.10
10X RT Buffer	1
MultiScribe RT 50 U/ μ L	0.67
Inhibidor RNase, 20 U/ μ L	0.13
100mM dNTPs (with dTTP)	0.10
Primer mi-RNA específico	2
RNA total	5

Tabla 14: Componentes de la mezcla de reacción.

	Hold	Hold	Hold	Hold
Temp	16 °C	42 °C	85 °C	4 °C
Tiempo	30 min	30 min	5 min	∞

Tabla 15: Condiciones programadas en el termociclador para la transcripción reversa.

3.6.3 Pre-amplificación (Pre-amp)

Para aumentar proporcionalmente el número de copias del cDNA original se aplicó un proceso de pre-amplificación utilizando TaqMan Universal PCR Master Mix with no AmpErase UNG (Applied Biosystems). Cada 10 μ l de reacción de pre-amplificación contienen 7.5 μ l de Preamp master mix, y 2.5 μ l de producto RT (cDNA) no diluido. Para la pre-amplificación se utilizaron las mismas sondas específicas para cada mi-RNA, diluidas a una proporción 1:99 en solución TE.

3.6.3.1 Condiciones de Pre-amp

Composición	Mix x 10 ul por reacción
TaqMan PreAmp Master Mix (2x)	5 ul
0.2x TaqMan miRNA assay (diluido en TE; 1:99)	2.5 ul
2.5 µl de producto RT no diluido	2.5 ul

Tabla 16: Componentes de la reacción de Pre-amp.

	Ciclos (10x)		
	Hold	Denature	Anneal / Extend
Temp	95 °C	95 °C	60 °C
Tiempo	10 min	15 sec	4 min

Tabla 17: Condiciones programadas en el termocilador para la pre-amplificación.

Una vez acabado el proceso, el producto pre-amplificado se diluyó en agua a una proporción 1:5.

3.6.4 Amplificación qPCR-TaqMan

La cuantificación relativa de las muestras se realizó por triplicado para cada miRNA, en un volumen final de 10 µl para cada reacción, en placas de 384 pocillos (Applied Biosystems). Se utilizaron 7 placas, y en cada placa se cuantificaron 13 muestras divididas entre controles y casos.

Componentes	Master mix (1x) 10 ul/ reacción
TaqMan MicroRNA Assay (20X)	0.5 ul
TaqMan Universal PCR Master Mix with no AmpErase UNG	5 ul
Agua libre de nucleasas	2
Producto RT (cDNA diluido 1:5)	2.5 ul

Tabla 18: Componentes de la mezcla de reacción.

3.6.4.1 Condiciones de Amplificación

	Hold	Hold	40 Ciclos	
Temp	50 C	95 C	95 C	60 C
Tiempo	2 min	10 min	15 seg	1 min

Tabla 19: Condiciones programadas en el termociclador para la amplificación (Termociclador 7900HT Fast Real-Time PCR;Applied Biosystems).



Figura 15: Los instrumentos que componen la plataforma 7900HT Fast Real-Time PCR.

3.7 Análisis de expresión

Una vez finalizada la PCR, se analizaron los datos mediante el programa SDS 2.4 (Applied Biosystems). Los ajustes del Ciclo Umbral (Threshold Cycle o Ct), para cada muestra se realizaron en modo automático. La cuantificación relativa de los niveles de miRNA fue calculada usando la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (357):

- Primero se normalizaron los valores Ct entre placas.
- Luego se calculó la fórmula ΔCt considerando el cel-miR-54 (spiked-in) como normalizador.

$$\Delta Ct = Ct \text{ miRNA} - Ct \text{ cel-miR-54.}$$

$$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct \text{ (Caso)} - \Delta Ct \text{ (control)})$$

3.8 Análisis estadísticos

Para el estudio de PE, las comparaciones de los parámetros clínico-patológicos entre los grupos de casos y controles se analizaron mediante el test ANOVA one-way para los datos numéricos, y para los datos categóricos se utilizó el test Chi-Square. Por otro lado, las comparaciones caso-control en la etapa de validación se analizaron utilizando el U-test de Mann-Whitney para datos no apareados.

Las correlaciones de los miRNAs con las características clínicas de los pacientes de PE se analizaron mediante los tests Spearman's Rank correlation o Point-Biserial correlation.

Los parámetros clínico-patológicos del grupo CEA y del grupo control (no CEA) se describieron como promedio y desviación estandar para las variables continuas, y como frecuencias para las variables categóricas, y se compararon mediante el T-test para muestras independientes o el test de Chi-cuadrado, respectivamente.

La distribución normal de miR-638 en suero fue evaluada mediante el Q-Q plot y el test de Shapiro-Wilks. El test de Wilcoxon-Mann-Whitney o el T-test, dependiendo de la normalidad de la distribución, se aplicaron para inferir las diferencias significativas entre los grupos CEA y control, o entre el grupo de pacientes CEA a los 0 y 5 años después de la intervención.

La relación entre miR-638 con los factores de riesgo vascular y los tratamientos se estimó mediante los tests Spearman's Rank correlation o Point-Biserial correlation. La capacidad discriminadora de los niveles de miR-638 sérico entre el grupo control y el grupo de pacientes CEA, o los subgrupos de pacientes CEA con diferentes etiologías; o el grupo de pacientes CEA entre los 0 y los 5 años después de la intervención se evaluaron mediante curvas ROC.

Finalmente, para analizar la asociación entre placa aterosclerótica de alto riesgo (CEA) y niveles séricos de miR-638 se estimó un modelo de regresión logística. CEA / control se utilizó como variable dependiente y se calcularon las "odds ratio" (OR) crudas y ajustadas. Las variables de ajuste incluyeron factores clásicos de riesgo vascular (hipertensión, CAD, fibrinógeno y colesterol) con una asociación estadísticamente significativa entre individuos CEA y control.

Todos los datos estadísticos se analizaron mediante el programa SPSS versión 15.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Se consideraron estadísticamente significativos aquellos resultados que tuvieran valores de $p < 0.05$.

3.9 Cultivo primario celular

El cultivo primario de HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells; Advantcell, Barcelona, España) se realizó en frascos de cultivo Corning T75 rectangulares (Cultek) utilizando el kit de cultivo "EGM bullet kit" (Lonza Ibérica, España) (500 ml), que contiene el medio EGM (Endothelial Growth Medium), 10 ml FBS (suero fetal bovino), 0.5 ml rhEGF (human Epidermal Growth Factor), 0.5 ml hidrocortisona, 0.5 ml GA-1000 (Gentamicin/Amphotericin-B), y 2 ml BBE (Bovine Brain Extract). Dicho medio se suplementó con 50 ml de FBS (Linus), 5 ml L-Glutamina 2mM (Invitrogen) y 5 ml de Penicillin 100u/ml / Streptomycin 100 µg/ml (Invitrogen).

Para incrementar la adhesión de las ECs, las superficies de crecimiento se cubrieron con Gelatina al 2% durante una hora y media. Para realizar los pases, las células fueron levantadas mediante la utilización de Tripsina al 0,05% durante un minuto. Una vez contadas las células vivas por microscopia mediante la cámara de Neubauer, las células se cultivaron en placas dependiendo del estudio a realizar. Las réplicas siempre fueron por triplicado para cada condición. La incubación de los cultivos en todo momento se realizó mediante estufa a 37° C con una atmósfera húmeda al 5% de

CO₂, reemplazando el medio de cultivo cada dos días hasta alcanzar una confluencia del 80-95%.

3.9.1 Estimulación de HUVEC con estímulos pro-inflamatorios

Para estudiar *in vitro* la respuesta inflamatoria en ECs y su posible implicación en la expresión de miR-638, las células HUVEC se cultivaron en placas de 6 pocillos por triplicado, con el medio de cultivo “EGM bullet kit” + 10% FCS, a razón de 4×10^5 células/pocillo. Al alcanzar una confluencia del 70%, las células se estimularon con las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α (100 U/ml) + IFN- γ (1000 U/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) o se dejaron sin estimular. A las 48 h de estimulación se recogieron tanto los sobrenadantes como las células y se guardaron a -80 °C.

RESULTADOS

4. Resultados

Los resultados de la presente Tesis Doctoral fueron estructurados en dos estudios:

- El primero, sobre la utilidad de los miRNAs circulantes como biomarcadores para la predicción precoz en fase asintomática para PE temprana. El artículo correspondiente fue publicado en la revista *Scientific Reports*, con factor de impacto de 5.228: ***“Usefulness of circulating microRNAs for the prediction of early preeclampsia at first-trimester of pregnancy”*** (Anexo1).

- El segundo, sobre el potencial diagnóstico / pronóstico del miR-638 como biomarcador en el ictus isquémico. El artículo ha sido enviado para su publicación a la revista *Journal of Neurosurgery* con factor de impacto de 4.059 y actualmente se encuentra en fase de revisión. ***“Low levels of serum miR-638 are associated with atherosclerotic plaque vulnerability in patients with high-grade carotid stenosis”*** (Anexo 2)

4.1 Estudio 1: Potencial de los miRNAs circulantes como biomarcadores de preeclampsia temprana.

4.1.1 Estudio descriptivo de preeclampsia temprana (PEt):

Este estudio analítico retrospectivo de casos y controles se realizó en el Departamento de Medicina Materno-Fetal (Hospital Clínico de Barcelona) y en el Laboratorio de Genética Molecular (IDIBELL). Las muestras de suero materno se obtuvieron de una cohorte prospectiva compuesta por 5.759 embarazos únicos no seleccionados en los que se realizaron los controles rutinarios para el primer trimestre del embarazo (11+0-13+6 semanas de gestación) entre mayo de 2009 y octubre de 2011.

- **Grupo Casos**: formado por 31 embarazadas que desarrollaron PE y requirieron parto antes de las 34 semanas de gestación (definida como PE temprana).
- **Grupo Control**: formado por 44 controles embarazadas en el mismo período de estudio que presentaron embarazos normotensos sin complicaciones por proteinuria.

En la tabla (20) se describen las características basales de todas las gestantes que participaron en el estudio. Todos los valores que mostraron $p < 0,005$, fueron considerados estadísticamente significativos.

4.1.2 Caracterización y descripción de los grupos del estudio

4.1.2.1 Edad

Las 31 pacientes presentaban una media de edad de 32.6 ± 6.6 años, y las 44 embarazadas controles tenían una media de edad de 32.3 ± 5.6 .

4.1.2.2 Raza y etnia

Se observó que la raza no caucásica y, en particular, la etnia sudamericana, representaba el 22% del total de las pacientes con PE ($p < 0.001$).

Característica	n	Grupo PE	n	Grupo Control	p Value
Edad materna al inicio de la gestación (años)	31	32.6 ± 6.6	44	32.3 ± 5.6	0.822
Raza (%) Caucásica	16	52 %	33	81 %	
Total No Caucásicas:	15	48.4%	8	18.2 %	<0.001
<i>Sudamericana</i>	7	22 %	6	14 %	
<i>Magrebí</i>	3	10 %	0	0 %	
<i>Asiática</i>	4	13 %	1	2.5 %	
<i>Africana</i>	1	3 %	1	2.5 %	
Índice masa corporal (kg/m ²)	31	24.5 ± 4.4	44	22.8 ± 3.2	0.060
Fumadoras (%)	31	2 (6.5%)	44	5 (11.4%)	0.384
Nuliparidad (%)	31	18 (58.1%)	44	24 (54.5%)	0.474

Tabla 20: Características generales de los grupos PE y Control. Los datos se presentan en (\pm SD) o n (%). Texto en negrita: valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

4.1.2.3 Índice de Masa Corporal (IMC)

El IMC es un factor de alta importancia relacionado con la PE, que se ha informado en varios estudios. El IMC medio fue de 24.5 ± 4.4 para los casos, y 22.8 ± 3.2 para los controles ($p < 0.060$).

4.1.3 Antecedentes epidemiológicos

Al estudiar los antecedentes y las complicaciones clínicas previas, observamos que el 41.9% de las actuales pacientes había sufrido anteriormente PE ($p < 0.001$). También se encontraron valores significativos ($p < 0.002$) en cuanto a pérdidas de fetos o neonatales durante las anteriores gestaciones en dicho grupo.

Característica	N	Grupo PE	n	Grupo Control	P value
Muerte fetal	31	10 (32.3%)	42	2 (4.8%)	<0.002
PE previa	31	13 (41.9%)	42	0 (0.0%)	<0.001
Hipertensión Crónica	31	9 (29%)	42	2 (4.55)	<0.004
Diabetes pre-gestacional	31	2 (6%)	42	2 (5%)	0.755
Enfermedades autoinmunes	31	2 (6,5%)	42	1 (2.4%)	0.390
Nefropatía	31	3 (9.7%)	42	0 (0.0%)	<0.041

Tabla 21: Antecedentes epidemiológicos de las pacientes objeto de estudio. Los datos se presentan en (\pm SD) o n (%). Texto en negrita: valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

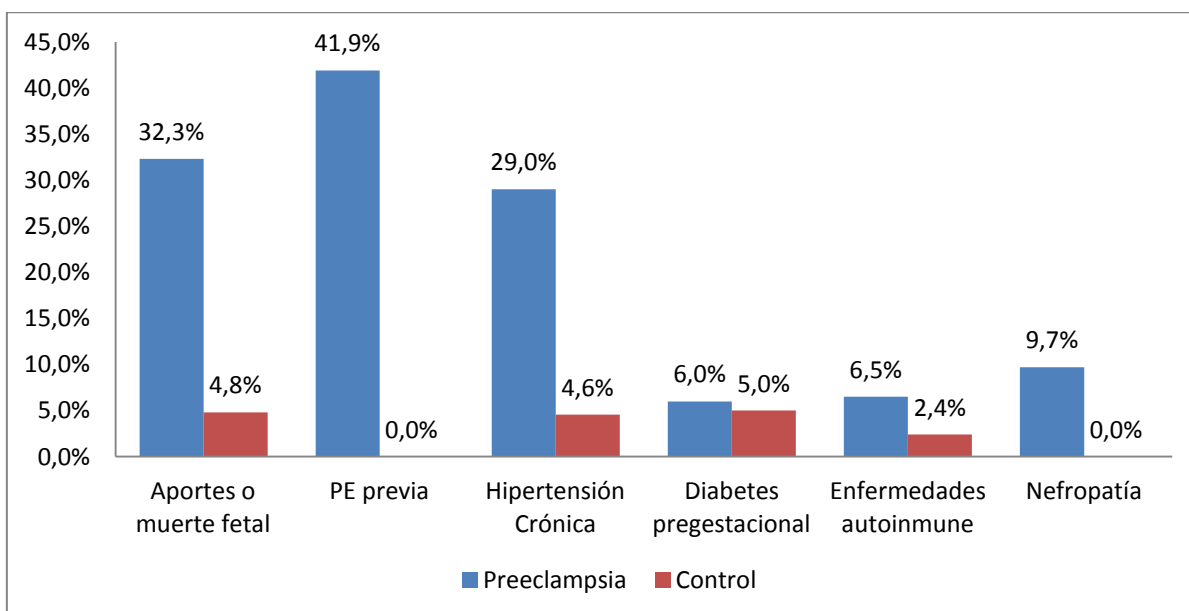


Figura 16: Distribución de las pacientes objeto de estudio según los antecedentes patológicos maternos

4.1.4 Variables clínicas materno-fetales

Los parámetros clínicos correspondientes a las gestaciones están representados en la siguiente tabla:

Característica	<i>n</i>	Grupo PE	<i>n</i>	Grupo Control	<i>P</i> value
MAP (mmHg, mediana (RIQ))	31	90 (79-98)	37	71 (69-77)	<0.001
Doppler AUt	31	2.4 (1.8-2.9)	37	1.6 (1.0-2.4)	<0.001
Edad gestacional al momento del parto. (semanas)	31	31.4 ± 2.5	44	37.5 ± 6.3	<0.001
Cesárea	30	25 (80.6%)	42	7 (15.9%)	<0.001
Peso de nacimiento (gr)	30	1374 ± 512	42	3232 ± 726	<0.001
Feto pequeño para edad gestacional	31	24 (77.4%)	44	4 (9.1%)	<0.001
Muerte fetal o neonatal	31	4 (12.9%)	44	0 (0.0%)	<0.026
Restricción del crecimiento intrauterino	31	20 (64.5%)	44	0 (0.0%)	<0.001
HELLP	31	3 (9,7%)	44	0 (0.0%)	<0.041

Tabla 22: Variables clínicas, maternas y neonatales de las pacientes objeto de estudio. Los datos se presentan en (\pm SD) o n (%). Texto en negrita: valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

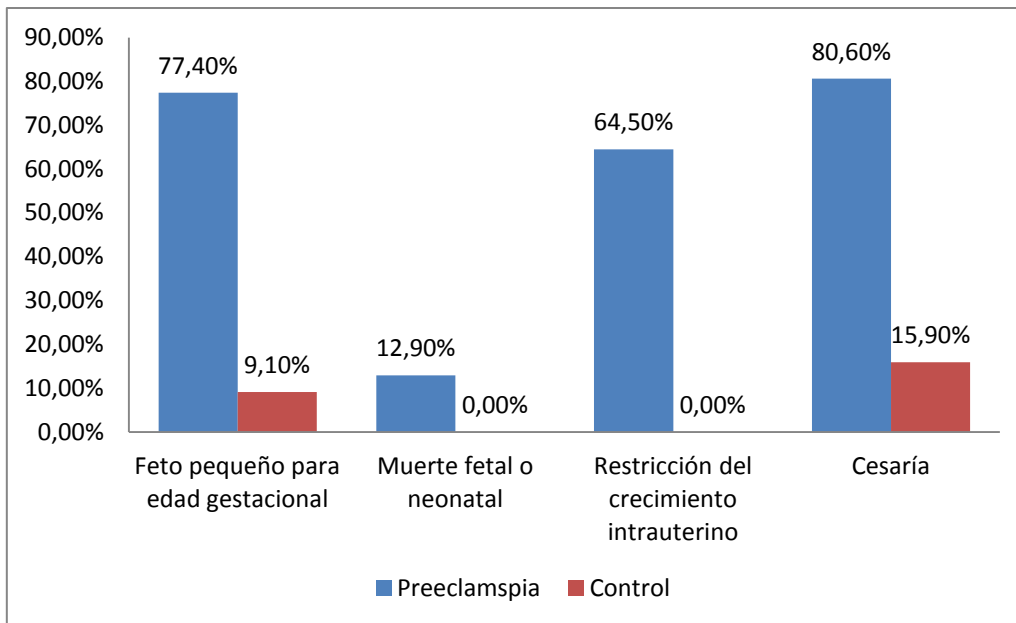


Figura 17: Distribución de las pacientes objeto de estudio según las complicaciones feto-neonatales

La media de edad gestacional en el momento del parto fue de $31,4 \pm 2,5$ en las pacientes PE y de $37,5 \pm 6,3$ en los embarazos no complicados ($p < 0.001$). Se registraron 3 casos de síndrome HELLP entre las pacientes con PE (9,68 %). También mostraron diferencias significativas los valores obtenidos por Doppler AU: 2,4 (1,8-2,9) para en grupo PE y 1,6 (1,0-2,4) para el grupo control ($p < 0.001$).

Entre las pacientes PE, hubo 4 casos de muerte fetal o neonatal (12,9 %) ($p < 0.026$). En cuanto a las variables de evaluación del estado de feto, como la restricción del crecimiento intrauterino, feto pequeño para edad gestacional y peso de nacimiento, los valores fueron significativos, como se esperaba, en el grupo PE ($p < 0.001$).

La intervención quirúrgica (cesárea) fue mayoritaria para las pacientes con PE, ya que el 80,6% del total del grupo fue sometido a esta cirugía. Por el contrario, en el grupo control sólo el 15,9% fueron intervenidas ($p < 0.001$).

4.1.5 Perfilado global diferencial de miRNAs circulantes en pacientes PE (primer trimestre) versus embarazos no complicados mediante la técnica OpenArray

Para determinar e identificar de forma global los miRNAs circulantes diferencialmente expresados entre pacientes PE y mujeres con embarazos no complicados, la cohorte de estudio descrita en el apartado de “Materiales y Métodos” se distribuyó en un total de 9 pools de muestras de suero de 75 gestantes (grupo “Control”; n= 44, repartidas en 5 pools; grupo “PE”; n= 31, repartidas en 4 pools). Dichos pools fueron depositados en 3 paneles de OpenArray. Cada panel contenía 3 pools, distribuidos según la siguiente tabla:

Panel	Pool 1	Pool 2	Pool 3
OA 1	Caso (n=6 muestras)	Caso (n=6 muestras)	Control (n=12 muestras)
OA 2	Caso (n=11 muestras)	Control (n=6 muestras)	Control (n=6 muestras)
OA 3	Caso (n=8 muestras)	Control (n=10 muestras)	Control (n=10 muestras)

Tabla 23: Distribución de los pools de muestras de suero en los paneles de OpenArray.

Se amplificaron un total de 63 miRNAs (8%) del total de 754 miRNAs que contienen los paneles. Los criterios de selección de los miRNAs candidatos se establecieron según el siguiente procedimiento:

Se ajustó el umbral de detección de ciclos a Ct <31 aplicando la opción de la normalización global. Todos los miRNAs que no fueron amplificados de forma correcta y fiable en todas las muestras, es decir, en los 9 pools, fueron descartados (Figura 18).

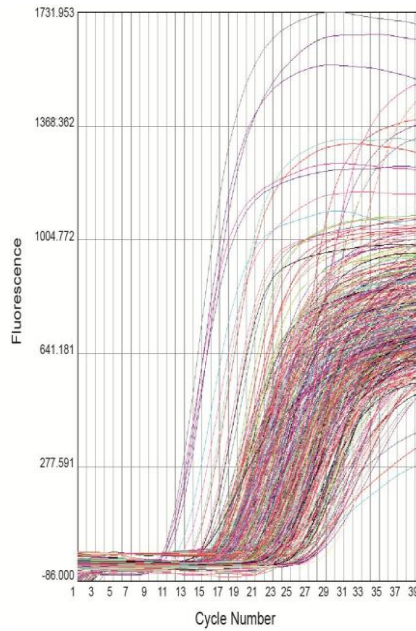
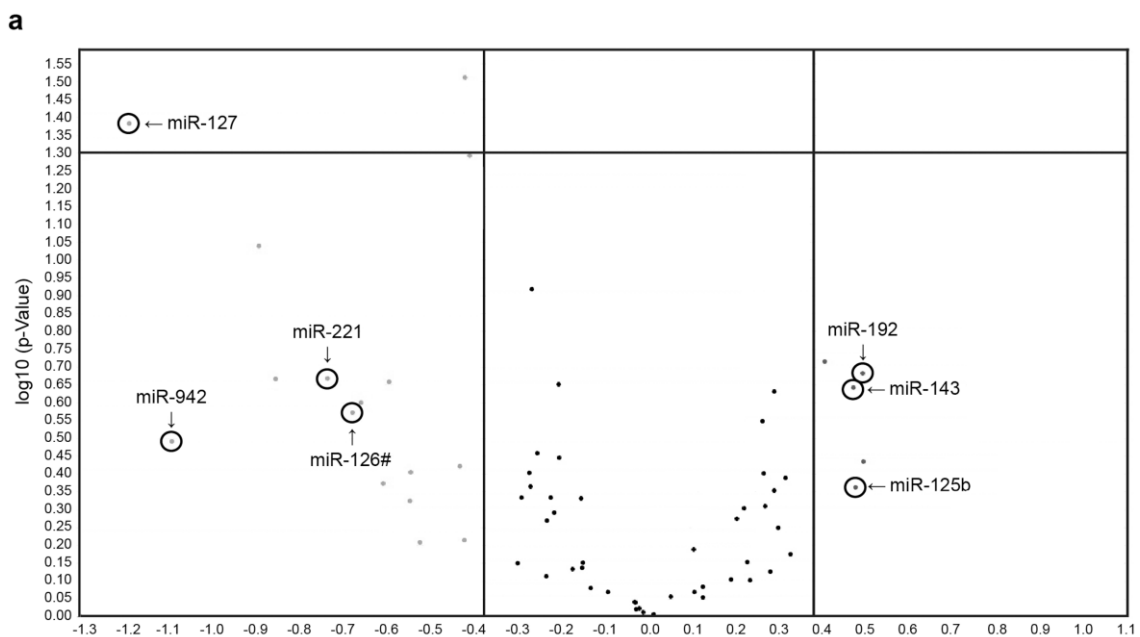


Figura 18: Curvas de amplificación correspondientes a 63 miRNAs amplificados de suero humano de una cohorte de 75 gestantes (4 pools de 31 pacientes con PE y 5 pools de pacientes con embarazos no complicados) en su primer trimestre de gestación.

Los que cumplieron esta condición estricta fueron 63 miRNAs. En la segunda etapa de selección se calcularon los $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de los 63 miRNAs para los 4 pools de PE respecto a los 5 pools de controles, donde se admitieron todos los valores de FC ≥ 1.3 y ≤ 0.7 (Figura 19 a), y siempre que tuvieran la misma tendencia (hacia una mayor o una menor abundancia) en un mínimo en 3 pools de los 4 pools del grupo de PE respecto a los pools control (Figura 19 b).



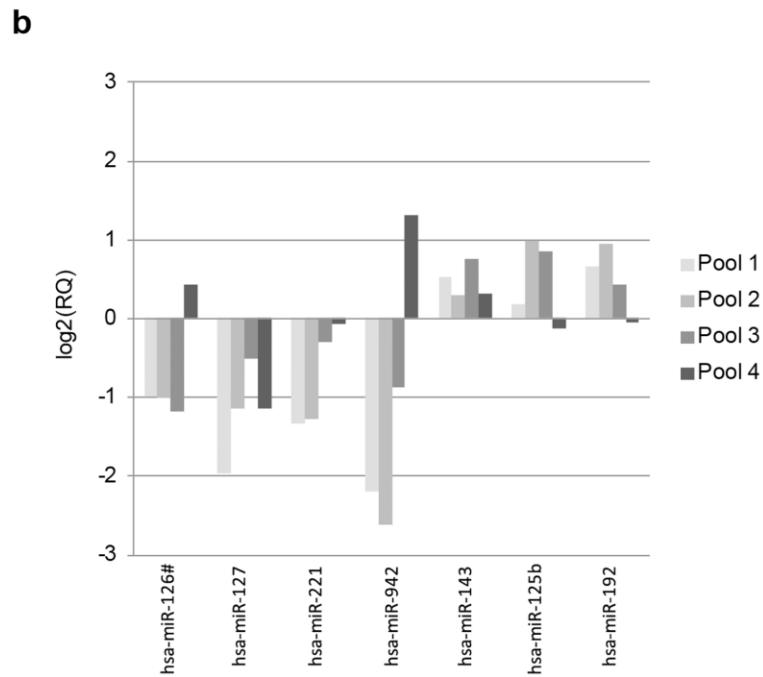


Figura 19: El perfilado global diferencial de miRNAs circulantes en pacientes PE (primer trimestre) versus embarazos no complicados mediante la técnica OpenArray. **(Figura 19 a)** la dispersión volcán de los valores de FC de los 63 miRNAs muestra cambios en la abundancia miRNA entre los pacientes PE y los embarazos control. Los 7 miRNAs seleccionados para su posterior validación (3 sobre expresados y 4 sub expresados). **(Figura 19 b)** Las tendencias de los 4 pools de pacientes de pre-eclampsia respecto a los 5 pools de gestantes controles se obtuvieron mediante la técnica OpenArray.

En la Tabla 24 se muestran los resultados del análisis de 7 miRNAs seleccionados como candidatos, que cumplieron los criterios preliminares. Se observaron valores de FC ligeramente sobreexpresados (**miR-192, miR-125b y miR-143**) y sub-expresados (**miR- 221, miR-126*, miR-942 y miR-127**) en los pacientes con PE. Sin embargo, no se evidenciaron diferencias significativas excepto para el miR-127, que mostró un valor al límite de la significación (**$p = 0.041$**).

Ensayo	FC OpenArray	p Value
hsa-miR-221	0.599 ↓	0.214
hsa-miR-126*	0.624 ↓	0.267
hsa-miR-942	0.467 ↓	0.322
hsa-miR-127	0.437 ↓	0.041
hsa-miR-143	1.387 ↑	0.228
hsa-miR-125b	1.391 ↑	0.433
hsa-miR-192	1.407 ↑	0.208

Tabla 24: Selección de miRNAs diferencialmente expresados. Los 7 miRNAs se ajustaron según los criterios establecidos para la selección de miRNAs candidatos a biomarcadores de PE.

4.1.6 Validación de la abundancia de los miRNA circulantes candidatos a biomarcadores de PE

Se realizó un análisis de validación individual mediante la técnica RT-qPCR TaqMan para cada muestra en esta cohorte, para determinar la expresión diferencial de los miRNAs seleccionados (miR-127, miR-942, miR-221, miR-126*, miR-125b, miR-192, miR-143 junto con el normalizador cel-miR-54).

4.1.6.1 Validación del normalizador cel-miR-54

La introducción de un miRNA normalizador exógeno al estudio, aparte de permitirnos detectar incidencias técnicas del proceso de RT-qPCR, también nos confirma la sensibilidad, precisión y exactitud del método de cuantificación, puesto que por el momento no ha sido fiable establecer un miRNA como control endógeno. Así, se relativizaron las cuantificaciones de los miRNAs respecto a la del control exógeno, y se determinó la $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de cada miRNA Figura 20.

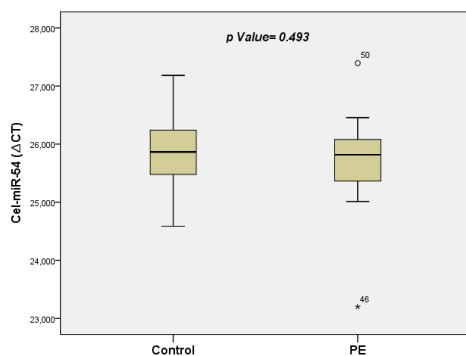
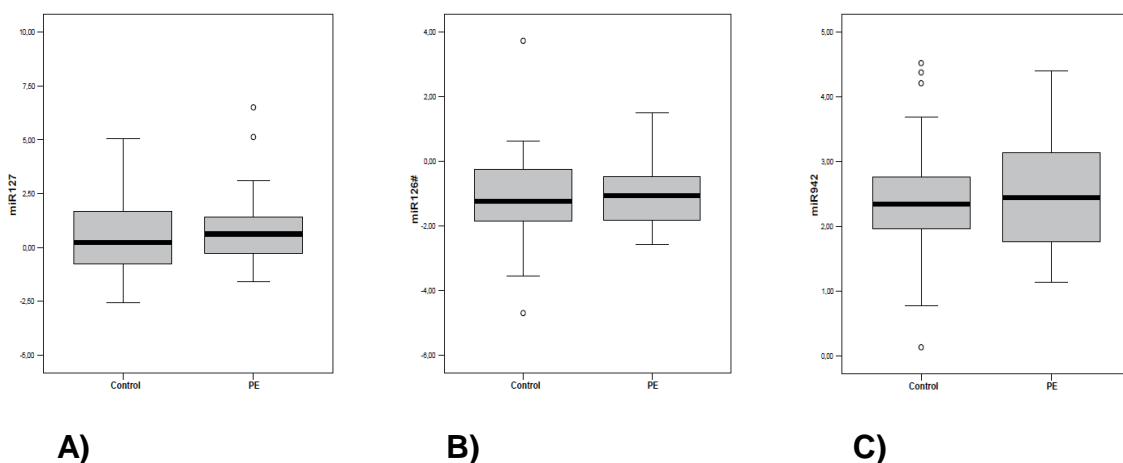


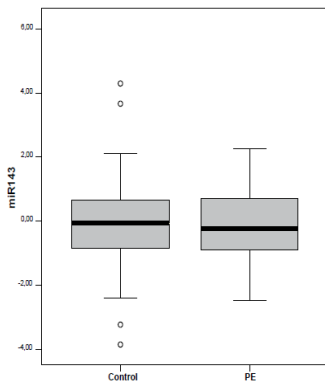
Figura 20: Diagrama de cajas. Expresión del normalizador Cel-miR-54 entre el grupo PE y el grupo Control.

La expresión de cel-miR-54 es consistentemente estable y no ha mostrado ninguna variación significativa entre los grupos Casos y Controles, como se esperaba (PE n= 44) y (Controles n= 31) ($p = 0.493$).

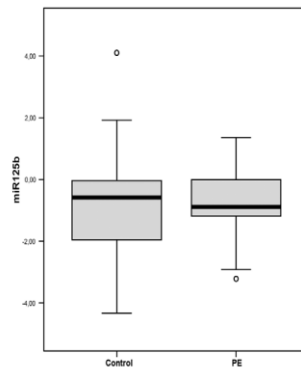
4.1.6.2 Validación de los miRNAs candidatos

A continuación mostramos mediante diagramas de cajas los niveles individuales de expresión de los miRNAs en suero (Figura 21). Los miRNAs candidatos pertenecen a la cohorte de validación del estudio de PE en el primer trimestre de gestación, que comprende el grupo de PE (31 gestantes) y el grupo control (42 gestantes). Los niveles de ΔCt miRNAs se normalizaron mediante el control exógeno cel-miR-54. Los valores de FC de cada miRNA se muestran en la Tabla 25.

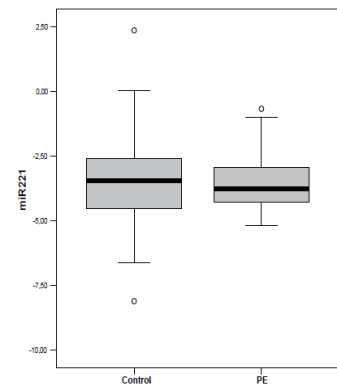




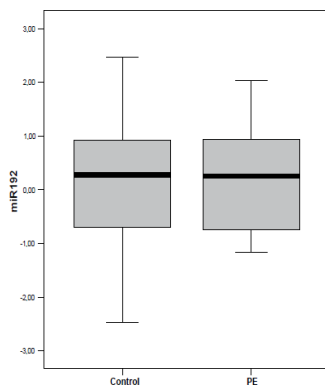
D)



E)



F)



G)

Figura 21: Diagramas de cajas. La expresión de los miRNAs candidatos no mostró ninguna variación significativa entre los dos grupos estudiados (PE, n= 44 y Controles, n= 31). **a)** Diagrama de cajas según la expresión de miR-127, **b)** Diagrama de cajas según la expresión de miR-126#, **c)** Diagrama de cajas según la expresión de miR-942, **d)** Diagrama de cajas según la expresión de miR-143, **e)** Diagrama de cajas según la expresión de miR-125b, **f)** Diagrama de cajas según la expresión de miR-221, **g)** Diagrama de cajas según la expresión de miR-192.

Ensayo	FC Validación	p Value
hsa-miR-221	0.999 ↓	0.846
hsa-miR-126*	0.952 ↓	0.918
hsa-miR-942	0.896 ↓	0.530
hsa-miR-127	0.720 ↓	0.404
hsa-miR-143	0.993 ↓	0.797
hsa-miR-125b	1.101 ↑	0.472
hsa-miR-192	1.043 ↑	0.749

Tabla25: Valores de expresión, presentados en FC, de los 7 miRNAs validados mediante la técnica RT-qPCR TaqMan.

4.1.7 Comparación de la abundancia diferencial de los miRNAs séricos candidatos a biomarcadores de PE determinados mediante las plataformas OpenArray y RT-qPCR TaqMan

Las tendencias de expresión diferencial de los miRNAs seleccionados, validados por RT-qPCR TaqMan, son coherentes con los resultados obtenidos mediante la tecnología OpenArray. Sin embargo, ninguno de los miRNAs validados mostró diferencias de abundancia significativas entre el grupo de PE y el grupo control no PE. Por tanto, el análisis de la abundancia de miRNAs en el suero materno en el primer trimestre del embarazo parece carecer de valor predictivo en PE temprana (Figura 23).

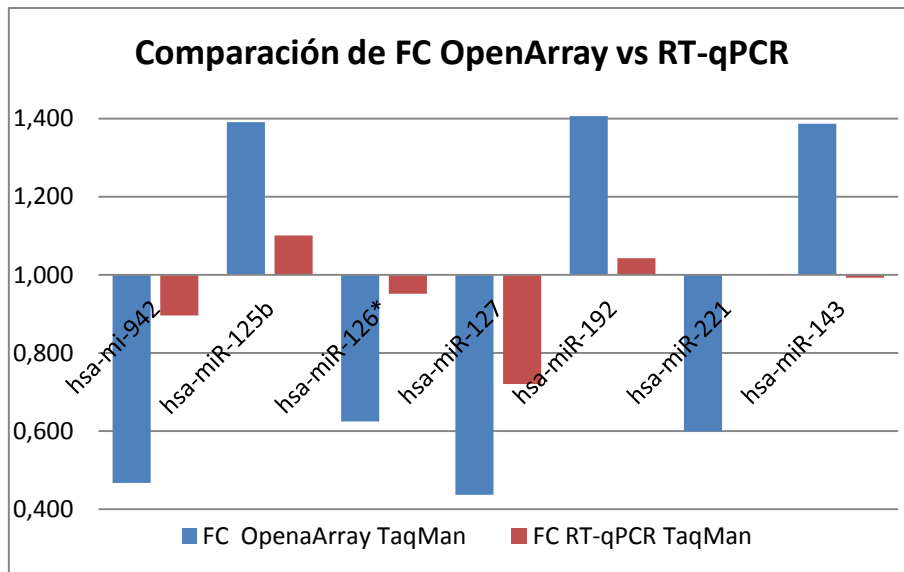


Figura 23: Comparación de la expresión diferencial (FC) de los 7 miRNAs expresados en sueros de gestantes de primer trimestre, obtenida mediante las técnicas de OpenArray vs qPCR- TaqMan. Las barras de color azul representan la expresión diferencial mediante la técnica OpenArray. Las barras de color rojo representan los valores de expresión diferencial validados mediante la técnica de RT-qPCR TaqMan.

4.1.8 Correlación entre la expresión de los miRNAs y las variables clínicas de PE.

Mediante el análisis del coeficiente de correlación *Spearman* para variables no paramétricas numéricas, se encontraron dos asociaciones estadísticamente significativas entre de las variables analizadas y la expresión diferencial de los miRNAs. Los miRNAs que presentaron algunas correlaciones negativas estadísticamente significativas fueron: miR-942, con la tensión arterial (MAP), con moderada correlación $Rho = -0.418$ ($p < 0.019$); miR-143, con el índice de pulsaciones de las AUt realizadas mediante Ecografía Doppler (UtA PI), con baja correlación $Rho = -0.373$ ($p < 0.043$) (Tablas 26 y27).

Ensayo	Edad gestacional parto		Peso de nacimiento		Media tensión arterial	
	Rho Spearman	p value	Rho Spearman	p value	Rho Spearman	p value
hsa-miR-126#	-0.243	0.195	-0.148	0.443	-0.233	0.215
hsa-miR-127	-0.208	0.260	-0.185	0.327	-0.238	0.198
hsa-miR-221	-0.087	0.648	-0.093	0.631	-0.163	0.389
hsa-miR-942	-0.267	0.146	-0.192	0.308	-0.418	0.019
hsa-miR-143	0.022	0.909	0.274	0.150	0.032	0.866
hsa-miR-125b	-0.087	0.647	0.003	0.988	0.053	0.782
hsa-miR-192	-0.154	0.415	0.121	0.533	-0.130	0.494

Tabla 26: Análisis de correlación entre los miRNAs y las variables clínicas de las gestantes con PE. Texto en negrita: valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

Ensayo	Edad		IMC		Media UtA PI	
	Rho Spearman	p value	Rho Spearman	p value	Rho Spearman	p value
hsa-miR-126#	0.275	0.141	-0.089	0.639	0.063	0.739
hsa-miR-127	0.082	0.660	-0.089	0.633	-0.005	0.978
hsa-miR-221	0.079	0.680	-0.309	0.096	0.096	0.612
hsa-miR-942	0.108	0.561	0.010	0.957	0.220	0.235
hsa-miR-143	-0.045	0.813	-0.121	0.524	-0.373	0.043
hsa-miR-125b	0.058	0.762	0.052	0.785	-0.124	0.514
hsa-miR-192	0.232	0.217	0.104	0.585	-0.036	0.851

Tabla 27: Análisis de correlación entre los miRNAs y las variables clínicas de las gestantes con PE. UtA PI: índice de pulsatilidad de la arteria uterina, IMC: índice de masa corporal. Texto en negrita: valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

Por otra parte, se realizó el análisis del coeficiente de correlación *Pearson* para variables categóricas, y se encontraron solamente dos asociaciones estadísticamente

significativas entre las variables analizadas y la expresión del miR-143, que presentó una correlación negativa estadísticamente significativa con la etnia, con moderada correlación $R_{bs} = -0.401$ ($p < 0.028$), y una baja correlación positiva con la paridad ($R_{bs} = -0.385$; ($p < 0.036$) (Tablas 28 y 29).

Variable	Etnia		Paridad		Fumadoras	
	r_{bs} Pearson	p value	r_{bs} Pearson	p value	r_{bs} Pearson	p value
hsa-miR-126#	0.336	0.070	0.234	0.212	0.046	0.809
hsa-miR-127	0.350	0.053	0.295	0.107	0.013	0.945
hsa-miR-221	0.179	0.345	0.326	0.079	-0.016	0.931
hsa-miR-942	0.139	0.456	0.127	0.496	-0.149	0.422
hsa-miR-143	-0.401	0.028	0.385	0.036	0.319	0.086
hsa-miR-125b	0.141	0.458	0.049	0.797	0.237	0.208
hsa-miR-192	-0.112	0.554	0.154	0.415	0.029	0.878

Tabla 28: Análisis de correlación entre los miRNAs y las variables clínicas categóricas de las gestantes con PE. Texto en negrita: valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

Variable	Muerte fetal		Tipo parto		Feto PEG	
	r_{bs} Pearson	p value	r_{bs} Pearson	p value	r_{bs} Pearson	p value
hsa-miR-126#	0.121	0.524	0.162	0.402	0.076	0.691
hsa-miR-127	-0.160	0.391	0.247	0.187	-0.031	0.869
hsa-miR-221	-0.166	0.381	0.151	0.433	0.107	0.573
hsa-miR-942	0.265	0.150	0.026	0.891	-0.159	0.392
hsa-miR-143	-0.287	0.124	-0.004	0.983	-0.213	0.259
hsa-miR-125b	-0.128	0.501	0.300	0.114	0.102	0.593
hsa-miR-192	0.076	0.691	0.035	0.857	-0.323	0.081

Tabla 29: Análisis de correlación entre los miRNAs y las variables clínicas categóricas de las gestantes con PE (II). Texto en negrita: valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

4.2 Estudio 2: miR-638 como biomarcador diagnóstico/pronóstico de placa aterosclerótica carotídea vulnerable

4.2.1 Caracterización de la población total del estudio

En este estudio piloto se recogieron prospectivamente muestras de suero de 67 individuos caucásicos, que fueron divididos en dos grupos principales:

1- Grupo de Casos de aterosclerosis carotídea avanzada sintomática, formado por 31 pacientes sometidos a la intervención quirúrgica de *endarterectomía carotídea* (CEA), presentaron síntomas (ictus isquémico, ataque isquémico transitorio (TIA), amaurosis fugax o ipsilateral) o fueron asintomáticos (ausencia de eventos cerebrovasculares).

Estos pacientes tenían un grado alto de estenosis carotídea >60%, según se diagnosticó mediante Eco Doppler vascular confirmada por Angio-RM o Angio-TC, según los criterios de NASCET (North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial).

Todos los pacientes sintomáticos se sometieron a CEA dentro de las tres semanas del evento sintomático. De acuerdo con los criterios morfológicos e histológicos, todas las placas extraídas por CEA presentaban características de inestabilidad tales como actividad inflamatoria, tapa fibrosa delgada, núcleo lipídico grande, ulceración visible, hemorragia intraplaca y ruptura.

Dentro el grupo de casos CEA se clasificaron los pacientes, según la manifestación clínica, en dos subgrupos:

- Subgrupo aterosclerosis carotídea avanzada sintomática (n=22).
- Subgrupo ictus isquémico (n=11).
- Subgrupo aterosclerosis carotídea avanzada asintomática (n=9).

2- El grupo control, formado por 36 pacientes, que visitaron la unidad de urgencias, sin antecedentes de accidente cerebrovascular ni aterosclerosis carotídea, todos los pacientes presentaron estenosis carotídea baja <30% según el diagnóstico por imagen Eco Doppler vascular.

Los pacientes con antecedentes conocidos de tromboembolismo arterial o venoso agudo, infecciones activas, insuficiencia renal, enfermedad hepática, neoplasias, trauma reciente o cirugía fueron excluidos del estudio.

El riesgo cardiovascular para los grupos CEA y control se estimó según el modelo de predicción SCORE (*Evaluación del riesgo coronario*) calibrado para uso en España (362). Los análisis hematológicos y bioquímicos estándar se realizaron rutinariamente en el laboratorio del hospital. Los datos clínicos básicos de los pacientes y los factores de riesgo vascular, incluyendo tratamiento farmacológico con antihipertensivos, estatinas y tratamiento antiplaquetario, se resumen en la Tabla 30:

Características	n	CEA	(±SD)/ n (%)	n	Controles	(±SD)/ n (%)	P value
Edad	31	65.0	10.4	36	67.7	13.4	0.37
Sexo (% masculino)	31	24	77.4	36	21	58.3	0.08
Fumadores	31	13	41.9	36	10	27.8	0.17
Dislipidemia	31	21	67.7	36	16	44.4	0.05
HTA	31	28	90.3	36	21	58.3	0.00
Diabetes	31	12	38.7	36	8	22.2	0.12
EVP	31	8	25.8	36	5	13.9	0.18
CAD	31	7	22.6	36	1	2.8	0.02
Ictus isquémico	31	22	71.0	36	0	0.0	0.00
Grado de estenosis de la arteria carótida contralateral > 50%	29	11	35.5	36	6.0	16.7	0.05
Fibrinógeno (g/l)	31	5.2	1.4	36	4.3	1.2	0.01
Colesterol total(mmol/l)	31	4.5	1.4	36	3.7	1.2	0.01
LDL-C (mmol/l)	31	2.6	1.3	36	2.2	0.7	0.08
HDL-C (mmol/l)	31	1.3	0.5	36	1.2	0.3	0.56
TG (mmol/l)	31	1.5	0.7	36	1.9	1.0	0.05
ESR (mm/h)	30	15.7	10.6	35	14.7	10.9	0.71

WBC x 106/l	31	6744	2483	30	7744	2597	0.11
Creatinina (mg/dl)	31	0.9	0.1	34	1.0	1.0	0.45
SBP (mm Hg)	31	151.6	29.0	36	139.2	36.8	0.14
Tratamiento antiplaquetario	29	26	83.9	36	11	30.6	0.00
Tratamiento de SBP	31	28	90.3	36	18	50.0	0.00
Tratamiento hipolipemiante	30	20	64.2	36	14	38.9	0.02

Tabla 30: Principales características clínicas de los pacientes sujetos a CEA. CAD: enfermedad de las arterias coronarias; HDL-C: lipoproteínas de alta densidad; HTA: hipertensión arterial; LDL-C: lipoproteínas de baja densidad; EVP: enfermedad vascular periférica; TG: triglicéridos; WBC: recuento de leucocitos; ESR: tasa de sedimentación eritrocítica; SBP: presión arterial sistólica. Los datos se presentan en (\pm SD) o n (%). Texto en negrita: valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$). La población general del estudio mostró características similares, excepto una incidencia significativamente más alta de accidente cerebrovascular, CAD e HTA, y un incremento significativo de fibrinógeno y colesterol total en pacientes CEA. Además, el número de pacientes que recibieron tratamiento anti-plaquetario para reducir el colesterol y/o tratamientos para reducir la tensión también fue significativamente mayor en el grupo CEA.

4.2.2 Aterosclerosis carotídea avanzada sintomática.

El grupo “CEA sintomáticos”, estaba compuesto por 22 pacientes que cumplían los criterios de inclusión, habiendo sufrido estenosis carotídea sintomática de alto grado ($\geq 60\%$, según se diagnosticó mediante Eco Doppler vascular) ingresados en la unidad de neurología con diagnóstico de accidente cerebrovascular. A dichos pacientes se les practicó una endarterectomía carotídea. La incidencia de ictus isquémico se presentó en 11 pacientes, la incidencia de accidente isquémico transitorio (AIT) se presentó en 8 pacientes, y la incidencia de amaurosis fugaz bilateral se presentó en 3 pacientes (Figura 24).

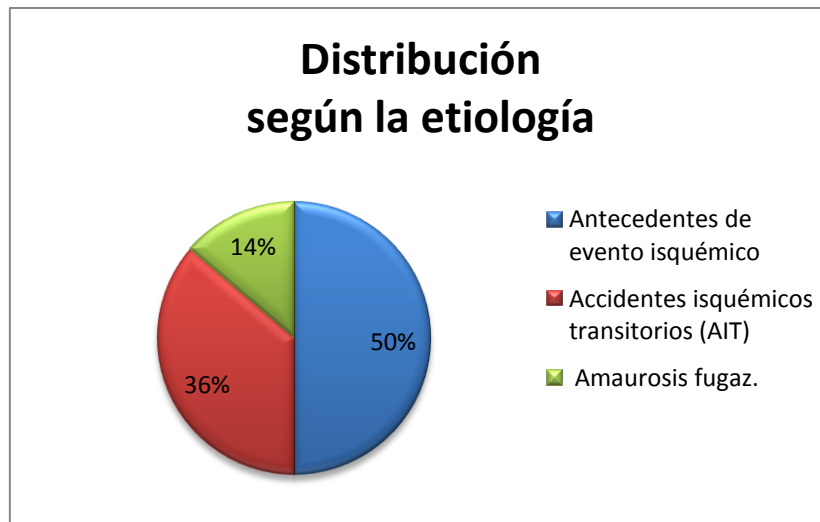


Figura 24: Distribución los pacientes objeto de estudio según la causa etiológica del grupo “CEA sintomáticos”

Según los resultados mostrados en la Tabla 31, entre los factores de riesgo, la incidencia de HTA en los pacientes CEA sintomáticos (n= 22) resultó significativa ($p < 0.02$), en comparación con el grupo control (n= 36). En cuanto a los parámetros clínicos, mostraron niveles significativamente altos para las concentraciones plasmáticas de fibrinógeno activado y colesterol total ($p < 0.03$ y $p < 0.02$, respectivamente). En cuanto al tratamiento farmacológico, se destaca que los individuos CEA sintomáticos se encuentran bajo tratamiento con medicamentos antiagregantes plaquetarios, anti-hipertensivos e hipolipemiantes ($p < 0.01$, $p < 0.01$ y $p < 0.02$, respectivamente).

Características	n	CEA	(±SD)/ n (%)	n	Controles	(±SD)/ n (%)	P value
Edad	22	63.8	11.0	36	67.7	13.4	0.25
Sexo	22	17	77.3	36	21	58.3	0.12
Fumadores	22	10	45.5	36	10	27.8	0.14
Dislipidemia	22	14	63.6	36	16	44.4	0.13
HTA	22	19	86.4	36	21	58.3	0.02
Diabetes	22	7	31.8	36	8	22.2	0.31
EVP	22	5	22.7	36	5	13.9	0.30

CAD	22	3	13.6	36	1	2.8	0.15
Ictus isquémico	22	22	100.0	36	0	0.0	0.00
Grado de estenosis de la arteria carótida contralateral > 50%	20	8	40.0	36	6.0	16.7	0.06
Fibrinógeno (g/l)	22	5.1	1.5	36	4.3	1.2	0.03
Colesterol total(mmol/l)	22	4.5	1.2	36	3.7	1.2	0.02
LDL-C (mmol/l)	22	2.4	1.1	36	2.2	0.7	0.30
HDL-C (mmol/l)	22	1.3	0.5	36	1.2	0.3	0.81
TG (mmol/l)	22	1.4	0.5	36	1.9	1.0	0.05
ESR (mm/h)	21	15.1	10.8	35	14.7	10.9	0.89
WBC x 106/l	22	7065	2407	30	7744	2597	0.33
Creatinina (mg/dl)	22	0.8	0.2	34	1.0	1.0	0.52
SBP (mm Hg)	22	156.0	32.3	36	139.2	36.8	0.09
Tratamiento antiplaquetario	20	19	95.0	36	11	30.6	0.00
Tratamiento de SBP	22	19	86.4	36	18	50.0	0.01
Tratamiento hipolipemiante	21	15	71.4	36	14	38.9	0.02

Tabla 31: Principales características clínicas de los pacientes sintomáticos sujetos a CEA. CAD: enfermedad de las arterias coronarias; HDL-C: lipoproteínas de alta densidad; HTA: hipertensión arterial; LDL-C: lipoproteínas de baja densidad; EVP: enfermedad vascular periférica; TG: triglicéridos; WBC: recuento de leucocitos; ESR: tasa de sedimentación eritrocítica; SBP: presión arterial sistólica. Los datos se presentan en (\pm SD) o n (%). Texto en negrita: valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

4.2.2.1 Ictus isquémico.

Dichos pacientes mostraron factores de riesgo significativamente elevados, como el consumo de tabaco ($p < 0.01$), los niveles de colesterol total ($p < 0.02$) y la presión arterial sistólica ($p < 0.02$) en comparación con el grupo control no-CEA. En cuanto a tratamiento farmacológico, la mayoría recibían tratamiento anti-plaquetario ($p < 0.01$) y anti-hipertensivo ($p < 0.02$) (Tabla 32).

Características	n	CEA	(±SD)/ n (%)	n	Controles	(±SD)/ n (%)	pvalue
Edad	11	64.7	13.6	36	67.7	13.4	0.52
Sexo	11	11	100.0	36	21	58.3	0.00
Fumadores	11	8	72.7	36	10	27.8	0.01
Dislipidemia	11	6.0	54.5	36	16	44.4	0.40
HTA	11	10	90.9	36	21	58.3	0.05
Diabetes	11	4	36.4	36	8	22.2	0.28
EVP	11	2	18.2	36	5	13.9	0.53
CAD	11	2	18.2	36	1	2.8	0.13
Ictus isquémico	11	11	100.0	36	0	0.0	0.00
Grado de estenosis de la arteria carótida contralateral > 50%	11	5	45.5	36	6.0	16.7	0.06
Fibrinogeno (g/l)	11	5.0	1.8	36	4.3	1.2	0.12
Colesterol total(mmol/l)	11	4.7	1.5	36	3.7	1.2	0.02
LDL-C (mmol/l)	11	2.5	1.4	36	2.2	0.7	0.25
HDL-C (mmol/l)	11	1.3	0.7	36	1.2	0.3	0.83
TG (mmol/l)	11	1.6	0.5	36	1.9	1.0	0.30
ESR (mm/h)	11	15.5	14.2	35	14.7	10.9	0.85
WBC x 106/l	11	7065	1387	30	7744	2597	0.41
Creatinina (mg/dl)	11	0.8	0.2	34	1.0	1.0	0.52
SBP (mm Hg)	11	169.5	27.9	36	139.2	36.8	0.02
Tratamiento antiplaquetario	9	8	88.9	36	11	30.6	0.00
Tratamiento de SBP	11	10	90.9	36	18	50.0	0.02
Tratamiento hipolipemiante	10	7	70.0	36	14	38.9	0.08

Tabla 32: Principales características clínicas de los pacientes con ictus isquémico sujetos a CEA. CAD: enfermedad de las arterias coronarias; HDL-C: lipoproteínas de alta densidad; HTA:

hipertensión arterial; LDL-C: lipoproteínas de baja densidad; EVP: enfermedad vascular periférica; TG: triglicéridos; WBC: recuento de leucocitos; ESR: tasa de sedimentación eritrocítica; SBP: presión arterial sistólica. Los datos se presentan en (\pm SD) o n (%). Texto en negrita: valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

4.2.3 Aterosclerosis carotídea avanzada asintomática.

Al analizar el grupo de pacientes CEA asintomáticos (n =9) respecto a los controles de la población de estudio, se evidenciaron diferencias significativas en algunos factores de riesgo, como hipertensión arterial (**$p < 0.02$**), enfermedad de las arterias coronarias (**$p < 0.01$**), y en algunos parámetros clínicos, como los niveles de fibrinógeno (**$p < 0.02$**) y la lipoproteína de baja densidad (LDL-C) (**$p < 0.01$**) en comparación con el grupo control no CEA (Tabla 33).

Características	n	CEA	(±SD)/ n (%)	n	Controles	(±SD)/ n (%)	pvalue
Edad	9	68.1	8.6	36	67.7	13.4	0.93
Sexo	9	7	77.8	36	21	58.3	0.25
Fumadores	9	3	33.3	36	10	27.8	0.52
Dislipidemia	9	7	77.8	36	16	44.4	0.08
HTA	9	9	100.0	36	21	58.3	0.02
Diabetes	9	5	55.6	36	8	22.2	0.06
EVP	9	3	33.3	36	5	13.9	0.19
CAD	9	4	44.4	36	1	2.8	0.00
Grado de estenosis de la arteria carótida contralateral > 50%	9	3	33.3	36	6.0	16.7	0.25
Fibrinógeno (g/l)	9	5.4	1.3	36	4.3	1.2	0.02
Colesterol total	9	4.5	1.7	36	3.7	1.2	0.10
LDL-C (mmol/l)	9	3.1	1.7	36	2.2	0.7	0.01
HDL-C (mmol/l)	9	1.4	0.6	36	1.2	0.3	0.30
TG (mmol/l)	9	1.6	0.9	36	1.9	1.0	0.37
ESR (mm/h)	9	17.1	10.5	35	14.7	10.9	0.56
WBC x 10 ⁶ /l	9	5960	2633	30	7744	2597	0.07
Creatinina (mg/dl)	9	0.9	0.1	34	1.0	1.0	0.70
SBP (mm Hg)	9	141.1	15.4	36	139.2	36.8	0.88
Tratamiento antiplaquetario	9	7	77.8	36	11	30.6	0.01
Tratamiento de SBP	9	9	100.0	36	18	50.0	0.01
Tratamiento hipolipemiante	9	5	55.6	36	14	38.9	0.30

Tabla 33: Principales características clínicas de los pacientes asintomáticos sujetos a CEA. CAD: enfermedad de las arterias coronarias; HDL-C: lipoproteínas de alta densidad; HTA: hipertensión arterial; LDL-C: lipoproteínas de baja densidad; EVP: enfermedad vascular

periférica; TG: triglicéridos; WBC: recuento de leucocitos; ESR: tasa de sedimentación eritrocítica; SBP: presión arterial sistólica. Los datos se presentan en (\pm SD) o n (%). Texto en negrita: valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

4.2.4 Seguimiento a largo plazo de pacientes CEA con aterosclerosis carotídea avanzada.

Este grupo de seguimiento, formado por 9 pacientes sometidos a CEA, fue analizado antes y 5 años después de la intervención quirúrgica. Las características clínicas de estos pacientes se indican en la Tabla 34.

Características	n	CEA		post CEA		P_{value}	
		n	(\pm SD) / (%)	n	(\pm SD) / (%)		
Edad (años)	9	64	8.0	9	69	8.0	-
Sexo (% Masculino)	9	9	100.0	9	9	100.0	-
Fumadores	9	4	44.4	9	0	0.0	0.04
Dislipidemia	9	4	44.4	9	5	55.6	0.50
HTA	9	8	88.9	9	8	88.9	0.77
EVP	9	7	77.8	9	7	77.8	0.71
CAD	9	1	11.1	9	2	22.2	0.50
Colesterol total (mmol/l)	9	5.2	0.7	9	4.7	1.1	0.26
LDL-C (mmol/l)	9	3.4	0.7	9	2.6	1.0	0.07
HDL-C (mmol/l)	9	1.1	0.2	9	1.3	0.3	0.12
TG (mmol/l)	9	1.5	0.5	9	1.8	1.3	0.46
WBC x 10 ⁶ /l	9	6679	1267	9	7460	2285	0.38
Tratamiento antiplaquetario	9	8	88.9	9	7	77.8	0.50
Tratamiento hipolipemiante	9	3	33.3	9	6	66.7	0.17

Tabla 34: Principales características clínicas de los pacientes con CEA a los 0 y 5 años después de la intervención. EAC: enfermedad de las arterias coronarias; HDL-C: lipoproteínas de alta densidad; HTA: hipertensión arterial; LDL-C: lipoproteínas de baja densidad; EVP: enfermedad vascular periférica; TG: triglicéridos; WBC: recuento de leucocitos; ESR: tasa de

sedimentación eritrocítica; SBP: presión arterial sistólica. Los datos se presentan en (\pm SD) o n (%). Texto en **negrita**: valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

4.2.5 Implicación de miR-638 en patología vascular: modelo celular.

Los principales tipos de células constitutivas que participan en la enfermedad vascular aterosclerótica y contribuyen a la aterogénesis y a la formación de las placas vulnerables son las ECs y las VSMCs. En condiciones pro-inflamatorias, la inducción de las ECs activa la iniciación de la transcripción génica.

Se determinó la expresión del miR-638 en ECs y su implicación en el proceso inflamatorio mediante la activación de las HUVEC por estímulos pro-inflamatorios (TNF α +IFN γ). Ello conlleva la expresión/secreción de una serie de moléculas que constituyen la respuesta inmune-inflamatoria, controladas en parte mediante la expresión de los miRNAs, que a su vez regulan las vías de señalización pro-inflamatorias, modificando la permeabilidad vascular, el estado protrombótico, hemodinámico, la lesión vascular y la supervivencia endotelial. Se ha comprobado que el miR-638 está sustancialmente sobre-expresado en VSMCs humanas proliferativas después de la estimulación por factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (358).

4.2.5.1 Estimulación pro-inflamatoria de ECs

Tras la incubación de las HUVEC inducidas mediante TNF α +IFN γ durante 48h, los resultados muestran una reducción de los niveles de miR-638, particularmente del miR-638 liberado en el sobrenadante (extracelular), en condiciones pro-inflamatorias. Por otro lado, tanto los niveles de miR-638 intracelulares como los extracelulares (circulantes en el sobrenadante) se encontraron infraregulados en comparación con los encontrados en células HUVEC no estimuladas. Por el contrario, las citoquinas pro-inflamatorias incrementaron la expresión endotelial y la liberación de miR-155, como se ha descrito en la literatura (359) (Figura 25).

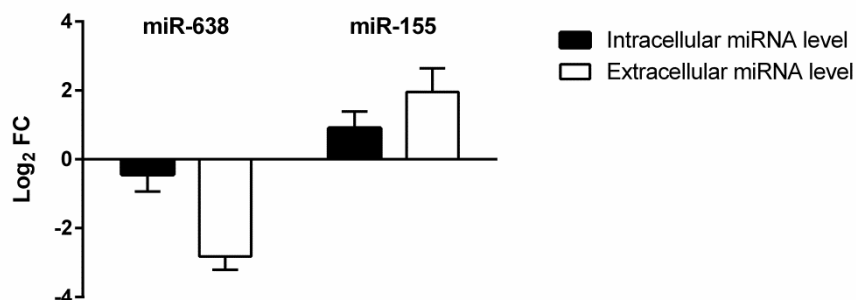


Figura 25: Expresión de miR-638 y miR-155 en HUVEC estimuladas (TNF α 200 μ g/ml, INF γ 100 μ g/ml) durante 48h. La gráfica de color negro representa la expresión intracelular de miR-638 y miR-155, mientras que la gráfica blanca representa la expresión de miR-638 y miR-155 en el sobrenadante extracelular.

4.2.6 Herramientas de predicción bioinformática de genes diana del hsa-miR-638 asociados con accidente cerebrovascular.

Se realizó un análisis de hsa-miR-638 utilizando siete diferentes algoritmos bioinformáticos (detallados en el apartado de Materiales y Métodos).

Por lo tanto, se obtuvieron 3.516 genes potenciales dianas para miR-638. Para revelar los posibles genes diana de miR-638 relevantes en patología cerebrovascular, comparamos nuestra lista de genes con la base de datos "SigCS", un recurso web de información genética integrada para el accidente cerebrovascular cerebral humano, con 1.943 genes no redundantes (360). Teniendo en cuenta todas las etiologías de la base SigCS, se obtuvieron 358 posibles genes diana para miR-638. Al limitar la búsqueda a las etiologías de "accidente cerebrovascular" y "aterosclerosis" (que incluyen a 302 genes), encontramos 61 genes como dianas potenciales de miR-638 (Tabla 35).

Por tanto, utilizando la base SigCS como referencia, el análisis bioinformático mostró 61 potenciales genes diana de miR-638. Así, de acuerdo a diferentes algoritmos de predicción de genes diana para miRNAs, el miR-638 podría estar vinculado con lesiones ateroscleróticas e ictus.

Gen	Referencia (ID)	Descripción
ACCN2	NM_001040467	amiloride-sensitive cation channel 2, neuronal
ACVRL1	NM_000020	activin A receptor type II-like 1
ADD1	NM_001119	adducin 1 (alpha)
ASS1	NM_000050	argininosuccinate synthase 1
BCKDHB	NM_000056	branched chain keto acid dehydrogenase E1, beta polypeptide
CACNA1A	NM_001252059	calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit
CACNA1C	NM_000719	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit
CHD5	NM_015557	chromodomain helicase DNA binding protein 5
CNR1	NM_001160226	cannabinoid receptor 1 (brain)
CX3CR1	NM_001171171	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1
CYP11B1	NM_000497	cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 1
CYP19A1	NM_000103	cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1
DBT	XM_005270545	dihydrolipoamide branched chain transacylase E2
DLG4	XM_005256489	discs, large homolog 4 (Drosophila)
DMPK	NM_001081560	dystrophia myotonica-protein kinase
ECE1	NM_001113347	endothelin converting enzyme 1
EPHX2	NM_001256482	epoxide hydrolase 2, cytoplasmic
ESR1	NM_000125	estrogen receptor 1
F13A1	NM_000129	coagulation factor XIII, A1 polypeptide
GAA	NM_000152	glucosidase, alpha; acid
GHR	NM_000163	growth hormone receptor
GRIN1	NM_000832	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 1
GRIN2B	NM_000834	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2B
HABP2	NM_001177660	hyaluronan binding protein 2
HFE	NM_000410	Hemochromatosis

HMCN1	NM_031935	hemicentin 1
HNF1A	NM_000545	HNF1 homeobox A
HSD11B2	NM_000196	hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 2
ITGA2	NM_002203	integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)
JAK2	NM_004972	Janus kinase 2
KALRN	NM_001024660	kalirin, RhoGEF kinase
KRT14	NM_000526	keratin 14
LDLR	NM_000527	low density lipoprotein receptor
LEP	NM_000230	Leptin
LPIN1	NM_001261427	lipin 1
LPIN2	NM_014646	lipin 2
MTHFR	NM_005957	methylenetetrahydrofolate reductase (NAD(P)H)
MYO7A	NM_000260	myosin VIIA
NF1	NM_000267	neurofibromin 1
NLRP3	NM_001079821	NLR family, pyrin domain containing 3
NOS1	NM_000620	nitric oxide synthase 1 (neuronal)
NOTCH3	NM_000435	notch 3
PCNT	NM_006031	Pericentrin
PDGFRA	XM_006714041	platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide
PLAU	NM_001145031	plasminogen activator, urokinase
PRKAR1A	NM_001276289	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha
PTGIS	NM_000961	prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase
SCN5A	NM_000335	sodium channel, voltage-gated, type V, alpha subunit
SERPINA3	NM_001085	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 3
SLC1A2	NM_001195728	solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2

SRR	NM_001304803	serine racemase
TBXA2R	NM_001060	thromboxane A2 receptor
TLR4	NM_003266	toll-like receptor 4
TNF	NM_000594	tumor necrosis factor
TNFRSF11B	NM_002546	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b
TNFRSF1B	NM_001066	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B
TNXB	NM_019105	tenascin XB
TRAK1	NM_001042646	trafficking protein, kinesin binding 1
UCP2	NM_003355	uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)
WNK4	NM_032387	WNK lysine deficient protein kinase 4
XYLT1	NM_022166	xylosyltransferase I

Tabla 35: Potenciales genes diana para miR-638 encontrados en la base de datos SigCS y relacionados con ictus y aterosclerosis

4.2.7 Análisis de asociación (FatiGO) para genes diana de miR-638

En el programa bioinformático FatiGO, los genes se clasificaron en 6 niveles de categorías funcionales relevantes, tanto a nivel de proceso biológico como de función molecular o de componente celular, de niveles más generales hacia niveles más específicos. Cuanto más específico sea el nivel, más informativo, pero no todos los genes pueden ser clasificados hasta los niveles mínimos. Se realizó un análisis de enriquecimiento de aquellas categorías funcionales según la clasificación de GO (361), de los 61 genes potenciales diana de miR-638, relacionados con accidente cerebrovascular sobrerrepresentadas o infrarrepresentadas de forma significativa ($p < 0,05$) en cada uno de los grupos, utilizando para ello el algoritmo implementado por el programa FatiGO.

Jaspar TFBS Term	Odds ratio (loge)	Pvalue	Adj_pvalue
Mafb	24.165	0.00003059	0.001897
miRNA target Term	Odds ratio (loge)	Pvalue	Adj_pvalue
hsa-miR-638	1.948	0.000005946	0.00418
Biocarta Term	Odds ratio (loge)	Pvalue	Adj_pvalue
Nitric Oxide Signaling Pathway	48.444	9.36E-05	0.00002547
Chaperones modulate interferon Signaling Pathway	50.251	0.000002669	0.000363
Eicosanoid Metabolism	43.316	0.00001545	0.0014
Growth Hormone Signaling Pathway	41.083	0.00002802	0.001906
SODD/TNFR1 Signaling Pathway	47.361	0.0002337	0.01271
Acetylation and Deacetylation of RelA in the nucleus	46.025	0.0002917	0.01322
Fibrinolysis Pathway	44.847	0.0003559	0.01383
Regulation of transcriptional activity by PML	42.839	0.000503	0.0171
NF-kB Signaling Pathway	41.168	0.0006749	0.0204
Reactome Term	Odds ratio (loge)	Pvalue	Adj_pvalue
Synaptic Transmission (REACT_13685)	29.923	0.00000969	0.0006395
Hormone biosynthesis (REACT_15314)	31.514	0.0003914	0.01292
KEGG Term	Odds ratio (loge)	Pvalue	Adj_pvalue
Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) (hsa05014)	39.171	7.58E-06	0.00000147
Cytokine-cytokine receptor interaction (hsa04060)	25.584	6.06E-04	0.00005877

Calcium signaling pathway (hsa04020)	27.081	0.000006234	0.0004031
Adipocytokine signaling pathway (hsa04920)	32.024	0.00003444	0.00167
Alzheimer's disease (hsa05010)	25.878	0.00006242	0.002422
Neuroactive ligand-receptor interaction (hsa04080)	21.481	0.0001283	0.004148
Type II diabetes mellitus (hsa04930)	33.418	0.0002303	0.006381
C21-Steroid hormone metabolism (hsa00140)	30.079	0.0005838	0.01416
MAPK signaling pathway (hsa04010)	20.113	0.0008219	0.01595
Long-term potentiation (hsa04720)	28.973	0.0007945	0.01595
InterPro Term	Odds ratio (loge)	Pvalue	Adj_pvalue
Voltage-dependent calcium channel, alpha-1 subunit	42.137	0.00002112	0.02281
EGF-like, type 3	25.243	0.00001705	0.02281

Tabla 36: Perfilado funcional (FatiGO) de 61 posibles genes diana de miR-638 relevantes implicados en accidentes cerebrovasculares y la aterosclerosis de acuerdo con la base de datos SigCS.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos de estas fuentes, el miR-638 parece constituir un miRNA vascular relevante, que participa en la fisiopatología del ictus y, por tanto, bajo la mencionada hipótesis, miR-638 podría ser susceptible de consideración como posible potencial biomarcador de patología cerebrovascular.

4.2.8 Expresión de miR-638 circulante en pacientes CEA sintomáticos.

En toda la población de pacientes (n=31) con estenosis carotídea sometidos a CEA, el nivel sérico relativo de miR-638 se encontró significativamente reducido comparado

con el de los individuos del grupo control no-CEA (n=36) ($p < 0.007$) (Fig 26a). Como se observa en la Fig 26b, la habilidad de miR-638 de diferenciar el grupo CEA del grupo control no CEA se estimó mediante el análisis de curvas ROC para el cálculo del área bajo la curva (AUC = 0,68; IC (95%) = 0,55-0,81; $p < 0.01$).

Se realizó un análisis similar para el subgrupo sintomático CEA (n=22), revelando que los niveles de miR-638 circulante también fueron significativamente inferiores ($p < 0.009$) (Fig 26c), y la capacidad discriminatoria de miR-638 mejoró al comparar los pacientes CEA sintomáticos respecto a los individuos control no-CEA (AUC = 0,66; IC (95%) = 0,52-0,81; $p < 0,04$) (Fig 26d).

Además, la diferencia entre los niveles circulantes relativos de miR-638 en el subgrupo de pacientes con accidente cerebrovascular (n=11) sometidos a CEA en comparación con los del grupo de control no CEA alcanzó el mayor nivel de significación estadística ($p < 0.0006$) (Fig 26e).

En consecuencia, la capacidad discriminatoria de miR-638 sérico entre el subgrupo de pacientes CEA con accidente cerebrovascular y el grupo control no CEA se incrementó (AUC = 0.76; IC (95%) = 0,59-0,96; $p < 0.01$) (Fig 26f).

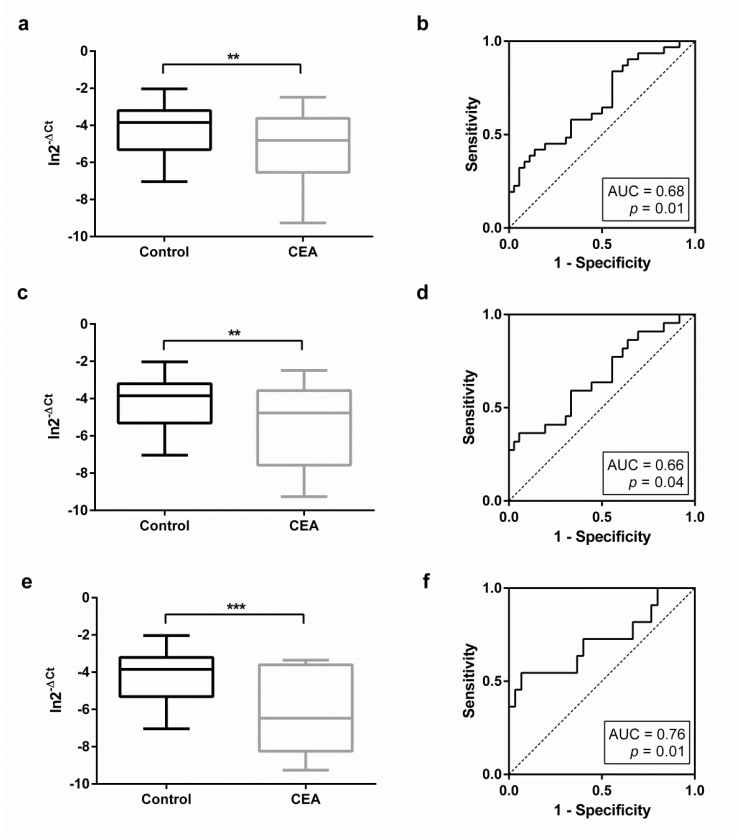


Figura 26: Diagramas de cajas y curva ROC, donde se muestra la expresión sérica relativa del marcador miR-638 en pacientes CEA, CEA sintomáticos y CEA con ictus, en comparación con el grupo control. $\Delta\Delta Ct = (Ct_{miR-638} - Ct_{miR-54})_{pacientes} - (Ct_{miR-638} - Ct_{miR-54})_{control}$. Los niveles circulantes de miR-638, evaluados por RT-qPCR, están infraexpresados en pacientes con CEA (n = 31) (**Fig 26a**), y también en los subgrupos de pacientes CEA sintomáticos (n=22) (**Fig 26c**), y en los pacientes CEA con accidente cerebrovascular (n = 11) (**Fig 26e**), comparados con individuos no CEA control (n=36) ($p < 0,01$; $p < 0,001$). $Ln2^{-\Delta Ct}$, los valores de miR-638 fueron normalizados con cel-miR-54, transformados en forma lineal usando la fórmula $2^{-\Delta Ct}$. La línea negra gruesa dentro de las cajas indica la mediana. Las partes superiores e inferiores de las cajas indican el percentil 25 y el percentil 75, respectivamente. Se utilizó el análisis de características (ROC) para determinar la precisión diagnóstica del miR-638 sérico que predice la intervención de CEA para el ictus isquémico de alto riesgo. (**Fig 26b**) Discriminación de pacientes con CEA respecto a individuos control no CEA, área bajo la curva (AUC) 0,68 (0,55 a 0,81). (**Fig 26d**) Discriminación de pacientes CEA sintomáticos respecto a sujetos control no CEA, AUC 0,66 (0,52 a 0,81). (**Fig 26f**) Discriminación de pacientes con CEA debido a ictus isquémico respecto a individuos control no CEA, AUC 0,76 (0,59 a 0,96). En todos los casos, las líneas discontinuas indican la línea de referencia (AUC =0.5).

4.3 Expresión de mir-638 circulante en pacientes CEA asintomáticos.

Por otro lado, la expresión relativa del miR-638 circulante en el subgrupo de pacientes con estenosis carotídea asintomática sometidos a CEA se encontró reducida respecto al grupo control no-CEA, aunque la diferencia no fue significativa debido al limitado tamaño de la muestra del subgrupo asintomático CEA (n=9). Curiosamente, los niveles séricos de miR-638 mostraron una distribución bifásica entre los pacientes asintomáticos CEA, que resultó ser estadísticamente significativa ($p < 0,016$).

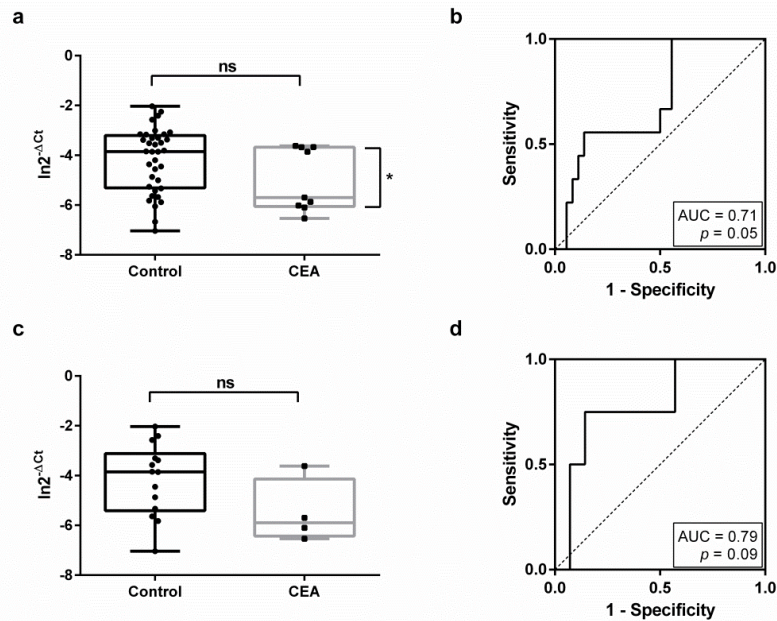


Figura 27: Diagrama de cajas y curva ROC donde se muestra la expresión sérica relativa del marcador miR-638 en subgrupo de pacientes CEA asintomáticos, en comparación con el grupo control. $\Delta\Delta Ct = (Ct_{miR-638} - Ct_{miR-54})_{pacientes} - (Ct_{miR-638} - Ct_{miR-54})_{control}$. Niveles séricos y precisión diagnóstica de miR-638 en el subgrupo de pacientes CEA asintomáticos en comparación con el grupo control no CEA. Los niveles séricos de miR638 evaluados por RT-qPCR muestran niveles infra-expresados en pacientes asintomáticos con CEA (n=9) en comparación con los controles no CEA (n=36) (Fig 27a) y en pacientes asintomáticos con CEA con alto riesgo cardiovascular (SCORE > 5) (n = 4) en comparación con los individuos no CEA control con alto riesgo cardiovascular (n=14) (Fig 27c). $\ln 2^{-\Delta Ct}$, niveles de miR-638 en relación con los de cel miR-54, transformados en forma lineal usando la fórmula $2^{-\Delta Ct}$. La línea negra gruesa dentro de las cajas indica la mediana. Las partes superiores e inferiores de las cajas indican el percentil 25 y el percentil 75, respectivamente. En todos los casos, las líneas discontinuas indican la línea de referencia (AUC = 0.5).

Encontramos también una correlación inversa significativa entre los niveles de miR-638 circulantes y los pacientes asintomáticos que presentan al menos dos de los tres tradicionales factores de riesgo vascular: el tabaquismo, la diabetes y la enfermedad vascular periférica ($r_{bs} = -0,693$; $p < 0.039$). Además, el miR-638 circulante demuestra que existe una buena eficacia discriminatoria entre el subgrupo CEA asintomático y el grupo de control no-CEA (AUC = 0,71; IC (95%) = 0,53 – 0,89; $p = 0,05$).

Por otra parte, el miR-638 sérico correlacionó negativamente con la aparición del ictus, tabaquismo, presencia de patología bilateral isquémica, enfermedad de las arterias coronarias y el tratamiento del colesterol. Por el contrario, el miR-638 sérico correlacionó positivamente con los niveles de triglicéridos séricos, aunque la correlación se perdió cuando los pacientes con ictus hemorrágico (n=6) fueron excluidos del análisis (Tabla 37).

Por último, mediante regresión logística, se confirmó el miR-638 circulante como biomarcador potencial predictivo independiente de placas vulnerables y, por tanto, del riesgo de accidente cerebrovascular en el grupo de pacientes CEA y en los correspondientes subgrupos sintomáticos e ictus isquémico, excepto en el reducido subgrupo de pacientes asintomáticos (Tabla 38).

Cabe señalar que los valores representados en la Tabla no incluyen a los datos de enfermedad de las arterias coronarias y fibrinógeno, no utilizados en el modelo debido a problemas de estimación de los errores estándar.

Correlación de Spearman			
hsa-miR-638			
Variable		ρ	<i>P value</i>
Edad (años)		0.040	0.746
Fibrinogeno (g/l)		0.000	0.998
Colesterol total (mmol/l)		0.029	0.818
LDL-C (mmol/l)		0.068	0.583
HDL-C (mmol/l)		0.224	0.068
TG (mmol/l)		0.339	0.005
ESR (mm/h)		0.030	0.812
WBC x 10⁶/l		0.058	0.641
Creatinina (mg/dl)		0.024	0.851
SBP (mm Hg)		0.038	0.759

Correlación biserial			
hsa-miR-638			
Variable		<i>r_{bs}</i>	<i>P value</i>
Sexo		0.147	0.234
Fumadores		-0.299	0.014
Dislipidemia		-0.156	0.207
HTA		-0.115	0.352
Diabetes		0.066	0.595
EVP		-0.087	0.484
CAD		-0.242	0.049
Ictus		-0.292	0.016
Grado de estenosis de la arteria carótida contralateral > 50%		-0.313	0.011
Tratamiento antiplaquetario		-0.205	0.101
Tratamiento de SBP		-0.236	0.054
Tratamiento hipolipemiante		-0.331	0.007

Tabla 37: Correlación de los niveles séricos de miR-638 con parámetros clínicos y factores de riesgo vascular en la población de estudio, CAD: enfermedad de las arterias coronarias; HDL-C: lipoproteínas de alta densidad; HTA: hipertensión arterial; LDL-C: lipoproteínas de baja densidad; EVP: enfermedad vascular periférica; TG: triglicéridos; WBC: recuento de leucocitos; ESR: tasa de sedimentación eritrocítica; SBP: presión arterial sistólica. Texto en negrita: valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

Variables	OR	CI 95%	P value	OR* Ajustado	CI 95%	P value
Todos los pacientes	0.64	0.45-0.89	0.011	0.62	0.41-0.88	0.013
Pacientes sintomáticos	0.65	0.45-0.90	0.015	0.63	0.42-0.90	0.016
Pacientes Ictus	0.50	0.29-0.77	0.004	0.44	0.23-0.71	0.003
Pacientes asintomáticos	0.60	0.32-1.07	0.097	0.61	0.32-1.08	0.102
Pacientes con SCORE >5	0.51	0.26-0.84	0.020	0.51	0.24-0.87	0.032

Tabla 38: Asociación entre el miR-638 sérico de pacientes CEA por regresión logística multivariada OR: Odds ratio; IC (95%): intervalo de confianza del 95% para la odds ratio; *p*: significación estadística. (*p* <0.05).

4.3.1 La evaluación sistemática del riesgo coronario (SCORE) aumenta la precisión de miR-638 circulante para la predicción vulnerable de la placa carotídea en individuos de alto riesgo cardiovascular.

Dado que el CAD se correlacionó significativamente con la disminución de los niveles séricos de miR-638, se evaluaron los niveles en suero de miR-638 en los individuos de alto riesgo cardiovascular utilizando el modelo de predicción SCORE. Se ha aplicado el modelo en dos grupos con un SCORE > 5; *n* = 12 del grupo CEA, y *n* = 14 del grupo de control no-CEA) para observar si mejoraría su precisión diagnóstica.

Un aumento de la incidencia de ictus esquemático en pacientes con CEA fue el único parámetro clínico significativamente diferente entre subgrupos CEA de alto riesgo cardiovascular en comparación con el grupo control no CEA. Confirmamos que los niveles séricos de miR-638 fueron significativamente menores en el subgrupo CEA + SCORE > 5 (*n*=12) (Fig 28A), en el subgrupo sintomático CEA + SCORE > 5 (*n*=8) (Fig 28C) y en el subgrupo CEA + SCORE > 5 (*n*=7) (Fig 28E), comparado con el grupo sin CEA + SCORE > 5 (*n*=14) (***p* <0.008, *p* <0.009 y *p* <0.003** respectivamente). Una vez más, la diferencia en los niveles de miR-638 en el suero entre el subgrupo asintomático CEA + SCORE > 5 (*n*=4) y el subgrupo no CEA control + SCORE > 5 no fue significativa, probablemente debido al tamaño reducido del CEA + SCORE asintomático > 5 (Fig. 27C). También se estratificó el análisis ROC de los niveles de miR-638 circulante para evaluar la sensibilidad y especificidad de la placa vulnerable y

la predicción del riesgo de accidente cerebrovascular entre los subgrupos descritos anteriormente con SCORE > 5 y se obtuvo una mejor precisión diagnóstica (CEA + SCORE > 5 subgrupo vs no CEA control + SCORE > 5 subgrupo: AUC = 0,79; IC95% = 0,61-0,97, $p < 0,01$ (Fig. 28B), sintomático CEA + SCORE > 5 subgrupo frente a no CEA control + SCORE > 5 subgrupo: AUC = 0,79; IC95% = 0,59-1,00; $p < 0,02$ (Fig. 28D), ACV CEA + SCORE > 5 subgrupo frente a noCEA + SCORE > 5 subgrupo: AUC = 0,85, CI95% = 0,66-1,04; $p < 0,01$ Fig. 28F). Subgrupo asintomaticos CEA + SCORE > 5 subgrupo vs no CEA control + SCORE > 5 subgrupo: AUC = 0,79, CI95% = 0,53-1,04; $p = 0,09$) (Fig. 27D).

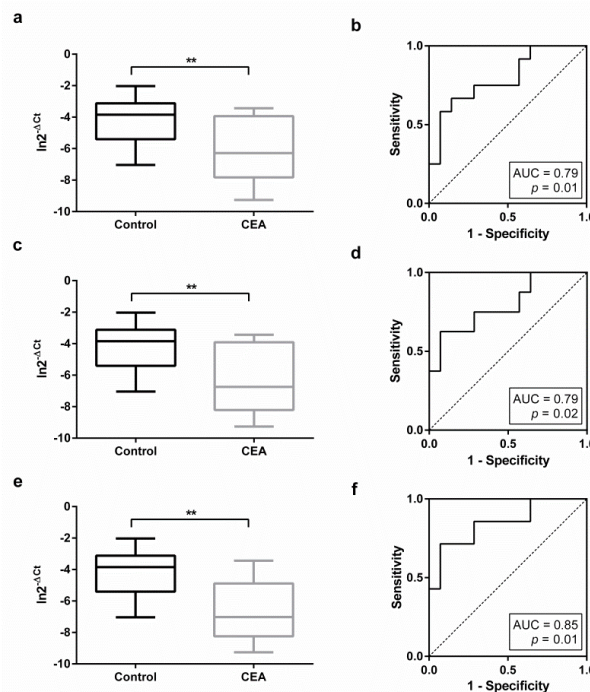


Figura 28: Diagrama de cajas y curva ROC donde se muestra la expresión sérica relativa del marcador miR-638 en pacientes CEA, CEA sintomáticos y CEA con ictus, en comparación con el grupo control en pacientes con elevado riesgo cardiovascular (SCORE > 5). $\Delta\Delta Ct = (Ct_{miR-638} - Ct_{miR-54})_{pacientes} - (Ct_{miR-638} - Ct_{miR-54})_{control}$.

4.3.2 Validación del miR-638 circulante como biomarcador pronóstico en pacientes CEA de seguimiento a largo plazo

Con el fin de analizar la capacidad predictiva del miR-638 en cuanto a la eficacia de la intervención CEA y posterior tratamiento farmacológico a largo plazo, se verificó si la concentración sérica del miR-638 se había incrementado en sujetos intervenidos con aterosclerosis carotídea elevada (n=9). Así, se analizó la evolución de dichos pacientes antes de la intervención (tiempo 0) y a los 5 años de la intervención. Los análisis del miR-638 fueron realizados también mediante la técnica RT-qPCR TaqMan, y los valores Ct de amplificación se normalizaron evaluando el miRNA exógeno cel-miR-54. Los resultados demuestran una sobre-expresión significativa de miR-638 en los individuos tratados después de 5 años con respecto a los valores obtenidos antes de someterse a la intervención CEA ($p < 0.04$), con una buena capacidad discriminadora (AUC = 0.79; IC (95%) = 0,57 – 1,01, $p < 0.04$) (Figura 29). Por lo tanto, los niveles circulantes de miR-638 podrían tener valor pronóstico de progresión de la enfermedad aterosclerótica en pacientes CEA y, en consecuencia, para la prevención secundaria del ictus. Además, el miR-638 podría constituir un biomarcador potencial para el pronóstico de placa carotídea asintomática en progresión.

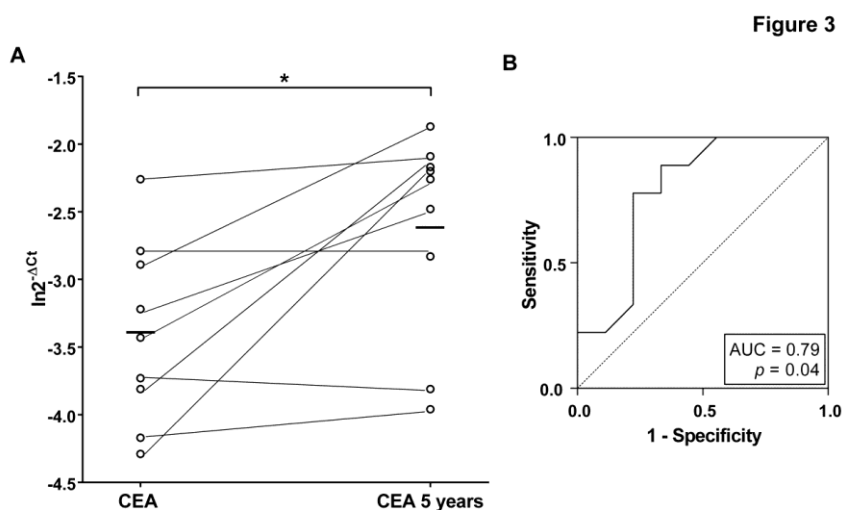


Figura 29: Potencial pronóstico de miR-638 circulante en el seguimiento a largo plazo de pacientes CEA. Expresión del miR-638 circulante en sueros de pacientes post CEA con aterosclerosis carotídea avanzada. (Fig. 29A) Comparación de los niveles séricos de miR-638 entre los 0 y los 5 años después de la intervención en pacientes CEA (n = 9) ($p < 0.05$). (Fig.29B) Análisis (ROC) de miR-638 en suero. Área bajo la curva (AUC) 0,79 (CI_{95%}= 0,57 – 1,01).

DISCUSIÓN

5. Discusión

Nuestro objetivo principal fue evaluar el potencial de los miRNAs circulantes como biomarcadores sensibles y específicos para el diagnóstico precoz de enfermedades y trastornos de origen vascular como PE y el ictus, ya sea por sí mismos o, en modelos predictivos, si se pueden combinar con otras variables biométricas como los marcadores ecográficos, en algoritmos multivariados.

5.1 Discusión del estudio 1:

La predicción precoz de la PE es uno de los objetivos más importantes en la medicina materno-fetal debido a la falta de una terapia específica para este trastorno severo, que afecta a la madre y, consecuentemente, al feto, requiriendo frecuentemente parto prematuro (363).

El equilibrio angiogénico alterado, la inflamación sistémica y la hipoxia e isquemia placentaria, entre otros, contribuyen a la patogénesis de la PE (364). Los esfuerzos actuales pretenden combinar las características maternas y los marcadores biofísicos y bioquímicos, evaluados en el primer trimestre, en algoritmos multivariados para poder estimar el riesgo de PE con niveles de fiabilidad de utilidad clínica (365-367)

En la actualidad, no existen técnicas fiables reconocidas para identificar en mujeres gestantes aquellas susceptibles de presentar durante el curso del embarazo trastornos que podrían poner en peligro tanto su vida como la del feto. La mayoría de las mujeres de segundo o tercer trimestre de gestación que están controladas en las unidades obstétricas no presentan signos o síntomas clínicos emergentes durante el primer trimestre de gestación.

La detección precoz y la selección de las mujeres gestantes que podrían desarrollar una situación de riesgo o complicaciones a lo largo del embarazo representarían una oportunidad para evaluar nuevas estrategias de intervención para limitar los efectos adversos de la PE y la eclampsia.

La razón fundamental para el desarrollo de los biomarcadores de detección precoz de las complicaciones asintomáticas en el embarazo no es sólo para la gestión contemporánea del embarazo, sino también para garantizar la calidad de vida tanto de la madre como de su feto, tanto durante el curso de la gestación como durante la vida post-gestacional. Estudios recientes ponen de manifiesto la utilidad putativa de los miRNAs de fluidos biológicos en el diagnóstico de las fases asintomáticas de la enfermedad y en la monitorización del tratamiento. Sin embargo, se desconoce el perfil de miRNAs diferencialmente regulados en el primer trimestre de gestación (es decir, de las 6 a las 12 semanas).

Uno de los objetivos generales de esta Tesis fue caracterizar los miRNAs como biomarcadores potenciales en la fase precoz gestacional y sus variaciones asociadas a parámetros clínicos y factores de riesgo. Así, se analizó la abundancia de los miRNAs circulantes en el suero materno durante el primer trimestre del embarazo en mujeres con gestaciones normales (sin ningún tipo de complicación) y en mujeres pre-sintomáticas que posteriormente desarrollaron PE, diagnosticadas en el segundo trimestre del embarazo.

Los trastornos hipertensivos del embarazo afectan al 2-7% de todas las gestaciones a nivel mundial. Estos trastornos incluyen la hipertensión inducida por el embarazo (PIH), la PE y el síndrome HELLP.

La PE se subdivide habitualmente en fase temprana (parto antes de las 34 semanas de gestación) y tardía (parto después de las 34 semanas de gestación). En un gran estudio poblacional, la tasa general de PE fue del 3,1%, y las tasas de PE temprana y de aparición tardía fueron de 0,4% y 2,7%, respectivamente (368). Dichos resultados se confirmaron en un estudio muy reciente del grupo colaborador, donde a partir de 4.203 mujeres gestantes analizadas, 169 (4%) desarrollaron PE, y 141 mujeres gestantes fueron diagnosticadas de PE tardía (3.4%), mientras que 28 mujeres fueron diagnosticadas de PE temprana (0.7%) (368).

Uno de los objetivos más importantes en la medicina materno-fetal es la predicción de la PE en la etapa asintomática, ya que debido a la falta de un tratamiento específico para este trastorno, que afecta a la madre y, en consecuencia, al feto, a menudo se requiere un parto prematuro (65).

El desafío radica en el diagnóstico precoz cuando no hay signos clínicos aparentes. Así, podría iniciarse una intervención temprana y la mortalidad y morbilidad maternas

podrían reducirse significativamente, incluso en los países en desarrollo. Hasta la fecha, se han propuesto varios biomarcadores prometedores, que podría utilizarse para realizar un diagnóstico precoz (369).

Por tanto la obtención de una prueba de detección fiable, podría diagnosticar la PE en las mujeres durante sus primeras etapas de embarazo, lo cual facilitaría un mejor control de las mujeres en riesgo, así como la identificación de aquellas mujeres cuyo tratamiento profiláctico les convendría y beneficiaría (363). De hecho, una terapia muy económica y simple podría salvar vidas si la PE pudiera identificarse en las primeras fases de la gestación. Por ejemplo, una dosis baja de ácido acetil salicílico (AAS) administrada antes o en la semana 16 de la gestación, puede reducir en un 89% la incidencia de parto pre-término (menor de 37 semanas completas) (370).

Recientes líneas de evidencia sugieren la existencia de dos formas de PE basándose en diferencias relacionadas con insuficiencia placentaria, manifestaciones clínicas, y participación fetal, (39, 371-373).

La primera forma, de aparición temprana, se presenta y detecta antes de las 34 semanas de gestación, y es la forma más estudiada, por lo que mediante pruebas de detección en el primer trimestre se puede lograr una mayor sensibilidad de detección (365-367,374). Sin embargo, es poco probable que la PE se detecte en una fase temprana a partir de un único parámetro predictivo y con precisión suficiente para ser clínicamente útil, debido a su heterogeneidad, fisiopatología multifactorial y a la falta de marcadores específicos.

Por lo tanto, estudios actuales proponen combinar características maternas, biofísicas y marcadores bioquímicos en el primer trimestre, en algoritmos multivariados, de modo que el riesgo de PE pueda ser detectado con una eficacia de utilidad clínica (365-367, 375). Ya se han presentado varios estudios que constatan la importancia de los parámetros biofísicos, como la presión sanguínea materna y el Doppler de las AUt (365, 366, 376,377).

Por otra parte, se han evaluado una gran cantidad de diferentes marcadores bioquímicos: productos de origen fetal y placentario, marcadores de insuficiencia renal o daño endotelial, marcadores de estrés oxidativo, angiogénicos y anti-angiogénicos, entre otros (387). Sin embargo, las pruebas no son coherentes, y los estudios que evalúan nuevos biomarcadores, como los miRNAs, son altamente recomendables para

clarificar mejor la compleja etiopatogenia de la enfermedad y, por consiguiente, la mejor manera de predecir (379).

Por lo tanto, en el caso de los miRNAs circulantes como biomarcadores, para un uso clínico rutinario, la estandarización técnica de la preparación de las muestras y los métodos de perfilado son importantes. El primer factor que puede afectar a la reproducibilidad de los resultados es la calidad del RNA aislado de muestras de sangre humana.

En un ensayo comparativo preliminar confirmamos la superior eficacia del kit de extracción de miRNA “Qiagen miRNeasy® Mini Kit” respecto al kit “mirVana™ PARIS™” para muestras de sangre humana (datos no mostrados). El suero contiene miRNAs estables, pequeños RNAs no codificantes con importantes funciones de regulación de la proliferación celular, la apoptosis y la comunicación celular, los cuales pueden ser identificados y cuantificados. Ello los convierte en biomarcadores ideales como candidatos no invasivos para el diagnóstico y pronóstico precoz (316,309).

Por otra parte, una expresión desregulada de miRNAs ha sido recientemente vinculada a complicaciones en el embarazo, tales como la PE (335). Por lo tanto, el objetivo fue evaluar el potencial de los miRNAs circulantes como biomarcadores sensibles y específicos para el diagnóstico precoz de PE, ya sea por sí mismos o en modelos de predicción cuando se combinan con otras variables biométricas, como marcadores ecográficos, en algoritmos multivariados (335,380).

En este contexto, para la predicción precoz de la PE temprana, ninguno de los miRNAs planteados como potenciales biomarcadores fue de ayuda para confirmar o excluir el desarrollo posterior de una PE. No obstante, este estudio sugiere que los miRNAs circulantes en suero materno no son útiles para la predicción de PE en fase temprana. De hecho, los niveles circulantes de miRNAs no se distinguen significativamente entre las mujeres que desarrollaron PE temprana, y los embarazos sin complicaciones cuando son evaluados en el primer trimestre de gestación mediante la tecnología de OpenArray, de alto rendimiento y fiable, que permite analizar una gran cantidad de miRNAs con una capacidad comparable a un microarray, y con la precisión y especificidad de la qPCR. La tecnología de OpenArray integra una alta densidad de ensayos de PCR con volúmenes de nl, permitiendo hasta 3.072 ensayos en PCRs en tiempo real en un solo experimento (381).

Por el contrario, tres estudios de alto rendimiento realizados recientemente también han evaluado los perfiles de expresión de miRNAs circulantes en muestras de suero de mujeres embarazadas con y sin PE, y reveló los miRNAs que se desregulaban en el suero/plasma de embarazos con PE (341, 350,382). Sin embargo, estos estudios se realizaron utilizando muestras de suero/plasma extraídas en una etapa avanzada de gestación (tercer trimestre). Por otra parte, Yang et al y Li et al, que pertenecen al mismo grupo de investigación, establecieron una prueba de concepto sobre la viabilidad, exhaustividad y sensibilidad de la secuenciación de última generación, aunque el escaso número de muestras analizadas en ambos estudios (Estudio 1: grupo control, n = 1; grupo PE leve, n = 2; grupo PE severa, n = 2; Estudio 2: grupo control, n = 4; grupo PE leve, n = 4; grupo PE severa, n = 4) plantea dudas sobre la fiabilidad global de sus datos para el diagnóstico/pronóstico de la PE.

Alternativamente, un artículo utilizando microarrays (341), informó que entre 821 miRNAs humanos detectados por microarrays, sólo 15 miRNAs se encontraron expresados diferencialmente y presentaron $FC \geq 2$ (y solamente dos de ellos con $FC > 4$) en el plasma de mujeres con PE severa.

Por lo tanto, dichos estudios respaldan nuestros resultados. Por tanto, la carencia de poder discriminador de los miRNAs séricos como biomarcadores potenciales durante la fase temprana de la PE o, mejor dicho, durante la fase preclínica de la PE no se debe a una sensibilidad limitada de las tecnologías de análisis de miRNA empleadas, sino que podría ser el resultado de la propia etiología de la PE.

De hecho, los síntomas clínicos ostensibles de la PE no se desarrollan hasta la semana 20 de gestación. En consecuencia, nuestro estudio sugiere que los miRNAs circulantes pueden ser un evento relativamente tardío en el desarrollo de la PE. Aunque el remodelado vascular uterino anormal es una característica de la patogénesis de la PE, lo que lleva a una reducción de la perfusión placentaria durante el embarazo temprano. Tal vez el grado de estrés y los daños infligidos a los trofoblastos y a las ECs por una respuesta inflamatoria incrementada debido a las características del ambiente materno, la predisposición genética y/o la mala autorregulación inmunológica sean todavía escasos para inducir niveles anormales diferenciales de los miRNAs circulantes durante el primer trimestre del embarazo.

Por lo tanto, el aumento de la disfunción placentaria puede estimular la liberación gradual de los mediadores de la placenta (incluyendo miRNAs) en la circulación

materna, lo que daría lugar a una lesión vascular materna generalizada y a un mayor incremento en los perfiles diferenciales de miRNAs circulantes solamente en etapas más avanzadas de la gestación.

Curiosamente, aunque la abundancia diferencial de 7 miRNAs circulantes, descubiertos en el análisis OpenArray y escogidos para la posterior validación entre PE y embarazos sin complicaciones, resultó bastante reducido. La mayoría de ellos son miRNAs polivalentes que han sido implicados claramente en el proceso de angiogénesis (miR-125b, miR-143, miR-942) (382-385), la inflamación (miR-126 #, miR-127, miR-192, miR-221), la hipoxia/isquemia (miR-127) (386) y la migración celular asociada a la remodelación vascular (miR-125b, miR-143, miR-127) (387-389), y algunos de ellos se han encontrado alterados en placentas de embarazos con PE (miR-126#,miR-192) (335). Estos dos miRNAs circulantes (miR-221, miR-125b) se han encontrado diferencialmente regulados en muestras de PE mediante secuenciación de alto rendimiento (SOLiD del inglés Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection), (338,350) y en análisis de perfiles de microarrays (341).

Por otra parte, se ha encontrado en pacientes con PE una correlación negativa entre los niveles de miR-942 y la presión arterial materna, y entre los niveles miR-143 y el IPm-AUt, de acuerdo a sus funciones, reveladas recientemente, en la regulación de la presión arterial y la función vascular (385, 390), lo cual podría ser sugestivo de utilidad como marcadores pronósticos. De hecho, el equilibrio angiogénico alterado, (391,392), la inflamación sistémica y la hipoxia (393) e isquemia placentarias, entre otros, contribuyen a la patogénesis de la PE (394,395).

Sin embargo, no hemos podido confirmar la expresión diferencial de estos 7 miRNAs en muestras individuales mediante RT-qPCR TaqMan, un ensayo diseñado para detectar y cuantificar miRNAs maduros de manera rápida, específica, precisa y robusta (396).

Para la cuantificación de miRNAs, hay informes contradictorios con respecto a la reproducibilidad de las diferentes tecnologías de perfiles de alto rendimiento. Sin embargo, los resultados obtenidos en nuestro estudio sugieren una correlación entre ambas técnicas, OpenArray y TaqMan RT-qPCR. De hecho, las tendencias (hacia una mayor o menor expresión) de los 7 miRNAs coinciden comparando los resultados obtenidos mediante OpenArray (realizado con muestras agrupadas) con los resultados

obtenidos en los ensayos RT-qPCR TaqMan (realizado con muestras individuales) (397-399).

Después de todo, las pequeñas diferencias en los cambios entre ambas plataformas podrían deberse a variaciones menores en la etapa de la pre-amplificación de cDNA de ambas tecnologías para mejorar la sensibilidad, o podría atribuirse simplemente a los diferentes métodos de normalización empleados, ya que se realizó una normalización global en la etapa de RT-qPCR en la plataforma OpenArray, a diferencia de la plataforma RT-qPCR TaqMan, cuyo normalizador (cel-mir-54) se introdujo en la fase de extracción del RNA total.

De hecho, un reciente análisis de los perfiles de expresión de miRNAs en plasma materno de embarazos con PE en comparación con embarazos normales mediante la plataforma SOLiD, identificó 51 miRNAs expresados diferencialmente, y 4 de ellos fueron validados mediante RT-qPCR TaqMan (350). Por lo tanto, una comparación de las dos plataformas empleadas en el estudio mencionado (secuenciación SOLiD frente a RT-qPCR TaqMan) reveló que la expresión diferencial de estos 4 miRNAs validados se redujo significativamente en la plataforma RT-qPCR TaqMan respecto a la obtenida en la plataforma de secuenciación SOLiD, de forma paralela a la reducción observada en nuestro estudio entre el OpenArray y la plataforma TaqMan RT-qPCR.

Entre las limitaciones del análisis actual reconocemos que este fue un estudio de casos y controles anidados incluyendo un pequeño número de pacientes con PE. Sin embargo, creemos que es poco probable que el aumento del tamaño de la muestra hubiera dado lugar a diferencias notables en los resultados. Además, se realizó el estudio con una población mediterránea de bajo riesgo. Todavía no podemos excluir que en los estudios de otras poblaciones se puedan obtener diferentes resultados. Finalmente, en contraste con las tecnologías de NGS, el número fijo de miRNAs representado en plataformas basadas en matrices tales como el sistema OpenArray de alto rendimiento, podría pasar por alto miRNAs circulantes no representados (por ejemplo, isomirs) o miRNAs inconsistentemente hibridados / amplificados, aunque estuvieran diferencialmente abundantes de manera genuina, influyendo el resultado del presente estudio.

En resumen, el desarrollo de un procedimiento de detección no invasiva y eficiente para identificar a mujeres con riesgo de PE sería beneficioso para intervenciones profilácticas/preventivas. Utilizando microarrays de miRNA y análisis de RT-qPCR en

tiempo real, nuestro estudio demuestra que el perfil de miRNAs circulantes en muestras de suero de los embarazos tempranos con PE no es significativamente diferente en comparación con el de los embarazos normales. Esto sugiere una limitada relevancia fisiopatológica funcional y predictiva de los miRNAs circulantes durante la fase precoz de la enfermedad.

5.2 Discusión del estudio 2:

El segundo objetivo de esta Tesis doctoral fue analizar la utilidad de miRNAs circulantes como biomarcadores de diagnóstico/pronóstico de otra complicación vascular de gran impacto a nivel de la salud pública: la enfermedad cerebrovascular (Ictus).

La aterosclerosis, principal causa del ictus, es un proceso inmune-inflamatorio crónico. La inflamación juega un papel clave en la generación de la isquemia cerebral y de las serias complicaciones que ésta conlleva en los pacientes con ictus (400,401).

Existen varios tipos de ictus, que, según la naturaleza de la lesión producida, cursan con isquemia cerebral o hemorragia cerebral, siendo la primera la forma dominante, que representa el 85% de todos los accidentes cerebrovasculares (121).

Así, la identificación de biomarcadores inflamatorios fiables capaces de prevenir el desarrollo de esta enfermedad en individuos asintomáticos, o su prognosis en pacientes que ya la han sufrido, representa un objetivo clínico primordial. Por otra parte, muy recientemente se ha demostrado que tanto el suero como otros fluidos corporales contienen cantidades apreciables de miRNAs estables derivados de diferentes tejidos / órganos (402,403). Además, se ha constatado que los niveles de miRNA en suero son estables, reproducibles, y consistentes entre individuos.

Aquí analizamos las características clínicas y el pronóstico de los pacientes que se sometieron a la terapia de endarterectomía carotídea (CEA) en la unidad de ictus. Los pacientes seleccionados para CEA mostraban una estenosis severa. Los factores de riesgo fueron en su mayoría similares entre los grupos, a excepción del tabaquismo, más frecuente en la población del subgrupo de ictus isquémico, y la enfermedad de las arterias coronarias, más frecuente en el subgrupo de aterosclerosis carotídea avanzada asintomática. Sin embargo, los pacientes CEA sintomáticos y los CEA asintomáticos, no mostraron ninguna diferencia estadísticamente significativa en cuanto a dislipidemia.

Tras la ruptura de una placa aterosclerótica se desencadena una respuesta hemostática que podría conducir a ictus isquémico. La evaluación del riesgo de las enfermedades cardiovasculares basadas en el análisis de biomarcadores es un requisito primordial para estratificar a los individuos de alto riesgo y para el tratamiento óptimo de los pacientes.

Las concentraciones plasmáticas de fibrinógeno activado y colesterol total en pacientes CEA debido a la estenosis carotídea, respecto al grupo control no CEA, fueron similarmente significativos. El fibrinógeno es un potente predictor de accidente cerebrovascular. (404-406).

En la literatura existen muchos estudios meta-análisis de eventos cardiovasculares en poblaciones sin enfermedad cardiovascular preexistente (407). En dichas poblaciones, se asoció un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular a los marcadores relacionados con hemostasia, inflamación y lípidos. Estos incluyen: fibrinógeno (HR: 2,33, IC del 95%: 1,91 a 2,84) (405), colesterol (HR: 0,44; IC del 95%: 0,42-0,48), y lipoproteínas de alta densidad (HDL) (HR: 1,83; IC del 95%: 1,65 a 2,03) (408).

El 30% de los ictus isquémicos son causados por el desarrollo de una placa aterosclerótica en las arterias carótidas. La evidencia para el tratamiento mediante la intervención quirúrgica endarterectomía carotídea (CEA) en pacientes sintomáticos con estenosis carotídea superior al 70% es convincente, como se ha demostrado en varios estudios (409,410).

La aterosclerosis carotídea es común en pacientes con accidente cerebrovascular isquémico y accidente isquémico transitorio (TIA), y representa el 4-12% de los casos. La prevalencia de la estenosis carotídea asintomática en los países desarrollados fue 2-8% en personas con factores de riesgo, y éstos eran dos veces más propensos a desarrollar accidente cerebrovascular isquémico agudo. (411).

Muchos cirujanos vasculares y neurólogos prefieren practicar seguimiento a sus pacientes después de la CEA porque asumen que un número considerable de pacientes desarrollará la reestenosis (412), y la reestenosis aumenta el riesgo de accidente cerebrovascular (413).

Los miRNAs circulantes son estables y se han revelado como reguladores vitales en muchos procesos fisiológicos y patológicos. Numerosos estudios sugieren que los miRNAs podrían convertirse en excelentes biomarcadores de diferentes enfermedades humanas (414).

En este estudio proponemos que la expresión alterada de miR-638 puede modular la cascada de expresión de diferentes genes diana que desempeñan un papel importante en la respuesta inflamatoria aterosclerótica. Así, hemos tratado de examinar los genes

relevantes en patología cerebrovascular regulados por miR-638 a partir de la base de datos SigCS y el análisis FatiGO (Tabla 36).

Recientes estudios han demostrado que el miR-638 podría desempeñar un papel relevante en la regulación de varios genes diana (por ejemplo, PLD1, CDK2, p53, PTEN, BRCA1, Sox2, SP2, SMCA1, TSPAN1 y VEGF) implicados en diversos procesos celulares, incluyendo la proliferación celular, la detención del ciclo celular, la apoptosis, la diferenciación, la reparación del DNA, la tumorigénesis y la neurogénesis (415-425).

Es importante destacar que, en el presente trabajo, se ha observado mediante el análisis FatiGo que la apoptosis es una de las vías más significativamente enriquecidas, lo que sugiere que la activación de cascadas de señalización de apoptosis desempeña un papel importante en los pacientes con accidente cerebrovascular isquémico. Un ataque isquémico en el cerebro induce daño celular a causa de la obstrucción parcial o total del flujo sanguíneo, que puede progresar a muerte celular (426-428).

Por tanto, la lesión cerebral induciría varios genes, activando cascadas moleculares a causa de la muerte celular necrótica en el núcleo anóxico, que a su vez provocaría apoptosis en la zona de penumbra (429).

Por otra parte, se observó que los genes diana de miR-638 estarían implicados en diferentes vías, como la vía de señalización de calcio, sinapsis glutaminérgica, y guiado de los axones, entre otros señalados en la Tabla 36. Además, nuestro análisis bioinformático ha revelado importantes objetivos de miR-638, como el factor de transcripción MAFB, un nuevo regulador de la inflamación del tejido adiposo humano cuyos polimorfismos se han asociado con un mayor riesgo de enfermedad coronaria y accidente cerebrovascular isquémico (430) y con las vías de transducción de señales implicadas en el accidente cerebrovascular, como la señalización NF- κ B, la señalización de NO, la señalización SODD / TNFR1, y las vías del metabolismo de los eicosanoides.

Nuestros estudios describen por primera vez la asociación de miR-638 circulante en suero con la enfermedad aterosclerótica de la arteria carótida.

Por lo tanto, utilizando el procedimiento de CEA como criterio indirecto de valoración, hemos demostrado que los niveles de expresión de miR-638 circulantes en suero se

correlacionan inversamente con el grado de estenosis de la arteria carótida en la enfermedad aterosclerótica.

Hay una necesidad de identificar los parámetros de pronóstico y diagnóstico clínico analíticos y de imágenes asociadas con un mayor riesgo de accidente cerebrovascular en fase temprana / tardía en estos pacientes (431).

Por el contrario, el tratamiento de la enfermedad carotídea asintomática para la prevención primaria de accidentes cerebrovasculares es muy controvertido (432,433) y aunque la CEA es considerada aceptable en pacientes con estenosis asintomática de alto grado, una esperanza de vida razonable, y riesgo perioperatorio de menos del 3% (435,436), un biomarcador eficaz, no invasivo, sería muy valioso para informar las mejores prácticas médicas para la enfermedad de la arteria carótida asintomática.

El miR-638, se encuentra robustamente expresado en VSMCs, aunque el papel conciso de miR-638 en la fisiopatología vascular es en gran parte desconocido. Se ha demostrado que este miRNA inhibe la proliferación de VSMCs humanas inducidas por factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) y la migración a través de la señalización ciclina D/NOR1 (358). Dicha vía está implicada en la regulación de diferentes procesos, como proliferación, diferenciación, metabolismo (437,438) y apoptosis. (428,439).

Se ha demostrado también la transferencia mediada por vesículas extracelulares que contienen miRNAs ateroprotectores, como miR-143/145, entre las ECs y las VSMCs, proporcionando evidencia convincente de que el transporte intercelular de miRNAs puede influir en la aterosclerosis (440). La disminución de la expresión de miR-638 también se ha asociado con la hipertensión (441). Por otra parte, miR-638 podría regular la expresión de genes relacionados con las vías de la respuesta al estrés oxidativo y el envejecimiento (442), de relevancia en el proceso de aterogénesis.

Hemos demostrado en este estudio la presencia de miR-638 en las ECs y su infrarregulación por estímulos pro-inflamatorios, a diferencia de miR-155, un regulador de retroalimentación negativa en la inflamación endotelial (359) que fue sobrerregulado en estas condiciones. Conjuntamente, los hallazgos anteriores predicen un papel relevante del miR-638 en la fisiopatología del ictus y apoyan el análisis del miR-638 circulante como biomarcador no invasivo para la enfermedad de la arteria carótida que conduce a un accidente cerebrovascular.

Encontramos también niveles reducidos de miR-638 sérico en pacientes con estenosis de alto grado sometidos a CEA, que se mantuvieron después de estratificar éstos en sintomáticos y asintomáticos, en base a los síntomas neurológicos. Por otra parte, los niveles séricos de miR-638 correlacionaron inversamente con varios factores de riesgo vascular, incluyendo la ocurrencia de accidente cerebrovascular, CAD, el tabaquismo y la presencia de patología bilateral (>50% de estenosis contralateral), y con el tratamiento del colesterol. Ictus isquémico y CAD comparten varios factores de riesgo y muchos aspectos de su fisiopatología subyacente (443).

Por lo tanto, nuestro estudio indica que los niveles circulantes de miR-638 podrían constituir un biomarcador útil para la identificación de la placa aterotrombótica vulnerable y la predicción del riesgo de ictus isquémico en pacientes con estenosis de alto grado y alto riesgo de enfermedad cardiovascular, logrando su mayor precisión diagnóstica en esta cohorte.

La normalización de los datos es un reto importante para el análisis de los miRNA circulantes porque aún no se han descrito genes control endógenos fiables en fluidos biológicos que puedan ser utilizados para la normalización. En nuestro estudio hemos usado el miRNA exógeno cel-miR-54 como normalizador. El uso de un normalizador “spiked-in”, como cel-miR-54, se ha popularizado no sólo para comprobar la purificación del RNA y la calidad de la RT, sino también como control de normalización (307,357, 444-447).

La determinación sérica de miR-638 también podría ser útil para el manejo a largo plazo la monitorización y / o la predicción de resultados después de procedimientos de revascularización carotídea. El subgrupo de pacientes incluidos en nuestro estudio, el cual fue sometido a CEA y se le realizó un seguimiento hasta 5 años después de la intervención, no experimentó ninguna variación significativa en todos los factores de riesgo vascular clásicos analizados excepto para tabaquismo.

Se ha reportado que el dejar de fumar, por sí solo, disminuye sustancialmente el riesgo de apoplejía durante un período de 5 años, en comparación con los fumadores continuados (448,449). Por lo tanto, la determinación del miR-638 sérico fue capaz de discriminar de manera fiable pre-CEA y post-CEA en estos pacientes.

La determinación del miR-638 circulante puede ser menos exigente técnicamente, más rentable y, por lo tanto, ser más susceptible a un cribado rutinario a gran escala de la enfermedad de la arteria carótida que la ecografía dúplex (450). La determinación

conjunta de miR-638, ya sea con factores de riesgo vascular clásicos o con otros potenciales biomarcadores séricos recientemente descritos, tales como otros miRNAs (451) proteínas (452) o micropartículas derivadas de células (453), pueden incrementar aún más la fiabilidad y la precisión de la diagnosis y/o prognosis de accidente cerebrovascular isquémico (454).

CONCLUSIONES

6. Conclusiones

- 1- El perfilado molecular diferencial utilizando la plataforma OpenArray es una herramienta útil para identificar miRNAs circulantes como potenciales biomarcadores no invasivos en patologías agudas o crónicas.
- 2- El cribado de 754 miRNAs ha confirmado la presencia de 63 de ellos (8%) en el suero de mujeres gestantes de primer trimestre, aunque sólo 15 miRNAs (2%) parecen estar diferencialmente, aunque modestamente (rango FC: 0,4-1,4), presentes cuando se comparan gestantes con preeclampsia y gestantes con embarazos no complicados.
- 3- La validación individual de 7 miRNAs, seleccionados a partir del perfilado molecular, mediante RT-qPCR TaqMan (miR-127, miR-942, miR-221, miR-126#, miR-192, miR-143, miR-125b) ha confirmado que ninguno de ellos se encuentra diferencialmente expresado en el suero de gestantes con preeclampsia respecto al suero de gestantes con embarazos no complicados.
- 4- En gestantes con preeclampsia, las correlaciones negativas encontradas entre el miR-942 sérico y la presión arterial materna, y entre el miR-143 sérico y el índice de pulsatilidad Doppler de la arteria uterina sugieren su utilidad potencial como biomarcadores pronósticos.
- 5- Los miRNAs del suero materno analizados durante el primer trimestre de la gestación no parecen tener ningún valor diagnóstico para preeclampsia temprana.
- 6- Análisis bioinformáticos y evidencias experimentales sugieren un papel destacado de miR-638 en inflamación y fisiopatología cerebrovascular.
- 7- Utilizando la revascularización de la arteria carótida (CEA) como punto final sustituto se ha revelado que los niveles séricos de miR-638 se correlacionan inversamente con aterosclerosis de la arteria carótida y estenosis de alto grado.
- 8- Los niveles séricos de miR-638 son significativamente menores en pacientes CEA y, particularmente, en pacientes CEA que han sufrido un ictus, comparado con individuos control con baja o nula estenosis.

- 9-** Los análisis de regresión logística multivariada indican que el miR-638 sérico constituye un predictor independiente de inestabilidad de la placa carotidea.
- 10-** Los niveles séricos de miR-638 pueden constituir un biomarcador no invasivo prometedor asociado con placa aterosclerótica carotidea vulnerable e ictus isquémico, particularmente en individuos con elevado riesgo cardiovascular.
- 11-** Asimismo, el miR-638 sérico podría resultar útil como biomarcador pronóstico, para monitorizar la efectividad del tratamiento médico y/o la aparición de restenosis en pacientes CEA.

Bibliografía

7. Bibliografía

1) Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology, Philadelphia: Elsevier, 8th edition, 2014.

2) Stavitsky AB. The innate immune response to infection, toxins and trauma evolved into networks of interactive, defensive, reparative, regulatory, injurious and pathogenic pathways. *Mol Immunol.* 2007; 44(11):2787–99.

3) Benjamin H. Maskrey, Ian L. Megson, Phillip D. Whitfield, Adriano G. Rossi. Mechanisms of Resolution of Inflammation. A Focus on Cardiovascular Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2011; 31: 1001-1006.

4) Roda JM, Eubank TD. Chapter 2: The cellular component of chronic inflammation. In: Roy S, Bagchi D, Raychaudhuri SP, editors. *Chronic inflammation: molecular pathophysiology, nutritional and therapeutic interventions.* Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group; 2013.p. 21–33.

5) Murakami M, Hirano T. The molecular mechanisms of chronic inflammation development. *Frontiers in Immunology.* 2012; 3:323.

6) René R. S. Packard and Peter Libby. Inflammation in Atherosclerosis: From Vascular Biology to Biomarker Discovery and Risk Prediction. *Clinical Chemistry,* 2008; 54:124–38.

7) Harmon AC, Cornelius DC, Amaral LM, Faulkner JL, Cunningham MW Jr, Wallace K, LaMarca B. The role of inflammation in the pathology of preeclampsia. *Clinical Science.* 2016;130, 409–419

8) Shirai T, Hilhorst M, Harrison DG, Goronzy JJ, Weyand CM. Macrophages in Vascular Inflammation – From Atherosclerosis to Vasculitis. *Autoimmunity.* 2015;48(3):139-151

9) Xia Y, Kellems RE, Is preeclampsia an autoimmune disease? *Clinical Immunology,* 2009;133, (1):1-12

10) Rodríguez-Mañas L, El-Assar M, Vallejo S, López-Dóriga P, Solís J, Petidier R, Montes M, Nevado J, Castro M, Gómez-Guerrero C, Peiró C, Sánchez-Ferrer CF. Endothelial dysfunction in aged humans is related with oxidative stress and vascular inflammation. *Aging Cell.* 2009;8(3):226-38.

11) Gimbrone MA, García-Cardeña G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circulation research.* 2016; 118(4):620-636.

- 12)** V Cachofeiro Ramos, D Sanz-Rosa, N de las Heras Jiménez, E Cediél Gil, M Miana Ortega, V Lahera Juliá. Inflammation, endothelial dysfunction and hypertension. *Hipertensión*. 2004; 21:331-3.
- 13)** Harmon AC, Cornelius DC, Amaral LM, Faulkner JL, Cunningham MW Jr, Wallace K, LaMarca B. The role of inflammation in the pathology of preeclampsia *Clin Sci (Lond)*. 2016 1; 130(6):409-19.
- 14)** Prieto D, Contreras C, Sanchez A, Endothelial dysfunction, obesity and insulin resistance. *Curr Vasc Pharmacol*. 2014, 12(3):412–426.
- 15)** Toda N, Okamura T, Obesity impairs vasodilatation and blood flow increase mediated by endothelial nitric oxide: an overview. *J Clin Pharmacol*. 2013, 53(12):1228–1239.
- 16)** Poston L, Igosheva N, Mistry HD, Seed PT, Shennan AH, Rana S, Karumanchi SA, Chappell LC, Role of oxidative stress and antioxidant supplementation in pregnancy disorders. *Am J Clin Nutr*. 2011; 94(6 Suppl):1980S-1985S.
- 17)** Sánchez-Aranguren LC, Prada CE, Riaño-Medina CE, Lopez M. Endothelial dysfunction and preeclampsia: role of oxidative stress. *Frontiers in Physiology*. 2014; 5:372.
- 18)** Chaudhari N, Talwar P, Parimisetty A, Lefebvre d'Hellencourt C, Ramanan P. A molecular web: endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress. *Front Cell Neurosci*. 2014,8:213
- 19)** Sedeek M, Montezano AC, Hebert RL, Gray SP, Di Marco E, Jha JC, Cooper ME, Jandeleit-Dahm K, Schiffrin EL, Wilkinson-Berka JL, Touyz RM. Oxidative stress, Nox isoforms and complications of diabetes–potential targets for novel therapies. *J Cardiovasc Transl Res* 2012,5(4): 509–518.
- 20)** Boulanger CM. Endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016; 36(4):e26-31.
- 21)** John E. Deanfield, Julian P. Halcox and Ton J. Rabelink. Endothelial Function and Dysfunction: Testing and Clinical Relevance. *Circulation*. 2007; 115:1285-1295
- 22)** Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999,14; 340(2):115-26.
- 23)** Vanhoutte PM, Endothelial dysfunction: the first step toward coronary arteriosclerosis. *Circ J*, 2009,73:595–601
- 24)** Gage MC, Yuldasheva NY, Viswambharan H, Sukumar P, Cubbon RM, Galloway S, Imrie H, Skromna A, Smith J, Jackson CL, Kearney MT, Wheatcroft SB. Endothelium-specific insulin resistance leads to accelerated atherosclerosis in areas with

disturbed flow patterns: a role for reactive oxygen species. *Atherosclerosis*, 2013,230:131–139

25) Muniyappa R, Sowers JR. Role of Insulin Resistance in Endothelial Dysfunction. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 2013; 14(1):5-12.

26) Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*, 2005; 352:1685–1695.

27) Doran AC, Meller N, McNamara CA. Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28:812–819.

28) Marx SO, Totary-Jain H, Marks AR. Vascular smooth muscle cell proliferation in restenosis. *Circ Cardiovasc Interv*. 2011; 4:104–111.

29) Van Varik BJ, Rennenberg RJMW, Reutelingsperger CP, Kroon AA, de Leeuw PW, Schurgers LJ. Mechanisms of arterial remodeling: lessons from genetic diseases. *Front Genet*. 2012; 3: 290.

30) Smith SD, Dunk CE, Aplin JD, Harris LK, Jones RL. Evidence for Immune Cell Involvement in Decidual Spiral Arteriole Remodeling in Early Human Pregnancy. *Am J Pathol*. 2009; 174(5): 1959–1971.

31) Zampetaki A, Kirton JP, Xu Q. Vascular repair by endothelial progenitor cells. *Cardiovasc Res*. 2008; 1;78(3):413-21

32) Leone AM, Valgimigli M, Giannico MB, Zaccone V, Perfetti M, D'Amario D, Rebuzzi AG, Crea F. From bone marrow to the arterial wall: the ongoing tale of endothelial progenitor cells. *Eur Heart J*, 2009, 30(8):890–899.

33) Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, Nishigaki I. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci*. 2013 9;9(10):1057-69.

34) Enkhmaa D, Wall D, Mehta PK, Stuart JJ, Rich-Edwards JW, Merz CN, Shufelt C. Preeclampsia and Vascular Function: A Window to Future Cardiovascular Disease Risk. *J Womens Health (Larchmt)*. 2016;25(3):284-91.

35) Sadat U, Jaffer FA, van Zandvoort MA, Nicholls SJ, Ribatti D, Gillard JH. Inflammation and neovascularization intertwined in atherosclerosis: imaging of structural and molecular imaging targets. *Circulation*. 2014,26;130(9):786-94.

36) World Health Organization (WHO). Non communicable Diseases Country Profiles. Genève WHO Fact sheet Updated June 2017) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/es/>

37) Maria Carolina Gongora*, Nanette K. Wenger. Cardiovascular Complications of Pregnancy. *Int. J. Mol. Sci*. 2015, 16, 23905-23928.

- 38)** Magee LA, Pels A, Helewa M, Rey E, von Dadelszen P, the Canadian Hypertensive Disorders of Pregnancy (HDP) Working Group. Diagnosis, evaluation, and management of the hypertensive disorders of pregnancy. *J Obstet Gynaecol Can.* 2014; 36(5):416-41.
- 39)** Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet* 2005; 365(9461):785-99.
- 40)** Rudra P, Basak S, Patil D, Latoo M Y. Recent advances in management of pre-eclampsia. *British Journal of Medical Practitioners*, 2011. 4(3).
- 41)** Chavatte-Palmer, P., A. Tarrade, and R. Lévy, Developmental origins of health and disease in adults: Role of maternal environment. *Origines développementales de la santé et des maladies de l'adulte: rôle de l'environnement maternel*, 2012. 40(9): p. 517-519
- 42)** Duley L, The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol*, 2009, 33(3): 130–137
- 43)** Tranquilli AL, Dekker G, Magee L, Roberts J, Sibai BM, Steyn W, Zeeman GG, Brown MA. The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: A revised statement from the ISSHP. *Pregnancy Hypertens.* 2014;4(2):97-104 15.
- 44)** Lambert G, Brichant JF, Hartstein G, Bonhomme V, Dewandre PY. Preeclampsia: an update. *Acta Anaesthesiol Belg.* 2014;65(4):137-49.
- 45)** National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE). Hypertension in pregnancy. NICE clinical guideline 107, RCOG Press, London (2011).
- 46)** Mol BW, Roberts CT, Thangaratinam S, Magee LA, de Groot CJ, Hofmeyr GJ., Pre-eclampsia. *Lancet.* 2016; 5; 387(10022):999-1011.
- 47)** American College of Obstetricians and Gynecologists the Task Force on Hypertension in Pregnancy. Hypertension in Pregnancy. *Obstet Gynecol*, 122 (2013), pp. 1122–1131
- 48)** Chaiworapongsa T, Chaemsaitong P, Yeo L, Romero R. Pre-eclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. *Nat Rev Nephrol* 2014; 10:466–80.
- 49)** Organización Mundial de la Salud. Mortalidad Materna. Ginebra: OMS; 2015. Nota descriptiva publicada en Septiembre de 2016. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs348/es/>
- 50)** Conde-Agudelo A, Belizan JM, Lammers C. Maternal-perinatal morbidity and mortality associated with adolescent pregnancy in Latin America: Cross-sectional study. *Am J Obstet Gynecol.* 2004. 192:342–349.

- 51)** Say L, Chou D, Gemmill A, Tunçalp Ö, Moller AB, Daniels JD, et al. Global Causes of Maternal Death: A WHO Systematic Analysis. *Lancet Global Health*. 2014;2(6): e323-e333.
- 52)** Alkema L, Chou D, Hogan D, Zhang S, Moller AB, Gemmill A, et al. Global, regional, and national levels and trends in maternal mortality between 1990 and 2015, with scenario-based projections to 2030: a systematic analysis by the UN Maternal Mortality Estimation Inter-Agency Group. *Lancet*. 2016; 387(10017):462-74.
- 53)** Uzan J, Carbonnel M, Piconne O, Asmar R, Ayoubi JM. Pre-eclampsia: pathophysiology, diagnosis, and management. *Vasc Health Risk Manag*. 2011;7:467-74.
- 54)** Redman CW. Preeclampsia: a multi-stress disorder. *Rev Med Interne*. 2011;32 Suppl 1:S41-4
- 55)** Brennan LJ, Morton JS, Davidge ST. Vascular dysfunction in preeclampsia. *Microcirculation* 2014; 21:4 –14.
- 56)** Ahmed A, Ramma W. Unravelling the theories of pre-eclampsia: are the protective pathways the new paradigm? *Br J Pharmacol*. 2015; 172(6):1574-1586.
- 57)** Huppertz B. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. *Hypertension* 2008; 51: 970–5.
- 58)** Tomimatsu T, Mimura K, Endo M, Kumasawa K, Kimura T. Pathophysiology of preeclampsia: an angiogenic imbalance and long-lasting systemic vascular dysfunction. *Hypertens Res*. 2017; 40(4):305-310.
- 59)** Jardim LL, Rios DR, Perucci LO, de Sousa LP, Gomes KB, Dusse LM. Is the imbalance between pro-angiogenic and anti-angiogenic factors associated with preeclampsia? *Clin Chim Acta*. 2015; 20;447:34-8
- 60)** Wang A, Rana S, Karumanchi SA. Preeclampsia: the role of angiogenic factors in its pathogenesis. *Physiology (Bethesda)* 2009; 24:147–158.
- 61)** Gathiram P, Moodley J. Pre-eclampsia: its pathogenesis and pathophysiology. *Cardiovasc J Afr*. 2016;27(2):71-8. 2016;27(2):71-78
- 62)** Redman C.W., Sargent I.L. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science*. 2005; 308:1592–1594
- 63)** Hod T, Cerdeira AS, Karumanchi SA. Molecular Mechanisms of Preeclampsia. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015,20;5(10).
- 64)** Powe CE, Levine RJ, Karumanchi SA. Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of antiangiogenic factors and implications for later cardiovascular disease. *Circulation*. 2011, 21; 123(24):2856-69.

- 65)** Chaiworapongsa T, Chaemsaitong P, Korzeniewski SJ, Yeo L, Romero R. Preeclampsia part 2: prediction, prevention and management. *Nat Rev Nephrol.* 2014;10(9):531-40
- 66)** Poon LC, Kametas NA, Pandeva I, Valencia C, Nicolaides KH. Mean arterial pressure at 11(+0) to 13(+6) weeks in the prediction of preeclampsia. *Hypertension.* 2008;51(4):1027-33.
- 67)** Crovetto F, Figueras F, Triunfo S, Crispi F, Rodriguez-Sureda V, Dominguez C, Llurba E, Gratacós E. First trimester screening for early and late preeclampsia based on maternal characteristics, biophysical parameters, and angiogenic factors. *Prenat Diagn.* 2015; 35(2):183-91.
- 68)** Papageorghiou AT, Yu CK, Nicolaides KH. The role of uterine artery Doppler in predicting adverse pregnancy outcome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2004; 18(3):383–96.
- 69)** Conde-Agudelo A, Bird S, Kennedy SH, Villar J, Papageorghiou AT. First- and second-trimester tests to predict stillbirth in unselected pregnant women: a systematic review and meta-analysis. *BJOG.* 2015; 122(1):41-55.
- 70)** Crossen JS, ter Riet G, Mol BW, van der Post JA, Leeflang MM, Meads CA, Hyde C, Khan KS. Are tests for predicting pre-eclampsia good enough to make screening viable? A review of reviews and critical appraisal. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2009; 88(7):758-65.
- 71)** Kane SC, da Silva Costa F, Brennecke S. First Trimester Biomarkers in the Prediction of Later Pregnancy Complications. *International BR.* 2014; 807196.
- 72)** Stampalija T, Gyte GM, Alfi revic Z. Utero-placental Doppler ultrasound for improving pregnancy outcome. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010;(9):CD008363.
- 73)** Park HJ, Shim SS, Cha DH. Combined Screening for Early Detection of Pre-Eclampsia. *Int J Mol Sci.* 2015,4; 16(8):17952-74.
- 74)** De Vivo A, Baviera G, Giordano D, Todarello G, Corrado F, D'anna R. Endoglin, PIGF and sFlt-1 as markers for predicting pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2008;87(8):837-42
- 75)** Myers JE, Kenny LC, McCowan LM, Chan EH, Dekker GA, Poston L, et al. Angiogenic factors combined with clinical risk factors to predict preterm preeclampsia in nulliparous women: a predictive test accuracy study. *BJOG.* 2013;120(10):1215–23
- 76)** Spencer K, Cowans NJ, Chefetz I, Tal J, Meiri H. First-trimester maternal serum PP-13, PAPP-A and second-trimester uterine artery Doppler pulsatility index as markers of pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2007;29(2):128-34.

- 77)** Wu P, van den Berg C, Alfirevic Z, et al. Early Pregnancy Biomarkers in Pre-Eclampsia: A Systematic Review and Meta-Analysis. Cho WC, ed. *Int J Mol Sci*. 2015;16(9):23035-23056
- 78)** Chappell LC, Duckworth S, Seed PT, Griffin M, Myers J, Mackillop L, et al. Diagnostic accuracy of placental growth factor in women with suspected pre-eclampsia: a prospective multicenter study. *Circulation*. 2013; 128(19):2121–31.
- 79)** Zeisler H, Llurba E, Chantraine F, Vatish M, Staff AC, Sennström M, Olovsson M, Brennecke SP, Stepan H, Allegranza D, Dilba P, Schoedl M, Hund M, Verlohren S. Predictive Value of the sFlt-1:PIGF Ratio in Women with Suspected Preeclampsia. *N Engl J Med*. 2016;7;374(1):13-22.
- 80)** Kumar M, Gupta U, Bhattacharjee J, Singh R, Singh S, Goel M, Sharma K, Rehman MU. Early prediction of hypertension during pregnancy in a low-resource setting *Int J Gynaecol Obstet*. 2016;132(2):159-64.
- 81)** Thangaratnam S, Langenveld J, Mol BW, Khan KS. Prediction and primary prevention of pre-eclampsia. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2011; 25(4):419-33.
- 82)** Zhu XL, Wang J, Jiang RZ, Teng YC. Pulsatility index in combination with biomarkers or mean arterial pressure for the prediction of pre-eclampsia: Systematic literature review and meta-analysis. *Ann Med*. 2015;47(5):414-22
- 83)** Lagana AS, Favilli A, Triolo O, Granese R, Gerli S. Early serum markers of pre-eclampsia: are we stepping forward?. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2015; 23. 1-5.
- 84)** Khong SL, Kane SC, Brennecke SP, da Silva Costa F. First-Trimester Uterine Artery Doppler Analysis in the Prediction of Later Pregnancy Complications. *Disease Markers*. 2015; 2015:679730.
- 85)** Wallace K, Richards S, Dhillon P, Weimer A, Edholm ES, Bengten E, Wilson M, Martin JN, Jr, Lamarca B. CD4 + T-helper cells stimulated in response to placental ischemia mediate hypertension during pregnancy. *Hypertension*. 2011; 57:949–55.
- 86)** Germain SJ, Sacks GP, Sooranna SR, Sargent IL, Redman CW, Systemic inflammatory priming in normal pregnancy and preeclampsia: the role of circulating syncytiotrophoblast microparticles, *J Immunol*. 2007, 1; 178(9):5949-56.
- 87)** Redman CW, Sargent IL. Immunology of pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2010; 63:534–43.
- 88)** Lamarca BD, Ryan MJ, Gilbert JS, Murphy SR, Granger JP. Inflammatory cytokines in the pathophysiology of hypertension during PE. *Curr Hypertens Rep*. 2007; 9:480–5.

- 89)** Prins JR, Boelens HM, Heimweg J, Van der Heide S, Dubois AE, Van Oosterhout AJ, Erwich JJ. Preeclampsia is associated with lower percentages of regulatory T cells in maternal blood, *Hypertens Pregnancy*. 2009; 28(3):300-11.
- 90)** Wallace K, Novotny S, Heath J, Moseley J, Martin JN Jr, Owens MY, LaMarca B. Hypertension in response to CD4(+) T cells from reduced uterine perfusion pregnant rats is associated with activation of the endothelin-1 system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2012;15;303(2):R144-9.
- 91)** Zhou CC, Zhang Y, Irani RA, Zhang H, Mi T, Popek EJ, Hicks MJ, Ramin SM, Kellems RE, Xia Y. Angiotensin receptor agonistic autoantibodies induce pre-eclampsia in pregnant mice. *Nat Med*. 2008; 14:855–62.
- 92)** Wallukat G, Homuth V, Fischer T, Lindschau C, Horstkamp B, Jupner A, Baur E, Nissen E, Vetter K, Neichel D, Dudenhausen JW, Haller H, Luft FC. Patients with PE develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *J Clin Invest*. 1999; 103:945–52.
- 93)** Whitley GSJ, Cartwright JE. Cellular and Molecular Regulation of Spiral Artery Remodelling: Lessons from the Cardiovascular Field. *Placenta*. 2010; 31(6):465-474.
- 94)** Mosca L, Benjamin EJ, Berra K, Bezanson JL, Dolor RJ, Lloyd-Jones DM, et al. Effectiveness-based guidelines for the prevention of cardiovascular disease in women—2011 update: a guideline from the American Heart Association. *Circulation* 2011; 123:1243-1262.
- 95)** Roberts JM, Hubel CA. Pregnancy: a screening test for later life cardiovascular disease. *Womens Health Issues* 2010; 20:304-307.
- 96)** Rich-Edwards JW, McElrath TF, Karumanchi SA, Seely EW. Breathing life into the lifecourse approach: pregnancy history and cardiovascular disease in women. *Hypertension*. 2010; 56:331-334.
- 97)** Yinon Y, Kingdom JC, Odutayo A, Moineddin R, Drewlo S, Lai V, Cherney DZ, Hladunewich MA. Vascular dysfunction in women with a history of preeclampsia and intrauterine growth restriction: insights into future vascular risk. *Circulation*. 2010, 2; 122(18):1846-53.
- 98)** Romundstad PR, Magnussen EB, Smith GD, Vatten LJ. Hypertension in pregnancy and later cardiovascular risk: common antecedents? *Circulation*. 2010; 122:1846-1853.
- 99)** Block HS, Biller J, Neurology of pregnancy. *Handb Clin Neurol*, 2014, 121:1595–1622.
- 100)** Leslie MS, Briggs LA. Preeclampsia and the Risk of Future Vascular Disease and Mortality: A Review. *J Midwifery Womens Health*. 2016; 61(3):315-24.

- 101)** Chen CW, Jaffe IZ, Karumanchi SA. Pre-eclampsia and cardiovascular disease. *Cardiovascular Research*. 2014; 101(4):579-586.
- 102)** Behrens I, Basit S, Lykke JA, Ranthe MF, Wohlfahrt J, Bundgaard H, Melbye M, Boyd HA. Association Between Hypertensive Disorders of Pregnancy and Later Risk of Cardiomyopathy. *JAMA*. 2016;8; 315(10):1026-33.
- 103)** Myatt L, Miodovnik M, Prediction of pre-eclampsia. *Semin Perinatol*, 1999, 23(1):45–57.
- 104)** Newstead J, von Dadelszen P, Magee LA, Pre-eclampsia and future cardiovascular risk. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2007,5(2):283–294.
- 105)** Smith GC, Pell JP, Walsh D, Pregnancy complications and maternal risk of ischaemic heart disease: a retrospective cohort study of 129,290 births. *Lancet*, 2001, 357(9273):2002–2006.
- 106)** Martin U, Davies C, Hayavi S, Hartland A, Dunne F. Is normal pregnancy atherogenic? *Clin Sci (Lond)*. 1999, 96(4):421–425.
- 107)** Kvehaugen AS, Dechend R, Ramstad HB, Troisi R, Fugelseth D, Staff AC. Endothelial function and circulating biomarkers are disturbed in women and children after pre-eclampsia. *Hypertension*, 2011, 58(1): 63–69.
- 108)** Sandvik MK, Leirgul E, Nygård O, Ueland PM, Berg A, Svarstad E, Vikse BE. Pre-eclampsia in healthy women and endothelial dysfunction 10 years later. *Am J Obstet Gynecol*, 2013, 209(6):569 e1–569 e10.
- 109)** Smith GN, Pudwell J, Walker M, Wen SW. Risk estimation of metabolic syndrome at one and three years after a pregnancy complicated by preeclampsia. *J Obstet Gynaecol Can*. 2012;34(9):836-841. .
- 110)** Akhter T, Larsson M, Wikstrom AK, Naessen T, Ultrasonographic individual artery wall layer dimensions indicate increased cardiovascular risk in previous severe pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol. Pregnancy Hypertens*. 2013; 3(2):66.
- 111)** Canno B. Cardiovascular disease: Biochemistry to behaviour. *Nature*. 2013 31; 493(7434): S2-3.
- 112)** World Health Organization. Projections of mortality and causes of death, 2015 and 2030 (http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/projections/en/, http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/en/, accessed 4 November 2014
- 113)** Mozaffarian D, Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R, de Ferranti SD, Floyd J, Fornage M, Gillespie C, Isasi CR, Jiménez MC, Jordan LC, Judd SE, Lackland D, Lichtman JH, Lisabeth L, Liu S, Longenecker CT, Mackey RH, Matsushita K, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nasir K, Neumar RW, Palaniappan L, Pandey DK, Thiagarajan RR, Reeves MJ, Ritchey M, Rodriguez CJ, Roth GA, Rosamond

WD, Sasson C, Towfighi A, Tsao CW, Turner MB, Virani SS, Voeks JH, Willey JZ, Wilkins JT, Wu JH, Alger HM, Wong SS, Muntner P; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report from the American Heart Association. *Circulation*. 2017;7; 135(10):e146-e603.

114) World Health Organization. WHO Mortality Database— 25th Jan update. Geneva, Switzerland: World Health Organization, Department of Health Statistics and Information Systems; 2015. http://www.who.int/healthinfo/mortality_data/en/ (Jan 2015). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>

115) Townsend N, Nichols M, Scarborough P, Rayner M. Cardiovascular disease in Europe - epidemiological update 2015. *Eur Heart J*. 2015 21;36(40):2696-705

116) Instituto Nacional de Estadística. Defunciones según la causa de muerte 2015 Disponible en: http://www.ine.es/prensa/edcm_2015.pdf. nota de prensa publicada en el 27 de Febrero de 2017

117) Plan de salud de Cataluña 2011-2015 http://salutweb.gencat.cat/web/.content/home/el_departament/pla_de_salut/documents/arxius/plan_de_salud_catalunya_es.pdf.

118) Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases.2013-2020. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/94384/1/9789241506236_eng.pdf?ua=1

119) Páramo JA ,Orbe J , Beloqui O , Colina I , Benito A , Rodríguez JA , Díez J .Association of age, inflammatory markers and subclinical atherosclerosis in subjects free from cardiovascular disease. *Med Clin (Barc)*. 2008; 131(10):361-5

120) Albers GW, Caplan LR, Easton JD, Fayad PB, Mohr JP, Saver JL, Sherman DG; TIA Working Group. Transient ischemic attack: proposal for a new definition. *N Engl J Med*. 2002; 347:1713–1716.

121) Díez Tejedor E, Fuentes B, Gil Núñez AC, Gil Peralta A, Matías Guiu J, por el comité ad hoc del Grupo de Estudio de Enfermedades Cerebrovasculares de la SEN. Guía para el tratamiento preventivo de la isquemia cerebral. En: Díez Tejedor, editor. Guía para el diagnóstico y tratamiento del ictus. Guías oficiales de la Sociedad Española de Neurología. Barcelona: Prous Science; 2006:133-183.

122) Jaunch EC, Saver JL, Adams Jr HP, et al. American Heart Association Stroke Council; Council on Cardiovascular Nursing; Council on Peripheral Vascular Disease; Council on Clinical Cardiology. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2013; 44:870-947.

- 123)** Díaz-Guzmán J, Egido-Herrero JA, Gabriel-Sánchez R, Barberà G, Fuentes B, Fernández-Pérez C, Abilleira S: Incidencia de ictus en España. Bases metodológicas del estudio Iberictus. *Rev. Neurol* 2008, 47 (12): 617-623.
- 124)** Werner Hacke. Guías para el Manejo del Ictus Isquémico 2008. http://www.congrex-switzerland.com/fileadmin/files/2013/eso-stroke/pdf/ESO08_Guidelines_Spanish.pdf.
- 125)** Arboix A, Pérez Sempere A, Alvarez Sabín J. Ictus: tipos etiológicos y criterios diagnósticos. En: Díez Tejedor E, editor. Guía para el diagnóstico y tratamiento del ictus. Barcelona: Prous Science; 2006: 1-23.
- 126)** Feigin VL, Norrving B, George MG, Foltz JL, Roth GA, Mensah GA. Prevention of stroke: a strategic global imperative. *Nat Rev Neurol*. 2016; 12(9):501-12.
- 127)** E. Martínez-Vila, M. Murie Fernández, I. Pagola y P. Irimia. Enfermedades cerebrovasculares. *Medicine*. 2011; 10(72):4871-81.
- 128)** Hankey GJ. Ischaemic stroke--prevention is better than cure. *J R Coll Physicians Edinb*. 2010; 40(1):56-63.
- 129)** Adams HP, del Zoppo G, Alberts MJ, Bhatt DL, Brass L, Furlan A, et al. Guidelines for the early management of adults with ischemic stroke. *Stroke*. 2007; 38:1655–1711.
- 130)** Salawu F, Umar I, Danburam A. Comparison of two hospital stroke scores with computerized tomography in ascertaining stroke type among Nigerians. *Ann Afr Med*. 2009; 8(1):14-8.
- 131)** Finley CA, Wijman CAC. Critical care of acute ischemic stroke. *Crit Care Clin*. 2007; 22:581–606.
- 132)** Alderazi YJ, Barot NV, Peng H, Vahidy FS, Navalkele DD, Sangha N, Misra V², Savitz SI. Clotting factors to treat thrombolysis-related symptomatic intracranial hemorrhage in acute ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2014; 23(3):e207-14.
- 133)** Jeffrey Saver. Time is brain-Quantified. *Stroke* 2006; 37:263-266.
- 134)** Kernan WN, Ovbiagele B, Black HR, Bravata DM, Chimowitz MI, Ezekowitz MD, Fang MC, Fisher M, Furie KL, Heck DV, Johnston SC, Kasner SE, Kittner SJ, Mitchell PH, Rich MW, Richardson D, Schwamm LH, Wilson JA; American Heart Association Stroke Council, Council on Cardiovascular and Stroke Nursing, Council on Clinical Cardiology, and Council on Peripheral Vascular Disease. Guidelines for the prevention of stroke in patients with stroke and transient ischemic attack: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2014; 45(7):2160-236.
- 135)** E. Díez Tejedor. Guía para el diagnóstico y tratamiento del ictus., Sociedad Española de Neurología Via Laietana. 2006. 57 Pral. 2ª Barcelona 1ª Edición

- 136)** Eilaghi A, d'Este CD, Lee TY, Jakubovic R, Brooks J, Liu RT, Zhang L, Swartz RH, Aviv RI. Toward patient tailored perfusion thresholds for prediction of stroke outcome. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2014;35(3):472-7.
- 137)** Brouns R, De Deyn PP. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clin Neurol Neurosurg.* 2009; 111(6):483–495.
- 138)** Libby, P., Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 2012. 32(9): p. 2045-51.
- 139)** Mathers CD, Boerma T, Ma Fat D. Global and regional causes of death. *Br Med Bull.* 2009;92:7-32. doi: 10.1093/bmb/ldp028.
- 140)** Woollard KJ, Geissmann F, Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat Rev Cardiol,* 2010, 7(2):77–86.
- 141)** Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA, Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat Rev Immunol,* 2013, 13(10):709–721.
- 142)** Zerneck A, Bot I, Djalali-Talab Y, Shagdarsuren E, Bidzhekov K, Meiler S, Krohn R, Schober A, Sperandio M, Soehnlein O, Bornemann J, Tacke F, Biessen EA, Weber C. Protective role of CXC receptor 4/CXC ligand 12 unveils the importance of neutrophils in atherosclerosis. *Circ Res.* 2008,1;102(2):209-17.
- 143)** Weber C, Noels H, Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med,* 2011, 17(11):1410–1422.
- 144)** Zerneck A, Weber C, Improving the treatment of atherosclerosis by linking anti-inflammatory and lipid modulating strategies. *Heart,* 2012, 98(21):1600–1606.
- 145)** The NHS Information Centre LS, Statistics on obesity, physical activity and diet: England, 2011. <http://www.hsic.gov.uk>. Published 24 Feb 2011.
- 146)** Alwan A (2011) World Health Organisation: global status report on noncommunicable diseases 2010. World Health Organization, Geneva].
- 147)** Critchley JA, Capewell S, Mortality risk reduction associated with smoking cessation in patients with coronary heart disease: a systematic review. *JAMA* 2003, 290(1):86–97.
- 148)** Dhingra R, Vasan RS. Age as a risk factor. *Med Clin North Am.* 2012;96(1):87-91. *Med Clin North Am.* 2012; 96(1):87-91.
- 149)** Nichols WW. Clinical measurement of arterial stiffness obtained from noninvasive pressure waveforms. *Am J Hypertens.* 2005;18(1 Pt 2):3S-10S.
- 150)** North BJ, Sinclair DA, The intersection between aging and cardiovascular disease. *Circ Res* 2012,110(8):1097–1108

- 151)** WHO (2011) Blood pressure. Available from: http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/blood_pressure_prevalence/en/index.html.
- 152)** Alwan A (2011) World Health Organisation: global status report on noncommunicable diseases 2010. World Health Organization, Geneva. http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report_full_en.pdf
- 153)** Lawes CM, Vander Hoorn S, Rodgers A; International Society of Hypertension. Global burden of blood-pressure-related disease, 2001. *Lancet*. 2008, 3; 371(9623):1513-8.
- 154)** Whitworth JA, WHO, ISH Writing Group (2003) 2003 World Health Organization (WHO)/ International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *J Hypertens* 21(11):1983–1992.
- 155)** Emerging Risk Factors Collaboration, Erqou S, Kaptoge S, Perry PL, Di Angelantonio E, Thompson A, White IR, Marcovina SM, Collins R, Thompson SG, Danesh J. Lipoprotein(a) concentration and the risk of coronary heart disease, stroke, and nonvascular mortality. *JAMA*. 2009,22;302(4):412-23.
- 156)** World Health Organization. Global Health Estimates: Deaths by Cause, Age, Sex and Country, 2000-2012. Geneva, WHO, 2014.
- 157)** Morrish NJ, Wang SL, Stevens LK, Fuller JH, Keen H. Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. *Diabetologia*. 2001, 44; 2: S14–S21.
- 158)** Gregg EW, Li Y, Wang J, Burrows NR, Ali MK, Rolka D, Williams DE, Geiss L. Changes in diabetes-related complications in the United States, 1990-2010. *N Engl J Med*. 2014,17;370(16):1514-23.
- 159)** Booth GL, Kapral MK, Fung K, Tu JV, Recent trends in cardiovascular complications among men and women with and without diabetes. *Diabetes Care*. 2006,29(1):32–37
- 160)** Laslett LJ, Alagona P Jr, Clark BA 3rd, Drozda JP Jr, Saldivar F, Wilson SR, Poe C, Hart M. The worldwide environment of cardiovascular disease: prevalence, diagnosis, therapy, and policy issues: a report from the American College of Cardiology. *J Am Coll Cardiol*. 2012, 25;60(25 Suppl):S1-49
- 161)** Stafoggia M, Cesaroni G, Peters A, Andersen ZJ, Badaloni C, Beelen R, Caracciolo B, Cyrys J, de Faire U, de Hoogh K, Eriksen KT, Fratiglioni L, Galassi C, Gigante B, Havulinna AS, Hennig F, Hilding A, Hoek G, Hoffmann B, Houthuijs D, Korek M, Lanki T, Leander K, Magnusson PK, Meisinger C, Migliore E, Overvad K, Ostenson CG, Pedersen NL, Pekkanen J, Penell J, Pershagen G, Pundt N, Pyko A, Raaschou-Nielsen O, Ranzi A, Ricceri F, Sacerdote C, Swart WJ, Turunen AW, Vineis P, Weimar C, Weinmayr

G, Wolf K, Brunekreef B, Forastiere F. Long-term exposure to ambient air pollution and incidence of cerebrovascular events: results from 11 European cohorts within the ESCAPE project. *Environ Health Perspect.* 2014;122(9):919-25.

162) Colin S, Chinetti-Gbaguidi G, Staels B. Macrophage phenotypes in atherosclerosis. *Immunol Rev.* 2014; 262:153-1661.

163) Thorp E, Tabas I. Mechanisms and consequences of efferocytosis in advanced atherosclerosis. *J Leukoc Biol.* 2009; 86:1089-1095.

164) Murphy AJ, Tall AR. Disordered haematopoiesis and athero-thrombosis. *Eur Heart J.* 2016; 7; 37(14): 1113–1121.

165) Luque A, Turu MM, Rovira N, Juan-Babot JO, Slevin M, Krupinski J. Early atherosclerotic plaques show evidence of infection by *Chlamydia pneumoniae*. *Front Biosci (Elite Ed).* 2012, 1; 4:2423-32.

166) Janczak D, Ziolkowski P, Garcarek J, Janczak D, Dorobisz K, Chabowski M. The cytokines within the carotid plaque in symptomatic patients with internal carotid artery stenosis. *Journal of Cardiothoracic Surgery.* 2014; 9:139.

167) Tall AR, Yvan-Charvet L. Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2015; 15:104-116

168) Badimon L, Vilahur G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *Intern Med.* 2014; 276(6):618-32.

169) Frostegård J. Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease. *BMC Medicine.* 2013; 11:117.

170) Bot I, Shi GP, Kovanen PT. Mast cells as effectors in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015; 35(2):265-71.

171) Carbone F, Mach F, Montecucco F. Update on the role of neutrophils in atherosclerotic plaque vulnerability. *Curr Drug Targets.* 2015; 16(4):321-33.

172) Miller YI, Chang MK, Binder CJ, Shaw PX, Witztum JL. Oxidized low density lipoprotein and innate immune receptors. *Curr Opin Lipidol.* 2003; 14:437-445.

173) Liu C, Desikan R, Ying Z, Gushchina L, Kampfrath T, Deiliiis J, Wang A, Xu X, Zhong J, Rao X, Sun Q, Maiseyeu A, Parthasarathy S, Rajagopalan S. Effects of a novel pharmacologic inhibitor of myeloperoxidase in a mouse atherosclerosis model. *PLoS One.* 2012; 7: e50767.

174) Chen W, Jin WQ, Chen LF, Williams T, Zhu WL, Fang Q. Urokinase receptor surface expression regulates monocyte migration and is associated with accelerated atherosclerosis. *Int J Cardiol.* 2012 15; 161(2):103-10.

- 175)** Lee W-S, Kim S-W, Ryu WS. Progression and Observational Frequency of Atheromatous Plaques in Autopsied Coronary Arteries. *Korean Circulation Journal*. 2009; 39(10):399-407.
- 176)** Otsuka F, Yasuda S, Noguchi T, Ishibashi-Ueda H. Pathology of coronary atherosclerosis and thrombosis. *Cardiovasc Diagn Ther*. 2016;6(4):396-408.
- 177)** Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res*. 2014;6; 114(12):1852-66.
- 178)** Wentzel JJ, Chatzizisis YS, Gijzen FJ, Giannoglou GD, Feldman CL, Stone PH. Endothelial shear stress in the evolution of coronary atherosclerotic plaque and vascular remodelling: current understanding and remaining questions. *Cardiovasc Res*. 2012; 96:234–243.
- 179)** Chatzikonstantinou A, Wolf ME, Schaefer A, Hennerici MG. Asymptomatic and Symptomatic Carotid Stenosis: An Obsolete Classification? *Stroke Research and Treatment*. 2012; 2012:340798.
- 180)** de Weerd M, Greving JP, Hedblad B, Lorenz MW, Mathiesen EB, O'Leary DH, Rosvall M, Sitzer M, Buskens E, Bots ML. Prevalence of asymptomatic carotid artery stenosis in the general population: an individual participant data meta-analysis. *Stroke*. 2010;41(6):1294-7.
- 181)** Rubio F, Martínez-Yélamos S, Cardona P, Krupinski J. Carotid endarterectomy: is it still a gold standard? *Cerebrovasc Dis*. 2005;20 (2):119-22.
- 182)** Ballotta E, Toniato A, Da Roit A, Lorenzetti R, Piatto G, Baracchini C. Carotid endarterectomy for asymptomatic carotid stenosis in the very elderly. *J Vasc Surg*. 2015;61(2):382-8
- 183)** Orrapin S, Rerkasem K. Carotid endarterectomy for symptomatic carotid stenosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017,7; 6:CD001081.
- 184)** Mazzaccaro D, Stegher S, Occhiuto MT, Malacrida G, Caldana M, Tealdi DG, Nano G. Treatment of significant carotid artery stenosis in 1824 patients. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 2015;56(1):107-18
- 185)** Litsky J, Stilp E, Njoh R, Mena-Hurtado C. Management of symptomatic carotid disease in 2014. *Curr Cardiol Rep*. 2014;16(3):462
- 186)** Golledge J, Greenhalgh RM, Davies AH. The symptomatic carotid plaque. *Stroke* 2000; 31:774-781.
- 187)** Rothwell PM, Eliasziw M, Gutnikov SA, Fox AJ, Taylor DW, Mayberg MR, Warlow CP, Barnett HJ; Carotid Endarterectomy Trialists Collaboration.

Analysis of pooled data from the randomised controlled trials of endarterectomy for symptomatic carotid stenosis. *Lancet*. 2003;11;361(9352):107-16.

188) Rantner B, Goebel G, Bonati LH, Ringleb PA, Mas JL, Fraedrich G; Carotid Stenting Trialists' Collaboration. The risk of carotid artery stenting compared with carotid endarterectomy is greatest in patients treated within 7 days of symptoms. *J Vasc Surg*. 2013; 57(3):619-626.e2; discussion 625-6.

189) Finn AV, Nakano M, Narula J, Kolodgie FD, Virmani R. Concept of vulnerable/unstable plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(7):1282-92.

190) Inaba Y, Chen JA, Bergmann SR. Carotid plaque, compared with carotid intima-media thickness, more accurately predicts coronary artery disease events: a meta-analysis. *Atherosclerosis*. 2012; 220:128-33.

191) Rockman CB, Hoang H, Guo Y, Maldonado TS, Jacobowitz GR, Talishinskiy T, Riles TS, Berger JS. The prevalence of carotid artery stenosis varies significantly by race. *J Vasc Surg*. 2013;57(2):327-37.

192) Rudd JH, Myers KS, Bansilal S, Machac J, Rafique A, Farkouh M, Fuster V, Fayad ZA. (18)Fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging of atherosclerotic plaque inflammation is highly reproducible: implications for atherosclerosis therapy trials. *J Am Coll Cardiol*. 2007;28;50(9):892-6.

193) Truijman MT, de Rotte AA, Aaslid R, van Dijk AC, Steinbuch J, Liem MI, Schreuder FH, van der Steen AF, Daemen MJ, van Oostenbrugge RJ, Wildberger JE, Nederkoorn PJ, Hendrikse J, van der Lugt A, Kooi ME, Mess WH; Plaque at RISK Study. Intraplaque hemorrhage, fibrous cap status, and microembolic signals in symptomatic patients with mild to moderate carotid artery stenosis: the Plaque at RISK study. *Stroke*. 2014 ;45(11):3423-6.

194) Luciano A.; RICCIO, Patricia M. y KLEIN, Francisco R. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad carotídea aterosclerótica extracraneal asintomática. *Medicina (B. Aires)*. 2011, vol.71, n.6

195) Di Legge S, Koch G, Diomedi M, Stanzione P, Sallustio F. Stroke Prevention: Managing Modifiable Risk Factors. *Stroke Res Treat*. 2012; 2012:391538

196) Maldonado NJ, Kazmi SO, Suarez JL. Update in the management of acute ischemic stroke. *Crit Care Clin*. 2014;30(4):673-97

197) Wikström A-K, Haglund B, Olovsson M, Lindeberg SN. The risk of maternal ischaemic heart disease after gestational hypertensive disease. *BJOG*. 2005; 112(11):1486-1491.

- 198)** Sidorov EV, Feng W, Caplan LR. Stroke in pregnant and postpartum women. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2011; 9:1235–1247
- 199)** Manfredi M, Beltramello A, Bongiovanni LG, Polo A, Pistoia L, Rizzuto N. Eclamptic encephalopathy: imaging and pathogenetic considerations. *Acta Neurol Scand*. 1997; 96(5):277–82.
- 200)** Razmara A, Bakhadirov K, Batra A, Feske SK. Cerebrovascular complications of pregnancy and the postpartum period. *Curr Cardiol Rep*. 2014;16(10):532
- 201)** von Dadelszen P, Magee LA. Preventing deaths due to the hypertensive disorders of pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2016;36:83-102.
- 202)** Cipolla MJ, Sweet JG, Chan SL. Cerebral vascular adaptation to pregnancy and its role in the neurological complications of eclampsia. *J Appl Physiol*. 2011; 110(2):329–39.
- 203)** Edlow JA, Caplan LR, O'Brien K, Tibbles CD. Diagnosis of acute neurological emergencies in pregnant and post-partum women. *Lancet Neurol*. 2013; 12:175–185
- 204)** Gongora MC, Wenger NK. Cardiovascular Complications of Pregnancy. Baker PN, ed. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015; 16(10):23905-23928.
- 205)** Magee L, Newstead J, Ng J, Ct A, Von Dadelszen P. Preeclampsia as a marker of cardiovascular disease. *Fetal Matern Med Rev*. 2008; 19:271–92.
- 206)** Tate J, Bushnell C. Pregnancy and stroke risk in women. *Women's health (London, England)*. 2011; 7(3):363-374.
- 207)** Bellamy L, Casas JP, Hingorani AD, et al. Pre-eclampsia and risk of cardiovascular disease and cancer in later life: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2007; 335:974.
- 208)** World Health Organization. Women's health. 2013. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs334/en/>. Accessed 20 Dic 2013.
- 209)** Joel G Ray, Marian J Vermeulen, Michael J Schull, Donald A Redelmeier. Cardiovascular health after maternal placental syndromes (CHAMPS): population-based retrospective cohort study. *The lancet*. 366, 9499, 2005- 19–25, P 1797–1803.
- 210)** Sara M. Freibert, David M. Mannino, Heather Bush, and Leslie J. Crofford. The Association of Adverse Pregnancy Events and Cardiovascular Disease in Women 50 Years of Age and Older. *Journal of Women's Health*. 2011, 20(2): 287-293.
- 211)** Irgens HU, Reisaeter L, Irgens LM, Lie RT. Long term mortality of mothers and fathers after pre-eclampsia: population based cohort study. *BMJ*. 2001 24; 323(7323): 1213–1217.

- 212)** Lee G, Tubby J. Preeclampsia and the risk of cardiovascular disease later in life - A review of the evidence. *Midwifery*. 2015; 31(12):1127-34.
- 213)** Veerbeek, J.H.; Hermes, W.; Breimer, A.Y.; van Rijn, B.B.; Koenen, S.V.; Mol, B.W.; Franx, A.; de Groot, C.J.; Koster, M.P. Cardiovascular disease risk factors after early-onset preeclampsia, late-onset preeclampsia, and pregnancy-induced hypertension. *Hypertension* 2015, 65, 600–606.
- 214)** Melchiorre K, Sutherland GR, Liberati M, Thilaganathan B. Preeclampsia is associated with persistent postpartum cardiovascular impairment. *Hypertension*. 2011;58(4):709-15
- 215)** Poulsen SH. Clinical aspects of left ventricular diastolic function assessed by Doppler echocardiography following acute myocardial infarction. *Dan Med Bull*. 2001; 48(4):199-210.
- 216)** Lin YS, Tang CH, Yang CY, Wu LS, Hung ST, Hwa HL, Chu PH. Effect of pre-eclampsia-eclampsia on major cardiovascular events among peripartum women in Taiwan. *Am J Cardiol*. 2011,15; 107(2):325-30.
- 217)** Aukes AM, de Groot JC, Aarnoudse JG, Zeeman GG. Brain lesions several years after eclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2009;200(5):504.e1-5.
- 218)** Aukes AM, De Groot JC, Wiegman MJ, Aarnoudse JG, Sanwikarja GS, Zeeman GG. Long-term cerebral imaging after pre-eclampsia. *BJOG*. 2012;119(9):1117-22.
- 219)** Kuklina EV, Tong X, Bansil P, George MG, Callaghan WM. Trends in pregnancy hospitalizations that included a stroke in the United States from 1994 to 2007: reasons for concern? *Stroke*. 2011;42(9):2564-70.
- 220)** Sharshar T, Lamy C, Mas JL. Incidence and causes of strokes associated with pregnancy and puerperium. A study in public hospitals of Ile de France. *Stroke in Pregnancy Study Group*. *Stroke* 1995; 26:930– 936.
- 221)** Suzanne Baumwell S. Ananth Karumanchi. Pre-Eclampsia: Clinical Manifestations and Molecular Mechanisms, *Nephron Clin Pract* 2007; 106:c72–c81].
- 222)** Jeng JS, Tang SC, Yip PK. Stroke in women of reproductive age: comparison between stroke related and unrelated to pregnancy. *J Neurol Sci*. 2004, 15; 221(1-2):25-9.
- 223)** Tang CH, Wu CS, Lee TH, Hung ST, Yang CY, Lee CH, Chu PH. Preeclampsia-eclampsia and the risk of stroke among peripartum in Taiwan. *Stroke*. 2009,40(4):1162-8.
- 224)** James AH, Bushnell CD, Jamison MG, Myers ER. Incidence and risk factors for stroke in pregnancy and the puerperium. *Obstet Gynecol*. 2005; 106(3):509-16.

- 225)** Davis EF, Newton L, Lewandowski AJ, Lazdam M, Kelly BA, Kyriakou T, Leeson P. Preeclampsia and offspring cardiovascular health: mechanistic insights from experimental studies. *Clin Sci* 2012; 123:53–72.
- 226)** Lim W, Lee Y, Yap FK, Aris IM, Ngee L, Meaney M, Gluckman PD, Godfrey KM, Kwek K, Chong Y, Saw S. Maternal Blood Pressure During Pregnancy and Early Childhood Blood Pressures in the Offspring: The GUSTO Birth Cohort Study. *Med Novemb* 2015; 94:1–9.
- 227)** Fugelseth D, Ramstad HB, Kvehaugen AS, Nestaas E, Støylen A, Staff AC. Myocardial function in offspring 5-8years after pregnancy complicated by preeclampsia. *Early Hum Dev* 2011; 87:531–535.
- 228)** Kajantie E, Eriksson JG, Osmond C, Thornburg K, Barker DJP. Preeclampsia is associated with increased risk of stroke in the adult offspring the helsinki birth cohort study. *Stroke* 2009; 40:1176–1180. 27.
- 229)** Eknoyan G, Hostetter T, Bakris GL, Hebert L, Levey AS, Parving HH, Steffes MW, et al. Proteinuria and other markers of chronic kidney disease: a position statement of the national kidney foundation (NKF) and the national institute of diabetes and digestive and kidney diseases (NIDDK). *Am J Kidney Dis.* 2003; 42(4):617-622.
- 230)** Roberts JM, August PA, Bakris G, Barton JR, Bernstein IM, Druzin M, Gaiser RR, Granger JP, Jeyabalan A, Johnson DD, Karumanchi S, Lindheimer M, Owens MY, Saade GR, Sibai BM, Spong CY, Tsigas E, Joseph GF, O'Reilly N, Politzer A, Son S, Ngaiza K. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2013; 122(5):1122-31.
- 231)** Sandvik, M.K., Hallan, S., Svarstad, E. and Vikse, B.E. Preeclampsia and prevalence of microalbuminuria 10 years later. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2013, 8, 1126–1134.
- 232)** Mangos, G.J., Spaan, J.J., Pirabhahar, S. and Brown, M.A. Markers of cardiovascular disease risk after hypertension in pregnancy. *J. Hypertens* 2012, 30, 351–358.
- 233)** Upadhyay RK. Emerging Risk Biomarkers in Cardiovascular Diseases and Disorders. *Journal of Lipids.*;2015:971453
- 234)** Kumar S, Mohan A, and Guleria R. Biomarkers in cancer screening, research and detection: present and future: a review. *Biomarkers* 2006; 11(5):385-405.
- 235)** Strimbu K, Tavel JA. What are Biomarkers? Current opinion in HIV and AIDS. 2010; 5(6):463-466.

- 236)** Signorelli SS, Fiore V, Malaponte G, Inflammation and peripheral arterial disease: the value of circulating biomarkers. 2014, *Int J Mol Med* 33(4):777–783
- 237)** Paneni F, Costantino S, Cosentino F, Molecular mechanisms of vascular dysfunction and cardiovascular biomarkers in type 2 diabetes. *Cardiovasc Diagn Ther* 2014,4(4):324–332
- 238)** Carty DM, Delles C, Dominiczak AF. Novel Biomarkers for Predicting Preeclampsia. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2008;18(5-24):186-194
- 239)** Abu-Asab, M. S., Chaouchi, M., Alesci, S., Galli, S., Laassri, M., Cheema, A. K., Amri, H. Biomarkers in the Age of Omics: Time for a Systems Biology Approach. *OMICS* : *OMICS*. 2011; 15(3): 105–112.
- 240)** Tainsky MA. Genomic and Proteomic Biomarkers for Cancer: A Multitude of Opportunities. *Biochimica et biophysica acta*. 2009; 1796(2):176-193.
- 241)** Biomarkers Definition Working Group Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Therapeutics*. 2001; 69:89–95
- 242)** Tan KH, Tan SS, Sze SK, Lee WK, Ng MJ, Lim SK. Plasma biomarker discovery in preeclampsia using a novel differential isolation technology for circulating extracellular vesicles. *Am J Obstet Gynecol*. 2014; 211(4):380.e1-13.
- 243)** Biomarkers Definition Working Group Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Therapeutics*. 2001; 69:89–95.
- 244)** González Hernández, Álvaro, Principios de bioquímica clínica y patología molecular. 2a ed. Elsevier, 2014
- 245)** Gerszten RE, Wang TJ. The search for new cardiovascular biomarkers. *Nature*. 2008; 451:949–52.
- 246)** Bell J. Predicting disease using genomics. *Nature*. 2004; 429:453–6
- 247)** Dong R, Shen Z, Zheng C, Chen G, Zheng S. Serum microRNA microarray analysis identifies miR-4429 and miR-4689 are potential diagnostic biomarkers for biliary atresia. *Sci Rep*. 2016 16;6:21084
- 248)** Govindarajan R, Duraiyan J, Kaliyappan K, Palanisamy M. Microarray and its applications. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*. 2012; 4(Suppl 2): S310-S312.
- 249)** Madrigal-Matute J, Rotllan N, Arand JF, Fernandez-Hernando C, MicroRNAs and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2013,15(5):322
- 250)** Rayner KJ, Moore KJ. The plaque “micro” environment: microRNAs control the risk and the development of atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2012, 14(5):413–421

- 251)** Sun X, Belkin N, Feinberg MW, Endothelial microRNAs and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2013, 15(12):372
- 252)** Zampetaki A, Dudek K, Mayr M, Oxidative stress in atherosclerosis: the role of microRNAs in arterial remodeling. *Free Radic Biol Med* 2013,64:69–77
- 253)** Imanishi T, Akasaka T, MicroRNAs in peripheral artery disease. *Curr Top Med Chem* 2013,13(13):1589–1595
- 254)** Koutsis G, Siasos G, Spengos K, The emerging role of microRNA in stroke. *Curr Top Med Chem* 2013,13(13):1573–1588
- 255)** Hulsmans M, Holvoet P, MicroRNAs as early biomarkers in obesity and related metabolic and cardiovascular diseases. *Curr Pharm Des* 2013,19(32):5704–5717
- 256)** Vavuranakis M, Kariori M, Vrachatis D et al, MicroRNAs in aortic disease. *Curr Top Med Chem* 2013, 13(13):1559–1572 37
- 257)** Quiat D, Olson EN, MicroRNAs in cardiovascular disease: from pathogenesis to prevention and treatment. *J Clin Invest* 2013,123(1):11–18
- 258)** Zhang, C. MicroRNomics: a newly emerging approach for disease biology. *Physiol Genomics* 2008 ,33, 139–147
- 259)** Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004 116, 281–297
- 260)** Urbich, C., Kuehbacher, A. & Dimmeler, S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res* 2005,79, 581–588
- 261)** Chen, X., Liang, H., Zhang, J., Zen, K. & Zhang, C. Y. Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol* 2012, 22,125–132.
- 262)** Morales-Prieto DM, Chaiwangyen W, Ospina-Prieto S, Schneider U, Herrmann J, Gruhn B, Markert UR. MicroRNA expression profiles of trophoblastic cells. *Placenta*. 2012;33(9):725-34
- 263)** Venter, J.C. et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001-291, 1304-512
- 264)** Lander, E.S. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001-409, 860-921
- 265)** Alexander, R. P., Fang, G., Rozowsky, J., Snyder, M. & Gerstein, M. B. Annotating non-coding regions of the genome. *Nature Rev. Genet.* (2010) 11, 559–571
- 266)** Djebali, S. et al. Landscape of transcription in human cells. *Nature* 2012-489, 101-8
- 267)** Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005,14;120(1)

- 268)** Manel Esteller. Non-coding RNAs in human disease. *Nature Reviews Genetics* 12 2011, 861-874.
- 269)** Soreq H. Novel roles of non-coding brain RNAs in health and disease. *Front Mol Neurosci.* 2014 26; 7:55.
- 270)** Shi Q, Yang X. Circulating MicroRNA and Long Noncoding RNA as Biomarkers of Cardiovascular Diseases. *J Cell Physiol.* 2016;231(4):751-5.
- 271)** Thomas Thum, Gianluigi Condorelli. Long Noncoding RNAs and MicroRNAs in Cardiovascular Pathophysiology, *Circ Res.* 2015;116:751-762
- 272)** Katayama, S. et al. Antisense transcription in the mammalian transcriptome. *Science* 2005,309, 1564-6.
- 273)** Griffiths-Jones, S., Saini, H. K., van Dongen, S. & Enright, A. J. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res.* 2008, 36, D154–D158
- 274)** Kozomara, A. & Griffiths-Jones, S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2014, 42, D68–D73. 18.
- 275)** Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294: 862–864.
- 276)** Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993; 75: 843–854
- 277)** Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2000; 403:901–906.
- 278)** Lai, X.; Schmitz, U.; Gupta, S.K.; Bhattacharya, A.; Kunz, M.; Wolkenhauer, O.; Vera, J. Computational analysis of target hub gene repression regulated by multiple and cooperative miRNAs. *Nucleic Acids Res.* 2012, 40, 8818–8834.
- 279)** Cai X., Hagedorn C.H., Cullen B.R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 2004;10:1957-1966.
- 280)** Rodriguez A., Griffiths-Jones S., Ashurst J.L., Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* 2004;14:1902-1910
- 281)** Kim, V.N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005, 6, 376–385
- 282)** Yates, L.A., Norbury, C.J. and Gilbert, R.J.C. The long and short of microRNA. *Cell.* 2013, 153, 516–519
- 283)** Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B. and Bartel, D.P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 2009, 19, 92–105

- 284)** Riffo-Campos ÁL, Riquelme I, Brebi-Mieville P. Tools for Sequence-Based miRNA Target Prediction: What to Choose? UI-TEI K, Pichler M, eds. *International JMS*. 2016;17(12):1987.
- 285)** Akhtar MM, Micolucci L, Islam MS, Olivieri F, Procopio AD. Bioinformatic tools for microRNA dissection. *Nucleic Acids Research*. 2016;44(1):24-44.
- 286)** Augustin R, Endres K, Reinhardt S, et al. Computational identification and experimental validation of microRNAs binding to the Alzheimer-related gene ADAM10. *BMC Medical Genetics*. 2012; 13:35
- 287)** Goodall, E.F., Heath, P.R., Bandmann, O., Kirby, J., Shaw, P.J. Neuronal dark matter: the emerging role of microRNAs in neurodegeneration. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2013,7, 178
- 288)** Ha, M., Kim, V.N. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014, 15(8), 509-24.
- 289)** Boyd, S. D. "Everything you wanted to know about small RNA but were afraid to ask." *Lab Invest* 2008,88(6): 569-578.
- 290)** Lee,Y., Kim,M., Han,J., Yeom,K.H., Lee,S., Baek,S.H. and Kim,V.N. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*.2004, 23, 4051–4060
- 291)** Borchert,G.M., Lanier,W. and Davidson,B.L. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol*. 2006, 13, 1097–1101.
- 292)** Han, J., Lee, Y., Yeom, K.H., Kim, Y.K., Jin, H., Kim, V.N. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & development*. 2004;18(24), 3016-27. doi:10.1101/gad.1262504.
- 293)** Zeng, Y. and Cullen, B.R. Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res*.2004, 32, 4776–4785
- 294)** Bohnsack, M.T., Czaplinski, K. and GA-Rlich, D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*, 2004,10, 185–191
- 295)** Ge, Y. and J. Chen. "MicroRNAs in skeletal myogenesis." *Cell Cycle*, 2011;10(3): 441-448.
- 296)** Hutvagner,G., McLachlan,J., Pasquinelli,A.E., Balint, ´ E., Tuschl,T. ´ and Zamore,P.D. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*. 2001; 293, 834–838.
- 297)** Winter,J., Jung,S., Keller,S., Gregory,R.I. and Diederichs,S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat. Cell Biol*.2009;11,228–234

- 298)** Katahira, J., Yoneda, Y. Nucleocytoplasmic transport of microRNAs and related small RNAs. *Traffic*. 2011; 12(11), 1468-74.
- 299)** Ambros, V. microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell*. 2001; 107, 823–826.
- 300)** Ambros, V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004;431, 350–355
- 301)** He, L., and Hannon, G. J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*. 2004; 5, 522-531.
- 302)** Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S. and Johnson, J.M. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*. 2005; 433, 769–773
- 303)** Pillai, R.S. MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA*. 2005;11, 1753–1761
- 304)** Eiring, A.M., Harb, J.G., Neviani, P., Garton, C., Oaks, J.J., Spizzo, R., Liu, S., Schwind, S., Santhanam, R., Hickey, C.J. et al. miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. *Cell*. 2010;140, 652–665
- 305)** Kim, D.H., Sætrom, P.I., Snøve, O. and Rossi, J.J. MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008; 105, 16230–16235
- 306)** Vasudevan, S., Tong, Y. and Steitz, J.A. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*. 2007; 318, 1931–1934.
- 307)** Mitchell, P. S., R. K. Parkin, et al. "Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection." *Proc Natl Acad Sci U S A* ; 2008.105(30): 10513-10518
- 308)** Zhao, Y.-N., Chen, G.-S, Hong, S.-J. Circulating MicroRNAs in gynecological malignancies: from detection to prediction. *Exp. Hematol. Oncol*; 2014. 3, 14
- 309)** Rodríguez Santa LM, González Teshima LY, Forero Forero JV, Castillo Giraldo AO. AngiomiRs: Potential Biomarkers of Pregnancy's Vascular Pathologies. *Journal of Pregnancy*. 2015; 2015:320386
- 310)** Boon RA, Vickers KC. Intercellular Transport of MicroRNAs. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2013; 33(2):186-192.
- 311)** Das S, Halushka MK. Extracellular vesicle microRNA transfer in cardiovascular disease. *Cardiovasc Pathol*. 2015; 24(4):199-206.
- 312)** Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, Tait JF, Tewari M. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011, 22;108(12):5003-8.

- 313)** 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(4):423-33.
- 314)** Xavier Loyer, Anne-Clémence Vion, Alain Tedgui, Chantal M. Boulanger. Microvesicles as Cell–Cell Messengers in Cardiovascular Diseases. *Circ Res.* 2014; 114:345-353
- 315)** May A, Wang TJ. Biomarkers for cardiovascular disease: challenges and future directions. *Trends Mol Med.* 2008; 14(6):261-7.
- 316)** De Guire V, Robitaille R, Tétreault N, Guérin R, Ménard C, Bambace N, Sapieha P. Circulating miRNAs as sensitive and specific biomarkers for the diagnosis and monitoring of human diseases: promises and challenges. *Clin Biochem.* 2013; 46(10-11):846-60.
- 317)** Romaine SPR, Tomaszewski M, Condorelli G, Samani NJ. MicroRNAs in cardiovascular disease: an introduction for clinicians. *Heart.* 2015;101(12):921-928
- 318)** Tsochandaridis M, Nasca L, Toga C, Levy-Mozziconacci A. Circulating microRNAs as clinical biomarkers in the predictions of pregnancy complications. *PLoS Med.* 2013;10(4):e100142
- 319)** Mendell JT, Olson EN. MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell.* 2012; 148:1172– 1187
- 320)** Signorelli SS, Li Volsi G, Pitruzzella A, Fiore V, Mangiafico M, Vanella L, Parenti R, Rizzo M, Li Volti G. Circulating miR-130a, miR-27b, and miR-210 in Patients With Peripheral Artery Disease and Their Potential Relationship With Oxidative Stress: A Pilot Study. *Angiology.* 2016. pii: 0003319716638242
- 321)** Ma J, Li N, Lin Y, Gupta C, Jiang F. Circulating Neutrophil MicroRNAs as Biomarkers for the Detection of Lung Cancer. *Biomark Cancer.* 2016; 8:1-7
- 322)** C.S. Gan, C.W. Wang, K.S. Tan. Circulatory microRNA-145 expression is increased in cerebral ischemia. *Genet Mol Res,* 11 (2012), pp. 147–152
- 323)** P.C. Tsai, Y.C. Liao, Y.S. Wang, H.F. Lin, R.T. Lin, S.H. Juo. Serum microRNA-21 and microRNA-221 as Potential Biomarkers for Cerebrovascular Disease. *J Vasc Res,* 50 (2013), pp. 346–354
- 324)** Zeng L, Liu J, Wang Y, Wang L, Weng S, Tang Y, Zheng C, Cheng Q, Chen S, Yang GY. MicroRNA-210 as a novel blood biomarker in acute cerebral ischemia. *Front Biosci (Elite Ed).* 2011,1; 3:1265-72.
- 325)** Tan KS, Arumugam A, Sepramaniam S, Lim KY, Setyowati KD, Wang CW, et al. Expression Profile of MicroRNAs in Young Stroke Patients. *PLoS ONE* 2009. 4(11): e7689.

- 326)** Jeyaseelan K, Lim KY, Armugam A. MicroRNA expression in the blood and brain of rats subjected to transient focal ischemia by middle cerebral artery occlusion. *Stroke*. 2008; 39(3):959-66.
- 327)** Liu DZ, Tian Y, Ander BP, Xu H, Stamova BS, Zhan X, Turner RJ, Jickling G, Sharp FR. Brain and blood microRNA expression profiling of ischemic stroke, intracerebral hemorrhage, and kainate seizures. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010;30(1):92-101.
- 328)** A. Selvamani, P. Sathyan, R.C. Miranda, F. Sohrabji. An antagomir to microRNA Let7f promotes neuroprotection in an ischemic stroke model. *PLoS One*, 2012;(7), p. e32662
- 329)** Kumar S, Kim CW, Simmons RD, Jo H. Role of flow-sensitive microRNAs in endothelial dysfunction and atherosclerosis: mechanosensitive athero-miRs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014; 34:2206–16.
- 330)** Santovito D, Mandolini C, Marcantonio P, De Nardis V, Bucci M, Paganelli C, Magnacca F, Uchino S, Mastroiacovo D, Desideri G, Mezzetti A, Cipollone F. Overexpression of microRNA-145 in atherosclerotic plaques from hypertensive patients. *Expert Opin Ther Targets*. 2013; 17(3):217-23.
- 331)** Cipollone F, Felicioni L, Sarzani R, Uchino S, Spigonardo F, Mandolini C, et al. A unique microRNA signature associated with plaque instability in humans. *Stroke*. 2011; 42:2556–63.
- 332)** Raitoharju E, Lyytikäinen LP, Levula M, Oksala N, Mennander A, Tarkka M, et al. miR-21, miR-210, miR-34a, and miR-146a/b are up-regulated in human atherosclerotic plaques in the Tampere Vascular Study. *Atherosclerosis*. 2011; 219:211–7.
- 333)** Tsai PC, Liao YC, Wang YS, Lin HF, Lin RT, Juo SH. Serum microRNA-21 and microRNA-221 as potential biomarkers for cerebrovascular disease. *J Vasc Res*. 2013; 50:346–54
- 334)** Peng H, Zhong M, Zhao W, Wang C, Zhang J, Liu X. Urinary miR-29 correlates with albuminuria and carotid intima-media thickness in type 2 diabetes patients. *PLoS One*. 2013; 8, e82607.
- 335)** Fu G, Brkić J, Hayder H, Peng C. MicroRNAs in Human Placental Development and Pregnancy Complications. *Int J Mol Sci*. 2013, 8; 14(3):5519-44
- 336)** Cox B, Leavey K, Nosi U, Wong F, Kingdom J. Placental transcriptome in development and pathology: expression, function, and methods of analysis. *Am J Obstet Gynecol*. 2015;213(4):138-51
- 337)** Várkonyi T, Nagy B, Füle T, Tarca AL, Karászi K, Schönleber J, Hupuczi P, Mihalik N, Kovalszky I, Rigó J Jr, Meiri H, Papp Z, Romero R, Than NG. Microarray

profiling reveals that placental transcriptomes of early-onset HELLP syndrome and preeclampsia are similar. *Placenta*. 2011; 32 Suppl:S21-9.

338) Yang Q, Lu J, Wang S, Li H, Ge Q, Lu Z. Application of next-generation sequencing technology to profile the circulating microRNAs in the serum of preeclampsia versus normal pregnant women. *Clin Chim Acta*. 2011, 20;412(23-24):2167-73

339) Huppertz B, Ghosh D, Sengupta J. An integrative view on the physiology of human early placental villi. *Prog Biophys Mol Biol* 2014; 114: 33-48.

340) Sandrim VC, Eleuterio N, Pilan E, Tanus-Santos JE, Fernandes K, Cavalli R. Plasma levels of increased miR-195-5p correlates with the sFLT-1 levels in preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2016;35(2):150-8.

341) Wu L, Zhou H, Lin H, Qi J, Zhu C, Gao Z, Wang H. Circulating microRNAs are elevated in plasma from severe preeclamptic pregnancies. *Reproduction*. 2012; 143(3):389-97.

342) Cretoiu D, Xu J, Xiao J, Suci N, Cretoiu SM. Circulating MicroRNAs as Potential Molecular Biomarkers in Pathophysiological Evolution of Pregnancy. *Dis Markers*. 2016;:3851054.

343) Akehurst C, Small HY, Sharafetdinova L, Forrest R, Beattie W, Brown CE, Robinson SW, McClure JD, Work LM, Carty DM, McBride MW, Freeman DJ, Delles C. Differential expression of microRNA-206 and its target genes in preeclampsia. *J Hypertens*. 2015;33(10):2068-74.

344) Sandrim VC, Luizon MR, Palei AC, Tanus-Santos JE, Cavalli RC. Circulating microRNA expression profiles in pre-eclampsia: evidence of increased miR-885-5p levels. *BJOG*. 2016; 123(13):2120-2128.

345) Jiang L, Long A, Tan L, Hong M, Wu J, Cai L, Li Q. Elevated microRNA-520g in pre-eclampsia inhibits migration and invasion of trophoblasts. *Placenta*. 2017; 51:70-75.

346) Ura B, Feriotto G, Monasta L, Bilel S, Zweyer M, Celeghini C. Potential role of circulating microRNAs as early markers of preeclampsia. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2014; 53(2):232-4.

347) Chen D, Wang W. Human Placental MicroRNAs and Preeclampsia *Biol Reprod*. 2013; 88(5): 130.

348) Lauren Anton, Anthony O. Olarerin-George, yz Nadav Schwartz, Srinivas Srinivas, Jamie Bastek, John B. Hogenesch, yz and Michal A. Elovitz, miR-210 Inhibits Trophoblast Invasion and Is a Serum Biomarker for Preeclampsia, *Am J Pathol*. 2013; 183(5):1437-45.

- 349)** Fu G, Ye G, Nadeem L, Ji L, Manchanda T, Wang Y, Zhao Y, Qiao J, Wang YL, Lye S, Yang BB, Peng C. MicroRNA-376c impairs transforming growth factor- β and nodal signaling to promote trophoblast cell proliferation and invasion. *Hypertension*. 2013;61(4):864-72.
- 350)** Li H, Ge Q, Guo L, Lu Z. Maternal Plasma miRNAs Expression in Preeclamptic Pregnancies. *Biomed Res Int*. 2013; 2013:970265
- 351)** Brown MA, Lindheimer MD, de Swiet M, Van Assche A, Moutquin JM. The classification and diagnosis of the hypertensive disorders of pregnancy: statement from the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP). *Hypertens Pregnancy* 2001;20(1): IX-XIV.
- 352)** Robinson HP, Fleming JE. A critical evaluation of sonar "crown-rump length" measurements. *Br J Obstet Gynaecol* 1975;82(9):702-10.)
- 353)** von Reutern GM, Goertler MW, Bornstein NM, Del Sette M, Evans DH, Hetzel A, Kaps M, Perren F, Razumovsky A, von Reutern M, Shiogai T, Titianova E, Traubner P, Venketasubramanian N, Wong LK, Yasaka M; Neurosonology Research Group of the World Federation of Neurology. Grading carotid stenosis using ultrasonic methods. *Stroke*. 2012; 43(3):916-21.
- 354)** He S, Zeng S, Zhou ZW, He ZX, Zhou SF. Hsa-microRNA-181a is a regulator of a number of cancer genes and a biomarker for endometrial carcinoma in patients: a bioinformatic and clinical study and the therapeutic implication. *Drug Des Devel Ther*. 2015;9: 1103-1175
- 355)** Al-Shahrour F, Diaz-Uriarte R, Dopazo J. FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes. *Bioinformatics*. 2004; 20:578-580
- 356)** Sans S, Fitzgerald AP, Royo D, Conroy R, Graham I. [Calibrating the SCORE cardiovascular risk chart for use in Spain]. *Rev Esp Cardiol* 2007;60(5):476-85
- 357)** Livak, KJ. & Schmittgen, TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C (T) Method. *Methods*. 2001; 25(4):402-8.
- 358)** Li P, Liu Y, Yi B, Wang G, You X, Zhao X, Summer R, Qin Y, Sun J. MicroRNA-638 is highly expressed in human vascular smooth muscle cells and inhibits PDGF-BB-induced cell proliferation and migration through targeting orphan nuclear receptor NOR1. *Cardiovasc Res*. 2013, 1; 99(1):185-93.
- 359)** Wu XY, Fan WD, Fang R, Wu GF. Regulation of microRNA-155 in endothelial inflammation by targeting nuclear factor (NF)-kappaB P65. *J Cell Biochem*. 2014; 115(11):1928-36.

- 360)** Park YK, Bang OS, Cha MH, Kim J, Cole JW, Lee D, Kim YJ. SigCS base: an integrated genetic information resource for human cerebral stroke. *BMC Syst Biol.* 2011;5 Suppl 2:S10.
- 361)** Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet.* 2000; 25(1):25-9.
- 362)** Sans S, Fitzgerald AP, Royo D, Conroy R, Graham I. Calibrating the SCORE cardiovascular risk chart for use in Spain. *Rev Esp Cardiol.* 2007; 60: 476-485.
- 363)** Bujold E, Roberge S, Lacasse Y, Bureau M, Audibert F, Marcoux S, Forest JC, Giguère Y. Prevention of preeclampsia and intrauterine growth restriction with aspirin started in early pregnancy: a meta-analysis. *Obstet Gynecol.* 2010; 116(2 Pt 1):402-14.
- 364)** Leticia Lemos Jardim a , Danyelle Romana Alves Rios b , Luíza Oliveira Perucci c , Lirlândia Pires de Sousa c , Karina Braga Gomes c , Luci Maria S. Dusse c. Is the imbalance between pro-angiogenic and anti-angiogenic factors associated with preeclampsia? *Clin Chim Acta.* 2015; 20; 447:34-8.
- 365)** Scazzocchio E, Figueras F, Crispi F, Meler E, Masoller N, Mula R, Gratacos E.. Performance of a first-trimester screening of preeclampsia in a routine care low-risk setting. *Am J Obstet Gynecol.* 2013; 208(3):203.e1-203.e10.
- 366)** Parra-Cordero M, Rodrigo R, Barja P, Bosco C, Rencoret G, Sepúlveda-Martinez A, Quezada S. Prediction of early and late pre-eclampsia from maternal characteristics, uterine artery Doppler and markers of vasculogenesis during first trimester of pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013; 41(5):538-44.
- 367)** Lisonkova S, Joseph KS. Incidence of preeclampsia: risk factors and outcomes associated with early- versus late-onset disease. *Am J Obstet Gynecol* 2013;209(6): 544.e1-544.e12.
- 368)** Kar M. Role of Biomarkers in Early Detection of Preeclampsia. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR.* 2014; 8(4):BE01-BE04.
- 369)** Roberge S, Villa P, Nicolaides K, Giguère Y, Vainio M, Bakthi A, Ebrashy A, Bujold E. Early administration of low-dose aspirin for the prevention of preterm and term preeclampsia: a systematic review and meta-analysis. *Fetal Diagnosis and Therapy.* 2012; 31(3):141–146.
- 370)** Crispi F, Domínguez C, Llurba E, Martín-Gallán P, Cabero L, Gratacós E. Placental angiogenic growth factors and uterine artery Doppler findings for characterization of different subsets in preeclampsia and in isolated intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol.* 2006 Jul;195(1):201-7

- 371)** J. L. van der Merwe, D. R. Hall, C. Wright, P. Schubert, D. Grové. Are Early and Late Preeclampsia Distinct Subclasses of the Disease—What Does the Placenta Reveal?. *Hypertens Pregnancy*. 2010;29(4):457-67
- 372)** Valensise H, Vasapollo B, Gagliardi G, Novelli GP. Early and late preeclampsia: two different maternal hemodynamic states in the latent phase of the disease. *Hypertension*. 2008; 52(5):873-80.
- 373)** Oliveira N, Magder LS, Blitzer MG, Baschat AA. First-trimester prediction of pre-eclampsia: external validity of algorithms in a prospectively enrolled cohort. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2014;44(3):279-85
- 374)** Akolekar R, Syngelaki A, Sarquis R, Zvanca M, Nicolaides KH. Prediction of early, intermediate and late pre-eclampsia from maternal factors, biophysical and biochemical markers at 11-13 weeks. *Prenat Diagn*. 2011; 31(1):66-74
- 375)** Kane SC, Da Silva Costa F, Brennecke SP. New directions in the prediction of pre-eclampsia. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2014;54(2):101-7
- 376)** Crispi F, Llurba E, Domínguez C, Martín-Gallán P, Cabero L, Gratacós E. Predictive value of angiogenic factors and uterine artery Doppler for early- versus late-onset pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2008 Mar; 31(3):303-9
- 377)** Velauthar L, Plana MN, Kalidindi M, Zamora J, Thilaganathan B, Illanes SE, Khan KS, Aquilina J, Thangaratinam S. First-trimester uterine artery Doppler and adverse pregnancy outcome: a meta-analysis involving 55,974 women. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2014;43(5):500-7
- 378)** Tsiakkas A, Duvdevani N, Wright A, Wright D, Nicolaides KH. Serum placental growth factor in the three trimesters of pregnancy: effects of maternal characteristics and medical history. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015 May; 45(5):591-8.
- 379)** Forest JC, Charland M, Massé J, Bujold E, Rousseau F, Lafond J, Giguère Y. Candidate biochemical markers for screening of pre-eclampsia in early pregnancy. *Clin Chem Lab Med*. 2012; 50(6):973-84.
- 380)** Caradeux J, Serra R, Nien JK, Pérez-Sepulveda A, Schepeler M, Guerra F, Gutiérrez J, Martínez J, Cabrera C, Figueroa-Diesel H, Soothill P, Illanes SE. First trimester prediction of early onset preeclampsia using demographic, clinical, and sonographic data: a cohort study. *Prenat Diagn*. 2013; 33(8):732-6.
- 381)** Grigorenko EV, Ortenberg E, Hurley J, Bond A, Munnely K. miRNA profiling on high-throughput OpenArray™ system. *Methods Mol Biol*. 2011;676:101-10.

- 382)** Yang Q, Lu J, Wang S, Li H, Ge Q, Lu Z. Application of next generation sequencing technology to profile the circulating microRNAs in the serum of preeclampsia versus normal pregnant women. *Clin Chim Acta*. 2011 20; 412(23-24):2167-73.
- 383)** He J, Jing Y, Li W, Qian X, Xu Q, Li FS, Liu LZ, Jiang BH, Jiang Y. Roles and mechanism of miR-199a and miR-125b in tumor angiogenesis. *PLoS One*. 2013; 8(2): e56647.
- 384)** He J, Qian X, Carpenter R, Xu Q, Wang L, Qi Y, Wang ZX, Liu LZ, Jiang BH. Repression of miR-143 mediates Cr (VI)-induced tumor angiogenesis via IGF-IR/IRS1/ERK/IL-8 pathway. *Toxicol Sci*. 2013; 134(1):26-38.
- 385)** Prior C, Perez-Gracia JL, Garcia-Donas J, Rodriguez-Antona C, Guruceaga E, Esteban E, Suarez C, Castellano D, del Alba AG, Lozano MD, Carles J, Climent MA, Arranz JA, Gallardo E, Puente J, Bellmunt J, Gurrpide A, Lopez-Picazo JM, Hernandez AG, Mellado B, Martínez E, Moreno F, Font A, Calvo A. Identification of tissue microRNAs predictive of sunitinib activity in patients with metastatic renal cell carcinoma. *PLoS One*. 2014; 9(1): e86263.
- 386)** Aguado-Fraile E, Ramos E, Sáenz-Morales D, Conde E, Blanco-Sánchez I, Stamatakis K, del Peso L, Cuppen E, Brüne B, Bermejo ML. miR-127 protects proximal tubule cells against ischemia/reperfusion: identification of kinesin family member 3B as miR-127 target. *PLoS One*. 2012; 7(9): e44305
- 387)** Li Y, Chao Y, Fang Y, Wang J, Wang M, Zhang H, Ying M, Zhu X, Wang H. MTA1 promotes the invasion and migration of non-small cell lung cancer cells by downregulating miR-125b. *J Exp Clin Cancer Res*. 2013; 29; 32():33)
- 388)** Yang Z, Zhang Y, Wang L. A feedback inhibition between miRNA-127 and TGFβ/c-Jun cascade in HCC cell migration via MMP13. *PLoS One*. 2013; 8(6): e65256
- 389)** Wu D, Huang P, Wang L, Zhou Y, Pan H, Qu P. MicroRNA-143 inhibits cell migration and invasion by targeting matrix metalloproteinase 13 in prostate cancer. *Mol Med Rep*. 2013; 8(2):626-30
- 390)** Albinsson S, Skoura A, Yu J, DiLorenzo A, Fernández-Hernando C, Offermanns S, Miano JM, Sessa WC. Smooth muscle miRNAs are critical for post-natal regulation of blood pressure and vascular function. *PLoS One*. 2011; 22; 6(4): e18869.
- 391)** Wang S., Olson E. N. Angiomirs—key regulators of angiogenesis. *Current Opinion in Genetics and Development*. 2009;19(3):205–211
- 392)** Hans F. P., Moser M., Bode C., Grundmann S. MicroRNA regulation of angiogenesis and arteriogenesis. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2010; 20(8):253–262.
- 393)** Lalevée S, Lapaire O, Bühler M. miR455 is linked to hypoxia signaling and is deregulated in preeclampsia. *Cell Death & Disease*. 2014; 5(9): e1408.

- 394)** Vitoratos N, Hassiakos D, Iavazzo C. Molecular mechanisms of preeclampsia. *Vitoratos N, Hassiakos D, Iavazzo C. J Pregnancy.* 2012; 2012():298343
- 395)** Bonauer A, Carmona G, Iwasaki M, Mione M, Koyanagi M, Fischer A, Burchfield J, Fox H, Doebele C, Ohtani K, Chavakis E, Potente M, Tjwa M, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science.* 2009;26; 324(5935):1710-3.
- 396)** Varkonyi-Gasic E, Hellens RP. Quantitative stem-loop RT-PCR for detection of microRNAs. *Methods Mol Biol.* 2011; 744():145-57.
- 397)** Chen Y, Gelfond JA, McManus LM, Shireman PK. Reproducibility of quantitative RT-PCR array in miRNA expression profiling and comparison with microarray analysis. *BMC Genomics.* 2009 28; (10):407.
- 398)** Sato F, Tsuchiya S, Terasawa K, Tsujimoto G. Intra-platform repeatability and inter-platform comparability of microRNA microarray technology. *PLoS One.* 2009; 4(5): e5540.
- 399)** Yauk CL, Rowan-Carroll A, Stead JD, Williams A. Cross-platform analysis of global microRNA expression technologies. *BMC Genomics.* 2010;26; (11):330
- 400)** Hallenbeck JM, Hansson GK, Becker KJ. Immunology of ischemic vascular disease: plaque to attack. *Trends Immunol.* 2005;26(10):550-6
- 401)** Chamorro A. Role of inflammation in stroke and atherothrombosis. *Cerebrovasc Dis.* 2004;17 Suppl 3:1-5
- 402)** Chim SS, Shing TK, Hung EC, Leung TY, Lau TK, Chiu RW, Lo YM. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem.* 2008; 54(3):482-90. doi: 10.1373/clinchem.2007.097972.
- 403)** Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, Benjamin H, Kushnir M, Cholakh H, Melamed N, Bentwich Z, Hod M, Goren Y, Chajut A. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One.* 2008;5;3(9):e3148.
- 404)** Beg M, Nizami A, Singhal KC, Mohammed J, Gupta A, Azfar SF. Role of serum fibrinogen in patients of ischemic cerebrovascular disease. *Nepal Med Coll J.* 2007 Jun;9(2):88-92
- 405)** Danesh J, Lewington S, Thompson SG, Lowe GD, Collins R, et al. Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular diseases and nonvascular mortality: an individual participant meta-analysis. *Jama,* 2005, 294: 1799–1809
- 406)** Tanne D, Benderly M, Goldbourt U, Boyko V, Brunner D, Graff E, Reicher-Reiss H, Shotan A, Mandelzweig L, Behar S; Bezafibrate Infarction Prevention Study Group. A prospective study of plasma fibrinogen levels and the risk of stroke among participants in the bezafibrate infarction prevention study. *Am J Med.* 2001,15; 111(6):457-63.

- 407)** van Holten TC, Waanders LF, de Groot PG, Vissers J, Hoefler IE, Pasterkamp G, Prins MW, Roest M. Circulating biomarkers for predicting cardiovascular disease risk; a systematic review and comprehensive overview of meta-analyses. *PLoS One*. 2013;22;8(4):e62080.
- 408)** Prospective Studies Collaboration, Lewington S, Whitlock G, Clarke R, Sherliker P, Emberson J, Halsey J, Qizilbash N, Peto R, Collins R. Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55,000 vascular deaths. *Lancet*. 2007; 1; 370(9602):1829-39.
- 409)** Barnett HJ, Taylor DW, Eliasziw M, Fox AJ, Ferguson GG, Haynes RB, Rankin RN, Clagett GP, Hachinski VC, Sackett DL, Thorpe KE, Meldrum HE, Spence JD. Benefit of carotid endarterectomy in patients with symptomatic moderate or severe stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. *N Engl J Med*. 1998, 12; 339(20):1415-25.
- 410)** Silver FL, Mackey A, Clark WM, Brooks W, Timaran CH, Chiu D, Goldstein LB, Meschia JF, Ferguson RD, Moore WS, Howard G, Brott TG; CREST Investigators. Safety of stenting and endarterectomy by symptomatic status in the Carotid Revascularization Endarterectomy Versus Stenting Trial (CREST). *Stroke*. 2011;42(3):675-80.
- 411)** Goldstein LB, Bushnell CD, Adams RJ, et al. Guidelines for the primary prevention of stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 2011; 42:517-84.
- 412)** European Carotid Surgery Trialists' Collaborative Group. MRC European Carotid Surgery Trial: interim results for symptomatic patients with severe (70–99%) or with mild (0–29%) carotid stenosis. *Lancet*. 1991; 337:1235–1243.
- 413)** North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high-grade carotid stenosis. *N Engl J Med*. 1991; 325:445–453.
- 414)** Weiland M, Gao XH, Zhou L, Mi QS. Small RNAs have a large impact: circulating microRNAs as biomarkers for human diseases. *RNA Biol*. 2012; 9(6):850-9.
- 415)** Lin Y, Li D, Liang Q, Liu S, Zuo X, Li L, Sun X, Li W, Guo M, Huang Z. miR-638 regulates differentiation and proliferation in leukemic cells by targeting cyclin-dependent kinase 2. *The Journal of biological chemistry*. 2015; 290: 1818-28
- 416)** Li D, Wang Q, Liu C, Duan H, Zeng X, Zhang B, Li X, Zhao J, Tang S, Li Z, Xing X, Yang P, Chen L, Zeng J, Zhu X, Zhang S, Zhang Z, Ma L, He Z, Wang E, Xiao Y, Zheng Y, Chen W. Aberrant expression of miR-638 contributes to benzo(a)pyrene-induced human cell transformation. *Toxicol Sci*. 2012 ;125(2):382-91.

- 417)** Tay Y, Tan SM, Karreth FA, Lieberman J, Pandolfi PP. Characterization of dual PTEN and p53-targeting microRNAs identifies microRNA-638/Dnm2 as a two-hit oncogenic locus. *Cell reports*. 2014; 8: 714-22
- 418)** Zhao LY, Yao Y, Han J, Yang J, Wang XF, Tong DD, Song TS, Huang C, Shao Y. miR-638 suppresses cell proliferation in gastric cancer by targeting Sp2. *Digestive diseases and sciences*. 2014; 59: 1743-53
- 419)** Zhang J, Bian Z, Zhou J, Song M, Liu Z, Feng Y, Zhe L, Zhang B, Yin Y, Huang Z. MicroRNA-638 inhibits cell proliferation by targeting phospholipase D1 in human gastric carcinoma. *Protein & cell*. 2015; 6: 680-88
- 420)** Zhang J, Fei B, Wang Q, Song M, Yin Y, Zhang B, Ni S, Guo W, Bian Z, Quan C, Liu Z, Wang Y, Yu J, Du X, Hua D, Huang Z. MicroRNA-638 inhibits cell proliferation, invasion and regulates cell cycle by targeting tetraspanin 1 in human colorectal carcinoma. *Oncotarget*. 2014, 15;5(23):12083-96.
- 421)** Xia Y, Wu Y, Liu B, Wang P, Chen Y. Downregulation of miR-638 promotes invasion and proliferation by regulating SOX2 and induces EMT in NSCLC. *FEBS letters*. 2014; 588: 2238245
- 422)** Wang F, Lou JF, Cao Y, Shi XH, Wang P, Xu J, Xie EF, Xu T, Sun RH, Rao JY, Huang PW, Pan SY, Wang H. miR-638 is a new biomarker for outcome prediction of nonsmall cell lung cancer patients receiving chemotherapy. *Exp Mol Med*. 2015;8;47:e162
- 423)** Bhattacharya A, Schmitz U, Raatz Y, Schönherr M, Kotteck T, Schauer M, Franz S, Saalbach A, Anderegg U, Wolkenhauer O, Schadendorf D, Simon JC, Magin T, Vera J, Kunz M. miR-638 promotes melanoma metastasis and protects melanoma cells from apoptosis and autophagy. *Oncotarget*. 2015, 20;6(5):2966-80.
- 424)** Ma K, Pan X, Fan P, He Y, Gu J, Wang W, Zhang T, Li Z, Luo X. Loss of miR-638 in vitro promotes cell invasion and a mesenchymal-like transition by influencing SOX2 expression in colorectal carcinoma cells. *Molecular cancer*. 2014; 13: 118
- 425)** Cheng, J., Chen, Y., Zhao, P., Liu, X., Dong, J., Li, J., Huang, C., Wu, R., & Lv, Y. Downregulation of miRNA-638 promotes angiogenesis and growth of hepatocellular carcinoma by targeting VEGF. 2016; *Oncotarget*, 7(21), 30702-30711.
- 426)** Chopp M, Li Y. Apoptosis in focal cerebral ischemia. *Acta Neurochir Suppl* 1996;66: 21-26
- 427)** Hamada, M., Nakamura, M., Tran, M.T. MafB promotes atherosclerosis by inhibiting foam-cell apoptosis. *Nat. Commun*. 2014; 5: 3147

- 428)** Carlos G. Santos-Gallego. MafB and the role of macrophage apoptosis in atherosclerosis: A time to kill, a time to heal MafB and the role of macrophage apoptosis in atherosclerosis: A time to kill, a time to heal. *Atherosclerosis*. 2016; 252:194-6.
- 429)** Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke*. 2009; 40(5):e331-9.
- 430)** Yang Q, Yin RX, Zhou YJ, Cao XL, Guo T, Chen WX. Association of polymorphisms in the MAFB gene and the risk of coronary artery disease and ischemic stroke: a case-control study. *Lipids Health Dis* 2015; 14:79.
- 431)** Naylor AR, Sillesen H, Schroeder TV. Clinical and imaging features associated with an increased risk of early and late stroke in patients with symptomatic carotid disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2015; 49(5):513-23.
- 432)** O'Brien M, Chandra A. Carotid revascularization: risks and benefits. *Vasc Health Risk Manag* 2014; 10:403-16.
- 433)** Naylor AR. Why is the management of asymptomatic carotid disease so controversial? *Surgeon* 2015; 13(1):34-43.
- 434)** Davies KJ, Thapar A, Kasivisvanathan V, Shalhoub J, Davies AH. Review of trans-atlantic cardiovascular best medical therapy guidelines - recommendations for asymptomatic carotid atherosclerosis. *Curr Vasc Pharmacol*. 2013;11(4):514-23.
- 435)** Ricotta JJ, Aburama A, Ascher E, Eskandari M, Faries P, Lal BK. Updated Society for Vascular Surgery guidelines for management of extracranial carotid disease: executive summary. *J Vasc Surg* 2011;54(3):832-6
- 436)** Brott TG, Halperin JL, Abbara S, et al. ASA/ACCF/AHA/AANN/AANS/ACR/ASNR/CNS/SAIP/SCAI/SIR/SNIS/SVM/SVS guideline on the management of patients with extracranial carotid and vertebral artery disease: executive summary. A report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, and the American Stroke Association, American Association of Neuroscience Nurses, American Association of Neurological Surgeons, American College of Radiology, American Society of Neuroradiology, Congress of Neurological Surgeons, Society of Atherosclerosis Imaging and Prevention, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society of Interventional Radiology, Society of NeuroInterventional Surgery, Society for Vascular Medicine, and Society for Vascular Surgery. *Circulation* 2011; 124(4):489-532.),(Ricotta JJ 2nd, Piazza M: Carotid endarterectomy or carotid artery stenting? Matching the patient to the intervention. *Perspect Vasc Surg Endovasc Ther*. 2011; 22: 124–136.

- 437)** Pearen MA, Ryall JG, Maxwell MA, Ohkura N, Lynch GS, Muscat GE (Nov 2006). "The orphan nuclear receptor, NOR-1, is a target of beta-adrenergic signaling in skeletal muscle". *Endocrinology*. 147 (11): 5217–27
- 438)** Pearen MA, Myers SA, Raichur S, Ryall JG, Lynch GS, Muscat GE (Jun 2008). "The orphan nuclear receptor, NOR-1, a target of beta-adrenergic signaling, regulates gene expression that controls oxidative metabolism in skeletal muscle". *Endocrinology*. 149 (6): 2853–65.
- 439)** Nomiya T, Nakamachi T, Gizard F, Heywood EB, Jones KL, Ohkura N, Kawamori R, Conneely OM, Bruemmer D. The NR4A orphan nuclear receptor NOR1 is induced by platelet-derived growth factor and mediates vascular smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem*. 2006 3; 281(44):33467-76.
- 440)** Hergenreider E, Heydt S, Tréguer K, Boettger T, Horrevoets AJ, Zeiher AM, Scheffer MP, Frangakis AS, Yin X, Mayr M, Braun T, Urbich C, Boon RA, Dimmeler S. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nat Cell Biol*. 2012, 12;14(3):249-56.
- 441)** Marques FZ, Campain AE, Tomaszewski M. Gene expression profiling reveals renin mRNA overexpression in human hypertensive kidneys and a role for microRNAs. *Hypertension* 2011; 58(6):1093-8.
- 442)** Christenson SA, Brandsma CA, Campbell JD, Knight DA, Pechkovsky DV, Hogg JC, Timens W, Postma DS, Lenburg M, Spira A. miR-638 regulates gene expression networks associated with emphysematous lung destruction. *Genome Med*. 2013, 31; 5(12):114.
- 443)** Kannel WB, Wolf PA, Verter J. Manifestations of coronary disease predisposing to stroke. The Framingham study. *Jama* 1983; 250(21):2942-6.
- 444)** Brase JC, Johannes M, Schlomm T, Falth M, Haese A, Steuber T, Beissbarth T, Kuner R, Sultmann H. Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. *Int J Cancer*. 2011;128:608–616
- 445)** Zahm AM, Thayu M, Hand NJ, Horner A, Leonard MB, Friedman JR. Circulating microRNA is a biomarker of pediatric Crohn disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2011; 53:26–33
- 446)** Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008; 3(6):1101-8
- 447)** Kang K, Peng X, Luo J, Gou D. Identification of circulating miRNA biomarkers based on global quantitative real-time PCR profiling. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 2012;3(1):4

448) Kawachi I, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Manson JE, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. Smoking cessation and decreased risk of stroke in women. *JAMA*. 1993, 13; 269(2):232-6.

449) Wannamethee SG, Shaper AG, Whincup PH, Walker M. Smoking cessation and the risk of stroke in middle-aged men. *Jama* 1995;274(2):155-60.

450) Brott TG, Halperin JL, Abbara S, et al. 2011 ASA/ACCF/AHA/AANN/AANS/ACR/ASNR/CNS/SAIP/SCAI/SIR/SNIS/SVM/SVS guideline on the management of patients with extracranial carotid and vertebral artery disease: executive summary. A report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, and the American Stroke Association, American Association of Neuroscience Nurses, American Association of Neurological Surgeons, American College of Radiology, American Society of Neuroradiology, Congress of Neurological Surgeons, Society of Atherosclerosis Imaging and Prevention, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society of Interventional Radiology, Society of NeuroInterventional Surgery, Society for Vascular Medicine, and Society for Vascular Surgery. *Circulation* 2011; 124(4):489-532.

451) Long G, Wang F, Li H, Yin Z, Sandip C, Lou Y, Wang Y, Chen C, Wang DW. Circulating miR-30a, miR-126 and let-7b as biomarker for ischemic stroke in humans. *BMC Neurol*. 2013, 16; 13:178.

452) Sarlon-Bartoli G, Boudes A, Buffat C, Bartoli MA, Piercecchi-Marti MD, Sarlon E, Arnaud L, Bennis Y, Thevenin B, Squarcioni C, Nicoli F, Dignat-George F, Sabatier F, Magnan PE; RISC Study Group. Circulating lipoprotein-associated phospholipase A2 in high-grade carotid stenosis: a new biomarker for predicting unstable plaque. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2012; 43(2):154-9.

453) Sarlon-Bartoli G, Bennis Y, Lacroix R, Piercecchi-Marti MD, Bartoli MA, Arnaud L, Mancini J, Boudes A, Sarlon E, Thevenin B, Leroyer AS, Squarcioni C, Magnan PE, Dignat-George F, Sabatier F. Plasmatic level of leukocyte-derived microparticles is associated with unstable plaque in asymptomatic patients with high-grade carotid stenosis. *J Am Coll Cardiol*. 2013; 15; 62(16):1436-41.

454) Jaczewska J, Abdulredha MH, Yau CY, Schmitt MM, Schubert I, Berggren PO, Weber C, Koenen RR, Moy VT, Wojcikiewicz EP. TNF- α and IFN- γ promote lymphocyte adhesion to endothelial junctional regions facilitating transendothelial migration. *J Leukoc Biol*. 2014; 95(2):265-74.

ANEXOS

8. Anexos

8.1 Anexo 1:

Este estudio trata sobre la predicción precoz de la PE temprana, ha sido publicado en la revista *Scientific Reports*, con factor de impacto de 5.228:

“Usefulness of circulating microRNAs for the prediction of early preeclampsia at first-trimester of pregnancy”.

8.2 Anexo 2:

El segundo estudio trata sobre la predicción precoz del ictus, ha sido enviado a la revista *Journal of Neurosurgery* con factor de impacto de 4.059 y está en proceso de revisión: “**Low levels of serum miR-638 are associated with atherosclerotic plaque vulnerability in patients with high-grade carotid stenosis**”.

