



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"
CAMPO DEL CONOCIMIENTO CIENCIAS MÉDICAS

**“Cambios en la expresión génica secundaria al efecto de antiagregantes
plaquetarios en la modulación de miR-145 y su efecto en la formación de
hiperplasia intimal en un modelo de fuerza tensional radial”**

TESIS DOCTORAL
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:
MC HUGO LAPARRA ESCAREÑO

TUTOR O TUTORES PRINCIPALES
ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA, INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y
NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
CARLOS ARTURO HINOJOSA BECERRIL, INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS
MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"
JOSEFINA MARÍA ALBERÚ GÓMEZ, INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y
NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"
MARÍA DEL CARMEN JIMÉNEZ MARTÍNEZ, INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA
FUNDACIÓN CONDE DE VALENCIANA

CIUDAD DE MÉXICO, MAYO DE 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

Página

3.	Resumen
4.	Introducción
25.	Planteamiento del problema
26.	Justificación
27.	Objetivos
27.	Hipótesis
27.	Metodología
39.	Resultados
50.	Discusión
58.	Conclusión
59.	Referencias

RESUMEN

Antecedentes: Las venas se utilizan como injerto vascular en un gran número de intervenciones de revascularización. A pesar de ser considerados como el mejor injerto, no están exentos de complicaciones. La hiperplasia intimal se define como la respuesta celular y molecular caracterizada por una proliferación continua, anormal, excéntrica, predominantemente de células musculares lisas (CML), tejido conectivo y matriz extracelular. El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) es el mitógeno más potente liberado posterior a una manipulación o lesión vascular y se ha identificado como importante efector de hiperplasia intimal.

Métodos: El objetivo de este estudio fue evaluar la expresión relativa de miR-145, miR-146 y miR-155 en la fase exploratoria. En la fase de descubrimiento realizamos el panel de microarreglos y realizamos los contrastes entre el grupo control, grupo de fístula arterio venosa y grupo experimental (fístula arteriovenosa bajo el efecto de Mesilato de Imatinib, un fármaco con efecto inhibidor del receptor de PDGF). Para ello utilizamos un modelo experimental de hiperplasia intimal donde se realiza una fístula arteriovenosa mediante una punción entre la vena cava inferior y la aorta abdominal.

Resultados: Nuestros datos indican que existe una regulación a la baja de miR-145 en la porción venosa y arterial de AVF, en comparación con el control. Asimismo, encontramos regulación positiva de miR-146 y miR-155 tanto en la porción venosa como arterial de la FAV, en comparación con el control. En la fase de descubrimiento encontramos diferencias en la regulación de miRNAs, asociados al uso de Mesilato de Imatinib, sobre genes diana con funciones estructurales de proliferación, diferenciación, migración, inflamación y muerte celular.

Conclusión: Como observamos en los resultados de nuestro estudio, la regulación de miRNAs sobre genes con funciones en la remodelación tisular de una fístula arteriovenosa que desembocan en la estructura cicatrizal en la pared de los vasos sanguíneos asociada a la activación de la agregación plaquetaria y su inhibición es muy importante. En el entorno específico de la hiperplasia intimal venosa, es fundamental conocer en profundidad los mecanismos moleculares con efectos sobre el endotelio y su interacción con las CML, en particular de los miRNAs encontrados con regulación a la alta y a la baja, así como los genes diana con funciones estructurales sobre la pared de la vena. Una de las principales importancias de esto es el desarrollo de posibles dianas terapéuticas.

Abreviaturas: Micro RNA (miRNA), células musculares lisas (CML), fístula arterio venosa (fav), grupo control (GC), grupo de fístula arterio venosa (G-FAV), grupo experimental (GE), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-R).

INTRODUCCIÓN

La aterosclerosis como consecuencia de la acumulación de lípidos en las paredes arteriales constituye la principal causa de enfermedad, discapacidad y muerte en la mayor parte de los países industrializados. Se han propuesto numerosas estrategias para el diagnóstico y tratamiento de esta patología. (1)

Las venas se utilizan como injerto vascular en un gran número de intervenciones de revascularización a nivel coronario y vascular periférico debido a su efectividad y permeabilidad. En Estados Unidos se utilizan aproximadamente 330,000 injertos autólogos de vena safena en este tipo de procedimientos en el transcurso de un año. Los injertos venosos al tener una estructura biológica tienen diferencias significativas con los injertos sintéticos y son capaces de interactuar con el medio y responder a estímulos bioquímicos y hemodinámicos. (2)

A pesar de ser considerados como el mejor injerto, no están exentos de complicaciones. Los injertos venosos cuyo ambiente hemodinámico fisiológico se caracteriza por un flujo sanguíneo con bajo estrés longitudinal y radial, al ser utilizados como un conducto en el sistema arterial presentan remodelación de su estructura vascular. En otras palabras el injerto se adapta al flujo sanguíneo de alta presión “arterializándose”, es decir, aumentando la cantidad de matriz extracelular y células musculares lisas bajo el endotelio venoso, un proceso conocido como hiperplasia intimal.(3)

La hiperplasia intimal se define como la respuesta celular y molecular

caracterizada por una proliferación continua, anormal, excéntrica, predominantemente de células musculares lisas (CML), tejido conectivo y matriz extracelular, siendo el resultado final la hiperplasia de la pared del vaso y la estenosis luminal. (4) (5)

En procedimientos de derivación arterial la lesión se produce en la porción venosa proximal a la anastomosis arterial. La lesión del endotelio venoso secundaria a las turbulencias del flujo juega un papel importante. Cuando el engrosamiento del endotelio vascular es excesivo puede comprometer la permeabilidad del injerto. (6) (7)

La permeabilidad de los procedimientos de revascularización es variable y depende de varios factores. Según ensayos clínicos controlados la permeabilidad reportada al año es de 30 - 50%. La hiperplasia del endotelio venoso como parte de una remodelación vascular excesiva se ha identificado como la principal causa de falla en este tipo de procedimientos. (8) (9)

La hiperplasia intimal fue identificada como una complicación de las reconstrucciones arteriales desde 1906, cuando Carrel y Guthrie observaron la formación de un “engrosamiento translúcido” semejante al endotelio en las anastomosis de injertos venosos implantados en arterias. (10)

La generación de la hiperplasia intimal involucra una serie de procesos biológicos complejos que se producen posterior a la lesión del endotelio vascular en un intento por reparar su estructura y función. Este engrosamiento a nivel del endotelio venoso

reduce el espacio intraluminal, lo cual predispone a la trombosis de las reconstrucciones vasculares.

La hiperplasia intimal habitualmente incluye la presencia de células musculares lisas (CML) alfa - actina positivas, abundantes componentes de matriz extracelular, componentes celulares inflamatorios como macrófagos, leucocitos y una gran variedad de mediadores y citoquinas, los cuales actúan de forma coordinada en un intento por adaptarse a los cambios hemodinámicos descritos. (11)

La mayor parte de la investigación celular y molecular de la hiperplasia intimal durante años estuvo enfocada al endotelio arterial, sobre todo del territorio coronario. Se ha puesto menos atención en el entorno específico del endotelio venoso y aunque se comparten algunos elementos, debido a las diferencias fisiológicas y anatómicas, las venas han demostrado ser más susceptibles a la formación de hiperplasia intimal. (12) (13) (14)

Se ha observado que en las venas hay menos componentes celulares y estructurales especialmente en la capa media y elástica, lo que lleva a un vaso sanguíneo que es más delgado y susceptible a los cambios hemodinámicos. Por otro lado, las fuerzas hemodinámicas que actúan sobre el endotelio venoso activan con más facilidad la proliferación de CML, comparadas con el endotelio arterial. (12) (15)

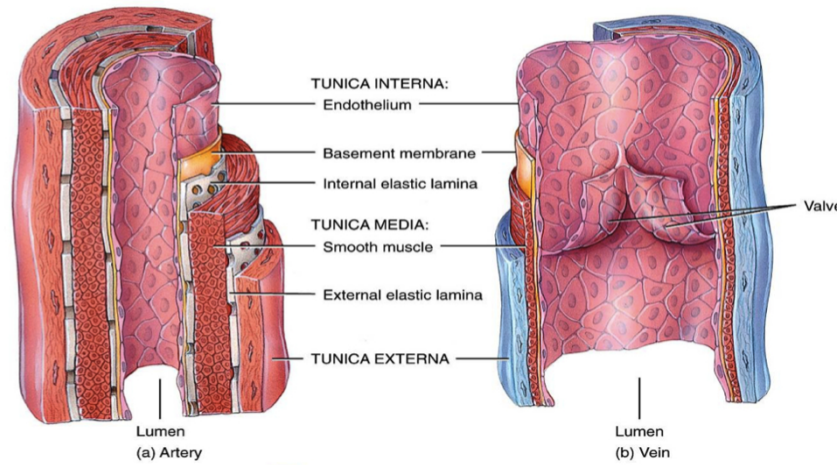


FIGURA 1. DIFERENCIAS ENTRE VENA Y ARTERIA

El mejor ejemplo para este concepto son los resultados de injertos de vena safena comparados con injertos de arteria mamaria interna para revascularización coronaria. La vena safena mayor y la arteria mamaria interna se han utilizado de forma rutinaria como injertos.

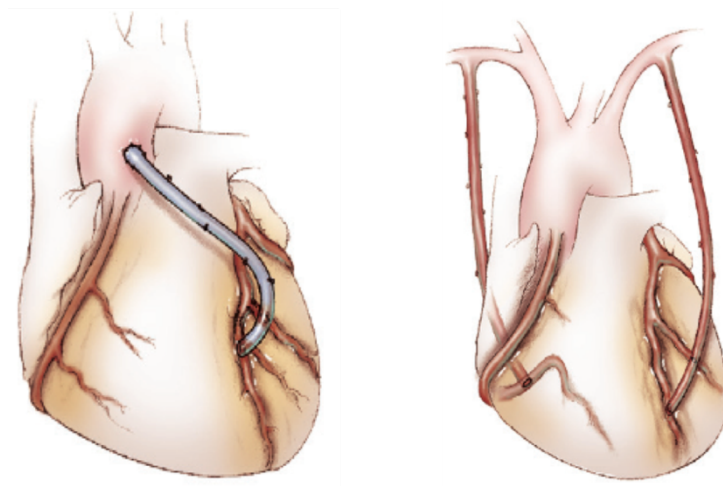


FIGURA 2. Injertos arteriales y venosos

La vena safena autóloga es el injerto utilizado con más frecuencia debido a su localización, longitud y fácil procuración, sin embargo, a costa de menor permeabilidad debido a una tasa más elevada de estenosis por hiperplasia intimal. Después del primer año de revascularización miocárdica más de 15% de los injertos venosos se encuentran ocluidos. En contraste con la vena safena, la arteria mamaria interna ha demostrado tener más resistencia a la estenosis con tasas de permeabilidad tan altas como 80% a 10 años después del procedimiento. (16)

Estos conceptos también se han observado por medio de estudios “in vitro”. Un ejemplo fue el realizado por Wong Et al, en donde se estudiaron las diferencias fenotípicas y funcionales entre CML de arterias y venas. En este trabajo se demostró que las CML venosas están menos diferenciadas y demuestran una mayor capacidad proliferativa y sintética que las CML arteriales. Estas características funcionales y fenotípicas específicas de CML en venas podrían explicar la rápida progresión de hiperplasia intimal que se produce en los injertos venosos en comparación con los injertos arteriales. (12)

Aunque el injerto se implanta en una modalidad “reversa” la presencia de válvulas produce un aumento en la impedancia del flujo laminar a través del injerto, especialmente en condiciones de alto estrés radial y longitudinal lo cual se traduce en turbulencia, una causa importante de lesión endotelial. Finalmente la pérdida en el balance de factores relajantes derivados del endotelio como en el contexto de un ambiente de alto estrés oxidante predispone a la adhesión, agregación y activación plaquetaria. (14) (17)

Para la mejor comprensión de los eventos biológicos habitualmente se han descrito tres fases o etapas de formación de la hiperplasia intimal, dentro de las cuales existen diferencias significativas tanto de los eventos moleculares, cascadas de señalización y componentes celulares. (7)

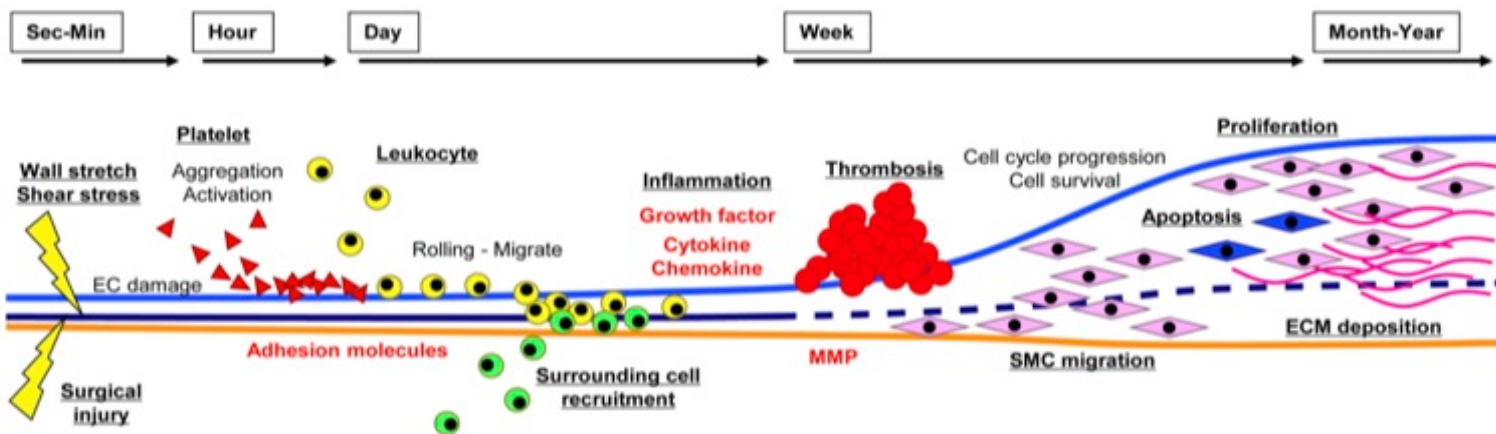


FIGURA 3. Etapas en la formación de hiperplasia intimal

Primera Fase : Apoptosis y Proliferación

Es la fase más aguda y se presenta en las primeras 24 horas posterior a la lesión del endotelio venoso. Al exponer el endotelio venoso a la circulación arterial, aumentan las fuerzas de tensión radial y de estrés longitudinal. Tan pronto como 30 minutos posterior a la lesión del endotelio inician vías apoptóticas secundarias a la pérdida de las uniones integrina – matriz extracelular, las cuales producen remodelación celular hasta en el 70% de las células musculares lisas. (18)

El endotelio normalmente produce factores que mantienen la homeostasis e inhiben la proliferación de CML. Estos son principalmente prostaciclina, heparán sulfato, óxido nítrico y péptido natriurético. Al perderse el equilibrio y disminuir su actividad se estimula la proliferación de estos componentes celulares. En sentido contrario también hay factores liberados tras la lesión del endotelio y que estimulan la proliferación de CML, ejemplos de ellos son Angiotensina II, C-myc, C-fos, bGFG, TGF-B y PDGF y citocinas inflamatorias como IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- α . (17) (7) (19)

El PDGF es de especial importancia en esta fase. Este factor de crecimiento se libera posterior a la degranulación de plaquetas que sucede posterior a la exposición de matriz subendotelial por el trauma al endotelio, con lo cual se inicia la cascada de agregación plaquetaria.

PDGF tiene un pico de liberación en las primeras 12 horas y su presencia se ha identificado como un importante factor mitogénico y quimioatrayente para CML. (20) De especial importancia es la isoforma PDGF-BB que aumenta su actividad aproximadamente 20 veces y tiene una afinidad predominante por el receptor PDGF-R, el cual es activado por medio de la vía de tirosina – cinasa. (21)

En consecuencia se produce un desbalance entre factores inhibidores y estimulantes cuyo resultado final es producir la migración de células musculares lisas hacia el espacio subendotelial en un intento por reparar la lesión del endotelio. En esta fase de proliferación las CML sufren la transformación de un fenotipo contráctil quiescente a un fenotipo proliferativo como resultado de la activación de

las citocinas y factores de crecimiento previamente mencionados, dentro de los cuales PDGF juega un papel primordial.

Aunque se han reportado algunas cascadas de señalización en la activación de las CML, una de las principales es la vía de fosfoinositol 3 Kinasa (P13k) - Akt. (21) (22) Se han documentado dos tipos principales de CML, un fenotipo quiescente, contráctil y diferenciado cuya estructura se compone esencialmente de alfa-actina y miosina, las cuales tienen una tasa de proliferación menor al 0.1% y constituyen los elementos celulares de la capa media de vasos sanguíneos sanos. (7) Por otro lado se encuentra el fenotipo sintético, el cual tiene semejanzas con las CML fetales y los fibroblastos en fase proliferativa. (7)

Las CML con fenotipo sintético se componen de gran cantidad de organelos celulares y abundante retículo endoplásmico, además producen 5 veces más matriz extracelular que el fenotipo diferenciado. Finalmente una característica que distingue a estas células es la disminución en la cantidad de miosina y un aumento en la beta-actina, la cual en algunas ocasiones se utiliza como marcador celular. En modelos experimentales se ha reportado un aumento en la proliferación del fenotipo proliferativo desde un 0.06% hasta un 10 – 40 %.[10][13][16] (7) (20) (23)

Segunda fase: Migración de CML

Un endotelio intacto, lo cual además incluye a las demás capas del vaso sanguíneo especialmente la capa muscular y lámina elástica interna, mantiene a las CML en estado quiescente y contráctil, de esta forma evitando su migración. Las

CML son un elemento fundamental en los vasos sanguíneos ya que constituyen el soporte estructural, confieren elasticidad y regulan el tono vascular (vasodilatación y vasoconstricción).

Sin embargo posterior a la pérdida de esta arquitectura posterior a un estímulo como lo es una lesión vascular, se pierde este equilibrio fisiológico y estructural. (24) Varias de las citocinas y factores de crecimiento previamente mencionados contribuyen a la migración de CML, sin embargo el más importante y debido a sus efectos quimioatrayentes es PDGF. Se ha identificado además que las CML que se encuentran en fase de migración tienen alta expresión del receptor de PDGF – BB. (25) (26)

Algunas de las vías de señalización identificados por medio de las cuales se produce la migración de CML son la activación de Calmodulina Kinasa II activada por Ca, activación de Proteínas G del monómero de la familia Rho cinasa Cdc42, Rac y Rho. Además las vías de MAP Kinasas y Fosfatidil Inositol 3 kinasa también juegan un papel fundamental. (27) (5)

La migración de CML de la capa media hacia la capa íntima tiene un pico a los 7 días de la lesión y continúa hasta 1 mes después de la misma. La acumulación progresiva de células musculares lisas en el espacio subendotelial constituye el elemento celular más importante en la estenosis endoluminal que compromete la permeabilidad de las reconstrucciones vasculares. (20) (27) (5)

Tercera fase: Proliferación de CML

La última fase representa la remodelación del endotelio vascular, adaptado a un nuevo ambiente biológico, el cual consiste esencialmente en restaurar la normalidad posterior a la lesión vascular. Posterior a la migración de la CML, éstas siguen proliferando y acumulándose bajo el endotelio. Se ha documentado además la producción constante matriz extracelular como colágeno y proteoglicanos que en gran medida son sintetizados por las mismas CML estimuladas por PDGF y es pieza clave en el soporte estructural de la nueva arquitectura vascular. (5) Por otro lado, la presencia de citocinas inflamatorias y factores de crecimiento aumenta la producción de metaloproteinasas, enzimas con la capacidad de remodelar las membranas basales y los componentes de matriz extracelular.

Los procesos de acumulación de CML y el volumen de producción de matriz extracelular parecen estar estrechamente relacionados, con proporciones bastante constantes de ambos elementos. Idealmente cuando el tejido vascular ha sido reparado de forma exitosa, la migración, proliferación y remodelación tendrían que llegar a su fin. Sin embargo, cuando este proceso continúa de forma patológica puede dar como resultado la acumulación anormal de componentes celulares y matriz extracelular. Las vías de señalización molecular identificadas más importantes en esta última etapa son la vía de Ras-MAPK y PI3K- Akt. (28) (29)

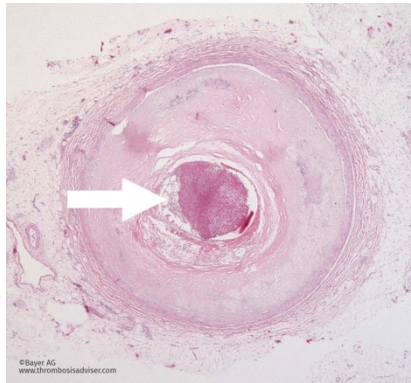


FIGURA 4. La hiperplasia intimal se forma por la migración y proliferación de células musculares lisas.

ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS PROPUESTAS PARA LA PREVENCIÓN DE HIPERPLASIA INTIMAL

Siendo la hiperplasia intimal la principal causa de falla en los injertos venosos, se han propuesto diversos tratamientos que van desde innovaciones en cirugía abierta y endovascular, tratamientos farmacológicos, hasta terapias génicas, cuyos resultados en algunos casos continúan siendo controversiales.

Una de las causas propuestas para la falta de resultados contundentes en el ámbito terapéutico es la falta de conocimiento para comprender las vías de expresión genómica que regulan la formación de hiperplasia intimal con el objetivo de diseñar estrategias terapéuticas dirigidas más eficaces. (30)

Hasta el momento la revisión quirúrgica de la anastomosis posterior a la falla de un injerto venoso continúa siendo el estándar de oro. La permeabilidad reportada a

un año es de 96 % a un año y de 85% a 5 años aproximadamente, sin embargo posterior a este tiempo, la tasa de permeabilidad disminuye de forma inversamente proporcional, con respecto al tiempo de la cirugía de exploración del injerto. (31)

TERAPIA ANTIAGREGANTE PLAQUETARIA EN CIRUGÍA VASCULAR Y BLANCOS TERAPÉUTICOS

El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) es el mitógeno más potente liberado posterior a una manipulación o lesión vascular y es liberado por plaquetas, células musculares lisas y células endoteliales. (32) (33)

Hay varias isoformas de PDGF, dependiendo del tipo de ligando. Se han descrito esencialmente 5 ligandos conocidos como A, B, C y D y un heterodímero AB. (34) Las isoformas de PDGF se unen a PDGFR, el cual es un receptor de superficie celular de tirosina - cinasa.

La unión del ligando produce la autofosforilación de los receptores en los residuos de tirosina y este evento induce a su activación. (35) Existen esencialmente dos tipos de receptores: PDGFR α y PDGFR β , con estructura y funciones diferentes, ya que no son codificados por el mismo gen. (35) (36)

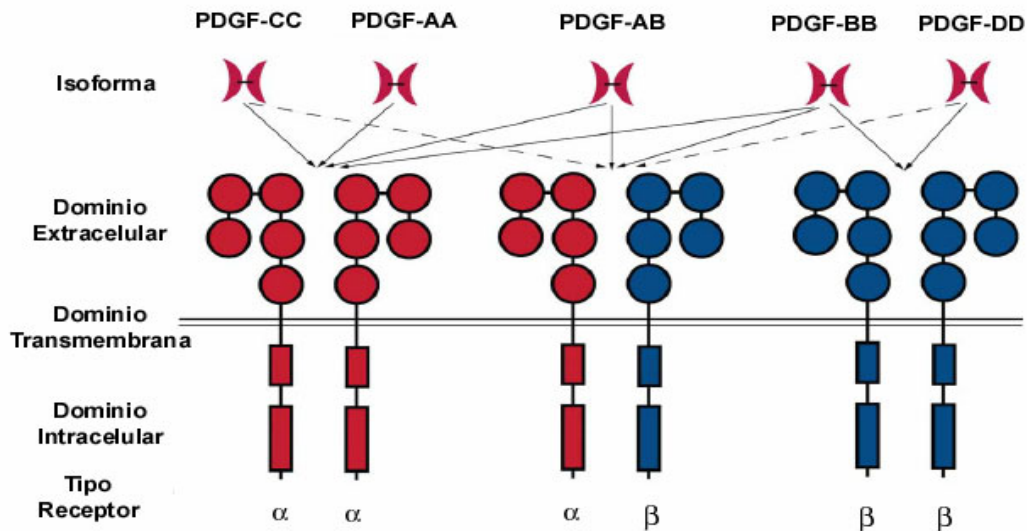


FIGURA 5. Isoformas de PDGF

Se han documentado diferencias importantes en cuanto a las funciones de los distintos tipos de isoformas y activación de receptores. Particularmente importante fue la diferencia entre arterias y venas. (37) PDGF-AA aumentó significativamente la proliferación en CML de arterias, pero no tuvo ningún efecto sobre la proliferación de CML en venas. Por el contrario las CML en venas tienen una respuesta proliferativa más potente a PDGF-BB que las CML arteriales. Esta diferencia probablemente se deba a la mayor expresión de PDGFRβ en venas y a la transactivación de EGF-R (receptor del factor de crecimiento epidérmico) inducida por PDGF-BB en CML de venas. (32)

Debido al importante papel de PDGF en la generación de hiperplasia intimal se ha propuesto a la terapia antiagregante como un modulador en la respuesta endotelial

teniendo como blanco terapéutico el bloqueo de la activación de la cascada de agregación plaquetaria. La terapia antiplaquetaria tanto en modelos animales experimentales como en seres humanos ha demostrado la importancia de las plaquetas en el proceso de estenosis vascular. (33)

En estudios experimentales previos sobre fármacos antiagregantes particularmente sobre ASA, ticlopidina y clopidogrel se demostró la efectividad de la terapia antiagregante en la prevención de hiperplasia intimal en arterias. (38) (39)

En otros estudios previos, incluyendo uno realizado por los investigadores que realizan esta tesis se ha demostrado el efecto inhibitorio de Cilostazol, un fármaco con actividad antiagregante plaquetaria, sobre la generación de hiperplasia intimal en el endotelio venoso. (39) (40)

Durante los últimos años se han propuesto tratamientos dirigidos hacia blancos terapéuticos clave en la generación de hiperplasia intimal, dentro de los cuales se encuentran especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico, prostaciclina, endotelina 1, angiotensina II, canales de calcio, metaloproteinasas, proteínas G, mitógenos activados por protein kinasas y factores de crecimiento, dentro de los cuales PDGF ha tenido un interés especial. (30) (41) (42)

Se ha propuesto incluso definir y modificar blancos terapéuticos por medio de terapia génica, con lo cual se tiene la ventaja de realizar el tratamiento de forma dirigida a los mecanismos fisiopatológicos causantes de la disfunción de los injertos vasculares. (43) Los potenciales blancos terapéuticos dentro de la terapia génica

incluyen a las células endoteliales, células musculares lisas, la activación de la cascada de la coagulación, vías inflamatorias y los mecanismos moleculares que activan factores de crecimiento, especialmente PDGF. (44)

Con respecto a este último, un ejemplo fue el experimento realizado por Cohen y Sacks en donde se demostró que la administración de nanopartículas de un RNA antisentido del receptor B del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) inhibe la formación de hiperplasia intimal en un modelo de lesión vascular en rata. (45)

Finalmente, se ha puesto interés en el bloqueo del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR). PDGF es un dímero de 30 kDa compuesto por una cadena A y / o B, que están codificadas por genes separados y regulados independientemente. Las cadenas PDGF-C y PDGF-D, secretadas como factores latentes e inactivos, se descubrieron más recientemente y su biología no está bien establecida. (46).

Las estrategias para la inhibición de la señalización de PDGF incluyen anticuerpos contra PDGF o PDGF-R, proteínas de fusión recombinantes de PDGF-R, aptámeros de oligonucleótidos que interfieren con la señalización de PDGF-R y fármacos inhibidores de PDGF-R. (47) (48)

Estos fármacos se han estudiado en el ámbito clínico y experimental. Algunos de ellos se utilizan de forma rutinaria en el campo de enfermedades autoinmunes, oncológicas, hematológicas, entre otras. Tal es el caso del mesilato de imatinib

(Gleevec, Novartis), que ha demostrado tener un efecto terapéutico en pacientes con leucemia mieloide crónica. (49)

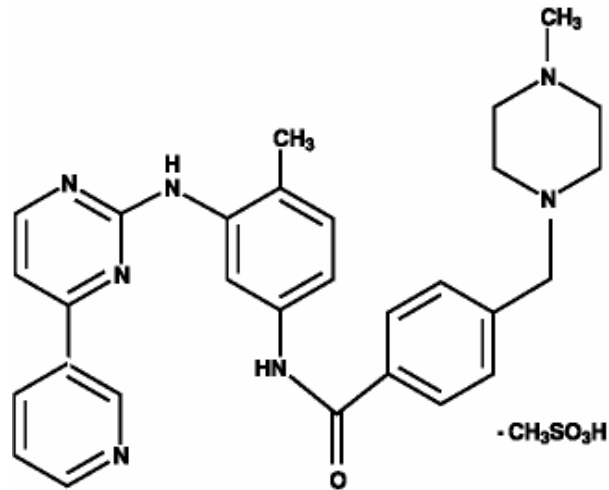


FIGURA 6. Estructura química del mesilato de Imatinib

Imatinib también ha sido evaluado como inhibidor selectivo del PDGF-R en estudios clínicos y experimentales. (50) Debido a su mecanismo de acción este fármaco se ha propuesto como un inhibidor de hiperplasia intimal en estudios experimentales realizados en arterias. Se observó un efecto antiproliferativo de Imatinib en CML, lo cual se asoció con disminución de hiperplasia intimal en análisis histopatológico. Hasta la fecha no se han realizado estudios en humanos ya que el potencial antiproliferativo de este fármaco aún se encuentra en estudio. (51)

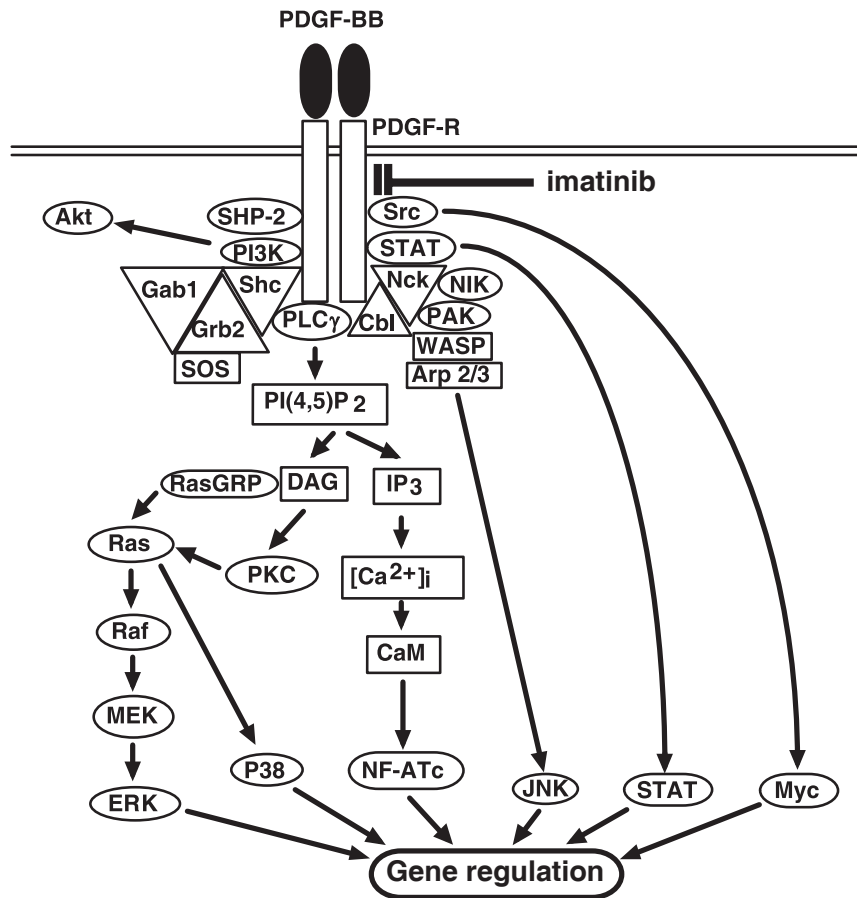


FIGURA 7. Efectos de Imatinib en el receptor de PDGF-R

Estos estudios experimentales han sido realizados en animales de laboratorio. Es importante mencionar el primer ensayo clínico controlado en humanos dentro del campo de cirugía vascular, el estudio PREVENT. Este análisis fue publicado en 1999 y reportó la seguridad y eficacia biológica derivado del bloqueo del factor de transcripción E2F, un importante mitógeno en el ciclo celular y que se ha asociado a la formación de hiperplasia intimal en injertos vasculares. (52)

El primer estudio incluyó 41 pacientes a los cuales se les realizó una derivación femoropoplítea y aunque no se reportaron diferencias significativas respecto al grupo control, sentó las bases para más evaluaciones mediante terapia génica en este campo. (52) Durante los años siguientes se realizaron más análisis derivados del bloqueo de este factor de transcripción en injertos vasculares, en donde además se incluyeron puentes aorto – coronarios. (9) (53)

EL PAPEL DE miRNAs EN LA BIOLOGÍA VASCULAR DE LA ESTENOSIS EN INJERTOS VENOSOS

Los miRNAs son pequeñas secuencias (de aproximadamente 22 PB) de RNA no codificante que funcionan como reguladores postranscripcionales negativos de la expresión génica por medio de degradación completa o parcial de sus RNAm diana. (54) Se han identificado como reguladores importantes tanto de procesos biológicos como de patologías como el cáncer (55) y enfermedades en el sistema cardiovascular. (56)

Lin-4 fue el primer miRNA del cual se reportaron sus funciones. Fue descubierto en el nematodo *Caenorhabditis Elegans* en 1993. La descripción de las funciones de estas secuencias no codificantes en vertebrados se realizó hasta el 2001. A partir de esta fecha se ha detallado el funcionamiento de más de 800 miRNAs en mamíferos, incluidos el ser humano. (57)

Un miRNA puede regular la expresión de múltiples genes y desde el punto de vista funcional es tan importante como cualquier otro factor de transcripción. De

hecho se ha identificado que los miRNAs pueden regular hasta el 30% de los genes en una célula y por lo tanto su presencia es relevante en la regulación de los principales procesos celulares. (58)

Debido a sus funciones reguladoras, los miRNAs son moduladores críticos para importantes funciones celulares como diferenciación celular, contracción, migración, proliferación y apoptosis. Es de esperarse que su expresión se encuentre alterada en los principales procesos patológicos en el sistema cardiovascular. (57)

El control de la proliferación celular está asociado con estas secuencias no codificantes, de hecho la hiperplasia intimal incluye un proceso inestable de inhibición de RNAm. La acción catalítica de los miRNAs es compleja y se realiza a través del complejo RISC y exonucleasas en el sitio 3'-UTR o por medio de represión / desestabilización (P-bodies). Varias características hacen que los miRNAs sean reguladores de la expresión génica, particularmente de genes proliferativos asociados con la hiperplasia intimal.

El conocimiento del control de los miRNAs asociados a la fisiopatología de la hiperplasia intimal necesita ser estudiado. Este es un mecanismo complejo debido a la amplia gama de posibilidades al vincular la expresión génica a una combinación de diferentes reguladores. (59) (60) (61) Varios miRNAs juegan un papel regulador importante en procesos celulares y pueden contribuir al inicio, desarrollo y progresión de enfermedades vasculares, como lo es la hiperplasia intimal. (62) (63) (64)

Se han identificado algunos miRNAs con especial afinidad por los cambios estructurales en las células del músculo liso. Una de las características más interesantes de los miRNAs es que aunque sean reguladores de varios genes, su expresión es específica de células y tejidos. El ejemplo clásico al hablar de vasos sanguíneos es miR-145, cuya expresión es específica de CML diferenciadas, siendo incluso un marcador celular. (65)

La aterosclerosis, una de las principales causas de muerte cardiovascular en el mundo consiste en la formación de placas de ateroma, en donde se ha identificado una regulación a la baja de miR-145 en células musculares lisas. Por otro lado, una regulación a la alta de miR-145 en las células espumosas (macrófagos con alto contenido en lípidos) disminuye el porcentaje de placa de ateroma. (66)

En arterias la regulación a la baja de miR-145 se ha identificado como un marcador para la formación de hiperplasia intimal. Cheng y Cols. reportaron que miR-145 es el miRNA más abundante en paredes vasculares normales y en CML aisladas, representando un importante regulador fenotípico. De hecho miR-145 se expresa selectivamente en CML de la pared vascular y su expresión está regulada de forma negativa en las paredes vasculares con hiperplasia intimal y en CML en estado proliferativo inducido por PDGF. (65)

En el estudio de Peter y Cols. se reportó que se requieren niveles de expresión intactos de miR-145 para que las CML presenten un fenotipo quiescente. (15) De forma interesante la regulación negativa de miR-145 se ha asociado a la transformación fenotípica de un estado quiescente a un estado proliferativo (67) y

esto fue corroborado por Zhang quien reportó que la sobreexpresión de miR-145 aumentó la expresión de genes marcadores de diferenciación de CML tales como α -actina, cadena pesada de miosina y calponina. Por el contrario, los niveles de estos genes disminuyeron en CML tratadas con un inhibidor de miR-145, 2'OMe-miR-145. Además, en las CML de arterias a las cuales se les realizaba una angioplastia o que eran expuestas a una concentración de PDGF de 20 ng/ml, disminuía significativamente la expresión de miR-145. (68)

Otro de los efectos identificados de la regulación de miR-145 incluye la inhibición en la formación de podosomas, protrusiones de membrana ricas en actina y que favorecen la migración de CML. PDGF favorece la formación de podosomas, por lo que su bloqueo puede asociarse a la inhibición de la migración de CML. (69)

Más recientemente se han estudiado los papeles de miR-146 y miR-155 en la biología de CML y han recibido especial atención, ya que se expresan de forma abundante en la pared vascular normal y existen cambios en su expresión en arterias y venas con hiperplasia intimal. (66) (70) (71)

Como podemos observar los miRNAs están involucrados en prácticamente todos los procesos celulares, por lo que su estudio como potenciales moduladores de blancos terapéuticos resulta interesante. Además, los miRNAs pueden representar nuevos biomarcadores y objetivos terapéuticos para diversas enfermedades, como lo es la hiperplasia intimal. (72)

El conocimiento de la existencia y función de los miRNAs en el proceso de reestenosis abren una nueva ruta para el estudio de las maniobras terapéuticas dirigidas a aquellos mecanismos y vías detonantes o iniciadoras de la hiperplasia intimal.(15)

En lo que respecta a las venas, en el campo de la cirugía vascular aún existen pocos datos aunque se han reportado alteraciones en los miRNAs, las cuales predisponen a la formación de hiperplasia intimal. Sobre todo se han identificado alteraciones en vías de señalización como MAPKinasa, fosfatidil inositol – 3 kinasa y vía p-53, en donde vías de muerte celular y los efectos detonantes de factores de crecimiento como PDGF juegan un papel fundamental.(73)

Derivado de estos conceptos es importante conocer la expresión de miRNAs en venas. Esto podría generar hipótesis sobre las vías moleculares en la fisiopatología de hiperplasia intimal secundarias a la manipulación del endotelio venoso. Además de conocer la expresión génica en un estado basal, resulta interesante evaluar algunas de las intervenciones terapéuticas prometedoras y su impacto en la expresión de miRNAs.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las reconstrucciones vasculares en donde se utiliza un injerto venoso tienen un índice de permeabilidad primaria al año variable, oscilando entre el 30 y el 50 %. La principal causa de trombosis se produce por estenosis de la porción venosa secundaria a formación de hiperplasia intimal.

A pesar de la magnitud del problema clínico ha habido escasez de intervenciones terapéuticas en este campo, especialmente en cuanto a investigación celular y molecular enfocada a hiperplasia intimal entorno específico de injertos venosos. Se han realizado investigaciones previamente, sin embargo el mecanismo de control de engrosamiento de la íntima y los factores causantes de hiperplasia no se conocen todavía con claridad.

JUSTIFICACIÓN

La hiperplasia intimal es un proceso fisiopatológico complejo y multifactorial en la cual se ha demostrado la participación de múltiples genes por lo que el estudio de la regulación de la expresión génica a través de blancos terapéuticos podría generar información útil acerca de la prevención de los mecanismos patológicos generadores de la hiperplasia intimal.

En los últimos años el aumento en el conocimiento de la función de los miRNAs en la biología vascular ha generado el desarrollo de nuevas líneas de investigación que van desde el conocimiento detallado de las vías de señalización molecular hasta la manipulación de los miRNAs y sus genes diana como blancos terapéuticos.

Las alteraciones en la expresión de miRNAs durante la generación de hiperplasia intimal deben de estudiarse a detalle especialmente los mecanismos de acción, sus genes diana y vías de señalización, con el objetivo de generar nuevas aplicaciones terapéuticas y validar las terapias ya existentes. (72)

OBJETIVOS

Objetivo principal: Identificar los miRNAs involucrados en la regulación génica de la hiperplasia intimal del endotelio venoso y su expresión con el uso de Mesilato de Imatinib.

Objetivo secundarios: Identificar vías relacionadas con hiperplasia intimal, que pudieran ser dianas terapéuticas para la prevención y tratamiento de la hiperplasia intimal en injertos venosos.

HIPÓTESIS

Existen diferencias en la expresión génica de miRNAs en venas de fístulas arteriovenosas comparadas con un control. Además existen diferencias en la expresión de miRNAs en venas de fístulas arteriovenosas secundario a la inhibición de la agregación plaquetaria posterior al efecto de Mesilato de imatinib sobre PDGF-R en el endotelio venoso.

METODOLOGÍA

Se trata de un diseño experimental, prospectivo, aleatorizado y controlado.

DISEÑO GENERAL DEL ESTUDIO

Este estudios se dividirá en 3 fases

- 1) Evaluación de la expresión génica de miR-145, miR-146, miR-155 (Fase exploratoria)
- 2) Realización de microarreglos (Fase de descubrimiento)
- 3) Evaluación del efecto de Imatinib en la expresión de microarreglos

MODELO EXPERIMENTAL DE FÍSTULA ARTERIOVENOSA

La realización de este proyecto se llevó a cabo con el apoyo del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina UNAM. **Acceptado por el comité de ética en animales (División de Investigación, Folio 098).**

Como modelo experimental se utilizó Rata Wistar (*rattus norvegicus domestica*) con un peso de 200 a 300 gramos. El estudio se dividió en 3 grupos, con una muestra de 3 modelos experimentales por grupo (n=3). El primer grupo se definió como grupo control (GC), el segundo grupo se definió como grupo de fístula arterio - venosa (G-FAV) y el tercer grupo se definió como grupo experimental (GE).

Las condiciones ambientales del bioterio influyen de manera directa en el estado de salud del animal, por lo que para este estudio fue indispensable asegurar un adecuado control de temperatura, humedad relativa y horas luz – oscuridad de acuerdo a las necesidades de esta especie, basándose en la Norma Oficial Mexicana 062-ZOO, referente al uso y cuidado de los animales de laboratorio.

REALIZACIÓN DE LA FAV

a) Manejo anestésico:

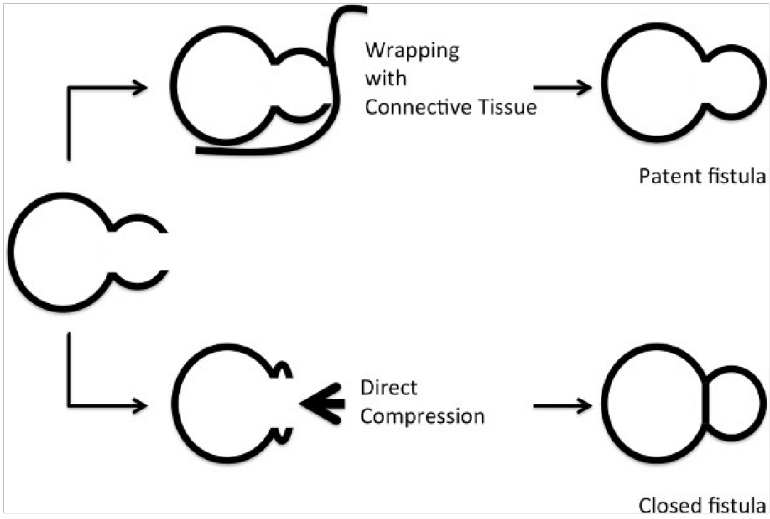
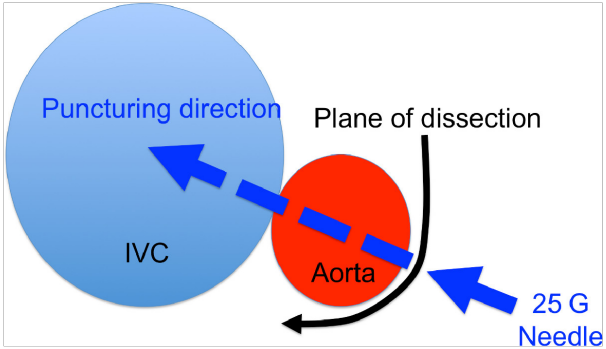
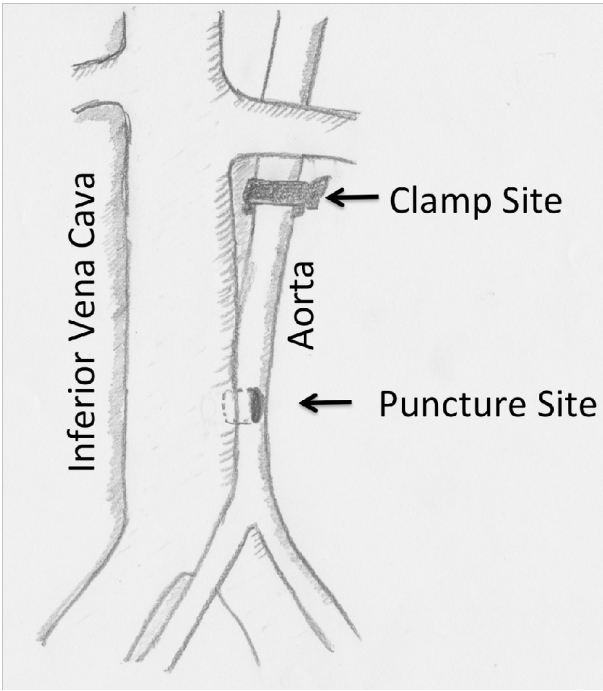
Se utilizó isoflurano al 4% con 0,8 l / min de oxígeno a una caja de plexiglás a través de un vaporizador de isoflurano. La conducción de la anestesia se realizó con Isoflurano al 2% mediante una máscara de silicón.

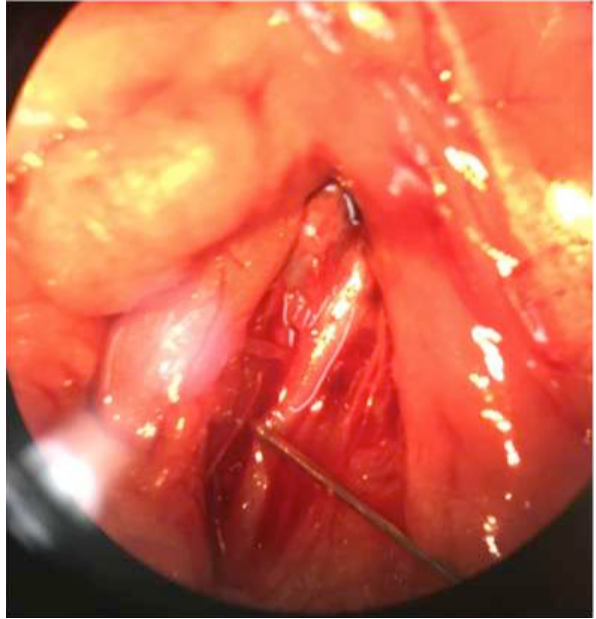
b) USG preoperatorio

Se realizó análisis de vena yugular, vena cava supra e infrarrenal y aorta abdominal utilizando tanto Doppler como modo B. Utilizando modo B, se mide el diámetro de cada vaso sanguíneo. Utilizando Doppler se mide la velocidad máxima y las formas de onda en cada uno de los sitios descritos.

c) Técnica quirúrgica

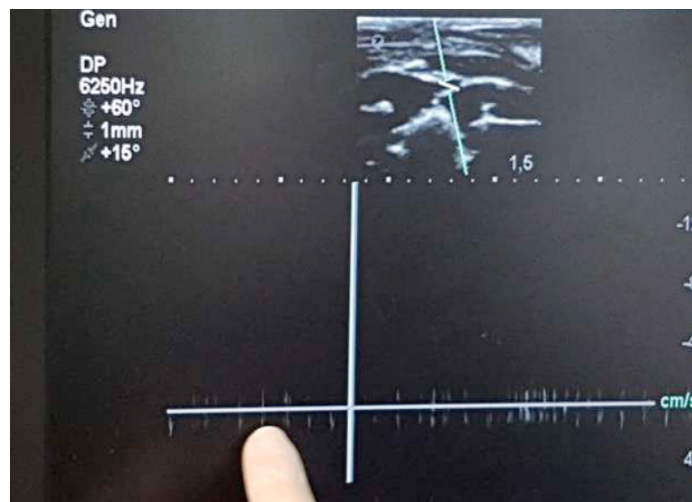
Se realizó una laparotomía exploradora, hasta obtener acceso retroperitoneal a la vena cava y aorta abdominal. Se colocó un clamp en la aorta infrarrenal para posteriormente realizar una punción directa con una aguja de 25 G. Se realizó compresión directa y se verificó la permeabilidad de la fístula aorto – cava.





d) Monitorización postoperatoria

En el periodo postoperatorio se analizó la forma y velocidades de la FAV para verificar su permeabilidad. Se realizó una evaluación diaria hasta los 7 días posteriores a la realización de la FAV, día en el cual se realizó la eutanasia del grupo de fístula - AV y grupo experimental.



ORGANIZACIÓN DE LOS MODELOS EXPERIMENTALES

- a) Grupo control (GC), n=3. En este grupo se procuró la vena cava infrarrenal, sin manipulación, la cual se utilizó como control.
- b) Grupo de fístula arterio - venosa (G-FAV). En este grupo se realizó la fístula arterio - venosa por punción como se describió previamente. No se utilizó ninguna condición experimental ni farmacológica en este grupo.
- c) Grupo experimental (GE). En este grupo se realizó la fístula arterio - venosa por punción como se describió previamente. En este grupo se administró mesilato de Imatinib, un inhibidor de PDGF-R. Debido a la accesibilidad, se decidió utilizar dos vías de administración: oral e intraperitoneal para llegar a una dosis máxima de 100 mg/kg. Para la administración de la dosis vía oral (50 mg/kg), se realizó una dilución del fármaco en solución salina, para obtener una concentración de 1 mg /ml. Esta dosis se administró a través de mecanismo tradicional para consumo diario. Este proceso fue supervisado por el médico veterinario responsable del proyecto. La administración intraperitoneal (50 mg/kg) se realizó en el momento de la laparotomía para la realización de la fístula arteriovenosa aorto-caval. Para ello se realizó una dilución del fármaco en una matriz de hidrogel estéril, la cual se colocó directamente sobre la fístula aorto-cava. La ventaja de esta vía de administración es la absorción peritoneal y además el contacto directo del fármaco con la adventicia de la aorta y la vena cava.

GRUPO	ABREVIATURA	DEFINICIÓN
Grupo control	GC	Arteria y vena sin manipulación
Grupo de Fístula Arterio - Venosa	G-FAV	Fístula arterio-venosa sin tratamiento farmacológico
Grupo experimental	GE	Fístula arterio-venosa con tratamiento farmacológico (Imatinib)

TABLA 1. ORGANIZACIÓN DE GRUPO DE ESTUDIO

FASE EXPLORATORIA

Durante esta fase se realizó el análisis de los miRNAs reportados en la literatura como efectores importantes en el endotelio venoso de injertos vasculares. Se evaluó inicialmente la expresión de miR-145, miR-146 y miR-155, cuya participación ha sido documentada en la hiperplasia intimal del endotelio arterial. Usando el modelo experimental del grupo de fístula arteriovenosa (G-FAV, n=3) y el grupo control (CG, n=3). Se realizó eutanasia al 7mo día de realizado el modelo experimental. Se procuraron por separado la porción arterial y venosa a nivel de la anastomosis de la fístula y se compararon ambos grupos de modelos.

Se procuraron las muestras derivadas del procedimiento quirúrgico e inmediatamente se colocaron en nitrógeno líquido para su transporte. Estas muestras se almacenaron a -80 °C hasta su uso. El procedimiento para la extracción y purificación del ARN total del tejido (hasta 5 mg de tejido) se realizó utilizando el Micro Kit RNeasy Plus (Cat. 74034), específicamente, utilizamos el protocolo

experimental para la purificación de ARN total de tejidos animales y humanos. Se utilizaron menos de 5 mg por experimento para el lisado de los tejidos. Para este propósito utilizamos buffer RLT más β -Mercaptoethanol. Se homogeneizaron las muestras utilizando una jeringa y aguja, para ello los lisados se filtraron a través de una aguja de calibre 20 G (0,9 mm) unida a una jeringa estéril, al menos 5-10 veces o hasta que se logró un lisado homogéneo. En caso necesario, para facilitar el manejo y minimizar pérdidas se aumentó el volumen del tampón de lisis.

La extracción total de ARN se realizó utilizando la tecnología RNeasy Micro Kit que combina las propiedades de unión selectiva de una membrana basada en sílice con la velocidad de una micro-centrífuga (tecnología microspin). Se añadió a la muestra el tampón de lisis (que contiene guanidina-tiocianato) y etanol para crear las condiciones que promueven la unión selectiva de ARN a la membrana RNeasy MinElute. Las muestras se colocaron en la columna de centrifugación RNeasy MinElute, con ello el ARN se une a la membrana de sílice. Los rastros de ADN para copurificarse se eliminaron mediante el tratamiento con DNasa en la columna de rotación RNeasy MinElute. La DNasa y cualquier contaminante se eliminaron, y el ARN total de alta calidad se eluyó en agua libre de RNasa (25 μ L). La calidad y concentración de cada muestra de ARN se validó utilizando un Agilent BioAnalyzer 2100.

Una vez que se realizó la extracción de ARN, se evaluó su integridad utilizando Agilent Bioanalyzer 2100 con una electroforesis basada en NanoChip de ARN (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) con un número de integridad de ARN (RIN)

> 6. Se eligieron las muestras de ARN para el análisis sólo cuando se lograba la calidad, la integridad y la concentración adecuada.

Posterior al aislamiento y purificación del RNA total, se realizó la transcripción reversa cuantitativa y amplificación por medio de reacción en cadena de la polimerasa (qRT-PCR) de forma convencional. Se utilizaron ensayos de ARN pequeños TaqMan para detectar y cuantificar miRNAs maduros en el endotelio venoso. Para cuantificar los niveles de expresión de miRNAs se realizó una normalización a genes de control endógenos. Para evitar sesgos se tuvo especial cuidado en la recolección de muestras, la cantidad de material (tejido venoso y arterial) utilizado, la preparación y calidad en la extracción de RNA y la eficiencia en la realización de PCR.

La expresión de estos miRNAs (miR-145-5p, miR-146a-5p y miR-155-5p) se analizó mediante ensayos de microARN (High Capacity RNA-cDNA Master Mix: Cat. PN 4377474C) implementados por el fabricante ThermoFisher para retrotranscripción de ADNc. La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) se realizó con el ensayo avanzado de miARN TaqMan (Cat A28007; Applied Biosystems) con el método comparativo de Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

Usando el ARN total (50 ng) obtenido previamente, se realizó la transcripción inversa con el primer específico (looped-RT) para cada uno de los miRNAs empleados utilizando 0.15 μ l de dNTP (100 mM), 1.0 μ l de transcriptasa inversa MultiScribe (50 U/ μ l), 1.5 μ l de tampón 10X, 0.19 μ l de inhibidor de RNasa (20 U/ μ l) y agua libre de RNasa. La reacción de retrotranscripción se mezcló con 10 μ l de

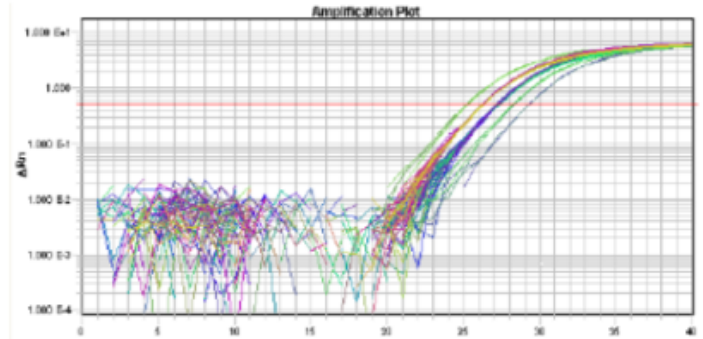
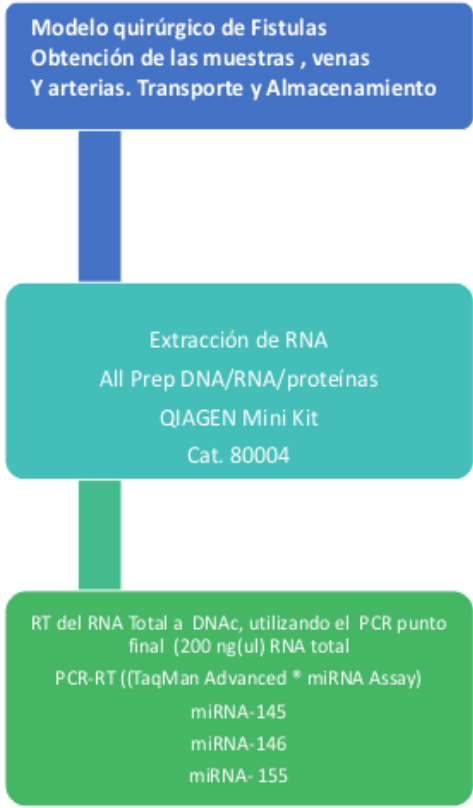
mezcla maestra TaqMan (Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG, 2X), 7.67 μ l de agua libre de RNasa y 10 μ l de sonda de PCR. Para la amplificación de qPCR, preparamos una dilución 1:10 de la plantilla de cDNA (producto de reacción miR-Amp). Para la reacción de amplificación de miR-Amp, agregamos 405 μ L de 0.1X TE buffer y TaqMan Fast Advanced Master. Para la tarjeta de matriz TaqMan, se cargó cada depósito con 100 μ L de mezcla preparada.

El protocolo térmico utilizado se optimizó utilizando TaqMan Fast Advanced Master Mix. El protocolo utiliza la activación enzimática durante 10 min a 92 °C, cuarenta ciclos. Finalmente el volumen utilizado fue de 1 μ L por pocillo en la tarjeta de reacción.

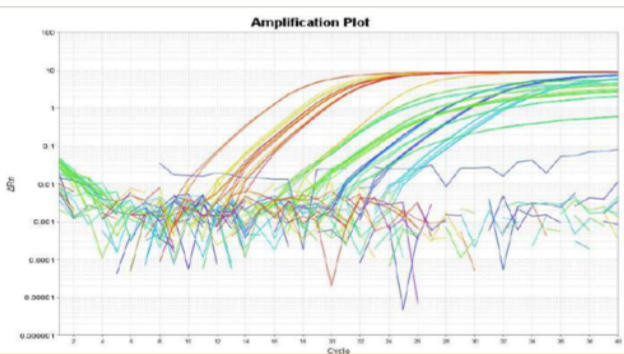
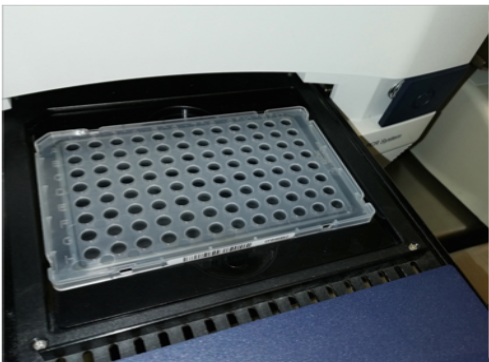
Se utilizó el software DataAssit (7500 Fast Real-Time PCR System/ Software v2.0.6) para el análisis de datos en el cual se utilizó el método Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) usando una línea de base automática y un umbral de 0.2 para determinar los datos sin procesar de Ct.

Usamos un corte de 32 para el análisis de expresión de miRNAs. Se tomaron Ct para cada grupo de réplicas. Los resultados se expresaron como expresión relativa de miARN entre todas las condiciones experimentales.

DIAGRAMA DEL FLUJO DE TRABAJO METODOLÓGICO



Curvas de amplificación
 $\Delta Ct = Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ gen endógeno}$
 $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct \text{ muestra de interés} - \Delta Ct \text{ control}$
Controles: Referencia Pasiva (Variaciones sistemáticas de las Replicas Técnicas)
Endógeno: No se modifica en las condiciones experimentales. Conot6rl de carga. Normalizador
Calibrador Muestra contra la que deseamos comparar las diferencias de expresión.



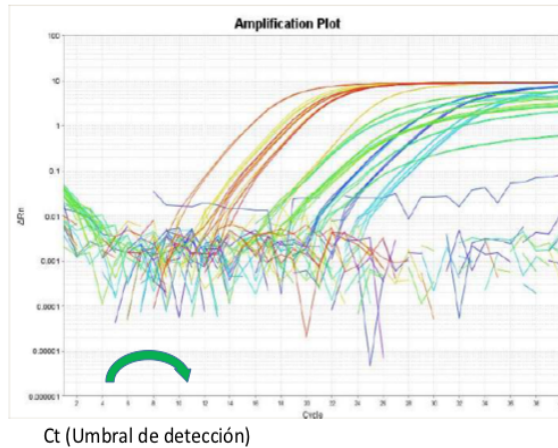
ANÁLISIS DE DIFERENCIA DE EXPRESIÓN POR METODO COMPARATIVO Ct

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gen interés}} - Ct_{\text{gen endógeno}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{muestra interés}} - \Delta Ct_{\text{calibrador}}$$

Curvas de Amplificación
Producto generado

Dependen:
Eficiencia de la amplificación
Cantidad de Templado inicial



FASE DE DESCUBRIMIENTO

En esta fase del estudio se realizó el panel completo de microarreglos y se estudió el efecto de Mesilato de Imatinib, un fármaco que bloquea el receptor de PDGF. Se realizó eutanasia al 7mo día de realizado el modelo experimental. Se procuraron por separado la porción arterial y venosa a nivel de la anastomosis de la fístula. Se utilizaron los tres grupos de estudio (GC, G-FAV y GE) y se compararon entre sí.

Se utilizó la plataforma de Affymetrix miRNA 4.0. Debido a que esta plataforma contiene sondas para otros organismos además de la rata, se extrajeron primero las sondas correspondientes a la rata Wistar. Se realizó el control de calidad de los datos y una normalización en dos pasos. El primer paso fue la normalización por cuantiles con los microarreglos dentro de cada grupo y la segunda fue mediante el

algoritmo Robust Multiarray Average (RMA) del paquete oligo que consiste en una corrección de fondo y la normalización entre todos los microarreglos.

Para anotar los datos se empleó el paquete de anotación pd.mirna.4.0. Con los datos anotados, el análisis de expresión diferencial se realizó mediante modelos lineales con el paquete limma contrastando los grupos de fístula arteriovenosa (G-FAV y G-E) con el grupo control (G-C). Para interpretar los datos estadísticos de expresión diferencial se aplicó el método de moderación de varianza de Bayes empírico.

El FDR fue controlado ajustando los valores p mediante el método Benjamini-Hochberg. Finalmente los resultados se visualizaron mediante un volcano plot del valor p vs. el logaritmo del fold change (logFC) para cada contraste así como un heatmap, también por contraste, de los genes diferencialmente expresados en cada muestra. Adicionalmente, se realizó el agrupamiento jerárquico de las muestras en cada contraste usando los valores de expresión de los genes diferencialmente expresados.

RESULTADOS

RESULTADOS DE FASE EXPLORATORIA

El uso del modelo experimental se llevó a cabo sin complicaciones. En el análisis exploratorio, encontramos una diferencia en la expresión de miRNAs en el contraste de G-FAV vs GC dentro de los primeros 7 días. **FIGURA 8**

Observamos una regulación a la baja de miR-145 en la vena (0.233 ± 0.3 , valor de p 0.0030) y arteria (0.33 ± 0.4 , valor de p 0.0630) de la fístula arteriovenosa en comparación con la vena de control (0.766 ± 0.15 , valor p 0.0110) y arteria de control (0.873 ± 0.3 , valor p 0.0600). Observamos una regulación al alza de miR-146 en la vena (29 ± 0.25 , valor de p 0.0256) y arteria (34.66 ± 0.35 , valor de p 0.0345) de la fístula arteriovenosa en comparación con la vena de control (5.43 ± 0.16 , p -valor 0.0123) y arteria control (3.8 ± 0.12 , p -valor 0.0650). Finalmente, observamos una regulación al alza de miR-155 en la vena (20 ± 0.39 , valor de p 0.0231) y arteria (22.66 ± 0.49 , valor de p 0.0234) de la fístula arteriovenosa en comparación con la vena de control (2.74 ± 0.2 , valor de p 0.0367) y arteria de control (3.43 ± 0.2 , valor de p 0.0767).

TABLA 2.

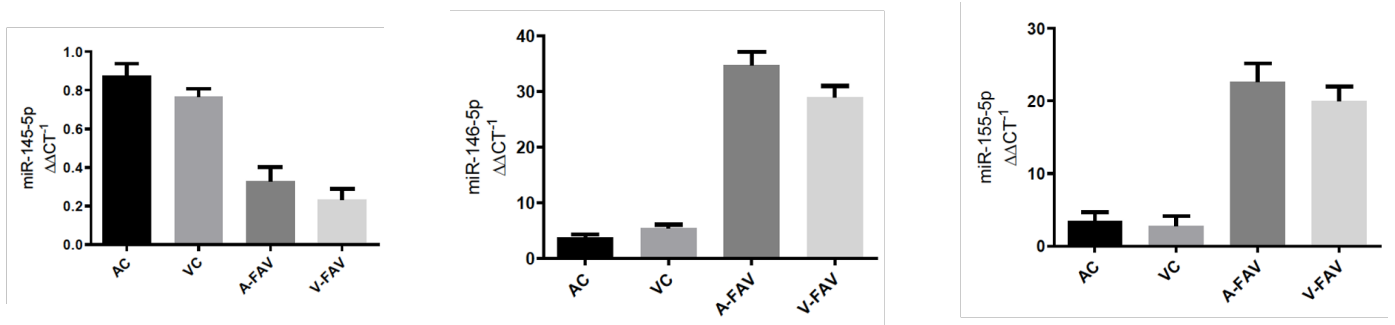


FIGURA 8. Resultados de la fase exploratoria

Modelo experimental	miR-145 ($\Delta\Delta^{CT-1}$)	Valor - P	Expresión relativa	miR-146 ($\Delta\Delta^{CT-1}$)	Valor - P	Expresión relativa	miR-155 ($\Delta\Delta^{CT-1}$)	Valor - P	Expresión relativa
Arteria control	0.873 ± 0.3	0.0600	ALTA	3.8 ± 0.12	0.0650	BAJA	3.43 ± 0.2	0.0767	BAJA
Vena control	0.766 ± 0.15	0.0110	ALTA	5.43 ± 0.16	0.0123	BAJA	2.74 ± 0.2	0.0367	BAJA
Arteria de FAV	0.33 ± 0.4	0.0630	BAJA	34.66 ± 0.35	0.0345	ALTA	22.66 ± 0.49	0.0234	ALTA
Vena de FAV	0.233 ± 0.3	0.0030	BAJA	29 ± 0.25	0.0256	ALTA	20 ± 0.39	0.0231	ALTA

TABLA 2. Resultados de fase exploratoria

En esta fase del estudio observamos la expresión génica de 3 miRNAs cuyas funciones han sido identificadas en la literatura y juegan un papel importante en la fisiopatología de la hiperplasia intimal. Estos miRNAs, especialmente miR-145, han sido estudiados de forma más amplia en arterias, especialmente en el territorio coronario.

Encontramos resultados similares a los reportado en los estudios previamente mencionados en la fisiopatología de la hiperplasia intimal arterial, a saber, una regulación a la baja de miR-145 y una regulación a la alta de miR-146 y miR-155. En nuestro estudio además de estudiar la hiperplasia intimal en arterias, estudiamos la hiperplasia intimal en venas.

Esto es algo fundamental, ya que en el campo de cirugía vascular, en el contexto específico de una reconstrucción quirúrgica en donde se realiza una conexión entre una arteria y una vena debe estudiarse dicha anastomosis de forma global para comprender de forma integral las vías y procesos fisiopatológicos de la hiperplasia intimal en injertos vasculares.

En nuestro estudio encontramos que la respuesta de la arteria y la vena en una anastomosis se comporta de manera similar, con una regulación a la baja de miR-145 y una regulación a la alta de miR-146 y miR-155. Las arterias y las venas se distinguen por diferencias estructurales que corresponden a sus diferentes funciones.

La arquitectura vascular también está definida por marcadores moleculares específicos que persisten a lo largo de la vida adulta; estos marcadores son algunos de los determinantes moleculares que controlan la diferenciación de células embrionarias indiferenciadas en arterias o venas.

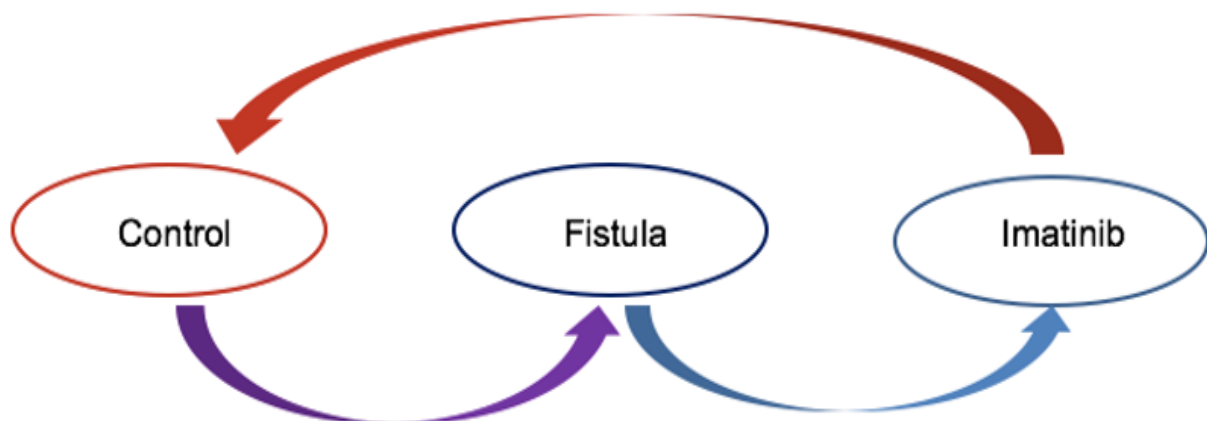
El receptor Eph-B4 y su ligando, ephrin-B2, son determinantes moleculares críticos de la identidad de los vasos y surgen en las células endoteliales en las primeras etapas del desarrollo embrionario. Eph-B4 y ephrin-B2 continúan expresándose en vasos adultos y marcan la identidad del vaso. Sin embargo, después de la cirugía vascular, la identidad del vaso puede cambiar y se caracteriza por una expresión alterada de Eph-B4 y ephrin-B2. Los injertos de vena muestran pérdida de identidad venosa, con menor expresión de Eph-B4.

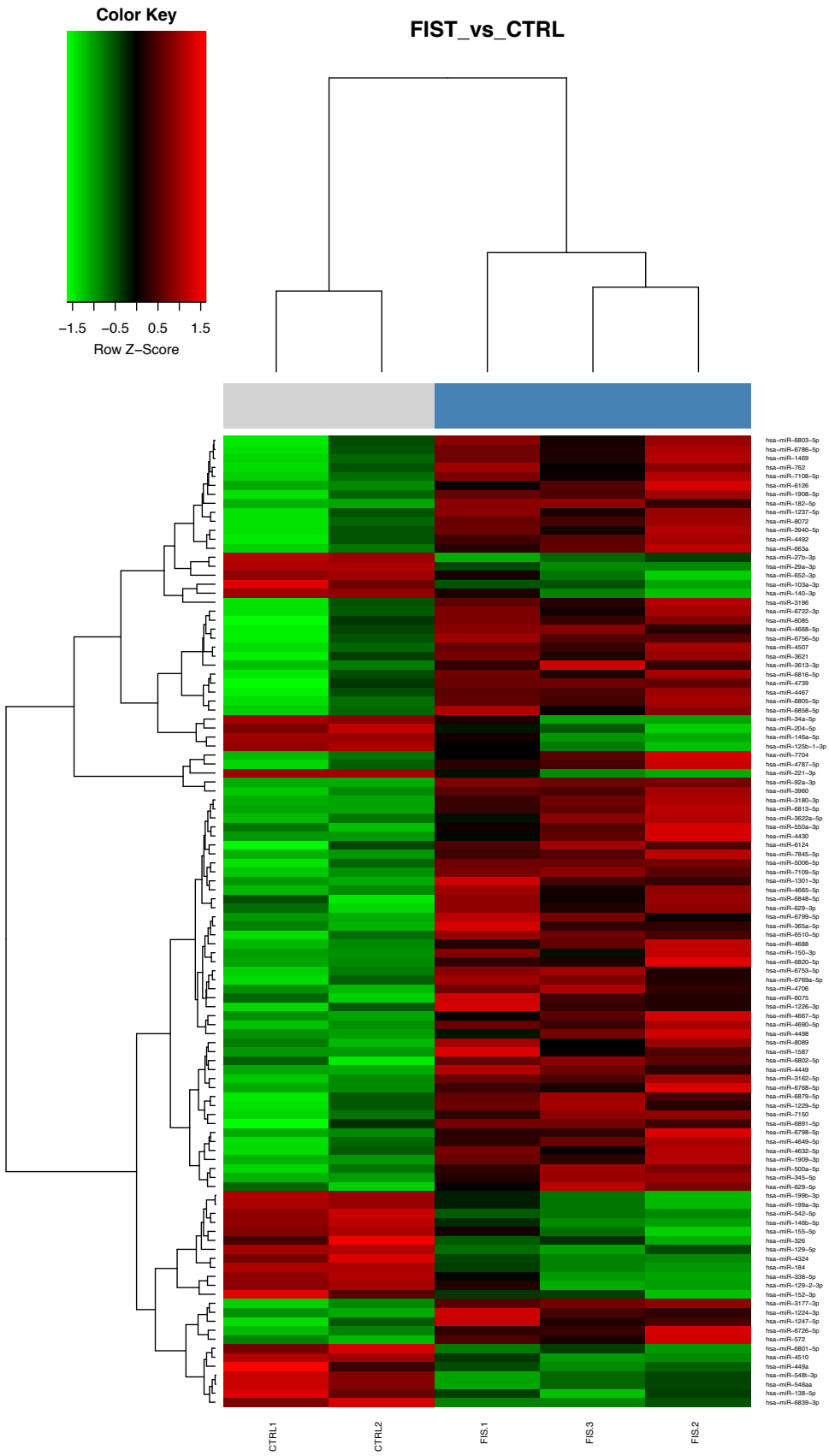
Se han realizado estudios en donde se ha demostrado que las fístulas arteriovenosas muestran ganancia de doble identidad arteriovenosa, con expresión tanto de Eph-B4 como de ephrin-B2. Los injertos utilizados para reparar arterias y venas exhiben una ganancia de identidad dependiente del contexto, es decir, los injertos en el ambiente arterial ganan identidad arterial mientras que los injertos en el ambiente venoso ganan identidad venosa.

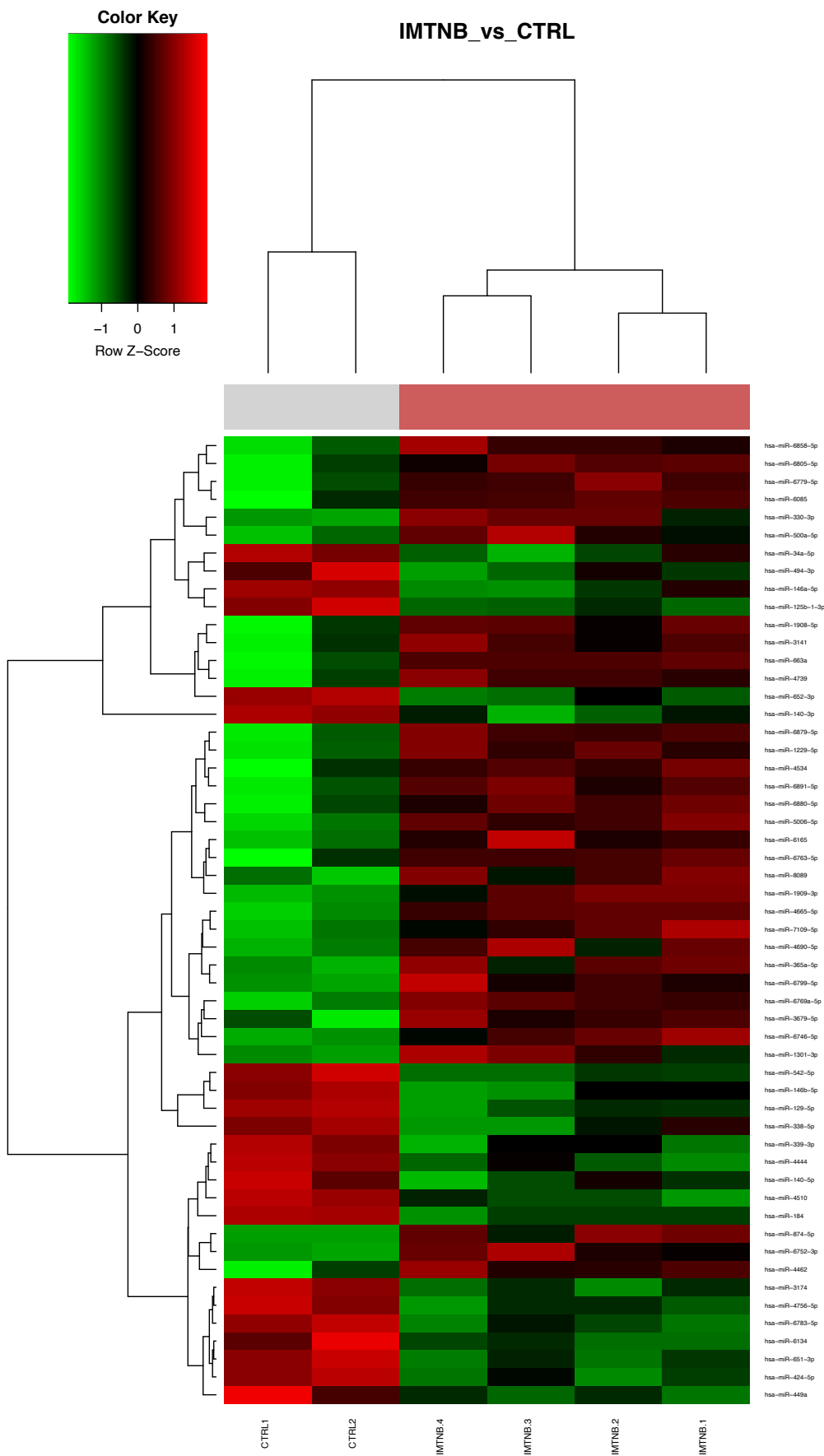
Esta información y nuestros resultados son interesantes debido a que a pesar de que los orígenes embrionarios son distintos en arterias y venas, los procesos biológicos y la fisiopatología de la hiperplasia intimal tienen una base molecular común.

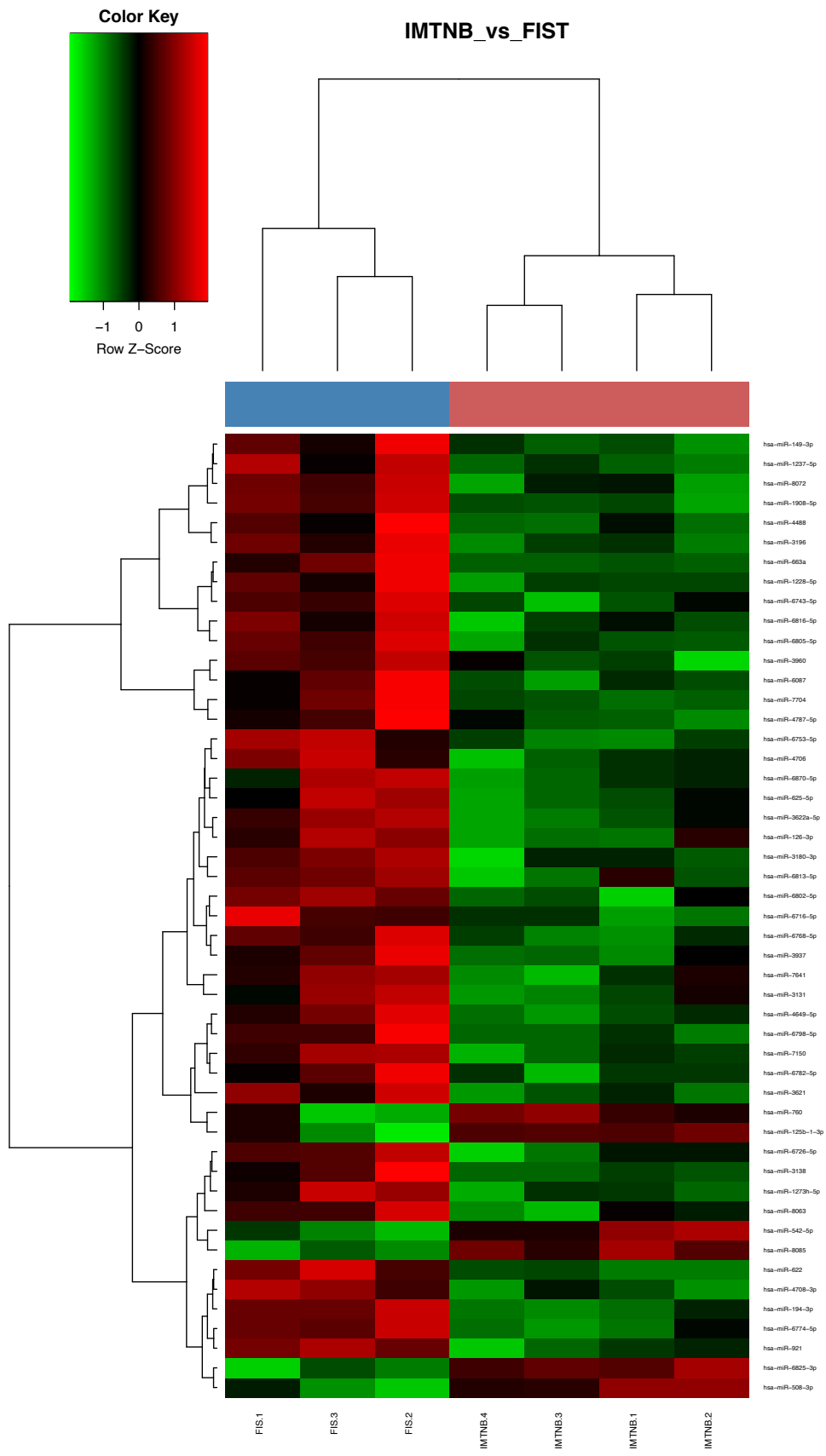
RESULTADOS DE FASE DE DESCUBRIMIENTO

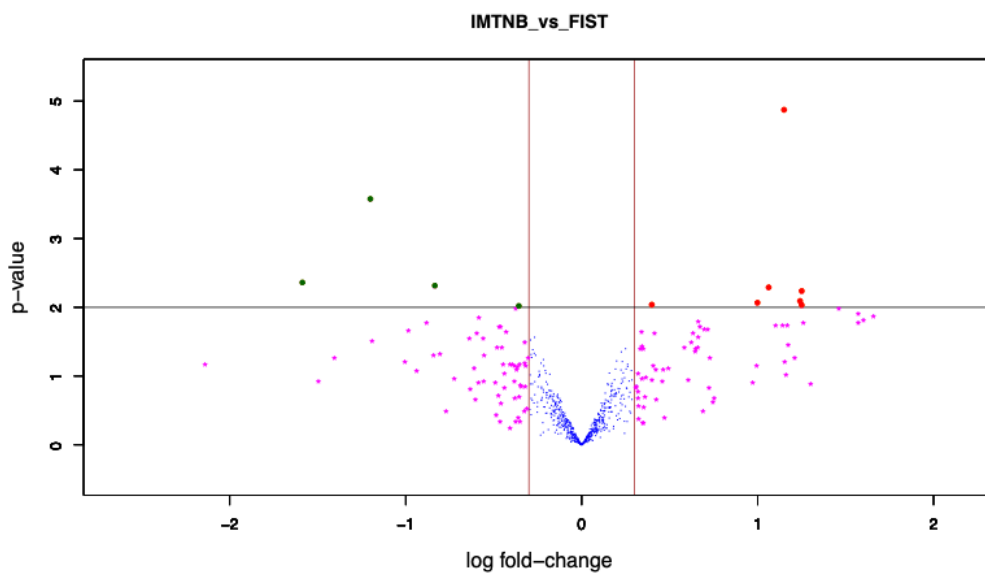
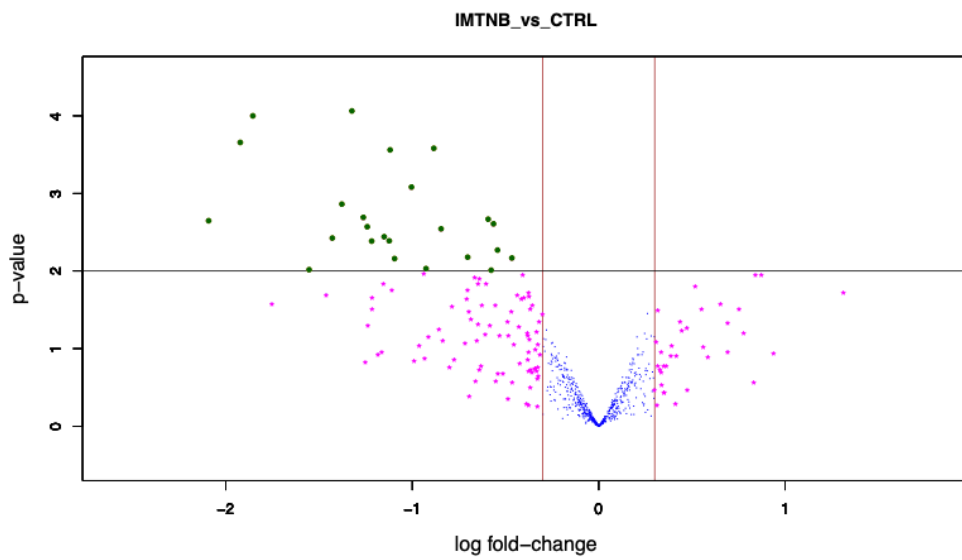
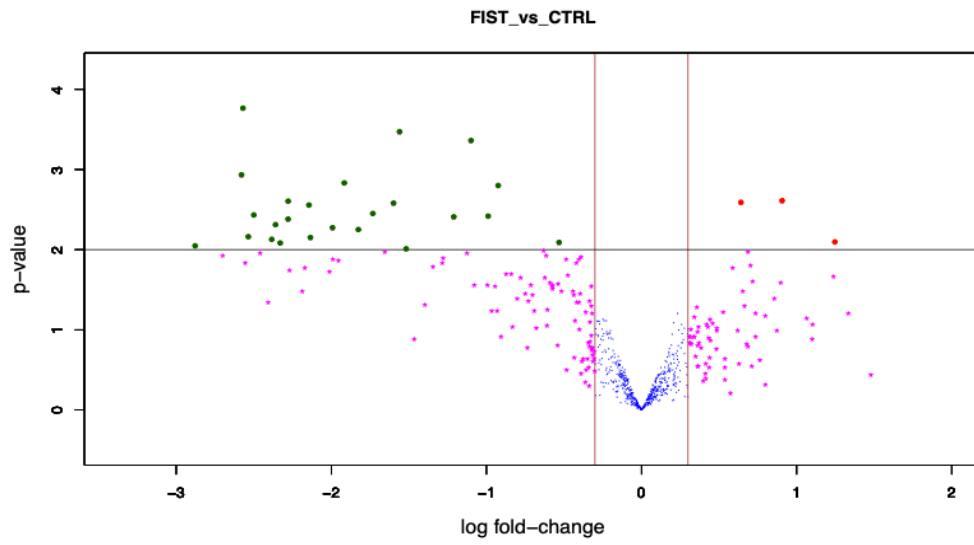
Se realizó el análisis de expresión diferencial de MiRNAs con los siguientes contrastes:











Para la organización de los datos obtenidos y según el enriquecimiento de función con importancia para el desarrollo de hiperplasia intimal en 4 grupo se clasificaron, lo cuales fueron: proliferación, diferenciación, migración, inflamación y muerte celular.

Proceso Biológico	A la Alta	A la Baja	Contraste asociado
Proliferación	miR-1909	miR-34a	Fistula vs. Control
	miR-6805	miR-125b	
	miR-4706		
	miR-3162		
	miR-6075		
	miR-6805		Imatinib vs. Control
	miR-4534	miR-129	
	miR-1229	miR-542	
	miR-1301	miR-184	
	miR-5006	miR-34a	

Proceso Biológico	A la Alta	A la Baja	Contraste asociado	
	miR-6165	miR-494	Imatinib vs Fistula	
		miR-3131		
		miR-126		
Diferenciación	miR-6769a	miR-184	Imatinib vs. Control	
	miR-6891	miR-34a		
	miR-126	miR-146b		
		miR-146b		
			miR-3131	Imatinib vs. Fistula
			miR-7641	
			miR-34a	
Migración	miR-1908		Fistula vs. Control	
		miR-338	Imatinib vs Control	
		miR-129		
Inflamación	miR-1908		Fistula vs. Control	
		miR-126	Imatinib vs. Fistula	
		miR-146a	Imatinib vs. Control	
	miR-129			
Muerte		miR-449a	Imatinib vs. Control	

TABLA 3. RESULTADOS DE FASE DE DESCUBRIMIENTO

DISCUSIÓN

Las venas se utilizan como injerto vascular en fístulas arterio venosas y reconstrucciones vasculares debido a su eficacia y permeabilidad. A pesar de ser considerado el mejor injerto vascular, no están exentos de complicaciones. Las venas, cuyo entorno hemodinámico fisiológico se caracteriza por un flujo sanguíneo con bajo estrés longitudinal y radial, cuando se utilizan como injerto vascular en el sistema arterial, muestran remodelación de su estructura.

En otras palabras, el injerto tiene un proceso de adaptación al flujo sanguíneo a alta presión "arterializándose", es decir, aumentando la cantidad de matriz extracelular y células de músculo liso debajo del endotelio venoso, proceso conocido como hiperplasia intimal.

Debido a que la hiperplasia de la íntima es la principal causa de falla de injertos vasculares, se han propuesto diversos tratamientos, que van desde innovaciones en cirugía abierta y endovascular, tratamientos farmacológicos, hasta terapias génicas, cuyos resultados siguen siendo controvertidos. Una de las propuestas ante la ausencia de resultados concluyentes en este campo terapéutico es la falta de conocimiento para comprender en profundidad las vías moleculares y genómicas que regulan el inicio y la progresión de la hiperplasia intimal con el fin de diseñar estrategias terapéuticas dirigidas más eficaces.

En los últimos años, la regulación de las células del músculo liso se ha identificado como un evento crítico en el desarrollo de la hiperplasia de la íntima. El endotelio venoso normalmente produce factores que mantienen la homeostasis e inhiben su proliferación. Las CML tienen una plasticidad dependiente del estímulo externo y se han descrito dos tipos principales de células. (74)

Existe un fenotipo quiescente, contráctil y diferenciado cuya estructura está compuesta esencialmente por alfa-actina y miosina, las cuales tienen una baja proliferación y constituyen la estructura principal de la capa media en los vasos sanguíneos. (75) Por otro lado, se ha descrito un fenotipo proliferativo de CML, que son células clave en el desarrollo de la hiperplasia intimal. (76) Existen mecanismos que pueden producir este cambio de un fenotipo contráctil a uno sintético, especialmente asociado a una lesión vascular. De forma interesante, los miRNAs pueden regular esta secuencia de eventos. (74)

Las CML son un elemento esencial en los vasos sanguíneos ya que constituyen soporte estructural, confieren elasticidad y regulan el tono vascular (vasodilatación y vasoconstricción). Sin embargo, si esta arquitectura se altera tras un estímulo como una lesión vascular, se producen modificaciones en este equilibrio fisiológico y estructural, lo que se evidencia como hiperplasia intimal.

Debido a sus funciones reguladoras, los miRNAs son moduladores esenciales para funciones celulares importantes como diferenciación celular, contracción, migración, proliferación y apoptosis. Es de esperar que la expresión de miRNAs esté alterada

en los principales procesos patológicos que involucran el sistema cardiovascular, incluyendo hiperplasia intimal. (57)

Una de las características más interesantes de los miRNAs es que si bien son reguladores de varios genes, su expresión es específica en células y tejidos. (56)

(72) Un ejemplo en vasos sanguíneos es el miR-146a, del cual se ha documentado un efecto regulador de CML y por lo tanto en la formación de hiperplasia intimal.

En nuestro estudio se observó una regulación al alza de miR-146a en los primeros 7 días tras el estímulo inicial de hiperplasia intimal en una fístula arteriovenosa, tanto en la porción venosa como en la porción arterial. Estos hallazgos también suponen una respuesta a un estímulo inflamatorio secundario a la lesión del endotelio vascular.

Se plantea la hipótesis de que miR-146a está involucrado en la proliferación de CML a través de su gen diana, el factor 4 similar a Krüppel (KLF4). (77) La expresión de miR-146a se elevó en un experimento realizado en carótidas de rata, usando un modelo de lesión con balón. En este estudio, la inhibición de miR-146a atenuó la proliferación de CML y la formación de neoíntima en las arterias carótidas. (70) Sin embargo, queda por describir en detalle el papel de miR-146a en el desarrollo de lesiones de la neoíntima asociadas con falla de injertos venosos en fístulas arteriovenosas y reconstrucciones vasculares.

KLF4 es un factor de transcripción codificado en el gen KLF4 y está formado por tres dedos de zinc dentro de sus secuencias carboxilo terminales. (78) Tiene una

función importante para mantener la integridad de la pared vascular y se asocia con procesos de diferenciación, proliferación y crecimiento celular. (79) También tiene importantes funciones estructurales asociadas con el funcionamiento de CML, lo que se ha relacionado con la regulación a través de la miocardina y el factor de respuesta sérica.

La expresión de KLF4 está regulada por vías transcripcionales y postranscripcionales; con respecto al sistema vascular existe una regulación importante a través de miRNAs. (79) Esto representa un área potencial de oportunidades, ya que mediante el desarrollo de dianas terapéuticas dirigidas a restablecer o regular los niveles de estos factores, se podría potencialmente atenuar o regular el proceso de hiperplasia intimal.

Encontramos alteraciones en la expresión de miRNAs comparando la vena de la fístula vs control. Estas miRNAs están involucradas en genes con procesos estructurales como diferenciación, migración, inflamación y muerte celular.

En los miRNAs con regulación a la alta que encontró que miR-328a y miR-505 son reguladores de la angiogénesis y sus alteraciones favorecen la proliferación y migración celular. (Zhang 2010) (Wang et al. 2019) miRNA miR-182 regula el funcionamiento de CML y su alteración favorece la formación de hiperplasia intimal. (Sun et al. 2016) Los miRNAs reguladas a la baja fueron miR-350 cuyas alteraciones han demostrado aumentar la proliferación en las células miocárdicas (Ge et al. 2013), miR-204 cuya regulación a la baja favorece la proliferación, migración y supresión de la apoptosis de CML (Wang et al. 2020), miR-503 que se

ha encontrado que tiene regulación en CML carotídeas (Yan et al. 2020) y miR-129 que tiene implicaciones importantes en el regulación de la hiperplasia de la íntima porque inhibe la proliferación de células del músculo liso vascular al dirigirse a Wnt5a. (Zhang et al. 2016)

En el grupo de fístula vs control encontramos hacia la alta a miR-1909, miR-6805, miR-4706, miR-3162 y miR-6075 con función de proliferación y a miR-1908 con función de migración e inflamación. Se han descrito las funciones de algunas secuencias en enfermedades cardiovasculares y proliferativas, tal es el caso de miR-6805 que presentó una regulación a la alta en infarto agudo al miocardio. (80) miR-3162 tuvo una regulación a la alta en melanoma de alto grado. (81). miR-6075 tuvo una regulación a la alta en células endoteliales expuestas a hipoxia tisular (82) y miR-1908 tuvo una expresión a la alta en mecanismos asociados a activación plaquetaria. (83).

En este grupo encontramos hacia la baja a miR-34a y miR-125b con función de proliferación y a miR-184, miR-146a, miR-129, miR-204, miR-338, miR-1999, miR-542, miR-146b con función de diferenciación celular. miR-34a se ha implicado recientemente en la senescencia de células progenitoras cardíacas, endoteliales y células musculares lisas vasculares. (84) miR-184 se ha asociado con patologías oncológicas como cáncer pulmonar y de ovario. (85). miR-129 regula de forma negativa la angiogénesis, así como la tasa de proliferación, la viabilidad celular y la actividad de migración de las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) in vitro. (86) miR-204 se ha asociado con regulación negativa de

migración y proliferación celular. (87). miR-338 se ha asociado con regulación negativa de migración en patologías como cáncer de hígado. (88).

En el análisis de enriquecimiento de función del grupo de fístula vs control encontramos que con respecto a proliferación las vías Notch 3 y 4 tienen una regulación a la alta asociado a fuerzas de cizallamiento (shear stress) e hipoxia tisular en células endoteliales, el cual es un factor clave en la generación de hiperplasia intimal. Hay una asociación en el sistema cardiovascular principalmente por mecanismos de adhesión celular. Se identifican vías tróficas mediadas por factores de crecimiento de tirosina cinasa. En cuanto a diferenciación celular se identificaron factores de crecimiento e interleucinas inflamatorias como IL-8 e IL-6. Finalmente en cuanto a migración e inflamación destacaron vías de regulación positiva de migración de células musculares lisas, angiogénesis y activación de vesículas extracelulares.

En el grupo de imatinib vs control encontramos hacia la alta a miR-4534, miR-1229, miR-1301, miR-5006 y miR-6165 con función de proliferación. También hacia la alta a miR-6769a y miR-6891 con función de diferenciación. En este grupo encontramos con regulación a la baja a miR-129, miR-542, miR-184, miR-34a y miR-494 con función de proliferación, a miR-34a y miR-146b con función de diferenciación, a miR-129 y miR-338 con función de migración, a miR-129 y miR-146a con función de inflamación y a miR-449a con función de muerte celular. Se ha identificado a miR-4534 con una regulación a la alta en cáncer de próstata. (89). miR-1229 se ha identificado con regulación a la alta en pacientes con cardiopatía isquémica en comparación con su control. (90). miR-1301 promueve la proliferación

celular y facilita la progresión del ciclo celular en cáncer gástrico. (91). Se ha encontrado una regulación a la alta de miR-6165 con la enfermedad de Moyamoya, una patología oclusiva cerebrovascular. (92). La regulación a la baja de miR-542 promueve la transición osteogénica de células musculares lisas en un modelo experimental de senescencia. (93) La inhibición de miR-494 aumentó la función de las células endoteliales.

Como dianas potenciales de miR-494 se identificaron los reguladores derivados de precursores de células endoteliales de BMP (BMPER). Ensayos de luciferasa mostraron unión directa de miR-494 en BMPER 3'UTR. (94). miR-449a actúa como un supresor de tumoral al reducir la proliferación, la migración y la invasión celular, así como al inducir la apoptosis en líneas celulares de glioblastoma humanas. (95)

En el análisis de enriquecimiento de función del grupo de imatinib vs control encontramos que con respecto a proliferación se identificaron las vías de PTEN con relación a replicación y estabilidad del genoma, via Wnt - Beta Catenina relacionada con regulación de la angiogénesis, regulación de la proliferación y migración de células musculares lisas. Decorina tiene un papel fundamental en estas vías proliferativas.

En cuanto a función de diferenciación identificamos el efecto de imatinib a través de receptores de tirosina cinasa y cambios estructurales en células musculares por canales dependientes de voltaje, específicamente de calcio. En cuanto a función de migración e inflamación encontramos cambios en regulación de interleucinas y citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, IL-8 y factor de necrosis tumoral.

Finalmente con respecto a muerte celular se encontró que con el uso de imatinib había regulación de vías involucradas en cáncer, como lo es la vía de E2F1.

En el grupo de imatinib vs fístula encontramos con regulación a la alta a miR-126 con función de diferenciación. En este grupo encontramos con regulación a la baja a miR-126 y miR-3131 con función de proliferación, a miR-3131 y miR-7641 con función de diferenciación, a miR-126 con función de migración y miR-126 con función de inflamación. miR-126 regula la señalización angiogénica y la integridad vascular, en un estudio experimental realizado por Fish et al. se encontró que miR-126 regula la respuesta de células endoteliales a VEGF. Además, la inhibición de miR-126 provocó la pérdida de la integridad vascular y hemorragia durante el desarrollo embrionario. (96).

Se ha identificado una regulación a la baja de miR-3131 en enfermedades proliferativas como melanoma y cáncer de mama. (81) (97). Finalmente la expresión de miR-7641 se reguló a la baja durante la diferenciación de células madre embrionarias humanas a células endoteliales. CXCL1, un miembro de la familia de quimiocinas CXC, promueve la neovascularización al unirse a receptores acoplados a proteína G y está relacionado con la biogénesis de células endoteliales así como angiogénesis, y se predijo como gen diana de miR-7641.

En un estudio realizado por Yoo et al. (98) miR-7641 inhibió significativamente CXCL1 a nivel transcripcional y postraducciona, lo cual sugiere que miR-7641 está relacionado con la diferenciación de células endoteliales.

En el análisis de enriquecimiento de función del grupo de imatinib vs fístula encontramos que con respecto a la mayoría de las funciones celulares había una regulación positiva de proliferación y angiogénesis, así como la respuesta positiva a shear stress principalmente por la vía Notch.

CONCLUSIONES

Como observamos en los resultados de nuestro estudio, la regulación de miRNAs sobre genes con funciones en la remodelación tisular de una fístula arteriovenosa que desembocan en la estructura cicatrizal en la pared de los vasos sanguíneos asociada a la activación de la agregación plaquetaria y su inhibición es muy importante. En el entorno específico de la hiperplasia intimal venosa, es fundamental conocer en profundidad los mecanismos moleculares con efectos sobre el endotelio y su interacción con las CML, en particular de los miRNAs encontrados con regulación a la alta y a la baja, así como los genes diana con funciones estructurales sobre la pared de la vena. Una de las principales importancias de esto es el desarrollo de posibles dianas terapéuticas.

REFERENCIAS

1. Herrington W, Lacey B, Sherliker P, Armitage J, Lewington S. Epidemiology of atherosclerosis and the potential to reduce the global burden of atherothrombotic disease. *Circ Res*. 2016 Feb 19;118(4):535–46.
2. Owens CD, Gasper WJ, Rahman AS, Conte MS. Vein graft failure. *J Vasc Surg*. 2015 Jan;61(1):203–16.
3. de Vries MR, Simons KH, Jukema JW, Braun J, Quax PHA. Vein graft failure: from pathophysiology to clinical outcomes. *Nat Rev Cardiol*. 2016 Aug;13(8):451–70.
4. Davies MG, Hagen PO. Pathobiology of intimal hyperplasia. *Br J Surg*. 1994 Sep;81(9):1254–69.
5. Newby AC, Zaltsman AB. Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. *J Pathol*. 2000 Feb;190(3):300–9.
6. Haruguchi H, Teraoka S. Intimal hyperplasia and hemodynamic factors in arterial bypass and arteriovenous grafts: a review. *J Artif Organs*. 2003;6(4):227–35.
7. Lemson MS, Tordoir JH, Daemen MJ, Kitslaar PJ. Intimal hyperplasia in vascular grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2000 Apr;19(4):336–50.
8. Taylor LM, Edwards JM, Porter JM. Present status of reversed vein bypass grafting: five-year results of a modern series. *J Vasc Surg*. 1990 Feb;11(2):193–205; discussion 205.
9. Conte MS, Bandyk DF, Clowes AW, Moneta GL, Seely L, Lorenz TJ, et al. Results of PREVENT III: a multicenter, randomized trial of edifoligide for the prevention of vein graft failure in lower extremity bypass surgery. *J Vasc Surg*. 2006 Apr;43(4):742–51; discussion 751.
10. Carrel A, Guthrie CC. Anastomosis of blood vessels by the patching method and transplantation of the kidney. 1906 [classical article]. *Yale J Biol Med*. 2001 Aug;74(4):243–7.
11. Lee T, Roy-Chaudhury P. Advances and new frontiers in the pathophysiology of venous neointimal hyperplasia and dialysis access stenosis. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2009 Sep;16(5):329–38.
12. Wong AP, Nili N, Strauss BH. In vitro differences between venous and arterial-derived smooth muscle cells: potential modulatory role of decorin. *Cardiovasc Res*. 2005 Feb 15;65(3):702–10.
13. Dobrin PB, Littooy FN, Endean ED. Mechanical factors predisposing to intimal hyperplasia and medial thickening in autogenous vein grafts. *Surgery*. 1989 Mar;105(3):393–400.
14. Szasz T, Thakali K, Fink GD, Watts SW. A comparison of arteries and veins in oxidative stress: producers, destroyers, function, and disease. *Exp Biol Med* (Maywood). 2007 Jan;232(1):27–37.
15. Neth P, Nazari-Jahantigh M, Schober A, Weber C. MicroRNAs in flow-dependent

- vascular remodelling. *Cardiovasc Res*. 2013 Jul 15;99(2):294–303.
16. Turner NA, Ho S, Warburton P, O'Regan DJ, Porter KE. Smooth muscle cells cultured from human saphenous vein exhibit increased proliferation, invasion, and mitogen-activated protein kinase activation in vitro compared with paired internal mammary artery cells. *J Vasc Surg*. 2007 May;45(5):1022–8.
 17. Muto A, Model L, Ziegler K, Eghbalieh SDD, Dardik A. Mechanisms of vein graft adaptation to the arterial circulation: insights into the neointimal algorithm and management strategies. *Circ J*. 2010 Aug;74(8):1501–12.
 18. Perlman H, Maillard L, Krasinski K, Walsh K. Evidence for the rapid onset of apoptosis in medial smooth muscle cells after balloon injury. *Circulation*. 1997 Feb 18;95(4):981–7.
 19. McNeil PL, Muthukrishnan L, Warder E, D'Amore PA. Growth factors are released by mechanically wounded endothelial cells. *J Cell Biol*. 1989 Aug;109(2):811–22.
 20. Fitridge R, Thompson M. Mechanisms of vascular disease: A reference book for vascular specialists. Adelaide: University of Adelaide Press; 2012.
 21. Jawien A, Bowen-Pope DF, Lindner V, Schwartz SM, Clowes AW. Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty. *J Clin Invest*. 1992 Feb;89(2):507–11.
 22. Mitra AK, Gangahar DM, Agrawal DK. Cellular, molecular and immunological mechanisms in the pathophysiology of vein graft intimal hyperplasia. *Immunol Cell Biol*. 2006 Apr;84(2):115–24.
 23. Zubilewicz T, Wronski J, Bourriez A, Terlecki P, Guinault AM, Muscatelli-Groux B, et al. Injury in vascular surgery--the intimal hyperplastic response. *Med Sci Monit*. 2001 Apr;7(2):316–24.
 24. Tan J, Yang L, Liu C, Yan Z. MicroRNA-26a targets MAPK6 to inhibit smooth muscle cell proliferation and vein graft neointimal hyperplasia. *Sci Rep*. 2017 Apr 21;7:46602.
 25. Heuchel R, Berg A, Tallquist M, Ahlén K, Reed RK, Rubin K, et al. Platelet-derived growth factor beta receptor regulates interstitial fluid homeostasis through phosphatidylinositol-3' kinase signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999 Sep 28;96(20):11410–5.
 26. Rönstrand L, Heldin CH. Mechanisms of platelet-derived growth factor-induced chemotaxis. *Int J Cancer*. 2001 Mar 15;91(6):757–62.
 27. Cospedal R, Abedi H, Zachary I. Platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) regulation of migration and focal adhesion kinase phosphorylation in rabbit aortic vascular smooth muscle cells: roles of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinases. *Cardiovasc Res*. 1999 Mar;41(3):708–21.
 28. Louis SF, Zahradka P. Vascular smooth muscle cell motility: From migration to invasion. *Exp Clin Cardiol*. 2010;15(4):e75-85.
 29. Muto A, Fitzgerald TN, Pimiento JM, Maloney SP, Teso D, Paszkowiak JJ, et al. Smooth muscle cell signal transduction: implications of vascular biology for vascular surgeons. *J Vasc Surg*. 2007 Jun;45 Suppl A:A15-24.
 30. Collins MJ, Li X, Lv W, Yang C, Protack CD, Muto A, et al. Therapeutic strategies to

- combat neointimal hyperplasia in vascular grafts. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2012 May;10(5):635–47.
31. Bandyk DF, Bergamini TM, Towne JB, Schmitt DD, Seabrook GR. Durability of vein graft revision: the outcome of secondary procedures. *J Vasc Surg.* 1991 Feb;13(2):200–8; discussion 209.
 32. Li L, Blumenthal DK, Terry CM, He Y, Carlson ML, Cheung AK. PDGF-induced proliferation in human arterial and venous smooth muscle cells: molecular basis for differential effects of PDGF isoforms. *J Cell Biochem.* 2011 Jan;112(1):289–98.
 33. Chandrasekar B, Tanguay JF. Platelets and restenosis. *J Am Coll Cardiol.* 2000 Mar 1;35(3):555–62.
 34. Fredriksson L, Li H, Eriksson U. The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004 Aug;15(4):197–204.
 35. Chen P-H, Chen X, He X. Platelet-derived growth factors and their receptors: structural and functional perspectives. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Oct;1834(10):2176–86.
 36. Bowen-Pope DF, Raines EW. History of discovery: platelet-derived growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 Nov;31(11):2397–401.
 37. Yang Z, Oemar BS, Carrel T, Kipfer B, Julmy F, Lüscher TF. Different proliferative properties of smooth muscle cells of human arterial and venous bypass vessels: role of PDGF receptors, mitogen-activated protein kinase, and cyclin-dependent kinase inhibitors. *Circulation.* 1998 Jan 20;97(2):181–7.
 38. Göncü T, Tiryakioğlu O, Ozcan A, Ari H, Sezen M, Vural H, et al. Inhibitory effects of ticlopidine and clopidogrel on the intimal hyperplastic response after arterial injury. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2010 Feb;10(1):11–6.
 39. Kudo FA, Kondo Y, Muto A, Miyazaki K, Dardik A, Nishibe M, et al. Cilostazol suppresses neointimal hyperplasia in canine vein grafts. *Surg Today.* 2009 Feb 7;39(2):128–32.
 40. Laparra-Escareño H, Ortega-Gómez A, Ventura-Gallegos JL, Zentella-Dehesa A, Santamaría-del Angel A, Hinojosa CA. Modelo experimental biológico y molecular de fuerza tensional para el estudio fisiopatológico de la hiperplasia intimal venosa. *RMA.* 2020 Apr 20;48(1).
 41. Schachner T. Pharmacologic inhibition of vein graft neointimal hyperplasia. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2006 May;131(5):1065–72.
 42. Wang M, Collins MJ, Foster TR, Bai H, Hashimoto T, Santana JM, et al. Eph-B4 mediates vein graft adaptation by regulation of endothelial nitric oxide synthase. *J Vasc Surg.* 2017 Jan;65(1):179–89.
 43. Ylä-Herttua S, Baker AH. Cardiovascular gene therapy: past, present, and future. *Mol Ther.* 2017 May 3;25(5):1095–106.
 44. Southerland KW, Frazier SB, Bowles DE, Milano CA, Kontos CD. Gene therapy for the prevention of vein graft disease. *Transl Res.* 2013 Apr;161(4):321–38.
 45. Cohen-Sacks H, Najajreh Y, Tchaikovski V, Gao G, Elazer V, Dahan R, et al. Novel PDGFbetaR antisense encapsulated in polymeric nanospheres for the treatment of

- restenosis. *Gene Ther.* 2002 Dec;9(23):1607–16.
46. Raica M, Cimpean AM. Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)/PDGF Receptors (PDGFR) Axis as Target for Antitumor and Antiangiogenic Therapy. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2010 Mar 11;3(3):572–99.
 47. Kameda H, Suzuki M, Takeuchi T. Platelet-derived growth factor as a therapeutic target for systemic autoimmune diseases. *Drug Target Insights*. 2007 Oct 30;2:239–47.
 48. Östman A, Heldin C-H. Involvement of platelet-derived growth factor in disease: development of specific antagonists. Elsevier; 2001. p. 1–38.
 49. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2001 Apr 5;344(14):1031–7.
 50. Buchdunger E, O'Reilly T, Wood J. Pharmacology of imatinib (STI571). *Eur J Cancer*. 2002 Sep;38 Suppl 5:S28-36.
 51. Park YJ, Min S-I, Jung IM, Lee T, Ha J, Chung JK, et al. Different Responses of Neointimal Cells to Imatinib Mesylate and Rapamycin Compared with Normal Vascular Smooth Muscle Cells. *Vasc Specialist Int*. 2014 Mar 30;30(1):5–10.
 52. Mann MJ, Whittemore AD, Donaldson MC, Belkin M, Conte MS, Polak JF, et al. Ex-vivo gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoy: the PREVENT single-centre, randomised, controlled trial. *Lancet*. 1999 Oct 30;354(9189):1493–8.
 53. Alexander JH, Hafley G, Harrington RA, Peterson ED, Ferguson TB, Lorenz TJ, et al. Efficacy and safety of edifoligide, an E2F transcription factor decoy, for prevention of vein graft failure following coronary artery bypass graft surgery: PREVENT IV: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2005 Nov 16;294(19):2446–54.
 54. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):281–97.
 55. Barbarotto E, Schmittgen TD, Calin GA. MicroRNAs and cancer: profile, profile, profile. *Int J Cancer*. 2008 Mar 1;122(5):969–77.
 56. Scalbert E, Bril A. Implication of microRNAs in the cardiovascular system. *Curr Opin Pharmacol*. 2008 Apr;8(2):181–8.
 57. Qin S, Zhang C. MicroRNAs in vascular disease. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011 Jan;57(1):8–12.
 58. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005 Jan 14;120(1):15–20.
 59. Nilsen TW. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. *Trends Genet*. 2007 May;23(5):243–9.
 60. Cannell IG, Kong YW, Bushell M. How do microRNAs regulate gene expression? *Biochem Soc Trans*. 2008 Dec;36(Pt 6):1224–31.
 61. Suárez Y, Fernández-Hernando C, Pober JS, Sessa WC. Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells. *Circ Res*. 2007 Apr 27;100(8):1164–73.

62. Magenta A, Greco S, Gaetano C, Martelli F. Oxidative stress and microRNAs in vascular diseases. *Int J Mol Sci.* 2013 Aug 22;14(9):17319–46.
63. Urbich C, Kuehbach A, Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res.* 2008 Sep 1;79(4):581–8.
64. Santoro MM. “Fishing” for endothelial microRNA functions and dysfunction. *Vascul Pharmacol.* 2011 Oct;55(4):60–8.
65. Cheng Y, Liu X, Yang J, Lin Y, Xu D-Z, Lu Q, et al. MicroRNA-145, a novel smooth muscle cell phenotypic marker and modulator, controls vascular neointimal lesion formation. *Circ Res.* 2009 Jul 17;105(2):158–66.
66. Wei Y, Nazari-Jahantigh M, Neth P, Weber C, Schober A. MicroRNA-126, -145, and -155: a therapeutic triad in atherosclerosis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013 Mar;33(3):449–54.
67. Cordes KR, Sheehy NT, White MP, Berry EC, Morton SU, Muth AN, et al. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature.* 2009 Aug 6;460(7256):705–10.
68. Zhang C. MicroRNA-145 in vascular smooth muscle cell biology: a new therapeutic target for vascular disease. *Cell Cycle.* 2009 Nov 1;8(21):3469–73.
69. Quintavalle M, Elia L, Condorelli G, Courtneidge SA. MicroRNA control of podosome formation in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. *J Cell Biol.* 2010 Apr 5;189(1):13–22.
70. Cao B-J, Wang X-W, Zhu L, Zou R-J, Lu Z-Q. MicroRNA-146a sponge therapy suppresses neointimal formation in rat vein grafts. *IUBMB Life.* 2019;71(1):125–33.
71. Wang K, Deng P, Sun Y, Ye P, Zhang A, Wu C, et al. MicroRNA-155 promotes neointimal hyperplasia through smooth muscle-like cell-derived RANTES in arteriovenous fistulas. *J Vasc Surg.* 2018;67(3):933-944.e3.
72. Jamaluddin MS, Weakley SM, Zhang L, Kougiyas P, Lin PH, Yao Q, et al. miRNAs: roles and clinical applications in vascular disease. *Expert Rev Mol Diagn.* 2011 Jan;11(1):79–89.
73. Lv L, Huang W, Zhang J, Shi Y, Zhang L. Altered microRNA expression in stenoses of native arteriovenous fistulas in hemodialysis patients. *J Vasc Surg.* 2016 Apr;63(4):1034-43.e3.
74. Joshi SR, Comer BS, McLendon JM, Gerthoffer WT. MicroRNA regulation of smooth muscle phenotype. *Mol Cell Pharmacol.* 2012 Jan 1;4(1):1–16.
75. Rzucidlo EM, Martin KA, Powell RJ. Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. *J Vasc Surg.* 2007 Jun;45 Suppl A:A25-32.
76. Liu M, Gomez D. Smooth muscle cell phenotypic diversity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019 Sep;39(9):1715–23.
77. Sun S, Zheng B, Han M, Fang X, Li H, Miao S, et al. miR-146a and Krüppel-like factor 4 form a feedback loop to participate in vascular smooth muscle cell proliferation. *EMBO Rep.* 2011 Jan;12(1):56–62.
78. Dang DT, Pevsner J, Yang VW. The biology of the mammalian Krüppel-like family of transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol.* 2000 Dec 1;32(11–12):1103–21.

79. Ghaleb AM, Yang VW. Krüppel-like factor 4 (KLF4): What we currently know. *Gene*. 2017 May 5;611:27–37.
80. Zhong Z, Wu H, Zhong W, Zhang Q, Yu Z. Expression profiling and bioinformatics analysis of circulating microRNAs in patients with acute myocardial infarction. *J Clin Lab Anal*. 2020 Mar;34(3):e23099.
81. Stark MS, Tyagi S, Nancarrow DJ, Boyle GM, Cook AL, Whiteman DC, et al. Characterization of the Melanoma miRNAome by Deep Sequencing. *PLoS ONE*. 2010 Mar 12;5(3):e9685.
82. Voellenkle C, Rooij J van, Guffanti A, Brini E, Fasanaro P, Isaia E, et al. Deep-sequencing of endothelial cells exposed to hypoxia reveals the complexity of known and novel microRNAs. *RNA*. 2012 Mar;18(3):472–84.
83. Plé H, Landry P, Benham A, Coarfa C, Gunaratne PH, Provost P. The repertoire and features of human platelet microRNAs. *PLoS ONE*. 2012 Dec 4;7(12):e50746.
84. Badi I, Burba I, Ruggeri C, Zeni F, Bertolotti M, Scopece A, et al. MicroRNA-34a Induces Vascular Smooth Muscle Cells Senescence by SIRT1 Downregulation and Promotes the Expression of Age-Associated Pro-inflammatory Secretory Factors. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2015 Nov;70(11):1304–11.
85. Tömböl Z, Szabó PM, Molnár V, Wiener Z, Tölgyesi G, Horányi J, et al. Integrative molecular bioinformatics study of human adrenocortical tumors: microRNA, tissue-specific target prediction, and pathway analysis. *Endocr Relat Cancer*. 2009 Sep;16(3):895–906.
86. Soufi-Zomorrod M, Hajifathali A, Kouhkan F, Mehdizadeh M, Rad SMAH, Soleimani M. MicroRNAs modulating angiogenesis: miR-129-1 and miR-133 act as angio-miR in HUVECs. *Tumour Biol*. 2016 Jul;37(7):9527–34.
87. Luan W, Qian Y, Ni X, Bu X, Xia Y, Wang J, et al. miR-204-5p acts as a tumor suppressor by targeting matrix metalloproteinases-9 and B-cell lymphoma-2 in malignant melanoma. *Onco Targets Ther*. 2017 Feb 27;10:1237–46.
88. Huang X-H, Chen J-S, Wang Q, Chen X-L, Wen L, Chen L-Z, et al. miR-338-3p suppresses invasion of liver cancer cell by targeting smoothened. *J Pathol*. 2011 Nov;225(3):463–72.
89. Nip H, Dar AA, Saini S, Colden M, Varahram S, Chowdhary H, et al. Oncogenic microRNA-4534 regulates PTEN pathway in prostate cancer. *Oncotarget*. 2016 Oct 18;7(42):68371–84.
90. Liu W, Ling S, Sun W, Liu T, Li Y, Zhong G, et al. Circulating microRNAs correlated with the level of coronary artery calcification in symptomatic patients. *Sci Rep*. 2015 Nov 5;5:16099.
91. Luo D, Fan H, Ma X, Yang C, He Y, Ge Y, et al. miR-1301-3p Promotes Cell Proliferation and Facilitates Cell Cycle Progression via Targeting SIRT1 in Gastric Cancer. *Front Oncol*. 2021 Apr 27;11:664242.
92. Wang G, Wen Y, Faleti OD, Zhao Q, Liu J, Zhang G, et al. A Panel of Exosome-Derived miRNAs of Cerebrospinal Fluid for the Diagnosis of Moyamoya Disease. *Front Neurosci*. 2020 Sep 25;14:548278.

93. Liu H, Wang H, Yang S, Qian D. Downregulation of miR-542-3p promotes osteogenic transition of vascular smooth muscle cells in the aging rat by targeting BMP7. *Hum Genomics*. 2019 Dec 11;13(1):67.
94. Esser JS, Saretzki E, Pankratz F, Engert B, Grundmann S, Bode C, et al. Bone morphogenetic protein 4 regulates microRNAs miR-494 and miR-126-5p in control of endothelial cell function in angiogenesis. *Thromb Haemost*. 2017 Apr 3;117(4):734–49.
95. Yao Y, Ma J, Xue Y, Wang P, Li Z, Li Z, et al. MiR-449a exerts tumor-suppressive functions in human glioblastoma by targeting Myc-associated zinc-finger protein. *Mol Oncol*. 2015 Mar;9(3):640–56.
96. Fish JE, Santoro MM, Morton SU, Yu S, Yeh R-F, Wythe JD, et al. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev Cell*. 2008 Aug;15(2):272–84.
97. Azizi M, Rahimi N, Bahari G, Hashemi SM, Hashemi M. The Relationship between Pre-miR-3131 3-bp Insertion/Deletion Polymorphism and Susceptibility and Clinicopathological Characteristics of Patients with Breast Cancer. *Microna*. 2020;9(3):216–23.
98. Yoo JK, Jung HY, Kim C-H, Son WS, Kim JK. miR-7641 modulates the expression of CXCL1 during endothelial differentiation derived from human embryonic stem cells. *Arch Pharm Res*. 2013 Mar;36(3):353–8.