

Enfoque: Genética, epigenética y enfermedad cardiovascular (III)

Biomarcadores epigenéticos y enfermedad cardiovascular: los microARN circulantes



David de Gonzalo-Calvo^{a,b,*}, Eduardo Iglesias-Gutiérrez^c y Vicenta Llorente-Cortés^{a,b,d}

^a Grupo de Lípidos y Patología Cardiovascular, Instituto de Investigación Biomédica Sant Pau (IIB Sant Pau), Barcelona, España

^b Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España

^c Departamento de Biología Funcional (Área de Fisiología), Universidad de Oviedo, Asturias, España

^d Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IIB), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Barcelona, España

Historia del artículo:

On-line el 14 de abril de 2017

Palabras clave:

MicroARN

Enfermedad cardiovascular

Biomarcadores

RESUMEN

Los microARN (miARN) son una clase de ARN no codificante de pequeño tamaño (20-25 nucleótidos) que participan en la regulación génica. En los últimos años, los miARN han emergido como un mecanismo epigenético clave en el desarrollo y en la funcionalidad del sistema cardiovascular. Estas especies moleculares regulan funciones básicas en prácticamente todos los tipos celulares y por ello están directamente asociadas con la fisiopatología de un gran número de enfermedades cardiovasculares. Desde su relativamente reciente descubrimiento en fluidos extracelulares, se ha estudiado los miARN como potenciales biomarcadores de enfermedad. Son numerosos los estudios que proponen a los miARN como biomarcadores circulantes de diferentes patologías cardiovasculares (infarto de miocardio, enfermedad coronaria o insuficiencia cardíaca, entre otras), incluso con propiedades fisicoquímicas y bioquímicas superiores a los indicadores proteicos convencionales utilizados actualmente en la práctica clínica. En el presente trabajo se ofrece una breve introducción al campo de los miARN, con especial atención a su potencial aplicación clínica. Esta incluye su posible papel como nuevos biomarcadores de diagnóstico o de pronóstico en la enfermedad cardiovascular.

© 2017 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Epigenetic Biomarkers and Cardiovascular Disease: Circulating MicroRNAs

ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs) are a class of small noncoding RNA (20-25 nucleotides) involved in gene regulation. In recent years, miRNAs have emerged as a key epigenetic mechanism in the development and physiology of the cardiovascular system. These molecular species regulate basic functions in virtually all cell types, and are therefore directly associated with the pathophysiology of a large number of cardiovascular diseases. Since their relatively recent discovery in extracellular fluids, miRNAs have been studied as potential biomarkers of disease. A wide array of studies have proposed miRNAs as circulating biomarkers of different cardiovascular pathologies (eg, myocardial infarction, coronary heart disease, and heart failure, among others), which may have superior physicochemical and biochemical properties than the conventional protein indicators currently used in clinical practice. In the present review, we provide a brief introduction to the field of miRNAs, paying special attention to their potential clinical application. This includes their possible role as new diagnostic or prognostic biomarkers in cardiovascular disease.

Full English text available from: www.revespcardiol.org/en

© 2017 Sociedad Española de Cardiología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Keywords:

MicroRNA

Cardiovascular disease

Biomarkers

Abreviaturas

ARNm: ARN mensajero

ARNnc: ARN no codificante

miARN: microARN

VÉASE CONTENIDO RELACIONADO:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.recesp.2017.03.014>, Rev Esp Cardiol. 2017;70:696-698

* Autor para correspondencia: Grupo de Lípidos y Patología Cardiovascular, Instituto de Investigación Biomédica Sant Pau (IIB Sant Pau), Sant Antoni Maria Claret 167, 08025 Barcelona, España.

Correo electrónico: DGonzalo@santpau.cat (D. de Gonzalo-Calvo).

INTRODUCCIÓN

Tan solo un 1-3% del genoma humano corresponde a secuencias de nucleótidos que codifican proteínas¹. El 97-99% restante se consideraba originalmente como ADN basura (*junk*) ya que se hipotetizó que estas secuencias no codificaban información biológicamente relevante. El número de genes que codifican proteínas es similar entre especies con alto y bajo grado de complejidad biológica. Por tanto, el grado de complejidad biológica no puede explicarse únicamente por el flujo unidireccional gen-proteína². La complejidad biológica podría estar determinada por

<http://dx.doi.org/10.1016/j.recesp.2017.02.027>

0300-8932/© 2017 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

la regulación de la expresión génica³. En la actualidad, se considera que los ARN no codificantes (ARNnc), ARN no traducidos a proteína claves en la regulación de la expresión génica, son una de las principales fuentes de esta complejidad⁴. En efecto, la proporción de genes que no codifican información para proteínas frente a genes que codifican información proteica es 17 veces mayor en los seres humanos en comparación con el nematodo *Caenorhabditis elegans*⁵.

Los ARNnc se clasifican en 2 subclases: ARNnc de cadena larga (mayores de 200 nucleótidos) y ARNnc pequeños (menores de 200 nucleótidos). Los microARN (miARN), con un tamaño de 19-25 nucleótidos, son el grupo de ARN de pequeño tamaño que ha atraído mayor atención durante los últimos años. El primer miARN fue descubierto en 1993 en *C. elegans*^{6,7}. Hasta principios del siglo XXI no se describieron los primeros miARN en humanos⁸. Desde entonces, este campo de investigación ha crecido de forma exponencial. Al igual que otros mecanismos epigenéticos previamente descritos, como la metilación del ADN o la modificación de histonas, los miARN son importantes reguladores de la expresión génica. Son moléculas muy conservadas y presentes en todos los tipos celulares. Participan en la mayoría (si no en todos) de los procesos biológicos⁹ constituyendo un mecanismo de control epigenético fundamental a nivel postranscripcional que permite la regulación temporal de la expresión del ARN mensajero (ARNm) y, por ello, la rápida respuesta a los cambios ambientales¹⁰. Se han identificado alrededor de 2.500 miARN humanos, catalogados en la base de datos miRBase¹¹, aunque en trabajos recientes se ha propuesto la existencia de un repertorio todavía mayor¹².

El presente artículo pretende proporcionar una breve descripción de la biología de los miARN intracelulares y extracelulares, así como resumir la información más reciente sobre la investigación de estas especies moleculares en la enfermedad cardiovascular, centrándose principalmente en su potencial como biomarcadores de futura aplicación clínica.

BIOGÉNESIS Y FUNCIÓN DE LOS MICROARN

Durante su biogénesis, los miARN siguen un proceso de varios pasos que incluye: transcripción, maduración nuclear, exportación al citoplasma y posterior procesamiento (figura).

En cuanto a su función, los miARN actúan a nivel postranscripcional mediante la degradación del ARNm o la inhibición de la traducción y en ambos casos disminuyen la expresión del gen sobre cuyo ARNm hacen diana. Generalmente solo existe complementariedad parcial entre los nucleótidos de la región *seed* del miARN (una secuencia de 6 a 8 nucleótidos en el extremo 5') y la del ARNm diana. La complementariedad perfecta entre miARN y ARNm no es fundamental para reducir la expresión génica y, de hecho, rara vez ocurre en mamíferos. Tanto el pequeño tamaño de la región *seed* como el incompleto emparejamiento con el ARNm diana permiten que un mismo miARN pueda suprimir la expresión de diferentes genes, a menudo funcionalmente relacionados. A su vez, un mismo ARNm puede contener múltiples sitios de unión para varios miARN y generar una compleja red de interacciones miARN-ARNm. De esta forma, se estima que los miARN tienen la capacidad de regular la expresión de aproximadamente el 60% de los genes humanos¹³. Así pues, los miARN constituyen una densa red reguladora de la expresión génica con múltiples efectos cooperativos sobre un gran número de genes; lo que permite controlar diversas rutas moleculares a distintos niveles².

MICROARN EXTRACELULARES: NUEVOS MEDIADORES EN LA COMUNICACIÓN INTERCELULAR

Pese a que el primer trabajo que describió la presencia de ARN extracelular intacto en la circulación sanguínea se publicó en el año 1972¹⁴, hasta el año 2007 no se propuso la existencia de miARN extracelulares¹⁵. Un año después, en un trabajo clave para este campo, Mitchell et al.¹⁶ demostraron la existencia de miARN en la

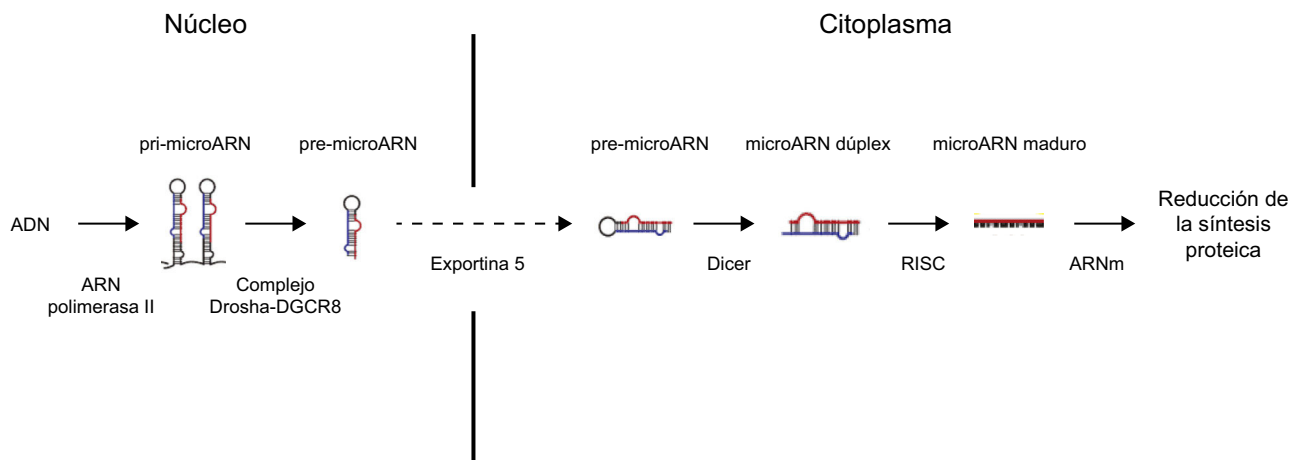


Figura. Biogénesis de microARN (miARN). En el núcleo, una gran proporción de genes de miARN se transcribe mediante la ARN polimerasa II (un grupo menor de estos mediante la ARN polimerasa III). La transcripción genera un miARN primario (pri-miARN), de cientos o miles de nucleótidos de longitud. En la vía de la biogénesis canónica miARN, el complejo de procesamiento de miARN (compuesto por la RNasa Drosha y el cofactor DGCR8) corta el pri-miARN generando el miARN precursor (pre-miARN) de 70 a 100 nucleótidos de longitud. Este pre-miARN se exporta desde el núcleo al citoplasma a través de la exportina 5. Una vez en el citoplasma, la enzima Dicer procesa y corta el pre-miARN generando un dúplex de pequeño tamaño (alrededor de 22 nucleótidos) que contiene el miARN maduro y la cadena complementaria. Cada dúplex contiene 2 miARN maduros: la hebra guía, con una prevalencia de 96-99%, y la hebra pasajera. Este dúplex se asocia con un miembro de la familia de proteínas de unión al ARN (AGO [argonauta]) que ensambla el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, del inglés RNA-induced silencing complex). La hebra guía se retiene en el complejo, mientras que la hebra pasajera se degrada. En algunos casos, ambas cadenas pueden ser funcionales. No todos los miARN conocidos se ajustan a esta ruta canónica. En una ruta alternativa los miARN (denominados *mirtrones*) derivan de los intrones generados durante el *splicing* del ARN mensajero (ARNm). La unión del complejo RISC-miARN al ARNm está mediada por un emparejamiento de Watson-Crick de la región *seed* del miARN, una secuencia de 6 a 8 nucleótidos en el extremo 5' del miARN, con secuencias complementarias generalmente en la región no traducida 3' (UTR) del ARNm diana. También se han descrito interacciones con las regiones codificantes y 5' UTR del ARNm. Una vez unido, el RISC es capaz de inducir el silenciamiento de la expresión génica a nivel postranscripcional mediante la degradación o la inhibición de la traducción del ARNm; lo que conduce en ambos casos a la reducción de los niveles de proteína diana correspondiente. El mecanismo predominante por el cual los miARN reducen la síntesis de proteínas es la deadenilación del ARNm diana, fenómeno que aumenta la susceptibilidad del ARNm a la degradación.

circulación sanguínea. Desde entonces se ha descrito la presencia de miARN en un amplio número de fluidos corporales¹⁷.

Al contrario que otros tipos de ARN como el ARNm, los miARN son altamente estables en el medio extracelular. Los miARN extracelulares están protegidos de la degradación por el empaquetamiento en diferentes tipos de vesículas lipídicas¹⁸, tales como cuerpos apoptóticos, micropartículas y exosomas, y por la unión con proteínas como AGO2 (argonauta 2) o NPM1 (nucleofosmina 1)¹⁹ o lipoproteínas, incluyendo lipoproteínas de alta y baja densidad²⁰. La interacción con elementos lipídicos o proteicos confiere a los miARN una gran resistencia a diferentes condiciones adversas, como la degradación por la actividad de ribonucleasa, los pH extremos, las temperaturas elevadas, los ciclos repetidos de congelación-descongelación o el almacenamiento prolongado¹⁶. De hecho, los miARN sintéticos libres se degradan rápidamente en el plasma sanguíneo¹⁶.

La incorporación de miARN en microvesículas ocurre de forma selectiva²¹. Nuestro grupo ha demostrado previamente que el perfil de miARN en microvesículas secretadas no se correlaciona necesariamente con el perfil intracelular de la célula de origen²². No obstante, los datos sobre la maquinaria celular implicada en el empaquetamiento de miARN en el interior de microvesículas o en la interacción proteína/lipoproteína-miARN son muy limitados²⁰. Del mismo modo, aún se está lejos de comprender completamente los mecanismos que regulan la selección de miARN para exportar. En este sentido, Villarroja-Beltri et al.²³ han descrito que la célula selecciona los miARN para exportar en exosomas mediante el reconocimiento de motivos específicos en la secuencia de nucleótidos. Por su parte, otros autores proponen que el contenido de miARN en exosomas se regula por el contenido global de miARN intracelular²⁴.

Los miARN extracelulares actúan como un auténtico sistema de comunicación intercelular regulando la expresión génica y el fenotipo de las células receptoras. Al igual que sus formas intracelulares, los miARN extracelulares participan tanto en respuestas fisiológicas y adaptativas como en el inicio y en el desarrollo de estados patológicos, incluyendo las enfermedades cardiovasculares^{25,26}. Algunos ejemplos muestran resultados convincentes sobre la relevancia de los miARN extracelulares en la homeostasis y en la patología del sistema cardiovascular. Zerneck et al.²⁷ proponen que los cuerpos apoptóticos generados durante la aterosclerosis son capaces de transmitir señales paracrinas mediante miARN regulando la estabilidad de la placa de ateroma. Hergenreider et al.²⁸ describen un mecanismo de comunicación ateroprotector entre las células endoteliales y las células vasculares musculares lisas mediado por vesículas extracelulares, miR-143 y miR-145. Shan et al.²⁹ demuestran que miR-223 se secreta por células sanguíneas y se internaliza por células de la pared vascular, por lo que desempeña un papel relevante en la fisiología de las células vasculares musculares lisas (proliferación, migración y apoptosis). Por ello, proponen que miR-223 constituye una señal genética endocrina entre células sanguíneas y células vasculares.

MICROARN EN LA FISIOLÓGIA Y PATOFISIOLÓGIA CARDIOVASCULAR

La alteración de los valores de expresión de miARN afecta directamente a la expresión de sus ARNm diana y, por lo tanto, los miARN son elementos potencialmente causales de la enfermedad. Desde la publicación del primer trabajo donde se demostró el papel de los miARN en el desarrollo de la leucemia crónica³⁰, numerosos estudios han correlacionado modificaciones en los perfiles de expresión de miARN con el inicio y la evolución de diferentes patologías incluyendo el cáncer, las enfermedades metabólicas o los trastornos neurológicos³¹. La relevancia de la regulación de la expresión génica a través de los miARN en el desarrollo y en

la homeostasis del sistema cardiovascular, así como la implicaciones de los miARN en la patología cardiovascular, están bien establecidas³². Se han publicado excelentes revisiones sobre el papel de los miARN en algunos aspectos relacionados con la funcionalidad y con diversas patologías del sistema cardiovascular³³⁻³⁵.

La alteración de los perfiles de expresión en los distintos tejidos que conforman el sistema cardiovascular se asocia con trastornos como la insuficiencia cardíaca, la aterosclerosis y las cardiomiopatías de diversa etiología³⁶. Los miARN se expresan en cardiomiocitos, fibroblastos, células endoteliales y células vasculares musculares lisas; controlan prácticamente todos los aspectos de la biología del sistema cardiovascular, incluyendo el remodelado y la fibrosis cardíaca, la apoptosis, la inflamación, la proliferación, la angiogénesis y el metabolismo. A este respecto, diferentes estudios demuestran que la sobreexpresión o la represión de miARN específicos en modelos *in vitro* e *in vivo* incluyendo, entre otros, miR-1, miR-126, miR-133a o miR-208a es un mecanismo clave en la patología cardiovascular^{36,37}. Un buen ejemplo del papel de los miARN en el desarrollo y en la fisiopatología cardiovascular proviene del modelo murino *knockout* condicional de la enzima Dicer en el corazón, implicada en la biogénesis de los miARN. Este modelo murino presenta miocardiopatía dilatada e insuficiencia cardíaca³⁸, así como defectos cardiovasculares congénitos³⁹.

MICROARN CIRCULANTES COMO BIOMARCADORES DE ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

La identificación de sujetos en fases subclínicas de la enfermedad y/o alto riesgo cardiovascular tiene implicaciones cruciales para la salud de los pacientes, así como para la gestión eficiente de los recursos de los sistemas de salud, especialmente en el contexto actual de alta prevalencia de mortalidad y morbilidad asociadas a enfermedad cardiovascular. Por ello es fundamental el descubrimiento de nuevos biomarcadores y la mejora de las herramientas diagnósticas, particularmente de los algoritmos de predicción de riesgo^{40,41}.

Los miARN circulantes presentan las propiedades biológicas y fisicoquímicas apropiadas para constituir biomarcadores útiles en la práctica clínica³: a) se pueden obtener mediante técnicas mínimamente invasivas en tipos de muestras utilizadas actualmente en los laboratorios clínicos; b) pueden originarse a partir de células necróticas o secretarse activamente a partir de células vivas; c) el perfil de miARN circulantes puede presentar una alta especificidad en función del tejido y de la enfermedad; d) el perfil de miARN circulantes se altera en situaciones de estrés celular y en condiciones patofisiológicas; e) los miARN son altamente estables y presentan una vida media larga dentro de la muestra; f) como ácidos nucleicos, los miARN ofrecen ventajas sobre los biomarcadores utilizados en la actualidad en la práctica clínica: los biomarcadores basados en péptidos pueden presentar distintas variantes de la misma molécula y están sujetos a modificaciones postraduccionales que dificultan su detección. Debido a su pequeño tamaño y a su composición química, los miARN son moléculas menos complejas que la mayoría de las moléculas biológicas del plasma; lo que facilita su determinación; g) se pueden cuantificar con una alta sensibilidad y especificidad de forma eficiente, rentable y relativamente rápida en los laboratorios clínicos actuales mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, y h) pueden obtenerse perfiles globales en un solo experimento mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o técnicas de relativo fácil acceso como la secuenciación o *microarrays*.

Todas estas características han llevado a distintos autores a proponer la aplicación clínica de miARN a corto o medio plazo⁴². Un test sanguíneo basado en miARN podría ser una potente

herramienta no invasiva que proporcionase al clínico una valiosa información para el correcto manejo del paciente.

A continuación se abordará el papel de los miARN como biomarcadores en algunas de las entidades clínicas que se engloban bajo el término «enfermedad cardiovascular», si bien cubrir todas las patologías y todos los miARN propuestos como biomarcadores va más allá del alcance de este artículo.

Síndrome coronario agudo

Uno de los principales campos explorados en el estudio de los miARN como biomarcadores de enfermedad cardiovascular es su potencial diagnóstico en el síndrome coronario (tabla).

La amplia mayoría de los trabajos se centran en el estudio de los valores plasmáticos de miARN enriquecidos en el tejido miocárdico (miR-1, miR-133a/b, miR-208a y miR-499), también enriquecidos en el músculo esquelético; y por ello conocidos como *myomiR*. La concentración de estos miARN en el plasma aumenta poco después de la necrosis del miocardio con cinéticas similares a las observadas para los indicadores cardíacos convencionales: como la troponina T cardíaca de alta sensibilidad^{43,45,46}. Los valores de miARN aumentan en los gradientes transcoronarios de los pacientes con síndrome coronario agudo, lo que sugiere que los miARN se liberan desde los cardiomiocitos necróticos⁵⁹. En

efecto, Cheng et al.⁶⁰ identificaron en un metanálisis a miR-133a y miR-499 como potenciales biomarcadores de infarto de miocardio con aplicación clínica. Se han propuesto otros miARN (miR-21, miR-92, miR-126 o miR-132) como indicadores con una alta sensibilidad y especificidad, no solo de infarto de miocardio, sino también de angina inestable^{49,50,61,62}. Cabe destacar que los miARN circulantes podrían añadir un valor diagnóstico a las troponinas cardíacas⁴⁷. El potencial de los miARN circulantes como biomarcadores se ha puesto especialmente de manifiesto en los estudios que analizan su capacidad para mejorar el diagnóstico en pacientes con dolor torácico⁴⁷. En este sentido, Zeller et al.⁴⁹ proponen que la combinación de miR-132, miR-150 y miR-186 presenta un valor diagnóstico para angina inestable superior al de indicadores clásicos combinados como la troponina I cardíaca, el péptido natriurético tipo B y la proteína C reactiva.

La capacidad de los miARN circulantes para aportar información en el diagnóstico de angina inestable y estable⁶³, infarto de miocardio y angina inestable⁴⁴, e infarto agudo de miocardio sin elevación del segmento ST e insuficiencia cardíaca aguda⁴⁸ también se ha destacado en diferentes trabajos.

Enfermedad coronaria

Proteínas plasmáticas como el fibrinógeno o la proteína C reactiva se han propuesto como biomarcadores de enfermedad

Tabla

Selección de estudios sobre microARN circulantes y enfermedad cardiovascular

Diseño experimental	Resultados destacados	Estudio
SCA		
71 pacientes ingresados en el departamento de cardiología	Valores elevados de miR-1 y miR-133a en pacientes de IAM, agina de pecho inestable y cardiomiopatía de <i>tako-tsubo</i>	Kuwabara et al. ⁴³
444 pacientes con SCA	Valores elevados de miR-1, miR-133a y miR-208b en pacientes de IAM en comparación con pacientes de angina inestable	Widera et al. ⁴⁴
216 pacientes con IAMCEST	Correlación de miR-133a con marcadores pronósticos, incluyendo tamaño del infarto	Eitel et al. ⁴⁵
510 pacientes de IAM remitidos para reperfusión mecánica primaria y 87 controles sanos	Valores elevados de miR-208b y miR-499 en paciente de AMI y casi indetectables en los controles sanos. Los pacientes con IAMCEST presentaron valores superiores a los pacientes sin IAMCEST; miARN detectables en el plasma 1 h después del inicio del dolor torácico	Devaux et al. ⁴⁶
332 pacientes con sospecha de SCA en el servicio de urgencias	Valores elevados de miR-1, miR-21, miR-146a, miR-208a y miR-499 en pacientes con SCA, incluso en pacientes con hscTnT inicialmente negativa o inicio de síntomas < 3 h; miR-1, miR-21 y miR-499 aumentaron el valor diagnóstico de hscTnT	Oerlemans et al. ⁴⁷
99 pacientes sin IAMCEST, 81 pacientes con EAC sin IAM y 99 controles sanos	Valores elevados de miR-1, miR-21 miR-133a, miR-423-5p y miR-499-5p pacientes sin IAMCEST afrente a control. Valores elevados de miR-21 y miR-499-5p en pacientes sin IAMCEST frente a EAC	Olivieri et al. ⁴⁸
Estudio en 3 fases con 315 pacientes, incluyendo a sujetos con angina inestable, dolor torácico de origen no coronario y controles sanos	El perfil de miARN compuesto por miR-132, miR-150 y miR-186 mostró el mayor poder diagnóstico de angina inestable	Zeller et al. ⁴⁹
1.155 pacientes con dolor torácico agudo en el servicio de urgencias	Valores elevados de miR-208b, miR-499 y miR-320a en pacientes con IAM en comparación con aquellos con otros diagnósticos	Devaux et al. ⁵⁰
EAC		
67 pacientes con EAC y 31 voluntarios sanos	Valores circulantes reducidos de miR-126, miR-17, miR-92a, miR-145 y miR-155 y elevados de miR-133a y miR-208a en pacientes con EAC	Fichtlscherer et al. ⁵¹
195 sujetos sometidos a angiografía coronaria para la evaluación del dolor torácico	Valores reducidos de miR-145 en pacientes de EAC. Valores de miR-145 asociados a gravedad	Gao et al. ⁵²
IC		
33 pacientes con IC aguda y 20 controles sanos	Valores elevados de miR-499 en pacientes con IC aguda	Corsten et al. ⁵³
50 pacientes con disnea y 39 controles sanos	Valores elevados de miR-423 en pacientes con IC	Tijssen et al. ⁵⁴
30 pacientes con IC crónica y 30 controles sanos	Valores elevados de miR-22, miR92b, miR-320a y miR-423 en pacientes con IC sistólica	Goren et al. ⁵⁵
RCV		
820 sujetos del estudio Bruneck (población general)	miR-126, miR-197 y miR-223 asociados con la incidencia de IAM	Zampetaki et al. ⁵⁶
873 pacientes con EAC	miR-197 y miR-223 predictores de mortalidad	Schulte et al. ⁵⁷
1.112 pacientes con EAC (430 pacientes con SCA y 682 pacientes con angina de pecho estable)	Valores de miR-132, miR-140-3p y miR-210 mejoraron la discriminación de un modelo de predicción de mortalidad	Karakas et al. ⁵⁸

EAC: enfermedad arterial coronaria; hscTnT: troponina T cardíaca de alta sensibilidad; IAM: infarto agudo de miocardio; IAMCEST: infarto de miocardio con elevación del segmento ST; IC: insuficiencia cardíaca; miARN: microARN; RCV: riesgo cardiovascular; SCA: síndrome coronario agudo.

coronaria⁶⁴. Sin embargo, el valor diagnóstico de estos indicadores es limitado, ya que los modulan factores no necesariamente relacionados con la enfermedad cardiovascular⁶⁴. Las técnicas de imagen disponibles no permiten detectar fases tempranas de la enfermedad. Por ello es fundamental el desarrollo de nuevos biomarcadores suficientemente robustos para identificar y caracterizar lesiones ateroscleróticas, especialmente aquellas inestables⁶⁵.

Varios estudios han analizado la asociación de los miARN circulantes con la enfermedad coronaria (tabla). En un trabajo pionero, Fichtlscherer et al.⁵¹ propusieron los valores circulantes de miR-126, miR-17, miR-92a, miR-133a, miR-145, miR-155 y miR-208a como indicadores de la presencia de enfermedad coronaria. Algunos de estos miARN han sido validados posteriormente en estudios independientes⁶⁶. El perfil de miARN circulantes parece estar asociado no solamente con la presencia de lesión coronaria, sino también con la gravedad de la enfermedad^{52,66,67}. Los miARN también se han propuesto como potenciales biomarcadores de placas vulnerables⁶². No obstante, gran parte de estos resultados se han obtenido en estudios caso-control con pequeñas poblaciones.

Insuficiencia cardíaca

Distintos estudios han demostrado la existencia de un perfil específico de miARN circulantes en pacientes con insuficiencia cardíaca (tabla). Marfella et al.⁶⁸, tras evaluar un panel de 84 miARN previamente asociados con las alteraciones estructurales en el corazón, detectaron un perfil circulante de 24 miARN característicos de pacientes con insuficiencia cardíaca. Salvo excepciones⁶⁹, diferentes estudios apuntan a miR-423 como un potencial biomarcador asociado a la insuficiencia cardíaca. En uno de los primeros trabajos en este campo, Tijssen et al.⁵⁴ identificaron 6 miARN elevados en pacientes con insuficiencia cardíaca, entre los que miR-423 mostró una fuerte asociación con el diagnóstico clínico de la enfermedad. Otros trabajos posteriores han validado estos resultados⁵⁵. Cabe destacar que en diferentes estudios se ha sugerido el potencial de los miARN como nuevos biomarcadores de insuficiencia cardíaca con fracción de eyección preservada⁷⁰, disfunción diastólica⁷¹ e insuficiencia cardíaca aguda⁵³.

Riesgo cardiovascular

Actualmente, la evaluación del riesgo cardiovascular está basada exclusivamente en factores de riesgo clásicos establecidos como la hipertensión, la dislipemia, la diabetes o el tabaquismo. Desafortunadamente, estos factores de riesgo tradicionales no explican completamente el riesgo de evento cardiovascular. Gran parte de los eventos ocurren en pacientes con un riesgo bajo o intermedio que presentan un número reducido de factores de riesgo cardiovascular clásicos⁶⁵. Por el contrario, una gran parte de los individuos clasificados según estos factores como de alto riesgo no experimenta ningún episodio cardiovascular; ni siquiera a largo plazo⁷². Así pues, existe un interés clínico evidente en el desarrollo de nuevos biomarcadores no invasivos y de fácil acceso que permitan mejorar significativamente la capacidad predictiva de los algoritmos desarrollados hasta la fecha, más allá de los factores de riesgo tradicionales³.

Varios trabajos han analizado la capacidad de los miARN circulantes para predecir futuros eventos cardiovasculares tanto en la población general como en pacientes con enfermedad coronaria conocida. Zampetaki et al.⁵⁶ demostraron por primera vez el potencial de los miARN para predecir eventos adversos. Demostraron, en una cohorte de 820 individuos con un seguimiento de 10 años, una asociación significativa de 3 miARN (miR-126, miR-197 y miR-223) con el riesgo de infarto de miocardio incluso

tras ajustar por posibles factores de confusión. El potencial pronóstico de miR-197 y miR-223 como predictores de mortalidad cardiovascular se corroboró en una cohorte de 873 pacientes con enfermedad coronaria⁵⁷. Por su parte, miR-132, miR-140 y miR-210 también se asociaron con muerte cardiovascular en una cohorte similar de 1.112 pacientes⁵⁸. Recientemente, Bye et al.⁷³ han propuesto que un panel de 5 miARN (miR-106a-5p, miR-424-5p, let-7g-5p, miR-144-3p y miR-660-5p) son capaces de mejorar la predicción del riesgo de infarto de miocardio en individuos sanos. Estos resultados ponen de manifiesto la prometedora aplicabilidad de los miARN como biomarcadores en la prevención primaria y secundaria de la enfermedad cardiovascular.

Otras patologías cardiovasculares

El estudio de miARN circulantes como biomarcadores de otras patologías cardiovasculares, más allá de las mencionadas, se ha abordado en un número minoritario de trabajos. En este sentido, a pesar de su gran incidencia, las investigaciones que han analizado la asociación entre miARN circulantes e ictus son escasas. El análisis de la expresión de miARN en sangre periférica de pacientes jóvenes con ictus isquémico reveló que los perfiles de miARN en sangre periférica pueden ser potenciales biomarcadores en el diagnóstico del ictus isquémico cerebral⁷⁴. El perfil sanguíneo de miARN también puede discriminar entre accidente cerebrovascular hemorrágico e isquémico⁷⁵. Otros autores han demostrado que los miARN séricos son indicadores con utilidad clínica en el caso del aneurisma aórtico abdominal⁷⁶. El posible papel de los miARN como biomarcadores de aterosclerosis periférica también se ha evaluado. Stather et al.⁷⁷ identificaron un perfil específico de enfermedad arterial periférica que presentó un buen potencial diagnóstico y ofreció, además, información sobre posibles rutas moleculares implicadas en la patogénesis de la enfermedad. Recientemente se ha revisado en detalle el posible papel de los miARN circulantes como biomarcadores de diferentes trastornos cardiovasculares, incluyendo la fibrilación auricular, la miocarditis, el embolismo pulmonar, la cardiomiopatía de *tako-tsubo*, las complicaciones vasculares ligadas a la diabetes o la demencia vascular^{78,79}.

LIMITACIONES EN LA APLICACIÓN CLÍNICA DE MICROARN CIRCULANTES COMO BIOMARCADORES

A pesar de los prometedores resultados de los miARN circulantes como nuevos biomarcadores de enfermedad cardiovascular, los miARN aún no han entrado a formar parte de la práctica clínica; principalmente a causa de la falta de grandes estudios de cohortes y por las limitaciones técnicas de su aplicación^{9,37}. Existe además una gran heterogeneidad entre los estudios, incluyendo diferencias entre los miARN y las enfermedades estudiadas; así como en el diseño experimental: recogida y tratamiento de las muestras y metodología empleada para el análisis de los miARN⁸⁰. En este sentido, un grupo notable de los trabajos publicados no han comparado el potencial diagnóstico o pronóstico de los miARN circulantes con indicadores clínicos previamente establecidos y actualmente utilizados en la práctica clínica: un paso clave en el desarrollo de nuevos biomarcadores. Otro aspecto destacable es la inadecuada selección de controles, especialmente para factores de confusión como edad, sexo, medicación y comorbilidades⁸¹. La falta de especificidad de los miARN propuestos como biomarcadores también constituye una limitación. Por ejemplo, miR-126 se ha asociado fuertemente con enfermedad coronaria⁵¹. No obstante, este mismo miARN también está íntimamente ligado a la insuficiencia cardíaca⁸² y a la diabetes⁸³; lo que pone en duda su utilidad clínica.

La implementación de diagnósticos basados en miARN en la rutina clínica también se ha visto obstaculizada por dificultades técnicas. Todavía no se han establecido métodos estandarizados para el aislamiento y la cuantificación de los miARN circulantes. Esta situación dificulta la comparación de estudios llevados a cabo por diferentes laboratorios. Asimismo, las actuales técnicas de detección de miARN no permiten un diagnóstico rápido; tan necesario, por ejemplo, en el caso del infarto agudo de miocardio.

OTROS BIOMARCADORES CIRCULANTES EPIGENÉTICOS DE ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

Los enfoques basados en ARNnc proporcionan nuevas oportunidades para desarrollar nuevos biomarcadores. Durante los últimos años, además de los miARN, son varios los trabajos que proponen el uso de ARNnc de cadena larga circulantes (los mayores de 200 nucleótidos) como biomarcadores sensibles y específicos no solo de enfermedad cardiovascular^{84,85}, sino también de respuesta terapéutica⁸⁶. La aplicación clínica de estas especies está más avanzada en el campo de la oncología, donde se han desarrollado ensayos para la detección del ARNnc de cadena larga PCA3 en orina: un biomarcador altamente específico de cáncer de próstata⁸⁷.

Otros mecanismos epigenéticos, como la metilación del ADN o la modificación de histonas, podrían constituir una potente fuente de biomarcadores circulantes. No obstante, muy pocos estudios han valorado el papel de estos mecanismos epigenéticos como indicadores útiles en la práctica clínica. Cabe destacar que recientemente se ha revisado la asociación entre la metilación del ADN y la presencia de enfermedad cardiovascular⁸⁸. En efecto, la hipometilación de la secuencia LINE-1 en células de sangre periférica o el tejido adiposo visceral está asociada con diabetes, obesidad, valores reducidos de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad y valores elevados de colesterol total e inflamación, incluso independientemente de otros factores de riesgo^{89,90}.

PERSPECTIVAS

No hace más de una década que se describieron los primeros miARN extracelulares. A pesar del relativamente corto intervalo de tiempo que ha transcurrido, hemos sido testigos de una gran evolución en su posible aplicación clínica como biomarcadores. La comunidad científica tiene grandes expectativas en la utilización clínica de los miARN circulantes como herramientas diagnósticas y pronósticas de la enfermedad cardiovascular. El hecho de que puedan detectarse fácilmente mediante la metodología empleada actualmente en los laboratorios clínicos, así como su asociación con la patología cardiovascular (en algunos casos, superior a la observada con indicadores convencionales) sugiere su potencial valor como biomarcadores. Sin embargo, se debe abordar varios aspectos antes de que los miARN se establezcan como nuevas herramientas clínicas. En los próximos años, la replicación de los actuales resultados en estudios independientes, multicéntricos y con grandes tamaños poblacionales constituirá un paso clave para dilucidar la aplicabilidad clínica real de los miARN circulantes.

FINANCIACIÓN

El presente trabajo ha recibido ayudas del Instituto de Salud Carlos III, cofinanciado con fondos FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional) (V. Llorente-Cortés: FIS PI14/01729), el Instituto de Salud Carlos III (CIBER Cardiovascular: CB16/11/00403), la Fundació La Marató de TV3 (V. Llorente-Cortés: 201521-10) y el Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad (E. Iglesias-Gutiérrez: DEP2012-39262). D. de

Gonzalo-Calvo tiene un contrato Sara Borrell (CD14/00109) del Instituto de Salud Carlos III. D. de Gonzalo-Calvo y V. Llorente-Cortés son miembros de la red europea Cardiolinc.

CONFLICTO DE INTERESES

Ninguno.

BIBLIOGRAFÍA

- Pennisi E. Genomics. ENCODE project writes eulogy for junk DNA. *Science*. 2012;337:1159-1161.
- Kaudewitz D, Zampetaki A, Mayr M. MicroRNA biomarkers for coronary artery disease? *Curr Atheroscler Rep*. 2015;17:70.
- Mayr M, Zampetaki A, Willeit P, Willeit J, Kiechl S. MicroRNAs within the continuum of postgenomics biomarker discovery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33:206-214.
- Liu G, Mattick JS, Taft RJ. A meta-analysis of the genomic and transcriptomic composition of complex life. *Cell Cycle*. 2013;12:2061-2072.
- Shabalina SA, Spiridonov NA. The mammalian transcriptome and the function of non-coding DNA sequences. *Genome Biol*. 2004;5:105.
- 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.
- Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993;75:855-862.
- Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000;408:86-89.
- Van Empel VP, De Windt LJ, Da Costa Martins PA. Circulating miRNAs: reflecting or affecting cardiovascular disease? *Curr Hypertens Rep*. 2012;14:498-509.
- Mendell JT, Olson EN. MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell*. 2012;148:1172-1187.
- Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2014;42:D68-D73.
- Backes C, Meder B, Hart M, et al. Prioritizing and selecting likely novel miRNAs from NGS data. *Nucleic Acids Res*. 2016;44:e53.
- Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009;19:92-105.
- Kamm RC, Smith AG. Nucleic acid concentrations in normal human plasma. *Clin Chem*. 1972;18:519-522.
- Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007;9:654-659.
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:10513-10518.
- Weber JA, Baxter DH, Zhang S, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*. 2010;56:1733-1741.
- Diehl P, Fricke A, Sander L, et al. Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation. *Cardiovasc Res*. 2012;93:633-644.
- Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:5003-5008.
- Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol*. 2011;13:423-433.
- Pigati L, Yaddanapudi SC, Iyengar R, et al. Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. *PLoS One*. 2010;5:e13515.
- De Gonzalo-Calvo D, Cenarro A, Civeira F, Llorente-Cortes V. MicroRNA expression profile in human coronary smooth muscle cell-derived microparticles is a source of biomarkers. *Clin Invest Arterioscler*. 2016;28:167-177.
- Villarroya-Beltri C, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Cabo F, et al. Sumoylated hnRNP2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun*. 2013;4:2980.
- Squadrito ML, Baer C, Burdet F, et al. Endogenous RNAs modulate microRNA sorting to exosomes and transfer to acceptor cells. *Cell Rep*. 2014;8:1432-1446.
- Bang C, Batkai S, Dangwal S, et al. Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest*. 2014;124:2136-2146.
- De Gonzalo-Calvo D, Dávalos A, Montero A, et al. Circulating inflammatory miRNA signature in response to different doses of aerobic exercise. *J Appl Physiol* (1985). 2015;119:124-134.
- Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal*. 2009;2:ra81.
- Hergenreider E, Heydt S, Tréguer K, et al. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nat Cell Biol*. 2012;14:249-256.
- Shan Z, Qin S, Li W, et al. An endocrine genetic signal between blood cells and vascular smooth muscle cells: role of microRNA-223 in smooth muscle function and atherogenesis. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65:2526-2537.
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes *mir15* and *mir16* at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:15524-15529.

31. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet.* 2011;12:861–874.
32. Small EM, Olson EN. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature.* 2011;469:336–342.
33. Boon RA, Dimmeler S. MicroRNAs in myocardial infarction. *Nat Rev Cardiol.* 2015;12:135–142.
34. Schober A, Weber C. Mechanisms of microRNAs in atherosclerosis. *Annu Rev Pathol.* 2016;11:583–616.
35. Thum T. Noncoding RNAs and myocardial fibrosis. *Nat Rev Cardiol.* 2014;11:655–663.
36. Beermann J, Piccoli MT, Viereck J, Thum T. Non-coding RNAs in development and disease: background, mechanisms, and therapeutic approaches. *Physiol Rev.* 2016;96:1297–1325.
37. Condorelli G, Latronico MV, Cavarretta E. MicroRNAs in cardiovascular diseases: current knowledge and the road ahead. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63:2177–2187.
38. Chen JF, Murchison EP, Tang R, et al. Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:2111–2116.
39. Saxena A, Tabin CJ. MiRNA-processing enzyme Dicer is necessary for cardiac outflow tract alignment and chamber septation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:87–91.
40. Amor AJ, Masana L, Soriguer F, et al. Estimating cardiovascular risk in Spain by the European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Rev Esp Cardiol.* 2015;68:417–425.
41. Brotons C, Moral I, Fernandez D, Cuixart L, Soteras A, Puig M. Assessment of the new score on cardiovascular risk charts in patients older than 65 years. *Rev Esp Cardiol.* 2016;69:981–983.
42. Rayner K, Dimmeler S, Calin GA, Thum T, Raizman JE, Diamandis EP. Novel biomarkers for acute myocardial infarction: Is microRNA the new kid on the block? *Clin Chem.* 2014;60:812–817.
43. Kuwabara Y, Ono K, Horie T, et al. Increased microRNA-1 and microRNA-133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage. *Circ Cardiovasc Genet.* 2011;4:446–454.
44. Widera C, Gupta SK, Lorenzen JM, et al. Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary syndrome. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;51:872–875.
45. Eitel I, Adams V, Dieterich P, et al. Relation of circulating microRNA-133a concentrations with myocardial damage and clinical prognosis in ST-elevation myocardial infarction. *Am Heart J.* 2012;164:706–714.
46. Devaux Y, Vausort M, Goretti E, et al. Use of circulating microRNAs to diagnose acute myocardial infarction. *Clin Chem.* 2012;58:559–567.
47. Oerlemans MI, Mosterd A, Dekker MS, et al. Early assessment of acute coronary syndromes in the emergency department: the potential diagnostic value of circulating microRNAs. *EMBO Mol Med.* 2012;4:1176–1185.
48. Olivieri F, Antonicelli R, Lorenzi M, et al. Diagnostic potential of circulating mir-499-5p in elderly patients with acute non ST-elevation myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2013;167:531–536.
49. Zeller T, Keller T, Ojeda F, et al. Assessment of microRNAs in patients with unstable angina pectoris. *Eur Heart J.* 2014;35:2106–2114.
50. Devaux Y, Mueller M, Haaf P, et al. Diagnostic and prognostic value of circulating microRNAs in patients with acute chest pain. *J Intern Med.* 2015;277:260–271.
51. Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, et al. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ Res.* 2010;107:677–684.
52. Gao H, Guddeti RR, Matsuzawa Y, et al. Plasma levels of microRNA-145 are associated with severity of coronary artery disease. *PLoS One.* 2015;10:e0123477.
53. Corsten MF, Dennert R, Jochems S, et al. Circulating microRNA-208b and microRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet.* 2010;3:499–506.
54. Tijssen AJ, Creemers EE, Moerland PD, et al. MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure. *Circ Res.* 2010;106:1035–1039.
55. Goren Y, Kushnir M, Zafir B, Tabak S, Lewis BS, Amir O. Serum levels of microRNAs in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2012;14:147–154.
56. Zampetaki A, Willeit P, Tilling L, et al. Prospective study on circulating microRNAs and risk of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2012;60:290–299.
57. Schulte C, Molz S, Appelbaum S, et al. MiRNA-197 and miRNA-223 predict cardiovascular death in a cohort of patients with symptomatic coronary artery disease. *PLoS One.* 2015;10:e0145930.
58. Karakas M, Schulte C, Appelbaum S, et al. Circulating microRNAs strongly predict cardiovascular death in patients with coronary artery disease—results from the large AtheroGene study. *Eur Heart J.* 2016. <http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehw250>.
59. De Rosa S, Fichtlscherer S, Lehmann R, Assmus B, Dimmeler S, Zeiher AM. Transcoronary concentration gradients of circulating microRNAs. *Circulation.* 2011;124:1936–1944.
60. Cheng C, Wang Q, You W, Chen M, Xia J. MiRNAs as biomarkers of myocardial infarction: a meta-analysis. *PLoS One.* 2014;9:e88566.
61. D'Alessandra Y, Carena MC, Spazzafumo L, et al. Diagnostic potential of plasmatic microRNA signatures in stable and unstable angina. *PLoS One.* 2013;8:e80345.
62. Ren J, Zhang J, Xu N, et al. Signature of circulating microRNAs as potential biomarkers in vulnerable coronary artery disease. *PLoS One.* 2013;8:e80738.
63. Niculescu LS, Simionescu N, Sanda GM, et al. MiR-486 and miR-92a identified in circulating HDL discriminate between stable and vulnerable coronary artery disease patients. *PLoS One.* 2015;10:e0140958.
64. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature.* 2011;473:317–325.
65. Hoefer IE, Steffens S, Ala-Korpela M, et al. Novel methodologies for biomarker discovery in atherosclerosis. *Eur Heart J.* 2015;36:2635–2642.
66. Zhu GF, Yang LX, Guo RW, et al. MicroRNA-155 is inversely associated with severity of coronary stenotic lesions calculated by the Gensini score. *Coron Artery Dis.* 2014;25:304–310.
67. Liu W, Ling S, Sun W, et al. Circulating microRNAs correlated with the level of coronary artery calcification in symptomatic patients. *Sci Rep.* 2015;5:16099.
68. Marfella R, Di Filippo C, Potenza N, et al. Circulating microRNA changes in heart failure patients treated with cardiac resynchronization therapy: responders vs. non-responders. *Eur J Heart Fail.* 2013;15:1277–1288.
69. Bauters C, Kumarwamy R, Holzmann A, et al. Circulating miR-133a and miR-423-5p fail as biomarkers for left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2013;168:1837–1840.
70. Watson CJ, Gupta SK, O'Connell E, et al. MicroRNA signatures differentiate preserved from reduced ejection fraction heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2015;17:405–415.
71. Nair N, Kumar S, Gongora E, Gupta S. Circulating miRNA as novel markers for diastolic dysfunction. *Mol Cell Biochem.* 2013;376:33–40.
72. Cooper JA, Miller GJ, Humphries SE. A comparison of the PROCAM and Framingham point-scoring systems for estimation of individual risk of coronary heart disease in the Second Northwick Park Heart Study. *Atherosclerosis.* 2005;181:93–100.
73. Bye A, Rosjö H, Nauman J, et al. Circulating microRNAs predict future fatal myocardial infarction in healthy individuals – The HUNT study. *J Mol Cell Cardiol.* 2016;97:162–168.
74. Tan KS, Armugam A, Sepramaniam S, et al. Expression profile of microRNAs in young stroke patients. *PLoS One.* 2009;4:e7689.
75. Leung LY, Chan CP, Leung YK, et al. Comparison of miR-124-3p and miR-16 for early diagnosis of hemorrhagic and ischemic stroke. *Clin Chim Acta.* 2014;433:139–144.
76. Kin K, Miyagawa S, Fukushima S, et al. Tissue- and plasma-specific microRNA signatures for atherosclerotic abdominal aortic aneurysm. *J Am Heart Assoc.* 2012;1:e000745.
77. Stather PW, Sylvius N, Wild JB, Choke E, Sayers RD, Bown MJ. Differential microRNA expression profiles in peripheral arterial disease. *Circ Cardiovasc Genet.* 2013;6:490–497.
78. Busch A, Eken SM, Maegdefessel L. Prospective and therapeutic screening value of non-coding RNA as biomarkers in cardiovascular disease. *Ann Transl Med.* 2016;4:236.
79. Schulte C, Karakas M, Zeller T. MicroRNAs in cardiovascular disease – clinical application. *Clin Chem Lab Med.* 2016. <http://dx.doi.org/10.1515/cclm-2016-0576>.
80. Navickas R, Gal D, Laucevičius A, Tapauskaitė A, Zdanytė M, Holvoet P. Identifying circulating microRNAs as biomarkers of cardiovascular disease: A systematic review. *Cardiovasc Res.* 2016;111:322–337.
81. Engelhardt S. Small RNA biomarkers come of age. *J Am Coll Cardiol.* 2012;60:300–303.
82. Fukushima Y, Nakanishi M, Nonogi H, Goto Y, Iwai N. Assessment of plasma miRNAs in congestive heart failure. *Circ J.* 2011;75:336–340.
83. Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, et al. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circ Res.* 2010;107:810–817.
84. De Gonzalo-Calvo D, Kenneweg F, Bang C, et al. Circulating long-non coding RNAs as biomarkers of left ventricular diastolic function and remodelling in patients with well-controlled type 2 diabetes. *Sci Rep.* 2016;6:37354.
85. Kumarwamy R, Bauters C, Volkman I, et al. Circulating long noncoding RNA, LIPCAR, predicts survival in patients with heart failure. *Circ Res.* 2014;114:1569–1575.
86. De Gonzalo-Calvo D, Kenneweg F, Bang C, et al. Circulating long noncoding RNAs in personalized medicine: Response to pioglitazone therapy in type 2 diabetes. *J Am Coll Cardiol.* 2016;68:2914–2916.
87. De Kok JB, Verhaegh GW, Roelofs RW, et al. DD3(PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. *Cancer Res.* 2002;62:2695–2698.
88. Muka T, Koromani F, Portilla E, et al. The role of epigenetic modifications in cardiovascular disease: a systematic review. *Int J Cardiol.* 2016;212:174–183.
89. Martín-Núñez GM, Rubio-Martín E, Cabrera-Mulero R, et al. Type 2 diabetes mellitus in relation to global LINE-1 DNA methylation in peripheral blood: a cohort study. *Epigenetics.* 2014;9:1322–1328.
90. Turcot V, Tchernof A, Deshaies Y, et al. LINE-1 methylation in visceral adipose tissue of severely obese individuals is associated with metabolic syndrome status and related phenotypes. *Clin Epigenetics.* 2012;4:10.