



**Universidad**  
Zaragoza

## Trabajo Fin de Grado

miRNA. Relación entre la Exposición al Tabaco  
en Mujeres Embarazadas y el Retraso del  
Crecimiento Intrauterino.

miRNA. Relationship between Tobacco Exposure in Pregnant  
Women and Intrauterine Growth Retardation.

*Autor/es*

**Alba Quirós Jiménez**

*Director/es*

**Eva Barrio Ollero**

*Facultad / Escuela*

*Medicina*

*Departamento de Anatomía e Histología Humana*

*Año*

*2020*

## **GLOSARIO:**

**ADP-ribosilación:** Adenosín Difosfato Ribosilasa.

**AGO2:** Proteína 2 de la familia de Argonautas.

**BRCA1:** BReast CAncer – cáncer de mama.

**CCG:** Triplete de nucleótidos Citosina – Citosina-Guanina.

**CIR:** Crecimiento Intrauterino Restringido.

**CMV:** Citomegalovirus.

**c-myc:** familia de protooncogen c-myc.

**CYP450 1A1:** citocromo P450, monooxigenasa extrahepática implicada en el metabolismo de elementos endógeno y fármacos.

**DICER:** complejo enzimático citoplasmático de la familia de RNase III (Ribonucleasa III)

**DNA:** Ácido Desoxirribonucleico.

**DNMTs:** DNA metil transferasas; enzimas que transfieren Grupos Metilo al DNA.

**DOHaD:** Hipótesis del Origen y Desarrollo de la Salud y la Enfermedad.

**DROSHA:** complejo enzimático nuclear de la familia de RNase III (Ribonucleasa III)

**DsRBP:** Proteína de Unión al Ácido Ribonucleico de Doble Cadena.

**FGR:** Restricción del crecimiento Fetal. Sinónimo de CIR.

**FMR1:** gen humano que codifica para la proteína de Retraso Mental Frágil o FMRP.

**GH:** Hormona del Crecimiento.

**GTP:** Guanosina Tri Fosfato.

**HATs:** Enzimas histona acetil transferasa. Transfiere grupos acetilo a las histonas.

**HDACs:** Enzimas histona des-acetilasasa. Eliminan grupos acetilo de las histonas.

**HMT:** Histona Metil Transferasa.

**IMC:** Índice de Masa Corporal.

**iRNA:** Ácido Ribonucleico Interferente.

**Islas CpG:** regiones de DNA promotoras constituida por una gran concentración de pares de citosina y guanina unidas por un fosfato (enlace fosfodiester).

**MAPK:** Proteína Quinasa activada por Mitogenos.

**MeDIPseq:** Técnica de Inmunoprecipitación Secuencial del Ácido Desoxi Ribonucleico metilado.

**MBD proteína:** Dominio Protéico de Unión a las regiones hipermetiladas CpG del DNA.

**MiRNA:** Micro Ácido Ribonucleico.

**NcRNA:** Ácido Ribonucleico No Codificante para proteínas.

**O<sub>2</sub>:** Oxígeno.

**piRNA:** Ácido Ribonucleico Interferente Piwi.

**Pre-miRNA:** Pre Micro Ácido Ribonucleico.

**Pri-miRNA:** Pri Micro Ácido Ribonucleico.

**PRL:** Prolactina.

**Ran-GTPasa:** Guanosina Tri Fosfatasa Ran.

**RICS:** Complejo Silenciador Inducido por el Ácido Ribonucleico.

**RNA:** Acido Ribonucleico.

**RNAasa III:** Ribonucleasa endonucleasa clase tres.

**RNAm:** Ácido Ribonucleico Mensajero.

**RNAPII:** Polimerasa dos del Ácido Ribonucleico.

**RNasa-H-like: ribonucleasa similar a H**

**RNAse III:** Ribonucleasa Endonucleasa clase tres. Cataliza la hidrólisis del RNA en fragmentos más pequeños.

**SAPK:** Proteína Quinasa Activadora de Estrés.

**SERM:** Modulador Selectivo de Receptores Estrogénicos.

**siRNA:** Ácido Ribonucleico Interferente Pequeño.

**TARGET:** Diana.

**VEGF:** Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

**XPO:** Proteína Transportadora Exportina.

# ÍNDICE:

1. RESUMEN .....	4
2. INTRODUCCIÓN .....	5
2.1. EPIGENÉTICA .....	5
2.1.1. Definición .....	5
2.1.2. Mecanismos epigenéticos .....	5
2.1.3. Factores externos y epigenética.....	8
2.2. miRNA .....	10
2.2.1. Definición .....	10
2.2.2. Síntesis y maduración de los miRNA .....	11
2.2.3. Peculiaridades en la síntesis de los miRNA .....	14
2.2.4. Implicaciones clínicas y patogénicas de los miRNA.....	15
2.3. CRECIMIENTO INTRAUTERINO RESTRINGIDO, TABACO Y miRNAs .....	17
2.3.1. Definición de crecimiento intrauterino.....	18
2.3.2. Etiología, factores de riesgo en el CIR .....	18
2.3.3. CIR y miRNAs .....	19
3. OBJETIVO INVESTIGACIÓN .....	20
4. MATERIAL Y MÉTODOS .....	21
4.1. TIPO DE ESTUDIO: .....	21
4.2. CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO: .....	21
4.3. PROCEDIMIENTO Y METODOLOGÍA:.....	23
4.4. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS: .....	24
5. RESULTADOS .....	25
6. DISCUSIÓN .....	29
7. CONCLUSIONES.....	33
8. BIBLIOGRAFÍA .....	35
9. ANEXOS .....	38
9.1. ANEXO 1: Búsqueda en miRBase. ....	38
9.2. ANEXO 2: Búsqueda en mirRDB.....	41

## 1. RESUMEN

**Introducción:** la epigenética se define como los cambios que se producen en el DNA y las histonas que tiene como consecuencia la alteración de la expresión génica sin alterar la secuencia de nucleótidos. En la última década esto ha adquirido una mayor importancia tras el desarrollo de la teoría del silenciamiento génico inducido por los iRNA. Entre ellos destacan los miRNA, fragmentos de RNA bicatenario que se unen al mRNA por complementariedad de bases inhibiendo la traducción a proteínas. La expresión aberrante de los mismos y las modificaciones epigenéticas que se producen pueden deberse a cambios ambientales o a tóxicos tales como el tabaco. El resultado del silenciamiento génico inducido por los miRNAs está involucrado en numerosas patologías, entre ellas, el CIR. **Objetivo:** estudiar el impacto del tabaquismo en la regulación epigenética durante el desarrollo embrionario, su implicación en el retraso del crecimiento intrauterino y la aparición de enfermedades en la edad adulta, a través del estudio de los miRNAs hipermetilados. **Material y métodos:** estudio observacional longitudinal de las alteraciones epigenéticas y la expresión alterada de los miRNAs en niños nacidos con CIR de madres fumadoras durante el primer trimestre de embarazo. **Resultados y Discusión:** Tras el análisis de los resultados obtenidos en la muestra podemos concluir que existe una relación causal entre las modificaciones epigenéticas que se producen como consecuencia de la exposición al tabaco y el desarrollo de CIR, habiendo encontrado alteración en la expresión de factores imprescindibles para la angiogénesis placentaria, como VEGF y PGF y para el adecuado crecimiento prenatal, como IGF1.

**Palabras clave:** epigenética, histonas, miRNA, silenciamiento génico, tabaco, Retraso del Crecimiento Intrauterino Restringido, VEGF, PGF, IGF1

### Abstract:

**Introduction:** Epigenetics is known as the changes that take place in the DNA and the histones resulting in the alteration of gene expression without changing the nucleotide sequence. In the last decade it has gained more and more importance after the development of the iRNA gene silencing theory. Among them highlight miRNA short sequences of double-stranded RNA that join to mRNA by complementarities of bases, and by doing this they inhibit the translation into proteins. The aberrant expression of this miRNAs and the epigenetic modifications taking place could be based in environmental changes and different toxic substances, such as tobacco. The result of the miRNA-induced gene silencing is involved in several pathologies, including IUGR. **Objective:** To analyze the tobacco impact in the epigenetic regulation during the embryonic development, and its involvement in intrauterine growth restriction and in the appearance of various diseases during adulthood, through the study of abnormally expressed miRNAs methylation. **Materials and methodology:** Longitudinal observational study of the epigenetic alterations and the altered expression of miRNAs in children born with IUGR to mothers who smoked during the first term of pregnancy. **Results and discussion:** After analysing of the results obtained in the sample we can conclude that there is a causal relationship between epigenetic modifications that occur as a consequence of tobacco exposure y development of IGUR, having founded alteration in the expression of essential factors for placental angiogenesis, such as VEGF and PGF and for the proper pre-natal growth, such as IGF1.

**Key Words:** epigenetics, histones, miRNA, gene silencing, tobacco, intrauterine growth restriction, VEGF, PGF, IGF1.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. EPIGENÉTICA

#### 2.1.1. Definición

La primera definición del término Epigenética “*por encima de los genes*” fue descrito en 1950 por Conrad H. Waddington (1) con el fin de estudiar por qué los organismos multicelulares podían desarrollar diferentes tejidos partiendo de la base de que todas las células del organismo presentaban la misma información genética. Conrad desarrolló el concepto de “paisaje epigenético” para intentar explicar y hacer una comparativa entre las diferentes marcas epigenéticas que se presentaban en mayor concentración “cimas” en el genoma, con respecto a las zonas de muy baja concentración de las mismas “valle”. Comenzó por lo tanto a desarrollarse los estudios acerca de la expresión génica en los diferentes tejidos de estos organismos (1,2).

Hoy día la Epigenética hace referencia a los cambios producidos en el DNA y sus histonas (proteínas asociadas) que provocan cambios en la expresión de los genes sin alterar la secuencia de nucleótidos, es decir, sin alterar la secuencia de DNA. Provocan cambios en la conformación y condensación de la cromatina, alterándose la expresión génica y por lo tanto el fenotipo (2, 3, 4). Estos cambios producidos son heredados de una generación a la siguiente y reversibles. (5).

La herencia de las modificaciones epigenéticas podría ser la explicación de la posible transmisión de las influencias medioambientales de padres a hijos.

Estas alteraciones epigenéticas, a excepción de la metilación del DNA, están presente solamente en los organismos eucariotas superiores (4).

#### 2.1.2. Mecanismos epigenéticos

Estos cambios en la expresión de los genes sin alterar la secuencia de DNA se consiguen gracias a través de los siguientes mecanismos:

##### 1. Metilación de las bases de citosina del DNA.

La metilación del DNA es uno de los principales mecanismos implicados en la regulación de la expresión génica. Los patrones de metilación en condiciones normales son específicos de cada tejido del organismo, y por lo tanto de cada especie y son heredables, pero durante el desarrollo embrionario (a partir de la octava división celular) sufren nuevos procesos de metilación. Estos nuevos procesos también pueden aparecer en las células somáticas de los adultos (2)

Las principales regulaciones comprendidas por el proceso de metilación son:

1. Silenciamiento de genes en el crecimiento y desarrollo celular normal.
2. Inactivación de cromosoma X en las mujeres.
3. Impronta genética, en la que el proceso de hipermetilación de uno de los dos alelos del gen provoca la expresión monoalélica (5).

La metilación en el ser humano (y restos de vertebrados) es llevada a cabo por DNA metiltransferasas (DNMTs), enzimas presentes en la Citosina de los dinucleótidos “islas” CpG (regiones del DNA constituidas por pares de bases citosina y guanina unidas por enlace fosfodiéster) que introducen grupos metilos en el carbono 5 (C5) de las bases nitrogenadas de citosina (3,4). En las células somáticas de nuestro organismo, las 5 metil citosinas suponen el 1%

del total de bases que conforman el DNA (2). En los últimos estudios realizados también se han descrito procesos de hipermetilación en regiones no – CpG (5).

Estas secuencias dinucleótido están cercanas a las regiones promotoras de inicio de la transcripción provocando por lo tanto que no se produzca (no transcripción – no producción de proteínas – no expresión génica). Esto se debe a que las bases de citosina metiladas provocan una mayor compactación de la cromatina, que no se transcribe, inactivando a los genes (3, 4, 6). Por lo tanto se puede establecer una relación inversamente proporcional entre la metilación del DNA y la expresión génica (2).

Esta alteración en la transcripción es explicada a través de dos mecanismos. El primero hace referencia a que existen factores de transcripción cuyo lugar de unión y reconocimiento son tripletes de CpG bloqueando de forma directa el proceso. El otro mecanismo se produce por inhibición indirecta llevada a cabo por complejos de proteínas con dominios de unión a CpG metilados (MBD proteína) que bloquean la unión de factores de transcripción (5).

Esta metilación puede estar sujeta a cambios inducidos por el medioambiente o factores externos tóxicos tales como el tabaco (objetivo de estudio), la desnutrición o la contaminación (3, 4, 6).

La metilación es necesaria para el correcto funcionamiento y desarrollo del ser humano, y para la protección de la integridad de los cromosomas, evitando la inestabilidad en los mismos, la cual supondría un mayor riesgo para el desarrollo de mutaciones irreversibles (5). Sin embargo, alteraciones en los patrones normales de metilación están implicados en el desarrollo de enfermedades, sobre todo, relacionadas con la patogenia de los procesos tumorales, a través de cambios en la metilación de genes supresores de tumores, oncogenes y genes que provocan inestabilidad del DNA (2).

## **2. Modificaciones postraduccionales de las Histonas alterando la conformación de la cromatina.**

Las histonas son proteínas cuya carga es básica y se encuentran unidas al DNA, en unidades llamadas nucleosomas, formando la cromatina. El nucleosoma está formado por un octámero de histonas rodeadas de 147 pares de bases de DNA (1, 4). Existen diferentes familias de histonas H1 (histona de unión, que no forma parte del nucleosoma pero une el DNA que separa dos complejos de histonas) y H2A, H2B, H3 y H4 (que forman parte del nucleosoma) (5).

La función de estas proteínas asociadas al DNA radica tanto en su protección y condensación, como en la regulación de la expresión génica, por lo que alteraciones en la secuencia de estas provocarán cambios en la expresión génica (4). Estas proteínas asociadas al DNA intervienen, además de procesos como la transcripción y condensación, en procesos imprescindibles tales como la reparación del DNA, la replicación o el splicing (5).

Estas alteraciones se producen a través de diferentes mecanismos como metilación, acetilación, fosforilación, ubiquitinación, sumoilación y ADP-ribosilación, mediante enlaces covalentes con el extremo amino-terminal de las histonas o por alteraciones internas, menos frecuente. La metilación se produce sobre bases de lisina y arginina, la acetilación, ubiquitinación y sumoilación sobre bases de lisinas, y la fosforilación oxidativa sobre serina y treonina (1, 4).

La importancia radica en que las histonas y su unión al DNA conforman la cromatina se encargan de la regulación estricta de los sitios de unión del DNA de las proteínas reguladoras de forma que, los fragmentos más compactados (heterocromatina) no permiten la unión a los factores de transcripción ni RNA transferasa por lo que no permite la transcripción ni expresión génica. Sin embargo, la acetilación de estas histonas, llevada a cabo por la histona-acetiltransferasa – HATs, permiten una descompactación (eucromatina) en el lugar de la acetilación permitiendo la unión a los elementos promotores de la transcripción, traduciéndose en síntesis de proteínas y expresión génica. Por otro lado, y de forma inversa, las zonas de DNA asociadas a histona deacetilasas (HDACs) tendrán una menor tasa de transcripción, debido a una mayor compactación de la cromatina. Otras enzimas relacionadas con las alteraciones postraduccionales de las histonas son las metiltransferasas (HMT), quinasas (MAPK y SAPK) (1, 4).

### 3. Intervención de secuencias de pequeños RNA no codificantes.

No todos los fragmentos de DNA codifican RNAs y proteínas. Un porcentaje de genes (aproximadamente unos 5000 conocidos) no codifican proteínas. Son los conocidos como RNA de interferencia. Existen tres tipos de RNA interferencia: siRNA (*small interfering RNA*), miRNA (*micro-RNA*) y piRNA (*Piwi-interacting RNAs*).

Los miRNA son los más conocidos. Se han descritos aproximadamente unos 1300, constituidos por una doble hebra de 22 nucleótidos aproximadamente. Estos miRNAs se unen por complementariedad a RNA mensajeros impidiendo la traducción y síntesis proteica de los mismos. (4).

Los miRNA intervienen tanto en el proceso de transcripción como en el de post-transcripción induciendo el silenciamiento génico (1). Funcionan como reguladores internos de una gran cantidad de genes, destacando entre ellos los retotransposones imprescindibles para la estabilidad del DNA o la regulación de los procesos tales como crecimiento y diferenciación celular (7).

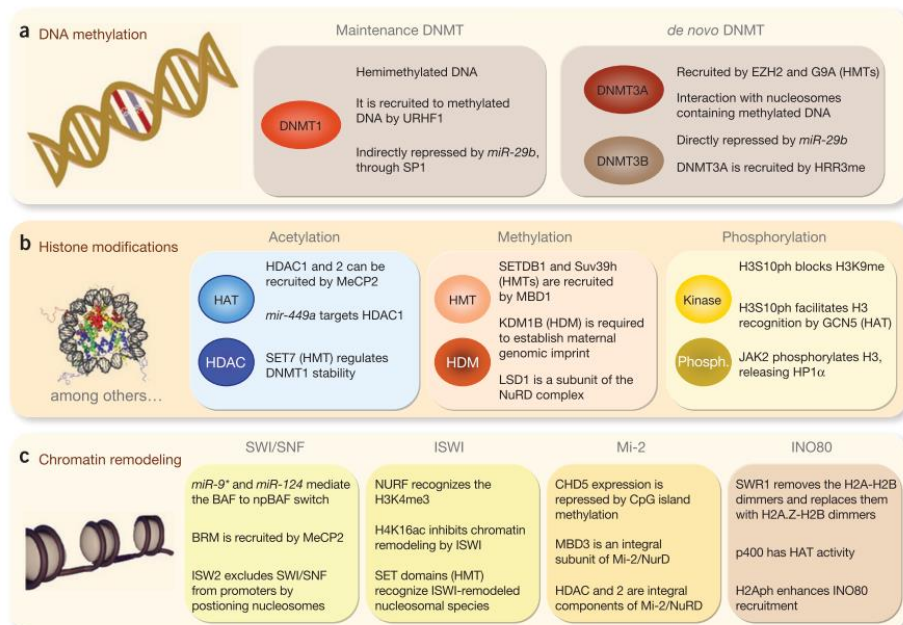


Figura 1: Principales mecanismos epigenéticos. Imagen extraída de: Portela A. y Esteller M. Review Epigenetic modifications and human disease. Nat Publ Gr. 2010; 28(10).(5).



El silenciamiento génico inducido por los miRNAs, y la alteración en la regulación de los mismos ha adquirido una gran importancia en el proceso de inicio y progresión de las neoplasias, sobre todo si esta expresión aberrante ocurre sobre oncogenes, o una disminución de la expresión sobre genes supresores de tumores. La implicación de los mismos no solo se relaciona con el desarrollo de los tumores, si no con su capacidad de crecimiento, invasión o diseminación metastásica, estableciéndose relación con el cáncer de pulmón, gastrointestinal, neuroblastoma o meduloblastoma entre otros (7).

### 2.1.3. Factores externos y epigenética.

Son múltiples los factores externos, tanto medioambientales, como tóxicos o hábitos que provocan modificaciones epigenéticas que alteran la expresión de nuestros genes. Entre ellos, los más clásicamente estudiados y que más se relacionan con estos cambios destacan los siguientes:

#### 1. Dieta

Nuestra alimentación diaria tiene mayor importancia, en cuanto a la expresión de nuestros genes se refiere, de la que nos cabría imaginar. Se ha demostrado que la calidad de la dieta ingerida durante la gestación y la lactancia, así como el peso al nacer, son determinantes no solo para el crecimiento y desarrollo de los niños, si no por el riesgo del desarrollo a lo largo de la vida de enfermedades relacionadas tales como diabetes mellitus tipo dos o hipertensión arterial, además de un riesgo aumentado a sufrir eventos cardiovasculares. Esto es debido a que el factor dieta influye y está muy implicado en el desarrollo de alteraciones epigenéticas que conducen a una mayor predisposición al desarrollo de estas enfermedades (4).

Así se ha determinado que dietas bajas en proteínas producen cambios en el patrón de metilación de determinados genes, y está involucrado en cambios en los miRNA, por ejemplo.

Con respecto a los miRNAs, el etanol regula el 1% de los mismos a nivel hepático. El exceso de etanol puede provocar aumentos de estos fragmentos de miRNA involucrado con diversas patologías. Por ejemplo la expresión del miRNA-127, inducida por el etanol, está relacionado con la acumulación de grasa hepática (4).

#### 2. Hábitos tóxicos y estilo de vida

##### 2.1 Tabaco:

La exposición fetal al humo del tabaco durante el embarazo, así como durante el desarrollo prenatal, está asociado a una gran cantidad de eventos y patologías conocidas como el aborto, el nacimiento pre término, el bajo peso al nacer o enfermedades en la vida adulta tales como asma o ciertos tumores.

La epigenética tiene una gran importancia en este aspecto, ya que el humo del tabaco durante la gestación se asocia a un aumento de la metilación del DNA y alteración de la expresión de los miRNAs.

Las alteraciones en la metilación provocan cambios en el CYP1A1 (citocromo P450 1A) placentario que en condiciones normales codifica proteínas encargadas, entre otros aspectos, del metabolismo de productos cancerígenos presentes en el cigarro. Estas metilaciones provocan polimorfismos del CYP1A1 que involucran un riesgo aumentado al desarrollo de cáncer de pulmón. (4).

## 2.2 Privación del sueño:

Las modificaciones del ritmo circadiano y del sueño producen alteraciones en la expresión de numerosos genes, entre los que destacan algunos encargados de la remodelación de la cromatina.

El gen que traduce a la proteína CLOCK, encargada de la regulación del ciclo circadiano presenta actividad acetiltransferasa (HAC) de histonas. Su alteración provoca cambios en el ritmo circadiano y en el metabolismo provocando una mayor predisposición al desarrollo de enfermedades como el trastorno bipolar ([4](#), [8](#), [9](#)).

## 2.3 Ejercicio físico:

El ejercicio físico produce cambios epigenéticos, alterando el patrón de metilación de DNA y alterando la expresión génica en tejidos relacionados como el adiposo y muscular. Así encontramos alteraciones en la metilación de un número elevado de genes relacionados con la obesidad y la diabetes mellitus tipo dos en personas sedentarias, lo cual expone la importancia de la epigenética en la fisiopatología de las enfermedades ([4](#)).

## 3. Medio Ambiente

El medio ambiente también es considerado un factor que influye en el desarrollo de alteraciones epigenética, destacando la contaminación y polución. Las principales alteraciones encontradas en el DNA son el aumento de las metilaciones.

Destacando el asma, enfermedad de origen multifactorial, en la que el factor heredado de atopia ha de sumarse a condiciones ambientales para el desarrollo de la enfermedad. Aquí entra en juego la epigenética, ya que en la patogenia de la enfermedad se ha objetivado un aumento de la metilación del DNA en el factor de transcripción con dominio "forkhead" - FOXP3 - que actúa directamente sobre los linfocitos CD4 reguladores y que codifica para la proteína escurfina, cuya deficiencia o alteración está altamente relacionada con el desarrollo de asma inducido por alérgenos aéreos, así como otros trastornos autoinmunes y linfoproliferativos. ([4,10](#)).

## 4. Cáncer

Mucho de los estudios de epigenética están enfocados a la relación de ésta con la fisiopatología de una gran cantidad de tumores ([4](#)).

La metilación, en condiciones normales, está relacionada con la regulación del crecimiento y diferenciación celular normal. Cuando esta metilación se altera, se puede producir un crecimiento acelerado que puede ser causa de desarrollo de tumores ([1](#)).

Se han descrito alteraciones en todos los mecanismos epigenéticos en la génesis tumoral, desde la metilación del DNA y la alteración de la conformación de la cromatina, hasta las alteraciones en la regulación de los miRNA, que se traducen principalmente en alteraciones en los oncogenes, silenciamiento de los genes supresores de tumores o de los genes encargados de la reparación del DNA ([1, 4](#)).

La epigenética no solo afecta a la cascada de desarrollo tumoral, sino que también se ha relacionado con su capacidad de crecimiento, invasión y extensión tumoral.

Entre ellos destacan las alteraciones en los receptores hormonales de tumores hormono-dependientes como el cáncer de mama, ovario, endometrio o próstata, donde se ha demostrado que existe hipermetilación de los receptores de estrógeno, progesterona y andrógenos que suponen una resistencia al tratamiento con bloqueo hormonal.

Otro ejemplo de la importancia de la epigenética se encuentra en la patogenia de adenomas hipofisarios. Existen numerosas alteraciones que dan lugar a un riesgo aumentado de desarrollar estos tumores, destacando el silenciamiento de genes supresores de tumores por hipermetilación del DNA y de forma complementaria, la hipometilación y acetilación de histonas en oncogenes. Es tal la implicación, que cada tipo de adenoma se correlaciona con una alteración epigenética específica, concretamente con un miRNA determinado. De forma que adenomas productores de GH y PRL se correlacionan con miRNA-23a, miRNA-23b y miRNA-24-2, que a su vez están disminuidos en los adenomas productores de ACTH. Sin embargo, en estos adenomas existe un aumento de los miRNA-30.

Estas alteraciones epigenéticas no sólo son útiles para conocer el desarrollo de tumores, si no que abren una vía al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas diana de estas alteraciones lo que permitiría tratar estos tumores desde la base molecular de los mismos de forma mucho más precoz.

Por otro lado la presencia aumentada de los miRNA en sangre podrían ser empleados para el diagnóstico precoz de los tumores específicos con los que se relacionan (4).

## 5. Fármacos

El estudio de las alteraciones epigenéticas brindan la oportunidad de desarrollar dianas terapéuticas, pero, sin embargo, debemos tener en cuenta que los fármacos comunes que utilizamos también pueden provocar alteraciones epigenéticas.

Esto ocurre con el tamoxifeno, modulador selectivo de los receptores estrogénicos (SERM), provoca hipermetilación en los genes responsables alterando la respuesta a los estrógenos, disminuyendo su eficacia terapéutica (4).

## 2.2. miRNA

### 2.2.1. Definición

Los miRNA son fragmentos de RNA bicatenario de pequeña longitud de aproximadamente 22 nucleótidos (21-25 nucleótidos). Descritos por primera vez en 1993 en *Caenorhabditis elegans* (nematodo de la familia *Rhabditidae*, pero no comenzó a desarrollarse ni investigarse hasta el descubrimiento de los RNA interference (RNAi) en 1998 (11). Actualmente sabemos que se expresan en la mayoría de las células eucariotas (12).

Existen tres tipos de RNA interferentes: siRNA, piRNA y **miRNA**, este último **objetivo de nuestro estudio**. Forman parte de los conocidos, y cada vez más estudiados, RNA no codificantes (ncRNA, fragmentos de RNA que no codifican para proteínas). Su función principal es la regulación de la expresión génica (13)

Son cadenas bicatenarias complementarias a una secuencia de RNA mensajero, a la cual se unen inhibiendo su expresión (13), por el mecanismo conocido como ribointerferencia o interferencia del RNA (iRNA). La inhibición de la traducción provoca la alteración en la síntesis proteica, y por lo tanto en la expresión génica (12).

Son codificados de forma genérica como miRNA + número (por ejemplo, miRNA-155), lo que permite su clasificación. Cada uno de ellos está implicado en el silenciamiento del fragmento de RNA mensajero del que son complementario. (13).

### 2.2.2. Síntesis y maduración de los miRNA

La biogénesis de los miRNA es de gran complejidad. En primer lugar, y para lograr entender cómo se forman y cuál es su mecanismo de acción debemos conocer su origen. Actualmente se han descrito entre 1100 y 1800 genes que codifican para miRNA en humanos y ratones, pero se sabe actualmente que no son específicos de estos, si no que están presentes en numerosas especies. Es por ello que además de su complejidad en la formación, que deriven de números genes hace más complejo su estudio, y además implica la importancia de los mismos en numerosos procesos tanto fisiológicos como control del ciclo y división celular y el crecimiento y diferenciación de los tejidos, así como patológicos, destacando el cáncer y las enfermedades neurológicas (12). El proceso fundamental por el que actúan es a través de la vía de silenciamiento génica (11).

La biogénesis de los miRNA consta de numerosos procesos llevados a cabo tanto en el núcleo como en el citoplasma y donde intervienen numerosas enzimas y elementos que pueden considerarse diana para el estudio de los mismos. A continuación, se detalla la ruta de síntesis que comienza en el núcleo celular y que podemos dividir en los siguientes pasos enumerados a continuación:

#### 1) Transcripción de los genes codificantes para miRNA:

El primer paso en la síntesis de los mismos es la transcripción del gen miRNA del que procede. Esta transcripción es llevada a cabo en el interior del núcleo por una RNA polimerasa II (RNAPII) (14) que da lugar al desarrollo de un transcrito primario y largo miRNA denominado pri-miRNA bicatenario, conformado en sus extremos por una caperuza en 5' y un complejo de poly-Adenina (poly-A) en 3' que forman una horquilla. La formación de la horquilla explica cómo los genes miRNA tienen mayor longitud que los fragmentos miRNA que codifican (11, 12).

#### 2) Acción de DROSHA/DGCR8 sobre el pri-miRNA:

DROSHA y DGCR8 constituyen un complejo microprocesador intranuclear imprescindible en el proceso de maduración de los miRNA y por lo tanto en su biogénesis (14, 15). Este complejo está constituido por una Ribonucleasa III intranuclear, DROSHA, y una proteína de doble cadena (RBP) de unión al RNA, DGCR8 (Síndrome DiGeorge en la región crítica del gen 8), junto con la asociación de diferentes proteínas (13, 14).

DROSHA es una Ribonucleasa Endonucleasa clase tres (RNase III), cuyo gen se encuentra ubicado en el brazo largo del cromosoma cinco (5p13.3). Conformada por dos dominios principales, uno de unión a la horquilla de pri-miRNA y otro de dominio de unión a su cofactor DGCR8, el cuál le aporta la estabilidad. DROSHA conforma la unidad catalítica del microprocesador (14). Por otro lado DGCR8 (solo conocido en vertebrados (16)) interactúa con DROSHA a través de su dominio C-terminal y actúa como proteína de unión (dsRBP) a la doble cadena de RNA (12, 17) indicando el lugar del corte. El microprocesador DROSHA-DGCR8 procesa las horquillas de los fragmentos de pri-miRNA, dando lugar al pre-miRNA conformando por 70 nucleótidos que es exportado al exterior del núcleo por la exportina cinco, proteína de transporte (17).

La presencia de DROSHA, necesaria para continuar la cadena de síntesis, tiene gran importancia, ya que esta enzima no es necesaria para la síntesis de los siRNA (endosirRNAs) pero sin embargo estos sí que requieren de la presencia de DICER (15). Este hecho le confiere al complejo DROSHA la importancia a la hora de la síntesis de los miRNA y por ello ha sido tan estudiada.

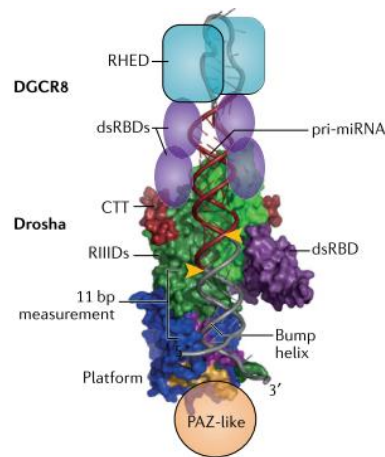


Figura 2: Estructura molecular del microprocesador DROSHA/DGCR8. Imagen extraída de: Treiber T, Treiber N., Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019; 20(1): 5–20 [\(12\)](#).

### 3) Acción Exportina 5 (XPO-5):

La exportina 5 es un receptor de exportación encargado del transporte del pre-miRNA, formado en el núcleo, al citoplasma celular. [\(11, 12, 18\)](#).

XPO-5 es una proteína dependiente de RAS guanosina-tri-fosfatasa (Ran-GTPasa) [\(19\)](#) que se une de forma preferente a los fragmentos cuyo extremo 3' presentan una horquilla de un mínimo de 5 nucleótidos, y base de más de 15 nucleótidos, estructura principal de la mayoría de los pre-miRNAs. El transporte al citoplasma lo realiza por la hidrólisis de una molécula de GTP (guanosa trifosfato) [\(16, 18, 20\)](#).

Además de la función de transporte descrita, la proteína exportina 5 también se encarga de estabilizar al miRNA no maduro (pre-miRNA) para evitar que sea degradado por exonucleasas [\(20, 21\)](#).

Aunque su estudio no ha sido tan extenso como los realizados sobre el microprocesador DROSHA/DGCR8, se sabe que la regulación de esta proteína es paso importante en el proceso de oncogénesis mediada por los miRNA. Esto puede ser explicado porque esta proteína es necesaria para el transporte de los pre-miRNA y su saturación, por la expresión de horquillas cortas en los pre-miRNA, provocaría la acumulación de estos últimos en el núcleo celular, y por consiguiente causar citotoxicidad y muerte celular [\(15, 18, 20\)](#).

Por otro lado, la disminución de la expresión de XPO-5 provocaría una reducción de la síntesis de pre-miRNAs. A su vez, mutaciones que inactivan el gen que traduce a XPO-5, o que provocan truncamientos en el mismo, también reduce el número de miRNAs maduros lo cual también ha sido observado en numerosos estudios de diferentes tipos de tumores, sobre todo si estas mutaciones se producen en genes supresores de la oncogénesis [\(20, 21\)](#)

### 4) DICER

El último eslabón en el proceso de maduración y síntesis de los miRNA se realiza en el citoplasma por el complejo enzimático DICER miembro de la familia RNAasa III similar a DROSHA.

Esta enzima está constituida por un dominio ATPasa/RNA helicasa en su extremo N-terminal, dos dominios RNAasa III (RIIIa y RIIIb) que presentan la acción principal de la enzima, un dominio denominado PAZ (similar en función a DGCR8) que reconoce los nucleótidos del

extremo 3' hidroxilo de los pre-miRNA a los que se une y un dominio de unión a la doble cadena de RNA (dsRBD) en el extremo C terminal. Se ha descrito la presencia de otro dominio denominado DUF283 cuya función aún se desconoce ([12](#), [16](#)).

DICER escinde el tallo asa del pre-miRNA de la siguiente forma: extremo hidroxilo 3' de la doble cadena pre-miRNA se anclan al dominio PAZ del complejo enzimático de DICER, mientras que el dominio de unión a la doble cadena de RNA, dsRBD, desplaza la cadena hacia el dominio catalítico DICER y fija el lugar de corte del precursor pre-miRNA a una distancia de 22 nucleótidos, permitiendo el corte de la hebra descendente del extremo 3' a 5', mediado por la RNAasa IIIa ([15](#)). La unión del extremo 3' al dominio PAZ, junto a DICER conforma una estructura espacial en L que permite el corte. Por otro lado, el extremo 5' fosfato se une al dominio helicasa, en el otro extremo, permitiendo la escisión en sentido ascendente 5' a 3' mediado por la RNAasa IIIb ([12](#), [16](#)). El producto final da lugar a dos cadenas complementarias cortas que constituyen el miRNA maduro de 22 nucleótidos ([16](#)).

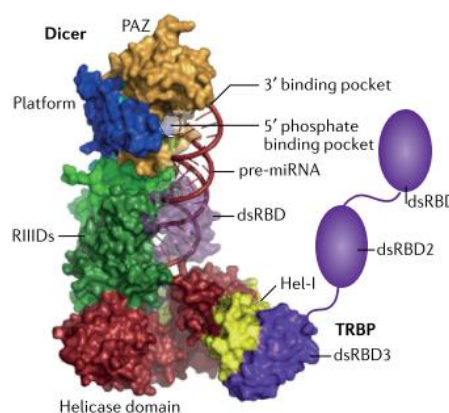


Figura 3: Estructura Molecular de DICER. Imagen extraída de: Treiber T, Treiber N., Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. Nat Rev Mol Cell Biol. 2019; 20(1): 5–20 ([12](#)).

## 5) AGO y RICS

Los miRNA maduros formados inducen al silenciamiento génico a través de su interacción con el complejo silenciador inducido por el RNA (RICS) ([12](#)).

De las dos hebras de miRNA complementarias obtenidas en el proceso descrito, solo será integrada en RISC la hebra antisentido denominada “hebra guía” ([16](#)). Esta es seleccionada por la Argonauta 2, proteína de la familia Argonauta (*Argonaute*), descritas por primera vez en el pulpo *Argonauta argo* de ahí su nombre. Se han descrito cuatro tipos diferentes de proteínas en los humanos, AGO 1-4 ([22](#)), pero es AGO2 la relacionada con RICS y los miRNA.

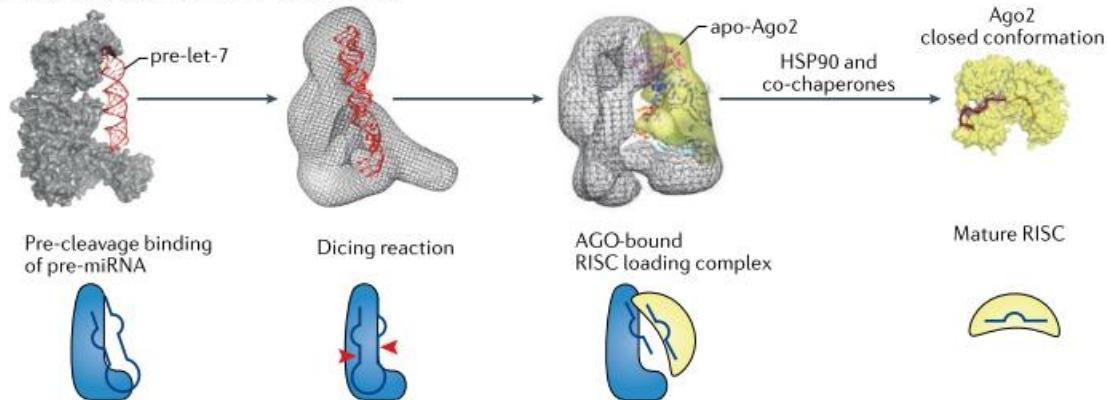
AGO2 es una RNAsa endonucleasa que constituye la unidad catalítica del complejo enzimático RISC. La unión de esta a la cadena antisentido, “hebra guía” se produce según la estabilidad de su extremo 5'. La otra hebra, “hebra sentido” o “hebra pasajera” es degradada por el complejo RISC una vez activado. ([19,20](#)).

Independientemente de su actividad endonucleasa, AGO también tiene la función de estabilizar a los miRNA maduros mediante su unión directa y su regulación postranscripcional ([16](#)).

La hebra guía monocatenaria de miRNA unida a AGO (complejo AGO-miRNA), se dirige al RNA mensajero (mRNA) complementario a la secuencia de miRNA formado y se une a él por el extremo 3' de la secuencia no traducida (UTR) escindiendo las colas de poliadenina A (poly(A)) desestabilizándolo e inhibiendo por lo tanto la traducción a proteínas. De esta forma se produce

el silenciamiento génico. El fragmento de nucleótidos de la posición 2 a 7 del miRNA es conocido como secuencia “semilla” ya que es imprescindible para el reconocimiento de los mismos y su

**d RNA binding by Dicer and RISC loading**



unión al mRNA complementario (11).

Figura 4: Transición conformacional de DICER durante la escisión y la unión de AGO. Imagen extraída de: Treiber T, Treiber N., Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. Nat Rev Mol Cell Biol. 2019; 20(1): 5–20 (12).

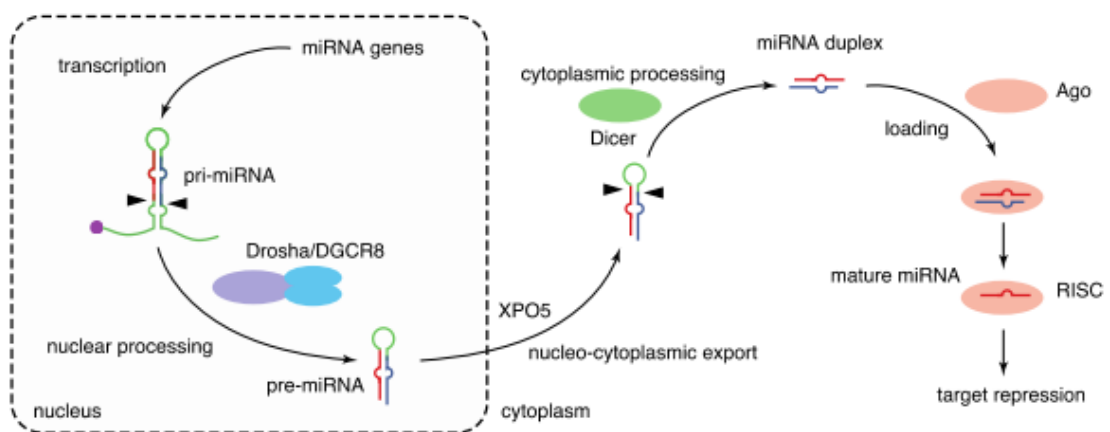


Figura 5: Proceso de formación y maduración de los miRNAs canónica. Imagen extraída de: Matsuyama H, Suzuki HI. Systems and synthetic microRNA biology: From biogenesis to disease pathogenesis. Int J Mol Sci. 2020; 21(1): 1–23. (11).

**2.2.3. Peculiaridades en la síntesis de los miRNA**

Todo lo anteriormente descrito hace referencia a la biogénesis de los miRNA conocidos como canónicos. Estos fueron los primeros descritos y cuya formación, maduración y síntesis es común. Sin embargo, con el avance en la investigación y en la implicación de los miRNA en la patogenia de numerosas enfermedades se han desarrollado nuevos modelos o peculiaridades en la síntesis del modelo descrito anteriormente.

Estos miRNA cuya síntesis y mecanismo de maduración difieren del modelo clásico el nombre de miRNA no canónico (Non canonical miRNA). Entre ellos destacamos a continuación algunos ejemplos característicos (19).

El miRNA-451 es el único ejemplo conocido hasta el momento cuya síntesis no requiere la acción de DICER. Esto es debido a su corta longitud la cual no requiere que sea cortada por DICER y puede unirse directamente a la proteína AGO2. (15, 16).

Por otro lado, siempre se ha estudiado como el transportador XPO5 transporta el pre-miRNA del interior del núcleo al citoplasma, pero hoy día se conoce que determinadas secuencias de pre-miRNA no son dependientes de XPO5 para su transporte. Esto se debe a que existen otros transportadores de la misma familia de exportinas, como la exportina 1 (XPO1) que reconoce pre-miRNA por la presencia de una caperuza en el extremo 5 monofosfato que se une a XPO1 en lugar de XPO5 para su salida al citoplasma, como por ejemplo el miRNA de la familia 320. La acción, desarrollo y síntesis de XPO5 no ha sido tan estudiada como DROSHA o DICER y por ello no se conoce con exactitud [\(15\)](#).

#### 2.2.4. Implicaciones clínicas y patológicas de los miRNA

La maduración y biogénesis adecuada de los miRNA es necesaria para el silenciamiento génico que en condiciones normales permite el desarrollo adecuado, no acelerado o alterado de las células. Esta implicación de los miRNA en el equilibrio de multiplicación y desarrollo celular no era conocida. Además del control de la regulación del ciclo celular, los miRNA se expresan de forma específica en cada uno de los tejidos, lo cual es imprescindible para su correcto desarrollo. Así, cualquier alteración en la síntesis o expresión de los mismos conlleva a una alteración en el desarrollo del tejido específico donde se expresa. Sin embargo, aún no se conoce la función específica de cada miRNA concreto expresado, pero sí, la necesidad de su expresión global adecuada para un correcto desarrollo y diferenciación de los tejidos [\(22, 23\)](#).

Las mutaciones, ya sean únicas o múltiples [\(23\)](#) presentes tanto en células germinales como somáticas [\(12\)](#), en alguno de los genes, proteínas y procesadores de la cadena de síntesis de los miRNA, implican un exceso o defecto en su expresión normal, puede provocar una alteración en la expresión génica que puede conducir al desarrollo de enfermedades según las proteínas alteradas o aumentar el riesgo de padecerlas [\(23\)](#).

Por ello han comenzado a estudiarse las relaciones en las alteraciones de los miRNA con la patogenia de numerosas enfermedades, entre las que destacan las neoplasias y la alteración en el crecimiento y desarrollo normal.

La mayoría de los estudios acerca de la expresión de los miRNA demuestran su importancia y presencia en numerosas enfermedades en el ser humano y cómo estos actúan como factores perpetuadores o de progresión de las mismas o incluso como factores sumatorios etiológicos en enfermedades de multicausalidad [\(22\)](#).

A continuación, detallamos algunas de estas implicaciones.

##### 1) Síndrome de DiGeorge y DGCR8

La proteína DGCR8 es imprescindible en la síntesis de los miRNA, ya que conforma, junto con DROSHA el complejo microprocesador que permite la formación del pre-miRNA. La delección del gen que codifica esta proteína, situado en el brazo largo del cromosoma 22 (22q11.2) se relaciona con el desarrollo del conocido síndrome de DiGeorge o síndrome velo-cardio-facial. Se concluyó que esta delección está implicada en una disminución de la expresión de los miRNA en las células, y que esta podría estar relacionada con las formas más agresivas de este síndrome [\(23\)](#).

##### 2) Síndrome del X frágil

Enfermedad genética causada por la expansión progresiva de tripletes citosina-guanina-guanina (CGG)<sub>n</sub>, con posterior hipermetilación provocada por el proceso de silenciamiento génico transcripcional del gen FMR1, en su extremo 5' no traducido, situado en el brazo



largo del cromosoma X (Xq27.3). Cursa con retraso en el crecimiento y desarrollo y déficit intelectual variable junto con facies fenotípicas características.

Este síndrome congénito adquiere gran importancia con respecto a la relación entre los miRNA y el desarrollo de enfermedades. Esto se debe a que tanto en células humanas, como en células de *Drosophila S2* (24), se ha podido demostrar la presencia de la proteína FMR1, cuyo déficit es el principal responsable de la patogenia de esta enfermedad, actúa como cofactor de unión a AGO (AGO2 en humanos y AGO1 en *Drosophila S2*) de RISC imprescindible en la síntesis y maduración del miRNA. Esta unión está ausente en los pacientes afectados del síndrome del X frágil, sugiriendo que la alteración en el proceso de silenciamiento de los miRNA sobre genes diana está asociada directamente con la patogenia de la enfermedad. Aunque esta relación cada día adquiere mayor importancia, aún no se han determinado los patrones de miRNA que pueden estar alterados en los pacientes afectados de este síndrome (23).

### 3) Neoplasias y miRNA

Tal vez la relación entre las alteraciones de los miRNA y su relación con el desarrollo de tumores es el aspecto más estudiado acerca de los miRNA, y lo que ha provocado el auge de su estudio.

La diferencia de expresión de los miRNA en las células tumorales en comparación a las células con diferenciación y multiplicación normal ha sido demostrada en numerosas neoplasias de diferente estirpe, llegándose a postular incluso que las proteínas alteradas en la expresión génica inducida por los miRNA pudiesen servir como futuros biomarcadores de diferentes neoplasias.

La importancia principal y lo que más ha fomentado el estudio de la relación entre los miRNA y el desarrollo de tumores radica en la expresión de los mismos como reguladores de los genes supresores de tumores y oncogenes. (13, 25).

En el otro extremo, se ha demostrado que los principales genes supresores de tumores, como p53 inducen a una mayor maduración y síntesis de miRNA específicos que actúan con función inhibitoria del crecimiento. También se ha demostrado que las principales proteínas supresoras del desarrollo de tumores también guardan relación con la regulación de los miRNA, como ocurre por ejemplo en el cáncer de mama tipo 1 (BRCA1). Esta proteína también estimula la expresión de otros pri-miRNA que permiten tanto inhibir el crecimiento como estabilizar genes determinados relacionados con el desarrollo de cáncer de mama (13, 23).

Existen por lo tanto diferentes familias de miRNA que se expresan en diferentes tejidos de forma común, y cuya alteración puede estar presente en neoplasias de estirpes tumorales distintas. Sin embargo otras familias de miRNAs se expresan de forma específica en un tejido. Estos podrían ser utilizados como marcadores muy precoces, antes incluso de marcadores sanguíneos o de lesiones macroscópicas, útiles para diagnóstico de estos tumores o incluso ser la base para el desarrollo de futuras dianas terapéuticas (22).

Sin embargo, no solo se relaciona la disminución de la expresión génica con el desarrollo de tumores, sino también las sobreexpresiones de las mismas también están involucradas. Así por ejemplo se han detectado sobreexpresiones de las proteínas DICER y AGO2 en el cáncer de próstata.(23).

#### **4) Enfermedades no neoplásicas y miRNA**

No sólo se ha estudiado la relación de los miRNA con enfermedades congénitas o el desarrollo de tumores, si no que cada vez se relacionan más con mecanismos patogénicos de enfermedades no neoplásicas.

En este punto, se han estudiado especialmente, la relación de los miRNA con la predisposición al desarrollo de esquizofrenia, encontrándose una sobreexpresión en la corteza prefrontal del miRNA-16, o una alteración de la expresión de los miRNA-9 y miRNA-189 en el cerebro de autopsias pacientes con Alzheimer. Estas alteraciones podrían explicar la importancia del mecanismo de interferencia génica durante el desarrollo neural, y su relación con las enfermedades neurodegenerativas ([23](#), [26,27](#)).

Otro aspecto estudiado de los miRNA es su relación con enfermedades metabólicas. Se conoce que varias familias de los miRNA se relacionan con la ruta metabólica de los triglicéridos y de la glucosa, tanto en el transporte como en la regulación de la síntesis y secreción. Alteraciones específicas de los mismos se relacionan con enfermedades tales como las dislipemias, en la que están implicados los miRNA-122 hepático-específicos. Otra familia estudiada, miRNA-375 y la familia let-7 expresadas en los islotes pancreáticos, que regula no solo la liberación de insulina, sino también la absorción de la glucosa, también regulada por los miRNA-103/107. Estas familias de miRNA y su relación con la patogenia de enfermedades relacionadas en los tejidos donde se expresa es objetivo de estudio tanto para el desarrollo de elementos de diagnóstico como dianas terapéuticas ([12,22](#))

Por último, como ya sabíamos, los miRNA no sólo se expresan en los seres humanos y esto también ha sido motivo de estudio. Adquiere gran importancia en este aspecto los virus que expresan miRNA en sus tejidos y que tiene capacidad de infectarnos. Entre ellos destacamos el Virus de la familia Herpes (VHS) y el Virus de la Hepatitis C (VHC). Estos virus, entre otros, codifican en su genoma miRNA específicos que no están presentes en el ser humano pero que están involucrados en la patogénesis del mismo cuando infecta una célula huésped (humana). El ejemplo más conocido, y mencionado anteriormente, es la familia de los miRNA-122, que se expresa de forma específica en el tejido hepático humano, se une a regiones específicas del RNA del VHC cuando infecta al hepatocito disminuyendo su replicación. Mutaciones en estos lugares de unión provocan un aumento de la replicación del mismo. Esta unión específica ya conocida está siendo estudiada con el objetivo de desarrollar inhibidores de este miRNA-122 que sean útiles como tratamiento ([12](#)).

### **2.3. CRECIMIENTO INTRAUTERINO RESTRINGIDO, TABACO Y miRNAs**

Las alteraciones del crecimiento intrauterino son otros de los aspectos que más están siendo estudiados en la actualidad en relación al desarrollo y alteración de los miRNA.

Se sabe que los miRNA tienen capacidad de atravesar la barrera placentaria y llegar a la sangre fetal. La regulación de los mismos ocurre tanto en tejidos maternos, como fetales y placentarios. Existen 4 miRNA que se expresan en la placenta de forma específica (miRNA-141, miRNA-149, miRNA-229-5p y miRNA-135b) y que podemos detectar en sangre tanto fetal como materna. Estos disminuyen tras el parto ([28](#)).

Como hemos indicado anteriormente, los miRNA son imprescindibles no solo para la adecuada diferenciación de los tejidos, si no también, para su adecuado crecimiento. Por lo que cabría esperar que, en las alteraciones en el proceso de crecimiento, y especialmente el crecimiento intrauterino restringido o retardado (CIR), adquieran un papel importante.

Esta asociación cobra especial importancia si además incluimos en ella uno de los factores principales relacionados con el CIR, el consumo de tabaco. Debemos recordar, como expresamos en el apartado número uno, que el tabaco es también uno de los principales factores que influyen en el desarrollo de alteraciones epigenéticas, destacando su influencia en la desregulación o disminución de diferentes familias de miRNAs específicas y en las alteraciones en los patrones normales de metilación del DNA.

Es por todo ello, que consideramos fundamental el estudio no solo de las alteraciones relacionadas con la restricción del crecimiento intrauterino y el tabaco, sino de cómo estas influyen en la expresión de los miRNAs.

Para poder establecer las relaciones comenzaremos realizando una definición de los conceptos más importantes relacionados y describiendo la fisiopatología del CIR.

### 2.3.1. Definición de crecimiento intrauterino

El concepto de crecimiento intrauterino retardado o restringido (CIR) (fetal growth restriction, IUGR) hace referencia a los fetos que presentan una limitación potencial en su curva de crecimiento genéticamente determinada. Se define como el nacimiento de un feto con un percentil por debajo de 3 (p3) de peso y talla para su edad gestacional o un percentil por debajo de 10 (p10) junto con alteraciones del flujo cerebro-umbilical o de las arterias uterinas medidos por ecografía Doppler [\(29\)](#).

Existen dos tipos diferentes de alteraciones del crecimiento durante la edad gestacional que podemos resumir de la siguiente forma:

- Pequeños para la edad gestacional (PEG). Estos fetos presentan una disminución tanto del peso y de la talla como consecuencias de alteraciones que ocurren desde el comienzo de la gestación ya sean de causas genéticas, como por ejemplo la aneuploidía, o de causa externa, ambiental, como la toma de fármacos teratogénicos. Realmente no son considerados verdaderos CIR.
- CIR propiamente dicho, al que nos referiremos a partir de ahora. Se produce una alteración en el crecimiento que aparece en gestaciones en estado avanzado (28-30 semanas de gestación) como consecuencia de una disfunción o alteración de la vascularización de la placenta y que se traduce en niños nacidos con bajo peso. Se considera una de las patologías con mayor morbilidad peri y neonatales asociadas, ya que se relaciona principalmente a un aumento del riesgo cardiovascular y de enfermedades metabólicas en la edad adulta. Afecta del 3-10% de los niños nacidos en el mundo [\(29\)](#).

### 2.3.2. Etiología, factores de riesgo en el CIR

La causa principal, clásicamente explicada, por la que se producía CIR hacía referencia a que factores externos, sobre todo la hipertensión arterial materna y los hábitos tóxicos como el tabaco, provocan una disfunción y alteración en la remodelación de las arterias espirales uteroplacentarias. Estas alteraciones provocan una dificultad para el paso de O<sub>2</sub> y nutrientes al feto lo que provocaba un estancamiento en el crecimiento y la curva ponderal del mismo.

La alteración en la remodelación de las arterias espirales deteriora la capacidad de invasión del trofoblasto y provoca una alteración en la formación de la placenta. Por otro lado, a nivel

funcional las resistencias vasculares de los vasos que nutren al feto aumentan y por lo tanto se reduce el flujo uteroplacentario [\(29\)](#).

Uno de los factores principales que provocan la disfunción placentaria que da lugar al desarrollo del CIR es la exposición al humo del tabaco, siendo este el factor de riesgo más importante durante el embarazo ya que se asocia a una elevada morbilidad neonatal y se relaciona con un aumento del riesgo del desarrollo de enfermedades adultas en los niños expuestos [\(30\)](#). Los procesos de metilación que se producen como consecuencia de la exposición, provocan una disminución de la expresión de los genes determinantes para el adecuado desarrollo de la placenta y las arterias uteroplacentaria, y de genes cruciales para el adecuado crecimiento fetal. Por otro lado, la nicotina actúa de forma directa sobre los receptores de acetilcolina placentarios produciendo vasoconstricción y aumento de las resistencias vasculares uterinas, y como consecuencia, disminución del flujo sanguíneo fetal [\(31\)](#).

Actualmente, aunque esta teoría sigue vigente, y además constituyen la base del diagnóstico del mismo, objetivadas a través de ecodoppler, se postulan numerosos mecanismos que están fuertemente relacionados con el desarrollo del CIR y que antes no habían sido estudiados. Entre estas nuevas teorías postuladas, destaca la importancia de alteraciones en la expresión de miRNAs específicos de placentas con disfunción vascular de fetos afectados de CIR, que han demostrado un aumento de las complicaciones relacionadas con esta patología. Estas alteraciones también han sido apreciadas, ya que comparten un mecanismo fisiopatológico común, en la preeclampsia [\(29\)](#).

### 2.3.3. CIR y miRNAs

Se han identificado aproximadamente 600 tipos diferentes de miRNA que se expresan de forma normal en el tejido placentario, siendo específicos de la placenta humana los miRNA expresados en el cromosoma 19, en el cromosoma 14 y el miRNA-371-3 principalmente. Esta expresión varía a lo largo de la gestación [\(29\)](#). Sin embargo, en las placentas de fetos diagnosticados de CIR existía tanto una disminución en la expresión de algunos de los miRNA de las familias nombradas, así como la expresión de otros miRNA diferentes de forma aberrante [\(30\)](#).

Estas alteraciones en la expresión de los miRNA son complementarias a secuencias TARGET de RNA mensajero de genes relacionados con la expresión de proteínas imprescindibles para la adecuada migración e invasión del trofoblasto, y por lo tanto de la adecuada formación de la placenta. Por lo que todo esto puede sugerir que los miRNA son imprescindibles para una adecuada función placentaria y que su desregulación se relaciona con numerosos genes implicados en el mecanismo fisiopatológico del CIR.

Por otro lado, esta alteración en el desarrollo y crecimiento intrauterino, en sí misma, implica alteraciones en la expresión de los patrones típicos de metilación del DNA y en la expresión normal de miRNA relacionados con el proceso de crecimiento y desarrollo de los tejidos en condiciones normales.

Un claro ejemplo de la importancia de los miRNAs en el desarrollo placentario y del feto en condiciones normales se aprecia en la siguiente figura [\(29\)](#) :



cual se explica cómo se producen alteraciones fenotípicas en fetos sin alterarse el genotipo como tal, es decir, como los factores externos maternos, ambientales, fetales y placentarios, pueden alterar la expresión del genoma (epigenética) sin alterar su secuencia (28).

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

El desarrollo de este trabajo pretende determinar el impacto de la exposición al tabaco en las alteraciones epigenéticas, en concreto, en la expresión de los miRNAs, y su relación con el desarrollo del crecimiento intrauterino restringido. Para ello se han recogido los datos de una investigación que actualmente se está desarrollando en la Universidad de Zaragoza.

Posteriormente los datos obtenidos serán analizados en la base de datos mirBASE y miRDB para establecer en qué regiones del genoma podrían actuar (TARGE) induciendo el silenciamiento génico.

### 4.1. TIPO DE ESTUDIO:

Se trata de un estudio observacional longitudinal del efecto del tabaco en la modificación del patrón epigenético y su relación con el retraso del crecimiento intrauterino. La población que está siendo estudiada son los recién nacidos en el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa y en el hospital Materno Infantil de Zaragoza. La recogida de muestras comenzó el 1 de octubre de 2018.

La muestra está constituida por sangre del cordón umbilical de recién nacido de madres fumadoras y madres no fumadoras. A los dos años de la obtención de la muestra inicial, en la consulta de revisión pediátrica, se recogerán los datos de peso y se obtendrá una segunda muestra de sangre para el estudio genético.

### 4.2. CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO:

#### Criterios de inclusión:

1. **Grupo de recién nacidos expuestos al humo del tabaco: hijos de madres que hayan fumado más de 10 cigarrillos al día durante el primer trimestre de embarazo.** Subdividido en dos grupos:
  - 1.1 Niños con retraso de crecimiento intrauterino diagnosticado por ecografía en el tercer trimestre de gestación y confirmado por un bajo peso al nacer
  - 1.2 Niños sin retraso de crecimiento intrauterino y un peso adecuado al nacer.
2. **Grupo de recién nacidos no expuestos al humo del tabaco: hijos de madres no fumadoras durante la gestación.** Subdividido en dos grupos:
  - 2.1 Niños con retraso de crecimiento intrauterino diagnosticado por ecografía en el tercer trimestre de gestación y confirmado por un bajo peso al nacer.
  - 2.2 Niños sin retraso de crecimiento intrauterino y un peso adecuado al nacer.

#### Criterios de exclusión:

1. Enfermedades de la madre que puedan ocasionar retraso en el crecimiento intrauterino.
2. Infecciones uterinas.
3. Malformaciones del feto.
4. Alteraciones cromosómicas.
5. Parto prematuro.
6. No firmar el consentimiento informado.

### **Selección de la muestra:**

Se realizará un muestreo de conveniencia, incluyendo de manera consecutiva a todos los recién nacidos que cumplan los criterios de inclusión hasta alcanzar el tamaño de la muestra, constituida por un total de 120 recién nacidos. De estos:

- Grupo de expuestos al factor de riesgo (n=60); sin retraso del crecimiento intrauterino (n=30); con retraso del crecimiento intrauterino (n=30).
- Grupo de no expuestos al factor de riesgo (n=60); sin retraso del crecimiento intrauterino (n=30); con retraso del crecimiento intrauterino (n=30).

### **VARIABLES A ESTUDIO:**

Se obtendrán de la historia mediante un cuestionario que ha sido elaborado para el estudio.

- Variables relativas a la madre:
  - Hábito tabáquico de la madre. Determinando el número de cigarrillos al día durante el primer trimestre / durante todo el embarazo.
  - Factores que podrían influir en las variables del estudio:
    - Ingesta de ácido fólico, aporte multivitamínico.
    - Factores de riesgo adicionales tales como estrés, diabetes e hipertensión arterial.
    - IMC de la madre antes de embarazo.
    - Paridad.
    - Años de la madre.
    - Consumo de alcohol: número de bebidas alcohólicas durante el primer trimestre/durante todo el embarazo, y drogas durante el embarazo.
    - Nivel de estudios.
    - Número de abortos.
- Variables relativas al padre:
  - Hábito tabáquico del padre. Determinando el número de cigarrillos al día.
- Variables relativas al recién nacido:
  - Sexo del recién nacido.
  - Peso, longitud y perímetro cefálico al nacimiento.
  - Peso, talla y perímetro cefálico a los dos años.
  - Edad gestacional en el momento del parto.
- Variables relativas a las modificaciones epigenéticas que serán estudiadas: Se han seleccionado diferentes genes candidatos de sufrir alteraciones epigenéticas por la exposición al humo del tabaco, establecidas en el estudio de Christina A. Markunas et al. (33) mediante cambios en la secuencia CpG. Las regiones génicas que se van a estudiar son aquellas que previamente se han identificado con diferencias estadísticamente significativas, con respecto a modificaciones epigenéticas inducidas por la exposición al tabaco, por medio de un análisis del metiloma completo realizado por nuestro equipo de investigación. Se cuantificará el porcentaje de CpG metiladas por región génica en el momento del nacimiento y a los dos años, ya que parte de estas alteraciones en la metilación pueden ser reversibles en este periodo de tiempo. Para ello se utilizará la técnica de pirosecuenciación con bisulfito desarrolladas por Shen L y Waterland LA (34).

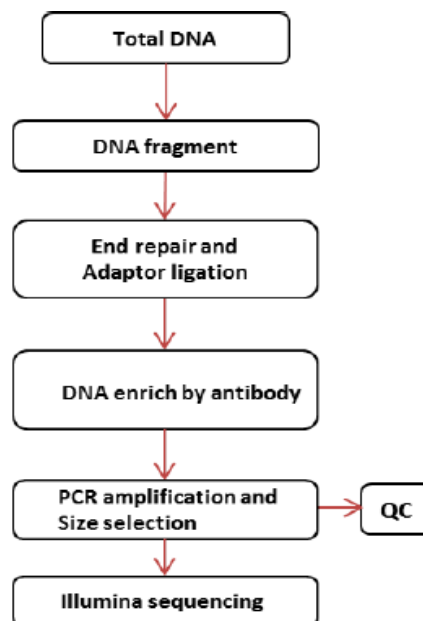
### 4.3. PROCEDIMIENTO Y METODOLOGÍA:

En la consulta de obstetricia se han seleccionado las pacientes que cumplen los criterios de inclusión de una manera consecutiva hasta la obtención de la muestra total. Se les explica el estudio y si aceptan participar se les solicita que firmen el consentimiento informado. Después del nacimiento del niño, antes del alta hospitalaria, se obtiene una muestra de sangre de cordón, recogida habitualmente en Hematología, se traslada al laboratorio de Genética de la facultad de Medicina donde se licuan y congela para la extracción posterior del DNA. La muestra de sangre se obtendrá de la misma manera en los dos grupos. A los dos años, en la consulta de revisión pediátrica, se recogerán los datos antes descritos y se obtendrá una nueva muestra para el estudio genético.

Tras la extracción del DNA, se procede a su amplificación, secuenciación y estudio de metilación.

Como previamente ya se habían seleccionado los genes de estudio mediante el análisis del MeDIPseq (Methylated DNA inmunoprecipitación Sequencing), se van a analizar y validar por pirosecuenciación los genes candidatos.

Para este análisis se seleccionó una muestra de DNA que fue escindida en fragmentos de 200-800 pares de bases. Posteriormente se ligó a Illumina con los adaptadores. Los fragmentos ligados fueron inmunoprecipitados por el anticuerpo anti-5-metilcitosina. El DNA enriquecido se amplificó por PCR y purificó. Se realizó un control de calidad (QC). Finalmente, las muestras obtenidas se diluyeron en una concentración final de aproximadamente 8 pares de base. El siguiente esquema resume el proceso:

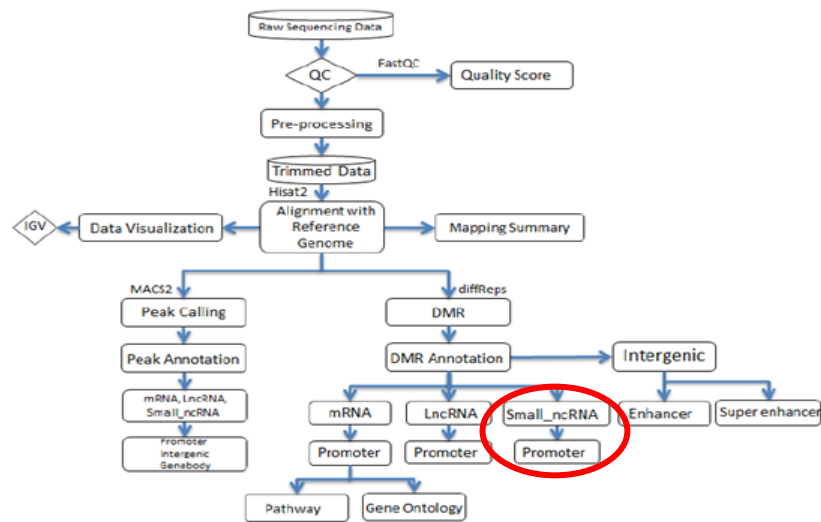


Esquema 1: MeDIP-seq experiment workflow.

Posteriormente los fragmentos cortos de las secuencias generadas a partir de HiSeq4000 fueron analizados, desde el extremo 5' al 3' y alineados con el genoma de referencia antes seleccionado, realizándose un mapeo y obteniendo las diferentes secuencias hipermetiladas, así como, los fragmentos largos no codificantes de RNA (ncRNA), los fragmentos de RNA mensajero (mRNA) así como los fragmentos pequeños no codificantes de RNA



(smallIncRNA) asociados. Estos últimos forman parte del complejo silenciador del RNA, conformado por los siRNA, piRNA y miRNA, este último objetivo de nuestro estudio y del que realizaremos el análisis de resultados. Este proceso se resume en el siguiente esquema:



Esquema 2: MeDIP-Seq data analysis workflow.

Los datos de los miRNAs utilizados en este trabajo son resultado de la investigación obtenidos por la Dra. Barrio, el Dr. Lerma y la Dra. Gascón que pertenecen al grupo de investigación B19-17R Crecimiento y Desarrollo: regulación génica y ambiental. De tal manera que su uso para este trabajo no suponga un perjuicio para su uso posterior.

#### 4.4. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS:

Se cuantificará el porcentaje de metilación de las citosinas de las secuencias promotoras de los genes estudiados y se compara si existen diferencias significativas en relación con el hábito tabáquico y/o el retraso de crecimiento intrauterino.

En este trabajo se analizará el porcentaje de metilación y alteración en la expresión de los miRNAs en los niños con retraso del crecimiento intrauterino de madres fumadoras de nuestro estudio.

Para el análisis de los resultados utilizaremos la base de datos mirBASE. Se trata de una plataforma que permite la búsqueda de secuencias y datos acerca de los diferentes miRNAs ya publicados. Cada entrada recoge la información de la horquilla precursora de la que se obtiene la transcripción de los diferentes miRNA maduros, ubicándolos y secuenciándolos según la región del genoma en la que actúan induciendo el silenciamiento postranscripcional.

Esta base de datos fue creada y es administrada por el laboratorio de Griffiths-Jones de la Facultad de Biología, Medicina y Salud de la Universidad de Manchester.

En el **Anexo 1** se puede apreciar un ejemplo esquematizado de su uso.

Tras este estudio inicial se realizará otra búsqueda en la base de datos miRDB. En esta plataforma podremos analizar cada una de las dianas (TARGET), descritas como posibles según complementariedad de bases, de los diferentes miRNAs estudiados, los genes donde actuarían induciendo el silenciamiento génico, pudiendo llegar a establecer de forma predictiva las funciones de cada uno de ellos. Además, a través del análisis computacional permite identificar

miRNAs funcionalmente activos en los seres humanos, permitiendo obtener información acerca de la expresión de cada uno de ellos en las diferentes líneas celulares.

Un ejemplo esquematizado de su uso se puede apreciar en el **Anexo 2**.

## 5. RESULTADOS

Tras analizar todos los datos obtenidos en el proceso de investigación previamente descrito, se han identificado ocho miRNAs hipermetilados en el estudio genético de la sangre de cordón de niños con CIR de madre fumadora de nuestra muestra.

Nombre Completo	microRNA 7-1 3p	microRNA 3918	microRNA 1244-1	microRNA 4721
Símbolos	MIR7-1	MIR3918	MIR1244-1	MIR4721
Otros símbolos	hsa-mir-7-1	hsa-mir-3918	hsa-mir-1244-1	hsa-mir-4721
Especie	Homo Sapiens	Homo Sapiens	Homo Sapiens	Homo Sapiens
Familia Genes	mir-7	mir-3918	mir-1244	mir-4721
Localización	Cromosoma 9 (9q21.32)	Cromosoma 6 (6q35.3)	Cromosoma 2 (2q37.1)	Cromosoma 16 (16P11.2)
Start	83969748	158764661	231713314	28843919
End	83969857 (-)	158764753 (-)	231713398 (+)	28844007 (-)
ID Gen - NCBI	407043	100500851	100302285	100616256
Tipo Gen	ncRNA	ncRNA	ncRNA	ncRNA
RNA central	URS00002C5007_9606	URS000075B9DC_9606	URS000075BB1F_9606	URS000075EF66_9606
Secuencia miRNA madura	66-CAACAAUACAGUCUGCAUA-87	19-ACAGGGCCGCAGAUUGGAGACU-39	55-AAGUAGUUGGUUUGUAUGAGAUGGUU-80	60-UGAGGGCUCCAGGUGACGGUGG-81
TARGET Descritos	2037	639	390	390
Registro mirBASE miRNA Promotor	MI0000263	MI0016424	MI0006379	MI0017356
Registro mirBASE miRNA maduro	MIMAT0004553	MIMAT0018192	MIMAT0055896	MIMAT0019835
Registro miRDB	hsa-mir-7-1-3p	hsa-mir-3918	hsa-mir-1244	hsa-mir-74721
Registro OMIN	615239			
Registro HCNG	407043	38919	35310	41609
Evidencia	Experimental - Clonado	Experimental - Illumina	Experimental - Illumina	Experimental - Illumina

Tabla 1: Características de los miRNA hipermetilados obtenidos por MeDIC-Seq tras el análisis de los casos.

Nombre Completo	microRNA 25 5p	microRNA 25 3p	microRNA 93 5p	microRNA 93 3p	microRNA 3656
Símbolos	MIR25	MIR25	MIR93	MIR93	MIR3656
Otros símbolos	hsa-mir-25 5p	hsa-mir-25 3p	hsa-mir-93 5p	hsa-mir-93 3p	hsa-mir-3656
Especie	Homo Sapiens	Homo Sapiens	Homo Sapiens	Homo Sapiens	Homo Sapiens
Familia Genes	mir-25	mir-25	mir-93	mir-93	mir-3656
Localización	Cromosoma 7 (7q22.1)	Cromosoma 7 (7q22.1)	Cromosoma 7 (7q22.1)	Cromosoma 7 (7q22.1)	Cromosoma 11 (11q23.3)
Start	100093560	100093560	100093768	100093768	119018944
End	100093643 (-)	100093643 (-)	100093847 (-)	100093847 (-)	119019012 (-)
ID Gen - NCBI	407014	407014	407050	407050	100500840
Tipo Gen	ncRNA	ncRNA	ncRNA	ncRNA	ncRNA
RNA central	URS00000C85B2_9606	URS00000C85B2_9606	URS00000DDD35_9606	URS00000DDD35_9606	URS000075C7FA_9606

Secuencia miRNA madura	14- AGGCGGAGACUU GGGCAAUUG-34	52- CAUUGCACUUGUC UCGGUCUGA-73	11- CAAAGUGCUGUUCG UGCAGGUAG-33	50- ACUGCUGAGCUAG CACUCCCCG-71	49- GGCGGGUGCG GGGGUGG-65
TARGET Descritos	51	919	1319	651	
Registro mirBASE miRNA Promotor	MI0000082	MI0000082	MI0000095	MI0000095	MI0015056
Registro mirBASE miRNA maduro	MIMAT0004498	MIMAT0000081	MIMAT0000093	MIMAT0004509	MIMAT0018076
Registro miRDB	hsa-mir-25-5p	hsa-mir-25-3p	hsa-mir-93 5p	hsa-mir-93 3p	
Registro OMIN	612150	612150	612984	612984	
Registro HCNG	407014	407014	407050	407050	38889
Evidencia	Experimental- Clonado	Experimental- Clonado- Northern	Experimental- Clonado-Northern	Experimental- Clonado	Experimental

Tabla 2: Características de los miRNA hipermetilados obtenidos por MeDIC-Seq tras el análisis de los casos.

Tras la revisión sistematizada de cada una de las posibles dianas de los miRNA descritos en la Tabla 1 y 2 (6396 posibles dianas en total) a través de la base de datos mirRDB, se realiza una selección de las dianas más relevantes en relación a los objetivos de nuestra investigación para poder establecer posteriormente hipótesis. Estas posibles dianas (TARGET) de cada uno de los miRNA descritos se recogen en las tablas 3-10.

No se han encontrado TARGET en relación a la secuencia madura del miRNA3656.

Gen relacionado	Descripción del gen	ID GEN - NCBI
TUSC2	Regulador de calcio mitocondrial del Gen Supresor de Tumores 2	11334
TNFSF4	Miembro número 4 superfamilia TNF (Factor de Necrosis Tumoral)	7292
CADM2	Molécula 2 de adhesión celular	253559
<b>VEGFA</b>	<b>Factor A de Crecimiento Endotelial Vascular</b>	<b>7422</b>
TP53NP1	Proteína tumoral p53 nuclear inducible 1 (Gen Supresor de Tumores)	<b>94241</b>
TRAF6	Receptor TNF (Factor de Necrosis Tumoral) asociado al factor 6	7189
BCCIP	Proteína de interacción de BRCA2 (Gen Supresor de Tumores)	56647
TRAF7	Factor 7 asociado al Receptor TNF (Factor de Necrosis Tumoral)	84231
<b>AMMECR1</b>	<b>Síndrome de Alport. Gen 1</b>	<b>9949</b>
CDC23	Proteína 23 del Ciclo División Celular	8697
CDC73	Proteína 73 Ciclo División Celular	79577
BCL2L1	BCL2 like 1 (Proteína Inhibidora de la Apoptosis)	598
MORF4L2	Factor 4 like 2 de Mortalidad	
CDC14A	Ciclo División Celular 14A	8556
CDC37L1	Ciclo División Celular 737 like 1	55664
CLU10S	Leucemia Linfocítica Crónica, regulación positiva de la cadena opuesta	574016
<b>FMR1</b>	<b>Síndrome de X Frágil</b>	<b>2332</b>
RAP1B	Miembro de la familia oncogen RAS	9643

Tabla 3: Posibles dianas del miRNA-7-1.

Gen relacionado	Descripción del gen	Registro NCBI
RAB5B	RAB5B Miembro de la familia oncogenes RAS	5869
BAP1	Proteína asociada a BRCA1 (Gen Supresor de Tumores)	8314

TRARG1	Regulador del Receptor GLUT4 (Proteína transportadora de glucosa regulada por insulina)	286753
<b>PGF</b>	<b>Factor de Crecimiento Placentario</b>	<b>5228</b>
CDON	Oncogen Regulador de la Adhesión Celular	50937
RAB4B	RAB4B Miembro de la familia oncogen RAS	53916
<b>CSHL1</b>	<b>Hormona Somatotropina Coriónica Humana like 1</b>	<b>1444</b>
TNFRSF18	Miembro 18 superfamilia del receptor TNF (Factor de Necrosis Tumoral)	8784
OSGIN1	Inhibidor 1 del Factor de Inducción de Estrés Oxidativo	29948
TNFAIP2	Proteína 2 inductora del TNF $\alpha$ (Factor de Necrosis Tumoral alfa)	7127
TNFAIP1	Proteína 1 inductora del TNF $\alpha$ (Factor de Necrosis Tumoral alfa)	7126
SOHLH1	Proteína Básica Específica de la espermatogénesis y ovogénesis	402381
<b>NBAS</b>	<b>Secuencia amplificada de Neuroblastoma</b>	<b>51594</b>
RAB40C	RAB40C miembro de la familia oncogen RAS	57799
<b>IGF2BP2</b>	<b>Proteína 2 de unión al mRNA de IGF2 (Factor de Crecimiento Insulínico 2)</b>	<b>10644</b>

Tabla 4: Posibles dianas del miRNA-3918

Gen relacionado	Descripción del gen	NCBI GEN	ID
F8	Factor de Coagulación VIII	2157	
NCR3LG1	Ligando 1 del Receptor 3 de Célula Cytotóxica Natural Killer	374383	
<b>ATXN1L</b>	<b>Ataxina like 1</b>	<b>342371</b>	
MYBL1	Protooncogen MYB like 1	4603	
TGFB2	Receptor 2 de TGFB (Factor de Crecimiento Transformante beta)	7048	
TNFAIP8L2	Proteína 8 like 2 inductora de TNF $\alpha$ (Factor de Necrosis Tumoral alfa)	79626	
DNMT3A	DNA Metiltransferasa 3 $\alpha$ (alfa)	1788	
NEUROD4	Diferenciación neuronal 4	58158	
<b>HGF</b>	<b>Factor de Crecimiento Hepático</b>	<b>3082</b>	
OSGIN2	Miembro 2 de la familia de inhibidores de factor de crecimiento inducido por estrés oxidativo	734	
CIP2A	Inhibidor de la proteína Fosfatasa 2A reguladora de la proliferación celular	57650	
FGFR1OP2	Compañero 2 del oncogen FGFR1	26127	
TDGF1	Factor Crecimiento 1 derivado del teratocarcinoma	6997	
CDC34	Factor 34 del ciclo de división celular	997	
F3	Factor tisular III de coagulación	2152	
<b>FXR1</b>	<b>Proteína autosómica homóloga 1 de FMR1</b>	<b>8087</b>	
ANAPC11	Subunidad 11 del complejo promotor de la anafase	51529	
CBL	Protooncogen CBL	867	

Tabla 5: Posibles dianas del miRNA-1244-1

Gen relacionado	Descripción del gen	Registro NCBI
TP63	Proteína p63 tumoral	8626
MLLT11	Cofactor 7 del factor de transcripción MLLT11	10962
RRAS2	Relacionado con RAS 2	22800
<b>FXR1</b>	<b>Proteína autosómica homóloga 1 de FMR1</b>	<b>8087</b>
BCAM	Molécula basal de la adhesión celular	4059

CDCA7	Factor 7 asociado al ciclo de división celular	83879
MYCL	Factor de transcripción del protooncogen MYCL	4610
AREL1	Proteína E3 ubiquitina ligasa 1 resistente a la apoptosis	9870
<b>HIF3A</b>	<b>Subunidad alfa del factor 3 inducible por hipoxia</b>	<b>64344</b>
<b>ATXN7L3</b>	<b>Ataxina 7 like 3</b>	<b>56970</b>
<b>FXR2</b>	<b>Proteína autosómica homóloga 2 de FMR1</b>	<b>9513</b>
C1QTNF6	Factor CIQ relacionado con TNF (Factor de Necrosis Tumoral) 6	<b>114904</b>
TNFAIP1	Proteína 1 inductora de TNF $\alpha$ (Factor de Necrosis Tumoral alfa)	7126
BAP1	Proteína 1 asociada al protooncogen BRCA1	8314

Tabla 6: Posibles dianas del miRNA-4721.

Gen relacionado	Descripción del gen	Registro NCBI
TP63	Proteína tumoral p63	8626
MISP3	Miembro 3n familia MISP (Mitotic Spindle Positioning - posición del huso en mitosis)	133230
APBB2	Proteína de unión, miembro 2, familia B, del precursor beta amiloide	323
PAN01	Proteína 1 proapoptótica nucleolar	101927423

Tabla 7: Posibles dianas del miRNA-25-5p.

Gen relacionado	Descripción del gen	Registro NCBI
RAB23	RAB23 miembro de la familia oncogen RAS	51715
FBN1	Fibrilina 1	2200
BTG2	Factor 2 de la proteína antiproliferativa BTG	7832
CADM2	Molécula 2 de adhesión celular	<b>253559</b>
BCL2L11	Proteína BCL2 like 11	10018
<b>ATXN1</b>	<b>Ataxina 1</b>	<b>6310</b>
<b>ATXN3</b>	<b>Ataxina 3</b>	<b>4287</b>
<b>ATXN7</b>	<b>Ataxin 7</b>	<b>6314</b>
APBB2	Proteína de unión, miembro 2, familia B, del precursor beta amiloide.	323
RAB3C	RAB3C miembro familia oncogen RAS	115827
NF2	Neurofibromina 2	4771
WASL	Síndrome Wiskott-Aldrich	8976
<b>FXR1</b>	<b>Proteína autosómica homóloga 1 de FMR1</b>	<b>8087</b>
INSIG1	Gen 1 inductor de insulina	3628
RAB8B	RAB8B miembro familia oncogen RAS	51762
IRS2	Sustrato 2 del receptor de la insulina	8660
<b>FMR1</b>	<b>Síndrome de X Frágil</b>	<b>2332</b>
SCAI	Supresor de invasión celular en cáncer	286205
CADC42	Factor 42 del ciclo de división celular	998
TRAF3	Factor 3 asociado a TNF (Factor de Necrosis Tumoral)	7187
<b>AGGF1</b>	<b>Factor Angiogénico 1</b>	<b>55109</b>
RAB2C	RAP2C miembro de la familia oncogen RAS	57826
<b>VEZF1</b>	<b>Proteína en dedos de zinc asociada al Endotelio Vascular</b>	<b>7716</b>

Tabla 8: Posibles dianas del miRNA-25-3p.

Gen relacionado	Descripción del gen	Registro NCBI
ITPRIPL2	Proteína ITPRIP like 2	162073
<b>ATXN1</b>	<b>Ataxina 1</b>	<b>6310</b>
TNFRSF21	Miembro 21 del receptor de la superfamilia TNF (Factor Necrosis Tumoral)	27242
F3	Factor tisular III de la coagulación	2152
RAB5B	RAB5B Miembro de la familia oncogenes RAS	5869
LRP8	Proteína 8 del receptor LDL (Lipoproteína de Baja Densidad)	7804
APP	Proteína Precursora Beta Amiloide	351
TPRG1L	Regulador like 1 de proteína tumoral p53	127262
LRPAP1	Proteína 1 asociada al receptor LDL (Lipoproteína de Baja Densidad)	4043
CDC23	Proteína 23 del Ciclo División Celular	8697
VASP	Fosfoproteína Estimuladora de la Vasodilatación	7408
<b>IGF2BP1</b>	<b>Proteína 1 de unión al RNAm del factor de crecimiento insulínico 2</b>	<b>10642</b>
<b>VEGFA</b>	<b>Factor A de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF)</b>	<b>7422</b>
<b>VEZF1</b>	<b>Proteína en dedos de zinc asociada al Endotelio Vascular</b>	<b>7716</b>
<b>FXN</b>	<b>Proteína Frataxina</b>	<b>2395</b>
VLDLR	Receptor VLDL (Lipoproteína de Muy Baja Densidad)	7436

Tabla 9: Posibles dianas del miRNA-93-5p.

Gen relacionado	Descripción del gen	Registro NCBI
RAB36	RAB36 Miembro de la familia oncogenes RAS	9609
RAB3B	RAB3B Miembro de la familia oncogenes RAS	5865
<b>HYPK</b>	<b>Proteína K asociada a Huntingtina</b>	<b>25764</b>
LDLRAD4	Domino 4 del receptor clase A de VLDL (Lipoproteína de Muy Baja Densidad)	753
RAB4A	RAB4A Miembro de la familia oncogenes RAS	5867
PLAC8	Proteína 8 Específica de Placenta	51316
CDC14B	Factor 14B asociado al ciclo celular	8555
HIVEP3	Proteína 3 de unión al VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana) tipo I	59269
TRAF1	Factor 1 asociado a TNF (Factor de Necrosis Tumoral)	7185

Tabla 10: Posibles dianas del miRNA-93-3p

## 6. DISCUSIÓN

Las secuencias hipermetiladas expresadas en la sangre de cordón de los niños nacidos con diagnóstico de crecimiento intrauterino restringido de madres fumadoras revelan cómo el humo del tabaco puede afectar a los patrones de metilación normales de los fetos. Estas alteraciones en la metilación reflejan una disminución de la expresión génica en las regiones afectas, en nuestro caso las secuencias que expresan los miRNA descritos.

La disminución de la expresión de los mismos conlleva alteraciones en su función normal, y estas, podrían reflejarse en el estudio de sus posibles dianas. Las dianas de cada miRNA son descritas según la complementariedad de bases entre el miRNA en cuestión y el mRNA, de forma que la alteración en las mismas conllevaría a una disminución de la expresión de las proteínas resultantes de la traducción de esa secuencia.

Tras el análisis de cada una de las posibles dianas, y con el fin de establecer una hipótesis que pueda justificar como el humo del tabaco provoca una alteración a nivel del crecimiento intrauterino, se seleccionan las dianas cuya alteración podrían ser la causa de la disfunción placentaria.

Entre ellas cabe destacar como el **miRNA-7-1** está asociado al **Factor A de Crecimiento Endotelial Vascular** (VEGFA), por lo que la disminución de la expresión de este miRNA cabría esperar que provocase alteraciones en el desarrollo y formación de los vasos tanto del feto como de la placenta. La cadena de mRNA que codifica para VEGFA también presenta complementariedad de bases, pudiendo ser otra posible diana, con la secuencia **miRNA-93 en su extremo 5'**.

Otras de las posibles dianas, en este caso del **miRNA-25 en su extremo 3'**, encontradas en relación a la disfunción vascular, es el **Factor Angiogénico 1**, relacionado con el adecuado desarrollo de los vasos. A su vez, este factor está implicado en una rara afectación congénita denominada Síndrome de Klippel-Trenaunay que se caracteriza por alteración en la formación de los vasos sanguíneos lo que conduce a malformaciones vasculares arterial, en forma de nevus flammeus, venosa e hipertrofia de las partes blandas de la región afecta. Esto podría establecer, no solo otro de los posibles argumentos a favor de la disfunción vascular placentaria con causa del CIR, si no que podría suponer un aumento del riesgo del desarrollo de esta patología en el feto.

La importancia de la relación entre la regulación adecuada de los miRNA y la angiogénesis placentaria ya fue demostrada en la investigación de Luo J et al. [\(32\)](#). En este estudio se comparó dos grupos de cerdos, unos con crecimiento intrauterino adecuado (controles) y otros con restricción del crecimiento (casos). En el grupo de los casos se demostró una disminución estadísticamente significativa en la expresión de diversas familias de miRNA, destacando el miRNA-150 que presenta actividad pro-angiogénica, en sangre venosa de cordón, con respecto al grupo control cuya expresión era normal. Por otro lado, demostraron que la expresión adecuada de estas familias de miRNA participaba en la regulación de los patrones epigenéticos normales en los fetos cerdos durante el embarazo.

Este estudio, de gran relevancia, supone un punto de inflexión para el desarrollo de una nueva teoría con respecto al desarrollo normal vascular en el proceso de embriogénesis, y por lo tanto una nueva explicación fisiopatológica para el crecimiento intrauterino restringido. Además, aunque este estudio fue realizado en cerdos, puede ser comparado con el estudio que actualmente estamos realizando en sangre de cordón de feto humano.

Otro estudio llevado a cabo por Lv Y et al. [\(35\)](#) establece también la relación entre el desarrollo de hipertensión arterial pulmonar en la vida adulta de niños nacidos con restricción del crecimiento intrauterino y la alteración en la expresión del miRNA-206 en el músculo liso de la arteria pulmonar. Para este estudio se utilizaron ratas.

En otro estudio, publicado este año, de este grupo de investigación [\(36\)](#) se demostró la relación entre el miRNA-206 y el retraso en el crecimiento intrauterino. Debido a sus resultados obtenidos en su estudio anterior, establecieron una hipótesis en relación a los niveles de miRNA-206 y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), altamente relacionado con la fisiopatología del CIR. Para ello, establecieron tres grupos de estudio, en embarazadas con riesgo de retraso en el crecimiento intrauterino, según el trimestre de embarazo. Determinaron en suero el nivel tanto de este miRNA-206 como del VEGF, por reacción en cadena de la polimerasa, obteniendo en todos los grupos de estudio, una relación inversamente proporcional entre la sobreexpresión del miRNA-206 y la disminución de los niveles del VEGF.

De la misma forma que fueron desarrollados estos estudios en relación al miRNA-206 y su papel en la fisiopatología del CIR, podrían desarrollarse estudios que permitan analizar los

niveles de miRNA-25 en sangre de cordón y en sangre materna en comparación con los niveles de VEGF para poder establecer una relación causal, pudiendo determinar así su relación con el CIR.

Por otro lado, el **miRNA-3918**, presenta complementariedad de bases con el mRNA que traduce para el **Factor de Crecimiento Placentario (PGF)** y de la **Hormona Somatotropina Coriónica Humana (CSHL1)**. Ambas proteínas son imprescindibles para el adecuado desarrollo de la placenta y para la correcta evolución del embarazo. Además, la disminución del PGF, está relacionada con el riesgo de sufrir preeclampsia, cuya fisiopatología está íntimamente relacionada con la del crecimiento intrauterino restringido. Por lo tanto, aunque estas dianas están descritas como posibles, se podría establecer una clara relación de las mismas y la expresión de este miRNA como bases para realizar estudios futuros acerca de la alteración específica de su expresión en la placenta, o como marcador en sangre para la realización del diagnóstico precoz de estas patologías de tanta morbimortalidad durante el embarazo.

**miRNA-93 en su extremo 5' y miRNA-3918**, presentan complementariedad de bases con el mRNA que codifica para la **Proteína 1 y 2, respectivamente, de Unión al factor de Crecimiento Insulínico 2 (IGF2BP2)** siendo este imprescindible para el adecuado crecimiento fetal. Por lo que podríamos plantear que la disminución de la expresión de esta proteína de unión podría relacionarse con una disminución de este factor, y este, a su vez, con una alteración en el crecimiento fetal. Esto supondría que no solo el CIR sería consecuencia de una disfunción vascular placentaria, si no que su fisiopatogenia podría abarcar otras múltiples causas. La disminución de la expresión de IGF2 en los niños con CIR, y su relación con la expresión alterada de los miRNAs ya fue descrita por Hu X y Lubo Z ([29](#)) en su estudio, demostrando su implicación en la disfunción placentaria.

El **Factor 3 Inducible por hipoxemia** es una proteína codificada por el gen HIF3. La región del mRNA que codifica la subunidad alfa de este factor (**HIF3A**) es una posible diana del **miRNA-4721**. **HIF3** juega un papel importante en la respuesta tisular adaptativa a una situación de hipoxia que conlleva alteraciones en los tejidos y órganos. Esto podría dar una explicación a la adaptación y alteraciones que se producen como consecuencia de la alteración en la perfusión de los tejidos que se producen en el CIR. Además, este factor alterado por la hipermetilación se relaciona con el Índice de Masa Corporal y el tejido adiposo, y el aumento de ambas, con el síndrome metabólico, una de las principales patologías asociadas al CIR en la edad adulta.

Además de las dianas descritas que podrían estar relacionadas de forma directa con la patogenia del CIR, podemos destacar otras cuyo resultado de la transcripción no se relaciona con las alteraciones placentarias ni vasculares descritas, pero sí podrían ser relevantes en la patogenia de diversos síndromes y enfermedades congénitas.

Entre ellas podemos destacar que **miRNA-7-1** tiene una posible diana en, **la proteína del gen 1 relacionado con el síndrome de Alport**. La delección del brazo largo del cromosoma X (Xq22.3) provoca la alteración de varios genes, entre ellos este. Este síndrome se caracteriza por alteración en la conformación de los hematíes, eliptocitosis, retraso mental e hipoplasia facial. Aunque sabemos que las alteraciones epigenéticas no provocan defectos sobre la secuencia génica de forma directa, es decir, no tiene capacidad de producir mutaciones, pero si la capacidad de desestabilizar al genoma a través de los mecanismos antes descritos, lo que si conlleva a una inestabilidad que induce un mayor riesgo de mutaciones. Con esta teoría se podría establecer una relación entre las dianas de estos miRNA y su relación de forma directa o indirecta de las alteraciones congénitas.



No sólo el síndrome de Alport en relación al miRNA-7-1 podría cumplir lo descrito, si no que otras dianas también encontradas durante el estudio de los miRNAs descritos, se relacionan con otras enfermedades congénitas. Entre ellas destacan las proteínas de la familia **Ataxina**, relacionadas con la Ataxia Espinocerebelosa. Se han descrito 6 tipos ataxina 1,2,3,7,8 y 10, relacionadas respectivamente con la Ataxia Espinocerebelosa tipo 1,2,3,7,8 y 10. Las mutaciones de los genes responsables de cada una de ellas dan lugar al desarrollo de la enfermedad. Así el **miRNA-1244-1**, **miRNA-25-3p** y **miRNA-93-5p** presentan como diana el gen que traduce para **Ataxina 1**, **miRNA-4721** y **miRNA-25-3p** para **Ataxina 7**, y este último también para **Ataxina 3**. Se podría por lo tanto plantear la posibilidad de que el tabaco o la expresión aberrante de estos miRNA estuviesen relacionada con el desarrollo de esta enfermedad congénita pero sin embargo, para poder demostrarlo sería necesario el estudio de estas expresiones aberrantes, de forma específica, en los pacientes afectados de Ataxia Espinocerebelosa para poder establecer relaciones.

Por otro lado, otra proteína de la misma familia, la **Frataxina**, está relacionada con el desarrollo de la **Ataxia de Friedreich** pero su mecanismo patogénico es diferente. Este se basa en la expansión de tripletes GAA (guanina-adenosina-adenosina) en las regiones no codificantes del **gen FXN**, provocando alteración en la expresión del mismo, dando lugar al desarrollo de la enfermedad. Este gen es diana del **miRNA-93-5p**. La **Corea de Huntington** comparte también el mismo mecanismo de expansión de tripletes, en este caso CAG (citosina-adenina-guanina) sobre las regiones no codificantes del gen que codifica esta proteína, el cual es diana del **miRNA-93-3p**. Se podría por lo tanto también establecer una hipótesis que permita la relación de estas enfermedades con la expresión alterada de los miRNAs ya que estos también proceden de regiones no codificantes.

Debemos tener en cuenta que las enfermedades con las que se relacionan los miRNAs descritos son patologías de alta morbimortalidad, que provocan una disminución de la esperanza de vida y calidad de la misma. Por lo tanto el poder establecer relaciones que permitan explicar el mecanismo fisiopatológico nos podría ayudar a desarrollar herramientas para su diagnóstico precoz, o simplemente para poder comprender como se desarrollan.

Por último, tras el análisis de las posibles dianas de estos miRNAs debemos destacar el **gen FMR1**, que produce la **proteína del retraso mental** relacionado con el **síndrome del X frágil**. El **miRNA-7-1** y **miRNA-25-3p** presenta complementariedad de bases con el **gen FMR1**, y además el **miRNA-1244-1**, **miRNA-4721** y **miRNA-25-3p** son posibles dianas del gen que codifica para la **Proteína autosómica homóloga 1 de FMR1** junto **miRNA-4721** también diana del gen de la **Proteína autosómica homóloga 2 de FMR1**. Ya existen estudios en relación a la expresión aberrante de los miRNAs y el síndrome X frágil ([23](#), [24](#)), debido a la correlación funcional de AGO1 y el gen FMR1. Tras analizar estos resultados, junto con los descritos en estas investigaciones, podríamos establecer que los miRNAs podrían jugar un papel muy importante en el desarrollo de esta enfermedad pero la falta de estudios al respecto no nos permite confirmarlo. El estudio de la alteración en la expresión de estos miRNAs ya sea, en relación a su síntesis y maduración, con respecto a la proteína AGO1, o por un mecanismo de hipermetilación que altere su expresión podría ser estudiado en los pacientes afectados de este síndrome para poder establecer estas relaciones.

Además de las principales dianas descritas, debemos destacar la importancia de la adecuada expresión de los miRNAs para un desarrollo, diferenciación y división celular, con lo cual sería lógico pensar su relación con el desarrollo de neoplasias. Este hecho, cada vez más estudiados, como hemos detallado anteriormente, aunque no se trata del objetivo de esta

investigación, sí que puede verse reflejado en nuestros resultados, ya que, tras el análisis de las dianas, numerosos oncogenes y proteínas tumorales podrían estar alteradas por las secuencias de miRNAs estudiadas. Los principales y más característicos encontrados quedan reflejados en la tabla de resultados.

Actualmente las líneas de investigación se centran, además de en establecer relación entre las diferentes familias de miRNAs y diferentes enfermedades, en la utilización de los miRNAs como herramienta de diagnóstico precoz de estas patologías, considerándose incluso previas al desarrollo de alteraciones moleculares. También se investiga su utilidad como posible diana terapéutica, ya que su expresión aberrante es potencialmente reversible.

## **7. CONCLUSIONES**

Tras la realización de este trabajo podemos establecer las siguientes conclusiones:

1. Las alteraciones epigenéticas producen alteraciones en la expresión génica sin alterar la secuencia de nucleótidos del DNA. Estos cambios son transmitidos de generación en generación, pero pueden ser reversibles y modificados por factores externos como la dieta, el tabaco y el medio ambiente.
2. Las modificaciones epigenéticas como consecuencia de la toxicidad directa del tabaco podría ser transmitida a la descendencia aumentando la probabilidad de desarrollo de enfermedades futuras relacionadas con el mismo. Además, tras el análisis de los resultados obtenidos se podría concluir que las modificaciones epigenéticas derivadas del tabaco también podrían ser útiles para explicar la relación de este con el CIR y el bajo peso al nacer.
3. La epigenética adquiere una importancia muy alta en el estudio de la patogenia de las enfermedades, sobre todo neoplásicas, influenciando en todos los escalones del desarrollo y progresión de la enfermedad.
4. Aunque el mecanismo de síntesis y maduración de los miRNAs es bien conocido, y su función también, aún no se han establecido los patrones fenotípicos derivados de su expresión aberrante tanto en su variante positiva como negativa. Sin embargo, cada día se establecen un mayor número de relaciones de influencia de estos en la patogenia de las enfermedades, sobre todo aquellos que se expresan en los tejidos de forma específica.
5. Las principales implicaciones clínicas conocidas actualmente con respecto a los miRNAs se relacionan con su influencia en el desarrollo de neoplasias.
6. La limitación principal actual con respecto al estudio de los miRNAs radica en la falta de estudios específicos que relacionen miRNA determinado con patología asociada. Esto nos lleva a concluir que, aunque los resultados de nuestro estudio son prometedores, con respecto a los miRNAs hipermetilados encontrados en niños nacidos con CIR de madre fumadora en nuestra muestra, sería imprescindible continuar con la realización de estudios de forma más específica para establecer relaciones causales entre los mismos.
7. Tras el estudio de los datos obtenidos en la investigación podemos concluir que existe una relación entre los miRNAs y la angiogénesis placentaria, pudiendo establecerse una

posible relación causal de los mismos con respecto al desarrollo de CIR en presencia de tabaco.

8. Además de las alteraciones vasculares derivadas de la expresión aberrante de los miRNAs que demuestran su relación con la disfunción placentaria vascular, también se puede concluir, tras el estudio de los resultados, que otros factores tales como el del crecimiento insulínico o directamente, el factor de crecimiento placentario, también podrían estar alterados en niños con CIR y madre fumadora.
9. La expresión alterada de diferentes miRNAs estudiados también están relacionadas con un aumento de la susceptibilidad de desarrollar otros trastornos congénitos tales como Ataxia Espinocerebelosa, la Corea de Hungtinton y el Síndrome del X Frágil. Para poder establecer esta relación sería necesario realizar un estudio de los miRNAs relacionados descritos, en pacientes afectados de estas patologías.
10. Las modificaciones epigenéticas descritas son potencialmente reversibles por lo tanto cuando comience la segunda fase de la investigación se valorará si estas alteraciones y resultados encontrados persisten en el genoma de los niños de nuestra muestra. Será entonces cuando podremos valorar si estas, han sido determinantes en el desarrollo y crecimiento de estos niños en sus dos primeros años de vida.
11. Tras el análisis de los resultados en la muestra estudiada, se puede establecer una relación causal entre el tabaco, el CIR y las alteraciones epigenéticas descritas, pero no podemos concluir que estas afirmaciones puedan ser extrapoladas al resto de la población, ya que para ello serían necesarios estudios de mayor evidencia que nos permitieran demostrar la hipótesis planteada.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Delgado-Coello BA. ¿Que es Epigenética? Ciencias. 2011; 1:p.1–10.
2. Rodríguez-dorantes M, Téllez-ascencio N, Cerbón MA, López M, Cervantes A. Metilación del DNA : un fenómeno epigenético de importancia médica. Rev invest clin. 2004; 56(1):p.56-71.
3. García R, Ayala PA, Perdomo SP. Epigenética: Definición, bases moleculares e implicaciones en la salud y en la evolución humana. Rev Ciencias la Salud. 2012; 10(1):p.59–71.
4. Juvenal G. Epigenética: vieja palabra, nuevos conceptos. RAEM. 2008; 45(5):p.66-74.
5. Portela A, Esteller M. Review Epigenetic modifications and human disease. Nat Publ Gr. 2010; 28(10):p.1057-68.
6. Kaminker P, Kaminker P. Epigenética, ciencia de la adaptación biológica heredable. Arch argent pediatr. 2007; 105(6):p.529–31.
7. Halu J. Epigenetic Studies in Human Diseases. Folia Biol. 2010; 56:p.83–96.
8. Maxson & Mitchell. The circadian eepigenome: how metabolism talks to chromatin remodeling. Physiol Behav. 2016; 176(1):p.139–48.
9. Möller-Levet CS, Archer SN, Bucca G, Laing EE, Slak A, Kabiljo R, et al. Effects of insufficient sleep on circadian rhythmicity and expression amplitude of the human blood transcriptome. Proc Natl Acad Sci. 2013; 110(12):p.1132–41.
10. Luis González Parias J, Duque Giraldo VE, Velásquez-Lopera MM. FOXP3: Controlador maestro de la generación y función de las células reguladoras naturales. SEI. 2010; 29(2):74–84.
11. Matsuyama H, Suzuki HI. Systems and synthetic microRNA biology: From biogenesis to disease pathogenesis. Int J Mol Sci. 2020; 21(1):p.1–23.
12. Treiber T, Treiber N, Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. Nat Rev Mol Cell Biol. 2019; 20(1):p.5–20.
13. Michlewski G, Cáceres JF. Post-transcriptional control of miRNA biogenesis. Rna. 2019; 25(1):p.1–16.
14. Pong SK, Gullerova M. Noncanonical functions of microRNA pathway enzymes – Drosha, DGCR8, Dicer and Ago proteins. FEBS Lett. 2018; 592(17):p.2973–86.
15. Kim YK, Kim B, Kim VN. Re-evaluation of the roles of DROSHA, Exportin 5, and DICER in microRNA biogenesis. Proc Natl Acad Sci. 2016; 113(13):p.1881–89.
16. Benjamin M. Davis, Glen F. Rall MJS. Early Second-Trimester Fetal Growth Restriction and Adverse Perinatal Outcomes. Physiol Behav. 2017; 176(1):p.139–48.
17. Inui M, Martello G, Piccolo S. MicroRNA control of signal transduction. Nat Rev Mol Cell Biol. 2010; 11(4):p.252–63.
18. Markus T, Czapinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. Rna. 2004; 10(2):p.185-91.
19. Stavast CJ, Erkeland SJ. The Non-Canonical Aspects of MicroRNAs: Many Roads to Gene Regulation. Cells. 2019; 8(11):1465.
20. Finnegan EF, Pasquinelli AE. MicroRNA biogenesis: Regulating the regulators. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2013; 48(1):p.51–68.

21. Lund E, Dahlberg JE. Substrate selectivity of exportin 5 and Dicer in the biogenesis of microRNAs. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2006; 71:p.59–66.
22. London L. Motivator and Barriers to Latina’s Participation in Clinical Trials. *Contemp C.* 2015; 40:p.3–14.
23. Soifer HS, Rossi JJ, Sætrom P. MicroRNAs in disease and potential therapeutic applications. *Mol Ther.* 2007; 15(12):p.2070–79.
24. Jin P, ZRNAescu DC, Ceman S, Nakamoto M, Mowrey J, Jongens TA, et al. Biochemical and genetic interaction between the fragile X mental retardation protein 3nd the microRNA pathway. *Nat Neurosci.* 2004; 7(2):p.113–17.
25. Hata A, Kashima R. Dysregulation of microRNA biogenesis machinery in cancer. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2016; 51(3):p.121–34.
26. Perkins DO, Jeffries CD, Jarskog LF, Thomson JM, Woods K, Newman MA, et al. microRNA expression in the prefrontal cortex of individuals with schizophrenia and schizoaffective disorder. *Genome Biol.* 2007; 8(2).
27. Tseng AM, Mahnke AH, Wells AB, Salem NA, Allan AM, Roberts VHJ, et al. Maternal circulating miRNAs that predict infant FASD outcomes influence placental maturation. *Life Sci Alliance.* 2019; 2(2):p.1–22.
28. Goyal D, Limesand SW, Goyal R. Epigenetic responses and the developmental origins of health and disease. *J Endocrinol.* 2019; 242(1):p.105–19.
29. Hu X, Lubo Z. MicroRNAs in Uteroplacental Vascular Dysfunction. *Cells.* 2019; 8(11):1344.
30. Hromikova I, Kotlabova K, Ondrackova M, Kestlerova A, Novotna V, Hympanova L, et al. Circulating C19MC MicroRNAs in preeclampsia, gestational hypertension, and fetal growth restriction. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013.
31. Sebastián F., David J., Orlenis M., Gil MA. Tabaquismo materno como factor posiblemente implicado en el desarrollo de la obesidad infantil. *Rev chil obstet ginecol.* 2016; 81(6):p.526-33.
32. Luo J, Fan Y, Shen L, Niu L, Zhao Y, Jiang D, et al. The pro-angiogenesis of exosomes derived from umbilical cord blood of intrauterine growth restriction pigs was repressed associated with MiRNAs. *Int J Biol Sci.* 2018; 14(11):p.1426–36.
33. Markunas CA, Xu Z, Harlid S, Wade PA, Lie RT, Taylor JA, et al. Identification of DNA methylation changes in newborns related to maternal smoking during pregnancy. *Environ Health Perspect.* 2014; 122(10):p.1147–53.
34. Shen L, Waterland Robert A. Methods of DNA methylation analysis. *Curr Opin Clin Nutri.* 2007; 10(5):p.576-81.
35. Lv Y, Fu L, Zhang Z, Gu W, Luo X, Zhong Y, et al. Increased expression of microRNA-206 inhibits potassium voltage-gated channel subfamily a member 5 in pulmonary arterial smooth muscle cells and is related to exaggerated pulmonary artery hypertension following intrauterine growth retardation in rats. *J Am Heart Assoc.* 2019; 8(2):p.1–13.
36. Li Y, Liu J. MicroRNA-206 predicts raised fetal growth retardation risk through the interaction with vascular endothelial growth factor in pregnancies. *Med.* 2020; 99(7).

BASES DE DATOS UTILIZADAS:

1. Orpha.net: Portal de información de enfermedades raras y medicamentos huérfanos [Internet]. Paris: Orphanet; 2000. Disponible en: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease\\_Search.php?lng=ES](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=ES)
2. miRBase: The microRNA database [Internet]. Manchester: University of Manchester; 2018. Disponible en: <http://www.mirbase.org/>
3. miRDB: an online database for prediction of funcional microRNA target [Internet]. Washington: Xiaowei Wang's lab at the Department of Radiation Oncology, Washington Univeristy School of Medicine; 2008. Disponible en: <http://mirdb.org/>
4. NCBI: National Center for Biotechnology Information [Internet]. US: National Library of Medicine; 1988. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>



## 9. ANEXOS

### 9.1. ANEXO 1: Búsqueda en miRBase.

Puedes realizar la búsqueda desde la página inicial de la web o desde la barra de herramientas.



The screenshot shows the miRBase website interface. At the top left is the miRBase logo, and at the top right is the University of Manchester logo. A navigation bar contains links for Home, Search, Browse, Help, Download, Blog, and Submit. Below the navigation bar, there are three main sections: 'Latest miRBase blog posts', 'miRNA count: 38589 entries', and 'Search by miRNA name or keyword'. The 'Search by miRNA name or keyword' section has a search input field containing 'hsa-mir-7-1' and buttons for 'Go' and 'Example'. Below this is a section for 'Download published miRNA data' with links for 'Download page' and 'FTP site'.

## miRBase: the microRNA database

miRBase provides the following services:

- The [miRBase database](#) is a searchable database of published miRNA sequences and annotation. Each entry in the miRBase Sequence database represents a predicted hairpin portion of a miRNA transcript (termed mir in the database), with information on the location and sequence of the mature miRNA sequence (termed miR). Both hairpin and mature sequences are available for [searching](#) and [browsing](#), and entries can also be retrieved by name, keyword, references and annotation. All sequence and annotation data are also [available for download](#).
- The [miRBase Registry](#) provides miRNA gene hunters with unique names for novel miRNA genes prior to publication of results. Visit the [help pages](#) for more information about the naming service.

To receive email notification of data updates and feature changes please subscribe to the [miRBase announcements mailing list](#). Any queries about the website or naming service should be directed at [mirbase@manchester.ac.uk](mailto:mirbase@manchester.ac.uk).

miRBase is managed by the [Griffiths-Jones lab](#) at the [Faculty of Biology, Medicine and Health, University of Manchester](#) with funding from the [BBSRC](#). miRBase was previously hosted and supported by the [Wellcome Trust Sanger Institute](#).

### References

**If you make use of the data presented here, please cite the following articles in addition to the primary data sources:**

[miRBase: from microRNA sequences to function.](#)

Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S.

Nucleic Acids Res 2019 47:D155-D162

[miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data.](#)

Kozomara A, Griffiths-Jones S.

Nucleic Acids Res 2014 42:D68-D73

Si realizas la búsqueda desde la barra de herramientas puedes acotarla más o realizar la búsqueda con otros criterios diferentes al nombre como por ejemplo la especie, el tejido en el que se expresa o la secuencia de la que procede.

### By genomic location

Select organism, chromosome and start and end coordinates. Leave the start/end boxes blank to retrieve all miRNAs on the selected chromosome.

Choose species:  Chr:  Start:  End:

### For clusters

Select organism and the desired inter-miRNA distance.

Choose species:  Inter-miRNA distance:

### By tissue expression

Select organism and tissue.

Choose species:  Select tissue:

### By sequence

#### Single sequence searches:

Paste a sequence here to search for similarity with miRBase miRNA sequences (**max size 1000 nts**). You can choose to search against hairpin precursor sequences or mature miRNAs. This search may take a few minutes. Please note: this facility is designed to search for homologs of microRNA sequences, **not to predict their target sites**. For target site prediction, please use [the available bespoke tools](#).

<input type="text"/>	<b>Search sequences:</b> <input type="text" value="Mature miRNAs"/>
	<b>Search method:</b> <input type="text" value="BLASTN"/>
	Choose BLASTN to search for a miRNA homolog in a longer sequence. SSEARCH is useful for finding a short sequence within the library of miRNAs (for instance, find a short motif in a miRNA or precursor stem-loop, or find mature sequences that are related to your query).
	<b>E-value cutoff:</b> <input type="text" value="10"/>
	<b>Maximum no. of hits:</b> <input type="text" value="100"/>
	<b>Show results only from specific organisms:</b> <input type="checkbox"/> human <input type="checkbox"/> mouse <input type="checkbox"/> worm <input type="checkbox"/> fly <input type="checkbox"/> Arabidopsis or choose a taxonomic classification: <input type="text" value="No species filter"/>

**Or:** Select the sequence file you wish to use

## Search miRBase


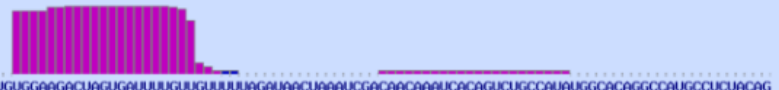
### By miRNA identifier or keyword

Enter a miRNA accession, name or keyword:

Tras la realización de la búsqueda aparece la página inicial. La primera imagen que aparece hace referencia al registro de la horquilla de la que procede el miRNA maduro. Aparecen datos acerca del gen del que procede (tales como localización, comienzo y fin de la secuencia, especie...) y las características del mismo, además de los enlaces a las principales bases de datos de genes como HGNC o Entrezgene.



## Stem-loop sequence hsa-mir-7-1

Accession	MI0000263 ( <a href="#">change log</a> )
Symbol	<a href="#">HGNC:MIR7-1</a>
Description	<b>homo sapiens</b> miR-7-1 stem-loop
Gene family	MIPF0000022; <a href="#">mir-7</a>
Literature search	 <a href="#">342 open access papers</a> mention hsa-mir-7-1 (2052 sentences)
Stem-loop	<pre> --u  u -   a  u      a  a      u      --   a 5'   ugga gu  uggccu gu  cugug<u>ugg agacu guguuu guuguu</u>  uuua<u>g</u> u   3'   aucu cg  accgga ca  ggu<u>auacc ucuga cacuaaa caacag</u>  aaau<u>c</u> a       gac  c  u      -  c      g      -      -      cu  a           </pre> <p><a href="#">Get sequence</a></p>
Deep sequencing	<a href="#">1208991</a> reads, <a href="#">3.66e+03</a> reads per million, 162 experiments 
Confidence	Annotation confidence: high Feedback: Do you believe this miRNA is real? <input type="button" value="Yes (+35)"/> <input type="button" value="No (-1)"/> <input type="button" value="Leave comment"/>
Comments	This human miRNA was predicted by computational methods using conservation with mouse and Fugu rubripes sequences [1]. Expression of the excised miR has been validated in zebrafish, and the 5' end mapped by PCR. Landgraf et al. confirm expression in human [2]. The mature sequence shown here represents the most commonly cloned form from large-scale cloning studies [2].
Genome context	<a href="#">Coordinates (GRCh38; GCA_000001405.15)</a> chr9: 83969748-83969857 [-]
Database links	EntrezGene: <a href="#">MIR7-1</a> HGNC: <a href="#">MIR7-1</a> RNAcentral: <a href="#">URS00002C5007_9606</a> Rfam: <a href="#">mir-7</a> miRBase Tracker: <a href="#">MI0000263</a>

Debajo aparecen las características del miRNA maduro, su secuencia final, sus datos de identificación y el RNA central del que procede.

## Mature sequence hsa-miR-7-5p

Accession	<a href="#">MIMAT0000252</a>
Previous IDs	<a href="#">hsa-miR-7</a>
Sequence	24 - <u>uggaagacugugauuuuguuguu</u> - 47 <a href="#">Get sequence</a>
Deep sequencing	<a href="#">3423555</a> reads, 162 experiments
Evidence	experimental; cloned [2-3]
Database links	RNAcentral: <a href="#">URS0000591950_9606</a>
Predicted targets	TargetMiner: <a href="#">hsa-miR-7-5p</a> TargetScanVert: <a href="#">hsa-miR-7-5p</a> miRDB: <a href="#">hsa-miR-7-5p</a> microrna.org: <a href="#">hsa-miR-7-5p</a>

También aparecen enlaces a las principales webs dedicadas a su estudio, como por ejemplo miRDB (Anexo2). Por último, aparecen referencias donde este miRNA ha sido citado que pueden ser consultadas.

Todas las secuencias registradas están disponibles para ser descargadas.

## 9.2. ANEXO 2: Búsqueda en miRDB

MirRBD es una base de datos disponible online. En ella podemos realizar una búsqueda de las posibles dianas de los diferentes miRNAs a través de la complementariedad de bases de las secuencias experimentales o clonadas de estos mediante análisis computacional.

miRDB

Choose one of the following search options:

**Search by miRNA name**

Human ▾ hsa-mir-7-1 Go Clear

**Search by gene target**

Human ▾ Gene Symbol ▾ Go Clear

miRDB is an online database for miRNA target prediction and functional annotations. All the targets in miRDB were predicted by a bioinformatics tool, MirTarget, which was developed by analyzing thousands of miRNA-target interactions from high-throughput sequencing experiments. Common features associated with miRNA binding and target downregulation have been identified and used to predict miRNA targets with machine learning methods. miRDB hosts predicted miRNA targets in five species: human, mouse, rat, dog and chicken. Users may also provide their own sequences for custom target prediction using the updated prediction algorithm. In addition, through combined computational analyses and literature mining, functionally active miRNAs in humans and mice were identified. These miRNAs, as well as associated functional annotations, are presented in the FuncMir Collection in miRDB. As a recent update, miRDB presents the expression profiles of hundreds of cell lines and the user may limit their search for miRNA targets that are expressed in a cell line of interest. To facilitate the prediction of miRNA functions, miRDB presents a new web interface for integrative analysis of target prediction and Gene Ontology data.

Esta búsqueda puede realizarse a través del nombre del miRNA a estudio, estableciendo las posibles dianas del mismo. Tras la búsqueda aparecen el número total de dianas posibles junto con la puntuación que establece la base de datos según el porcentaje de posibilidad como diana, ordenándolos con este criterio. A su vez se pueden obtener detalles de la posible diana, así como el estudio del gen con el que se relaciona.

Si pinchas sobre cualquiera de ellos aparece la secuencia a la que pertenece, señalando en azul las regiones complementarias, así como el acceso a NCBI del gen en cuestión. Además también aparece la secuencia miRNA madura de la que procede.

There are **2037** predicted targets for hsa-miR-7-1-3p in miRDB.

Target Rank	Target Score	miRNA Name	Gene Symbol	Gene Description
1	100	hsa-miR-7-1-3p	<b>RIMKLB</b>	ribosomal modification protein rimK like family member B
2	100	hsa-miR-7-1-3p	CEP170	centrosomal protein 170
3	100	hsa-miR-7-1-3p	OTUD6B	OTU domain containing 6B
4	100	hsa-miR-7-1-3p	C2orf69	chromosome 2 open reading frame 69
5	100	hsa-miR-7-1-3p	CCNG2	cyclin G2
6	100	hsa-miR-7-1-3p	TENT5A	terminal nucleotidyltransferase 5A
7	100	hsa-miR-7-1-3p	GUCY1A2	guanylate cyclase 1 soluble subunit alpha 2
8	100	hsa-miR-7-1-3p	MINDY2	MINDY lysine 48 deubiquitinase 2
9	100	hsa-miR-7-1-3p	CTDSPL2	CTD small phosphatase like 2
10	99	hsa-miR-7-1-3p	ZFXH3	zinc finger homeobox 3
11	99	hsa-miR-7-1-3p	VGLL3	vestigial like family member 3
12	99	hsa-miR-7-1-3p	FBXO30	F-box protein 30
13	99	hsa-miR-7-1-3p	BCAP29	B cell receptor associated protein 29
14	99	hsa-miR-7-1-3p	TPD52L1	TPD52 like 1
15	99	hsa-miR-7-1-3p	PDE5A	phosphodiesterase 5A
16	99	hsa-miR-7-1-3p	BCL11A	BCL11A, BAF complex component
17	99	hsa-miR-7-1-3p	FOXN2	forkhead box N2
18	99	hsa-miR-7-1-3p	NEUROD6	neuronal differentiation 6
19	99	hsa-miR-7-1-3p	GMFB	glia maturation factor beta
20	99	hsa-miR-7-1-3p	EEF1E1	eukaryotic translation elongation factor 1 epsilon 1
21	99	hsa-miR-7-1-3p	GOLGA7	golgin A7
22	99	hsa-miR-7-1-3p	ATL2	atlastin GTPase 2

### MicroRNA and Target Gene Description:

miRNA Name	<a href="#">hsa-miR-7-1-3p</a>	miRNA Sequence	CAACAAAUCACAGUCUGCCAU
Previous Name	hsa-miR-7-1*		
Target Score	100	Seed Location	739, 882, 1902, 3123, 3318, 3347
NCBI Gene ID	<b>57494</b>	GenBank Accession	<a href="#">NM_020734</a>
Gene Symbol	RIMKLB	3' UTR Length	3407
Gene Description	ribosomal modification protein rimK like family member B		

### 3' UTR Sequence

```

1 ctccactggt aattaaccaa caaaaccctt gtaaaacttt ctttctctt ttctatnttt
61 aaaaccaact tgcaatgctg ttcattggagg atgctcagga agatgagaga aaattagtag
121 gattagttgg agagagtggg agatagatga gacctctgct agtaagatgt tactttcatt
181 tacaatcctt acaaatagag aggcagaata ggtggggtat agaaaaatgt caggctctca
241 tagttaccct tttaaattgc taaaaaatgt gtagctcat aggcctatgag gaacaataac
301 tttttttttt tcatggtccc ttgcttttgt tttgtacaa aaaaaaatgg tttgctaca
361 aatatccaag tagcataact tcacattgtg ttggaagatt tgtcatcagt gaggaaaaa
421 tctgcataaa ttacaggaat ttttgatata tacagctctg aaaaattctgc catttctta
481 ttaactagca gcttttagtt gtagtttatg aaactctgag gggctctttt actgggattt
541 cttatntttt tgttttttcc cgcctaatat ggtgggaggc caaattgaat ataaccaat
601 aaaggcttct taatgacaaa attggcatgt ttgcatgatg aaatggaaat gaacagtatt
661 gcaatgtccg gtatacaaaa ttttttaaat tcaatgtaga taaaattaca ctagttaaaa
721 atatgtgcat tcaatttatg ttgttagtga ttttagtcttt tttgaaagat gtgctctggt
781 aatgttgctt ttttttttcc ttttttttca tgctagtctc caattttctg tctatgctt
841 gcatctttaa caatggccaa agtgaagaaa atgctacctt ttttgtaaac agacactga
901 cttgaaacat gtacatttaa agccttttat tttttccctt tttgttttgg tagttgggca
961 ttttaataag gacaaggaaa aatatttttg ggggcaaatc aagagcctat gaggttctaag
  
```

La búsqueda también puede realizarse a la inversa, es decir, puedes comenzar la búsqueda introduciendo el gen que deseas estudiar obteniendo las secuencias miRNAs posibles relacionadas.



- [Target Search](#)
- [Target Expression](#)
- [Target Ontology](#)
- [Target Mining](#)
- [Custom Prediction](#)
- [FuncMir Collection](#)
- [Data Download](#)
- [Statistics](#)
- [Help | FAQ](#)
- [Comments](#)
- [Citation | Policy](#)

Choose one of the following search options:

**Search by miRNA name**

Human

---

**Search by gene target**

Human

miRDB is an online database for miRNA target prediction and functional annotations. All the targets in miRDB were predicted by a bioinformatics tool, MirTarget, which was developed by analyzing thousands of miRNA-target interactions from high-throughput sequencing experiments. Common features associated with miRNA binding and target downregulation have been identified and used to predict miRNA targets with machine learning methods. miRDB hosts predicted miRNA targets in five species: human, mouse, rat, dog and chicken. Users may also provide their own sequences for custom target prediction using the updated prediction algorithm. In addition, through combined computational analyses and literature mining, functionally active miRNAs in humans and mice were identified. These miRNAs, as well as associated functional annotations, are presented in the FuncMir Collection in miRDB. As a recent update, miRDB presents the expression profiles of hundreds of cell lines and the user may limit their search for miRNA targets that are expressed in a cell line of interest. To facilitate the prediction of miRNA functions, miRDB presents a new web interface for integrative analysis of target prediction and Gene Ontology data.



**Gene 57494** is predicted to be targeted by 276 miRNAs in miRDB.

Target Detail	Target Rank	Target Score	miRNA Name	Gene Symbol	Gene Description
<a href="#">Details</a>	1	100	<a href="#">hsa-miR-7-1-3p</a>	RIMKLB	ribosomal modification protein rimK like family member B
<a href="#">Details</a>	2	100	<a href="#">hsa-miR-7-2-3p</a>	RIMKLB	ribosomal modification protein rimK like family member B
<a href="#">Details</a>	3	99	<a href="#">hsa-miR-5688</a>	RIMKLB	ribosomal modification protein rimK like family member B
<a href="#">Details</a>	4	99	<a href="#">hsa-miR-3613-3p</a>	RIMKLB	ribosomal modification protein rimK like family member B
<a href="#">Details</a>	5	99	<a href="#">hsa-miR-4789-3p</a>	RIMKLB	ribosomal modification protein rimK like family member B
<a href="#">Details</a>	6	99	<a href="#">hsa-miR-3148</a>	RIMKLB	ribosomal modification protein rimK like family member B
<a href="#">Details</a>	7	99	<a href="#">hsa-miR-495-3p</a>	RIMKLB	ribosomal modification protein rimK like family member B
<a href="#">Details</a>	8	98	<a href="#">hsa-miR-320a-5p</a>	RIMKLB	ribosomal modification protein rimK like family member B
<a href="#">Details</a>	9	98	<a href="#">hsa-miR-6833-3p</a>	RIMKLB	ribosomal modification protein rimK like family member B
<a href="#">Details</a>	10	98	<a href="#">hsa-miR-548aj-3p</a>	RIMKLB	ribosomal modification protein rimK like family member B
<a href="#">Details</a>	11	98	<a href="#">hsa-miR-4666a-3p</a>	RIMKLB	ribosomal modification protein rimK like family member B
<a href="#">Details</a>	12	98	<a href="#">hsa-miR-3121-3p</a>	RIMKLB	ribosomal modification protein rimK like family member B
<a href="#">Details</a>	13	98	<a href="#">hsa-miR-548x-3p</a>	RIMKLB	ribosomal modification protein rimK like family member B
<a href="#">Details</a>	14	98	<a href="#">hsa-miR-548e-5p</a>	RIMKLB	ribosomal modification protein rimK like family member B
<a href="#">Details</a>	15	97	<a href="#">hsa-miR-6853-3p</a>	RIMKLB	ribosomal modification protein rimK like family member B
<a href="#">Details</a>	16	97	<a href="#">hsa-miR-548j-3p</a>	RIMKLB	ribosomal modification protein rimK like family member B
<a href="#">Details</a>	17	97	<a href="#">hsa-miR-548aq-3p</a>	RIMKLB	ribosomal modification protein rimK like family member B