



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Expresión diferencial del miR-30b en diferentes tejidos de
un modelo murino de menopausia experimental.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Gil Ruiz, Teresa

Tutor/a: Porcel Roldán, Rosa Caridad

Cotutor/a externo: NOVELLA DEL CAMPO, SUSANA

Director/a Experimental: PEREZ CREMADES, DANIEL BERNARDO

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) constituyen la principal causa de morbilidad y mortalidad tanto en hombres como en mujeres. Sin embargo, existen diferencias específicas de sexo en cuanto prevalencia, incidencia y pronóstico. Dichas diferencias pueden deberse al papel cardioprotector que presentan las principales hormonas femeninas, los estrógenos dado que las mujeres en edad fértil presentan una menor incidencia de ECV que los hombres de su misma edad. El riesgo cardiovascular aumenta con la aparición de la menopausia, es decir, con el inicio del climaterio y la consecuente disminución de los niveles de estrógenos. Las consecuencias fisiológicas de la menopausia se han podido evaluar a través del desarrollo de modelos animales experimentales, siendo la extirpación quirúrgica de los ovarios, denominada ovariectomía, la técnica de referencia para estudiar el efecto de la privación de hormonas ováricas en el campo preclínico.

Los estrógenos, y más concretamente el 17β -estradiol (E2), contribuyen a la regulación de la función vascular mediante mecanismos genómicos y epigenéticos. Dentro de los mecanismos de regulación activados por los estrógenos, destaca el papel mediador de una clase de RNAs no codificantes, los miRNAs. Mir-30b-5p pertenece al grupo de miRNAs sensibles a los niveles de estrógenos. Destaca por su implicación en la regulación de la angiogénesis, inflamación y apoptosis, todas ellas rutas relacionadas con el mantenimiento de la función cardiovascular.

El presente trabajo pretende analizar la implicación de los estrógenos sobre la expresión de miR-30b-5p a través de un ensayo RT-PCR realizado en diversos tejidos de ratones hembra y macho. Además, se analiza la expresión del miRNA en el corazón de un modelo murino de menopausia experimental, para determinar los efectos que tiene la ausencia de estrógenos inducida a través de la ovariectomía. En definitiva, se intenta comprender la implicación de miR-30b-5p en la acción cardioprotectora atribuida a los estrógenos, combinando el manejo de herramientas bioinformáticas con la realización de ensayos de expresión *in vitro*.

Este trabajo se relaciona con el Objetivo de Desarrollo Sostenible (ODS) de Salud y Bienestar (ODS 3) de la Agenda 2030, que propone: "garantizar una vida sana y promover el bienestar para todos en todas las edades".

PALABRAS CLAVE

MiR-30b; menopausia; estrógenos; estradiol, ovariectomía; qPCR.

Autor del TFG

Dña. Teresa Gil Ruiz

Tutor Académico

Prof. Dña. Rosa Caridad Porcel Roldán

Cotutor

Dña. Susana Novella Del Campo

Cotutor colaborador

D. Daniel Bernardo Pérez Cremades

Valencia, Junio de 2023

ABSTRACT

Cardiovascular diseases (CVD) are the leading cause of morbidity and mortality in both men and women. However, there are sex-specific differences in prevalence, incidence and prognosis. These differences may be due to the cardio-protective role of the main female hormones, estrogens, since women of fertile age have a lower incidence of CVD than men of the same age. Cardiovascular risk increases with the onset of menopause, that is, with the beginning of climacteric maturity and the consequent decrease in estrogen levels. The physiological consequences of the menopause have been evaluated through the development of experimental animal models, where the surgical removal of the ovaries, known as oophorectomy, is the reference technique for studying the effect of ovarian hormone deprivation in the preclinical field.

Estrogens, and more specifically 17 β -estradiol (E2), contribute to the regulation of vascular function through genomic and epigenetic mechanisms. Among the regulatory mechanisms activated by estrogens, stands out the mediating role of a class of non-coding RNAs, the miRNAs. Mir-30b-5p belongs to the group of miRNAs sensitive to estrogen levels. It is notable for its involvement in the regulation of angiogenesis, inflammation and apoptosis, all of which are pathways related to the maintenance of cardiovascular function.

The present work aims to analyse the involvement of estrogens in the expression of miR-30b-5p by means of an RT-PCR assay carried out in various tissues of female and male mice. In addition, miRNA expression in the heart of a murine model of experimental menopause is analysed to determine the effects of oophorectomy-induced estrogen deprivation. Ultimately, the aim is to understand the involvement of miR-30b-5p in the cardioprotective action attributed to estrogens, combining the use of bioinformatics tools with in vitro expression assays.

This work is related to the Sustainable Development Goal (SDG) on Health and Well-being (SDG 3) of the 2030 Agenda, which proposes to "ensure healthy lives and promote well-being for all at all ages".

KEY WORDS

MiR-30b; menopause; estrogens; estradiol; oophorectomy; qPCR.

FINANCIACIÓN

Este trabajo ha sido financiado por el, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad (FIS 19/1714 y FIS 22/1083) y la Generalitat Valenciana (CIAICO 2021/211).

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar las gracias a todas las personas que me han acompañado durante la realización de este trabajo.

Gracias a Susana por darme la oportunidad de formar parte del grupo de investigación LINCE y por proponerme llevar a cabo este proyecto. Agradezco toda la confianza que ha depositado en mí desde el primer momento.

Gracias a Daniel por supervisarme y guiarme a lo largo de toda mi estancia.

También me gustaría agradecer el apoyo recibido por parte de mis compañeras de laboratorio. Que han sido pacientes y me han ayudado a continuar aprendiendo. Su presencia ha hecho que mi estancia en el grupo de los “lince” sea inolvidable.

Gracias a mi familia por estar presente en los momentos más críticos de la carrera.

Por último, quisiera agradecer a mis amigas de la universidad todo su apoyo, atención y cariño. Pues no solo han sido compañeras de carrera, sino también de vida.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1. La acción cardioprotectora de los estrógenos.	1
1.2. Efectos cardiovasculares de la menopausia.	2
1.3. Los microRNAs regulados por estrógenos y el envejecimiento vascular.	4
1.3.1. MiR-30b: un microRNA regulado por estrógenos.	5
1.4. Análisis de los perfiles de expresión de los miRNAs.	7
1.5. Aproximaciones In Silico en el estudio de miRNAs.....	8
2. Objetivo:.....	8
3. Materiales y Métodos	9
3.1. Análisis bioinformáticos	9
3.1.1. Estudio de miR-30b-5p.	9
3.1.2. Identificación de factores de transcripción reguladores del miR-30b-5p.	9
3.1.3. Predicción de los genes diana del miR-30b-5p.	9
3.1.4. Anotación funcional de miR-30b-5p.	10
3.2. Análisis <i>in vitro</i> de hsa-miR-30b-5p	10
3.2.1. Animales del estudio.	10
3.2.2. Modelo experimental de menopausia.....	11
3.2.3. Extracción de RNA de tejidos.	12
3.2.4. Cuantificación de la expresión de hsa-miR-30b-5p.	13
3.2.5. Determinación de la expresión de NOS3.	16
3.2.6. Análisis estadísticos.	16
4. Resultados	16
4.1. Estudio bioinformático de miR-30b.....	16
4.1.1. Secuencias de hsa-miR-30b-5p y mmu-miR-30b-5p.	16
4.1.2. Genes dianas de miR-30b-5p.	17
4.1.3. Factores de transcripción reguladores del miR-30b.	18
4.1.4. Rutas biológicas reguladas por miR-30b.....	19
4.2. Expresión de miR-30b-5p en diferentes tejidos murinos.	22
4.3. Expresión de miR-30b-5p en el modelo murino de menopausia.	23
4.4. Validación del origen de las muestras analizadas.....	25
5. Discusión	26
5.1. Limitaciones del estudio	27
6. Conclusión.....	27
6.1. Proyecciones futuras	28
7. Anexo I	29
8. Bibliografía	31

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Miembros de la familia miR-30 y su localización genómica

Figura 2. Vía canónica de biogénesis de miR-30b-5p

Figura 3. Descripción del ensayo RT-qPCR

Figura 4. Diagramas de Venn obtenidos a partir de las dianas predichas a través de miRDB, TargetScan y microT-CDS

Figura 5. Factores de transcripción que regulan la expresión de hsa-miR-30b-5p

Figura 6. Procesos biológicos asociados en humanos a los genes diana de miR-30b-5p

Figura 7. Rutas KEGG asociadas en humanos a los genes diana de miR-30b-5p

Figura 8. Expresión génica de hsa-miR-30b-5p mediante qPCR en tejidos de ratones SAMR1 macho y hembra

Figura 9. Expresión diferencial de hsa-miR-30b-5p mediante qPCR en tejidos de ratones SAMR1 macho y hembra

Figura 10. Expresión génica de hsa-miR-30b-5p mediante qPCR en corazones de ratonas SAMR1 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx, Ove)

Figura 11. Expresión génica de eNOS mediante qPCR en corazones de ratonas de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx, Ove)

Tabla 1. Condiciones térmicas de la qPCR realizada en QuantStudio 5.

Tabla 2. Secuencias del miR-30b-5p obtenidas a partir de miRBase.

Tabla 3. Factores de transcripción con sitios de unión en el promotor de hsa-miR-30b obtenidos de la base de datos TransmiR v2.0

Tabla 4. Factores de transcripción con sitios de unión en el promotor de mmu-miR-30b obtenidos de la base de datos TransmiR v2.0

Tabla S1. Procesos biológicos asociados en humanos a los genes diana del miR-30b-5p predichos mediante miRDB, TargetScan y microT-CDS

Tabla S2. Rutas KEGG asociadas en humanos a los genes diana del miR-30b-5p predichos mediante miRDB, TargetScan y microT-CDS

ABREVIATURAS

cDNA	DNA complementario
CDS	Región de codificación
CT	Ciclo umbral de la qPCR
DMSO	Dimetilsulfóxido
E1	Estrona
E2	17 β -estradiol
E3	Estriol
E4	Estretol
ECV	Enfermedades cardiovasculares
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
ER	Receptores de estrógeno
ERE	Elementos de respuesta al estrógeno
FT	Factor de transcripción
GAPDH	Enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
Hcy	Homocisteína
miRNA	microRNA
MRE	Elementos de respuesta a microRNA
mRNA	RNA mensajero
NO	Óxido nítrico
ODS	Objetivo de Desarrollo Sostenible
OMS	Organización Mundial de la Salud
OvE	Ovariectomía y tratamiento con E2
Ovx	Ovariectomía
qPCR	PCR cuantitativa
ROS	Especies Reactivas del Oxígeno
RT	Transcripción inversa
RT-PCR	Reacción en cadena polimerasa de transcripción inversa
Sham	Control de la cirugía ovariectomía
snRNA	RNA nuclear pequeño
snRNP	Proteína ribonuclear pequeña
UTR	Región no traducida

1. Introducción

1.1. La acción cardioprotectora de los estrógenos.

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) se erigen actualmente como la principal causa de morbilidad y mortalidad tanto en hombres como en mujeres, sin embargo, existe disparidad sexual en su desarrollo. Numerosos estudios han demostrado que las ECV difieren según el sexo en cuanto prevalencia, incidencia y pronóstico (Hayward, 2000).

Las mujeres en edad fértil presentan una menor incidencia de enfermedades cardiovasculares que los hombres de su misma edad, sin embargo, el riesgo cardiovascular aumenta con la aparición de la menopausia (Virani et al., 2021). En mujeres postmenopáusicas, la incidencia de ECV llega a cuadruplicarse con respecto a mujeres premenopáusicas (Lerner & Kannel, 1986), debido a la falta de estrógenos que caracteriza a este proceso fisiológico (Newson, 2018).

Los estrógenos son hormonas sexuales esteroideas femeninas que desempeñan un papel importante en el desarrollo sexual y reproductivo de las mujeres. En mujeres premenopáusicas, los estrógenos se producen principalmente en los ovarios, el cuerpo lúteo y la placenta. Aunque, también pueden sintetizarse en órganos no gonadales como el cerebro, el hígado, el corazón o la piel. El estradiol, 17β -estradiol, se considera la principal hormona circulante femenina y es el estrógeno más potente durante el período premenopáusico en la vida de una mujer. A pesar de ser el estradiol (E2) la forma más abundante, también se producen otras dos formas naturales de estrógenos circulantes -estrona (E1) y estriol (E3)-, mientras que una tercera forma -estetrol (E4)- sólo se produce durante el embarazo. E1 desempeña un papel más importante después de la menopausia, cuando es sintetizada en el tejido adiposo a partir de la dehidroepiandrosterona suprarrenal. E3 es el estrógeno menos potente y se forma a partir de E1 a través de la 16α -hidroxilación, juega un papel más importante durante el embarazo cuando la placenta lo produce en grandes cantidades (Iorga et al., 2017).

El E2 producido por los ovarios durante etapa reproductiva de una mujer actúa en gran medida como un factor endocrino que afecta a los tejidos distales. Sin embargo, el E2 sintetizado por otro tipo de tejidos periféricos es capaz de ejercer su acción de manera local, como un factor paracrino o autocrino. Diversos tejidos son capaces de producir E2 a través de la conversión de andrógenos mediada por la enzima aromataasa. Por ejemplo, los tejidos adiposos, cerebrales y óseos, así como el endotelio vascular y las células musculares lisas del sistema circulatorio. Dicha síntesis extragonadal, constituye la única fuente de producción endógena de E2 en mujeres postmenopáusicas y hombres (Iorga et al., 2017). Además, durante el cese de la función ovárica en la menopausia o tras una ovariectomía quirúrgica, la E1 producida en los tejidos periféricos, se convierte en la principal forma de estrógeno circulante (Davezac et al., 2021).

Por tanto, el estado reproductivo del individuo determina la producción de estrógenos, que alcanza su punto más álgido durante los años reproductivos y disminuye durante la transición y el período posmenopáusico (Shapiro, 2012).

Los estrógenos, principalmente el E2, son capaces de modular el sistema cardiovascular mediante mecanismos genómicos y no genómicos, bien directamente actuando sobre las células vasculares e inflamatorias a través de los receptores de estrógeno (ER, de sus siglas en inglés), o indirectamente a través de efectos sistémicos (Pérez-Cremades et al., 2018a).

En el primer caso, el E2 se une a los ER en lo que se conoce como mecanismo "clásico", y forman un complejo regulador capaz de mediar la transcripción de los factores vasoactivos derivados del endotelio (Pérez-Cremades et al., 2018a). Por el momento, se han identificado tres ER, ER α , ER β y el receptor de estrógeno 1 acoplado a proteína G (GPER) ((Barton et al., 2018). Las dos isoformas clásicas -ER α y ER β - se expresan en el endotelio y las células musculares lisas de las arterias coronarias humanas y animales (Davezac et al., 2021). Ambas isoformas pueden inducir cambios en la expresión génica a través de la formación de homo- u heterodímeros (Pérez-Cremades et al., 2018a). Los ER median sus efectos uniéndose a secuencias de DNA específicas denominadas elementos de respuesta a estrógenos (ERE) (Klinge, 2001).

No obstante, se ha demostrado que el ER α media la mayor parte de los efectos vasculares de E2 (Novella et al., 2019). ER α participa mayoritariamente como factor de transcripción de la vía genómica anteriormente descrita. Pero, también puede llevar a cabo una segunda vía no genómica de respuesta rápida a los estrógenos, conocida como señalización esteroidea rápida iniciada por la membrana (MISS), como se ha demostrado específicamente en el endotelio (Arnal et al., 2017).

A través de estas vías de señalización, los estrógenos actúan como protectores vasculares contribuyendo al aumento de la vasodilatación arterial y angiogénesis; regulador de la contracción del músculo liso mediante la liberación de mediadores vasoactivos; la inhibición de procesos inflamatorios; la regulación de la proliferación de células vasculares y la regulación del metabolismo lipídico sistémico y del oxidativo, disminuyendo las ERO (Especies Reactivas del Oxígeno), el estrés oxidativo y la fibrosis (Iorga et al., 2017; Pérez-Cremades et al., 2018a; Vidal-Gómez et al., 2018). Son capaces de promover un aumento de factores vasodilatadores implicados en la regulación del tono vascular, como los factores relajantes derivados del endotelio, entre los cuales destaca el óxido nítrico (NO) (Chambliss & Shaul, 2002). El aumento de NO en el endotelio se debe en parte a una mayor expresión de la enzima encargada de su síntesis, la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) (Sumi & Ignarro, 2003).

Por lo tanto, los estrógenos afectan a la salud cardiovascular regulando la reactividad vascular, la presión arterial, la función endotelial y el remodelado cardíaco (Pérez-Cremades et al., 2021).

1.2.Efectos cardiovasculares de la menopausia.

Lo cierto es que la función vasculoprotectora de los estrógenos antes de la menopausia está bien establecida, pero se sigue tratando de elucidar cómo el descenso de estrógenos fruto de la menopausia contribuye a un mayor riesgo cardiovascular. Parece que la disminución de los niveles de estrógenos que conlleva la menopausia se encuentra estrechamente relacionada con una alteración de la función vascular, un aumento de la inflamación, una reducción de la vasodilatación dependiente del óxido nítrico y una regulación al alza de ciertos sistemas hormonales como el sistema renina-angiotensina-aldosterona o el sistema nervioso simpático (Maas et al., 2021). La alteración de la expresión y/o señalización de los RE endoteliales debida a la carencia de estrógenos y al envejecimiento podría contribuir también a la pérdida de beneficios vasculares que sufren las mujeres tras el inicio de la menopausia (Davezac et al., 2021).

La "menopausia" es un término clínico empleado para describir el cese permanente de la menstruación que tiene lugar en mujeres de cierta edad, ante una disminución de la actividad ovárica folicular. La menopausia marca el inicio del climaterio en la mujer, sobreviene cuando el ciclo menstrual cesa debido a la anovulación. Se diagnostica retrospectivamente tras un año de ausencia de menstruación (Shapiro, 2012). No se trata de un acontecimiento brusco; de hecho, la transición

a la menopausia suele durar entre cuatro y seis años, constituyendo la etapa perimenopáusicas (Harlow et al., 2012). A pesar de ser un proceso casi exclusivo de hembras de la especie humana, las hembras de la mayoría de los mamíferos también experimentan una senescencia reproductiva natural a mediados o finales de su vida. Sin embargo, la esperanza de vida de la inmensa mayoría de las especies no sobrepasa sus años reproductivos a diferencia de la mujer, cuya esperanza de vida se extiende mucho más allá de la etapa de vida reproductiva. En el caso de las mujeres, la senescencia reproductiva que caracteriza la menopausia suele producirse en torno a la quinta década de vida, cuando su reserva finita de folículos ováricos inmaduros se agota mediante una combinación de ciclos ovulatorios y apoptosis normal (es decir, muerte celular programada) denominada atresia (Shapiro, 2012).

Muchos factores de riesgo para la salud varían con la edad y después de la menopausia, como por ejemplo, un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares, osteoporosis, cáncer, aumento de peso, diabetes, ictus, disfunción sexual, trastornos afectivos, trastornos del sueño y deterioro cognitivo (Neves-e-Castro et al., 2015; The North American Menopause Society, 2012).

Sin embargo, evaluar los fundamentos biológicos de la transición a la menopausia en los seres humanos puede resultar complicado debido a las diferencias heterogéneas existentes en muchos factores vitales, como la edad, la paridad, la dieta, el estatus socioeconómico, la exposición ambiental y las características genéticas. Por ello, se han desarrollado varios modelos experimentales en animales de laboratorio para estudiar los efectos de las hormonas gonadales y el envejecimiento, como los primates no humanos y los roedores. Los modelos de primates no humanos son especialmente útiles para la investigación traslacional. Sin embargo, son costosos y a menudo requieren muchos años de estudio para dilucidar el impacto del envejecimiento y la senescencia reproductiva debido a su mayor longevidad en comparación con los roedores (Bellino & Wise, 2003). Los modelos de roedores, en concreto las ratas y ratones de laboratorio, resultan especialmente útiles, pues sus pautas de envejecimiento se encuentran bien definidas y sus sistemas reproductor y cerebral minuciosamente estudiados, además su menor esperanza de vida permite llevar a cabo estudios menos duraderos (Bimonte-Nelson et al., 2015).

A pesar de que los roedores se erigen como modelos valiosos y apropiados para el estudio de la menopausia, existen diferencias clave entre la senescencia reproductiva en humanos y roedores (Finch, 2014). Los roedores tienen un ciclo estral en lugar de un ciclo menstrual. El ciclo estral de los roedores difiere del menstrual en varios aspectos, entre ellos que el revestimiento uterino de los roedores se reabsorbe en lugar de desprenderse a través de la menstruación. El ciclo estral se produce cada cuatro o cinco días y consta de cuatro fases -proestro, estro, metaestro y diestro- que implican fluctuaciones hormonales ováricas similares a las del ciclo menstrual humano. Por otro lado, los roedores suelen entrar en un estado de celo persistente durante su senescencia reproductiva (estropausia), caracterizado por concentraciones moderadas y elevadas de 17β -estradiol. Mientras que la menopausia se caracteriza por niveles bajos, a veces indetectables, de 17β -estradiol (Goldman et al., 2007).

Existen diversos modelos de roedores que permiten estudiar diversos aspectos de la menopausia. Por ejemplo, se suele emplear un modelo de ratones con ovarios intactos para estudiar el envejecimiento del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (Kermath & Gore, 2012). En cambio, la extirpación quirúrgica de los ovarios conocida como ovariectomía permite obtener un modelo de menopausia experimental en animales hembra, para poder evaluar los efectos de las hormonas gonadales en el campo preclínico (Davezac et al., 2021).

1.3. Los microRNAs regulados por estrógenos y el envejecimiento vascular.

Los miRNAs son pequeños RNA no codificantes, altamente conservados que se encuentran formados por 18-25 nucleótidos. Estas moléculas de RNA endógeno son capaces de modular la expresión génica a nivel post-transcripcional en organismos multicelulares, ya sea inhibiendo la traducción del RNA mensajero (mRNA) o promoviendo su degradación (Correia de Sousa et al., 2019). Un miRNA es capaz de regular diversos mRNAs diana, además de actuar de manera conjunta con otros miRNAs para coordinar la regulación de un gen determinado. Se estima que regulan aproximadamente el 30% de genes en mamífero, y hasta un 60% de los genes codificantes de proteínas en humanos (Friedman et al., 2009). A pesar de que la mayoría se localizan en el interior de las células, también se han descrito miRNAs circulantes en los fluidos corporales (Zhu & Fan, 2011).

Se han observado diferencias específicas de sexo y envejecimiento en los perfiles de expresión de miRNAs. La influencia de las hormonas sexuales y el envejecimiento sobre la regulación de los miRNAs ha quedado constatada en diversas investigaciones. Por ejemplo, los cambios de expresión de miRNAs determinados en mujeres postmenopáusicas y ratonas ovariectomizadas evidencian el papel regulador de los estrógenos sobre la expresión de los miRNAs (Hao et al., 2016).

Además de la regulación a través de los ER, mencionada anteriormente, los estrógenos también ejercen una regulación indirecta de la expresión génica, modulando la actividad transcripcional de ciertos miRNAs. Estos miRNAs responden a la presencia de estrógenos mediante los sitios de unión a ER localizados en su región regulatoria (ERE). Por otro lado, la variación en los niveles de expresión de los miRNAs no solo se debe a la acción reguladora de los estrógenos, sino también a la existencia de miRNAs localizados en los cromosomas sexuales (Pérez-Cremades et al., 2018a, 2021; Vidal-Gómez et al., 2018).

Los miRNA suprimen la expresión génica a nivel postranscripcional interaccionando con elementos de respuesta a miRNA (MRE), situados dentro de las regiones no traducidas (UTR) de los mRNA diana. Los MRE son reconocidos a través de la región semilla de 2-8 nucleótidos localizada en el extremo 5' del miRNA (Zaporozhchenko et al., 2020). La mayoría de los miRNAs regulan la expresión del gen diana interactuando con las regiones 3'UTR de sus transcritos diana. Sin embargo, también son capaces de interaccionar con promotores de genes, regiones 5'UTRs o secuencias codificantes (Arora et al., 2013; Correia de Sousa et al., 2019).

El grado de complementariedad entre la secuencia semilla del miRNA y el respectivo sitio de unión (MRE) determina el destino del mRNA diana. Una unión completa de la secuencia semilla con el mRNA diana provoca la degradación del mRNA, mientras que una unión incompleta conduce a su represión traduccional. Esta represión o inhibición de la traducción por miRNAs tiene lugar durante el inicio de la traducción (Arora et al., 2013).

Se sabe que los miRNA intervienen en la regulación de muchos procesos celulares, llegando a desarrollar un papel clave en complejas vías de regulación relacionadas con la función cardíaca. Por ejemplo, se ha demostrado que los miRNAs intervienen en la regulación de la presión arterial y la función vascular, así como en el metabolismo de los lípidos en el corazón. Además, regulan directamente la proliferación, diferenciación y conducción cardíaca de las células del corazón. Algunos miRNAs incluso participan en el desarrollo y la progresión de ciertas enfermedades car-

diovasculares relacionadas con el envejecimiento, como la aterosclerosis y la insuficiencia cardíaca. Mientras que otros estudios indican su posible uso como biomarcadores de diagnóstico para diversas cardiopatías (Zhou et al., 2018).

Lo cierto es que la biogénesis, maduración y forma de acción de los miRNAs se encuentran reguladas por numerosos mecanismos moleculares específicos de célula, en condiciones fisiológicas y de enfermedad (Correia de Sousa et al., 2019). La propia maquinaria de biosíntesis de miRNAs se encuentra regulada por E2 (Pérez-Cremades et al., 2018a).

1.3.1. MiR-30b: un microRNA regulado por estrógenos.

El miR-30b pertenece a la familia de miRNAs miR-30, cuya expresión tisular se encuentra relacionada con los niveles de estrógeno (Pérez-Cremades et al., 2018a). En humanos esta familia se encuentra codificada por seis genes ubicados en los cromosomas 1, 6 y 8 (Figura 1A). Consta de siete miembros, entre los cuales se encuentran miR-30a, miR-30b, miR-30c, miR-30d, miR-30e y miR-30c, que a su vez se divide en miR-30c-1 y miR-30c-2. Todos ellos comparten la misma secuencia semilla de reconocimiento en su extremo 5' (Figura 1B), pero difieren en las secuencias compensatorias de su extremo 3' (Figura 1C), lo que les permite regular diferentes dianas y participar en diversas vías biológicas (Mao et al., 2018; Yang et al., 2017).

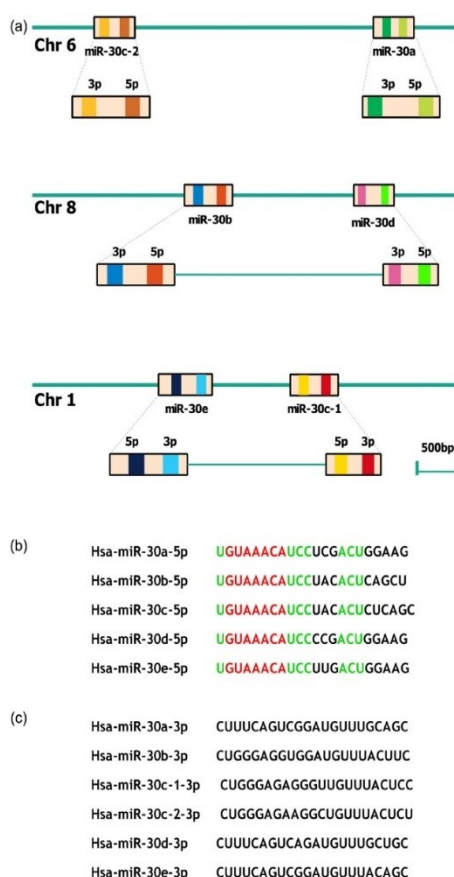


Figura 1. Miembros de la familia miR-30 y su localización genómica. (a) Localización genómica de los miembros de la familia miR-30. (b) Secuencias maduras de los miembros de la familia miR-30 originadas del brazo 5' de los precursores. Las secuencias semilla resaltadas en rojo y verde representan nucleótidos conservados. (c) Secuencias maduras de miembros de la familia miR-30 que surgen del brazo 3' de los precursores (Yang et al., 2017).

La familia miR-30 interviene en el crecimiento celular y la diferenciación tisular, así como en diversos procesos implicados en la remodelación ventricular como la autofagia, la apoptosis, el estrés oxidativo y la inflamación. La expresión de esta familia en el corazón es abundante, por lo que su participación en la función cardiovascular resulta relevante. Sobre todo, destaca su intervención en la patología cardíaca, pues diversos estudios han determinado una reducción significativa de su expresión tras la inducción de una isquemia/reperfusión miocárdica o hipertrofia cardíaca (Zhang et al., 2019).

El miR-30b-5p es particularmente interesante debido a sus propiedades proangiogénicas, antiinflamatorias y antiapoptóticas registradas en las células endoteliales ante una lesión vascular. Su sensibilidad a los estrógenos ha sido demostrada empíricamente, a través del aumento de expresión detectado en células de cáncer de mama tratadas con E2 (Bhat-Nakshatri et al., 2009); los cambios cíclicos contemplados en su expresión endometrial (Kuokkanen et al., 2010); las diferencias de sexo descritas en los perfiles de expresión cerebrales de pacientes esquizofrénicos (Mellios et al., 2012) y la sobreexpresión determinada en células endoteliales tratadas con E2. Además, se han encontrado sitios de unión a ER en la región reguladora del precursor pre-miR-30b (Vidal-Gómez et al., 2018).

El mecanismo de maduración de los miRNA se basa en una sucesión de escisiones enzimáticas de moléculas precursoras debido a la actividad hidrolizante, específica e inespecífica de RNA, desempeñada por una serie de complejos proteicos (Zaporozhchenko et al., 2020). A continuación, se describe el proceso de biogénesis de miR-30b (Figura 2). En primer lugar, la RNA polimerasa II transcribe el gen MIR30B, generando un transcrito primario largo (pri-miR-30b). Posteriormente, el pri-miRNA es hidrolizado por un complejo microprocesador compuesto por una RNasa III Droscha y la proteína de unión al RNA, DGCR8 (gen de la región crítica del síndrome de Di George). La hidrólisis libera moléculas de RNA de ~70 nt con estructura de horquilla conocidas como miRNAs precursores (pre-miR-30b). El pre-miR-30b consta de un bucle monocatenario y un tallo bicatenario que termina en un extremo 3' colgante. El reconocimiento de ambos elementos estructurales por parte del complejo exportina-5/RanGTP previene la degradación nuclear del pre-miR-30b y permite su transporte al citoplasma (Li et al., 2018; Zaporozhchenko et al., 2020). En el entorno citoplasmático, el pre-miR pasa a formar parte de un complejo proteico de procesamiento, constituido por la enzima RNasa III Dicer, la proteína de unión al RNA de respuesta a la transactivación (TRBP) y la proteína activadora de la proteína quinasa R (PACT). Dicer escinde la horquilla del pre-miRNA en una molécula de RNA de doble cadena con extremos 3' colgantes (Li et al., 2018; Zaporozhchenko et al., 2020). Dicho miRNA dúplex inmaduro consta de dos brazos: miR-5p y miR-3p (Mitra et al., 2015). Finalmente, la carga de una de las dos cadenas en una proteína de la familia argonauta (AGO1-AGO4) conduce a la formación del complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), encargado de reconocer la diana e implementar el efecto regulador. El complejo RISC cargado (miRISC) es capaz de inhibir la traducción del mRNA o promover su degradación.

Anteriormente creían que la cadena no seleccionada (miRNA*), por lo general miR-3p, quedaba relegada como subproducto y era degradada. De modo que, la mayoría de los estudios solo consideraban los efectos reguladores de la hebra más abundante. Sin embargo, ya se ha comprobado que la cadena miRNA* también es capaz de ejercer una acción reguladora. Por ello, ahora un miRNA maduro se designa con el sufijo "-3p" o "-5p" dependiendo de la cadena de origen (Camps et al., 2014).

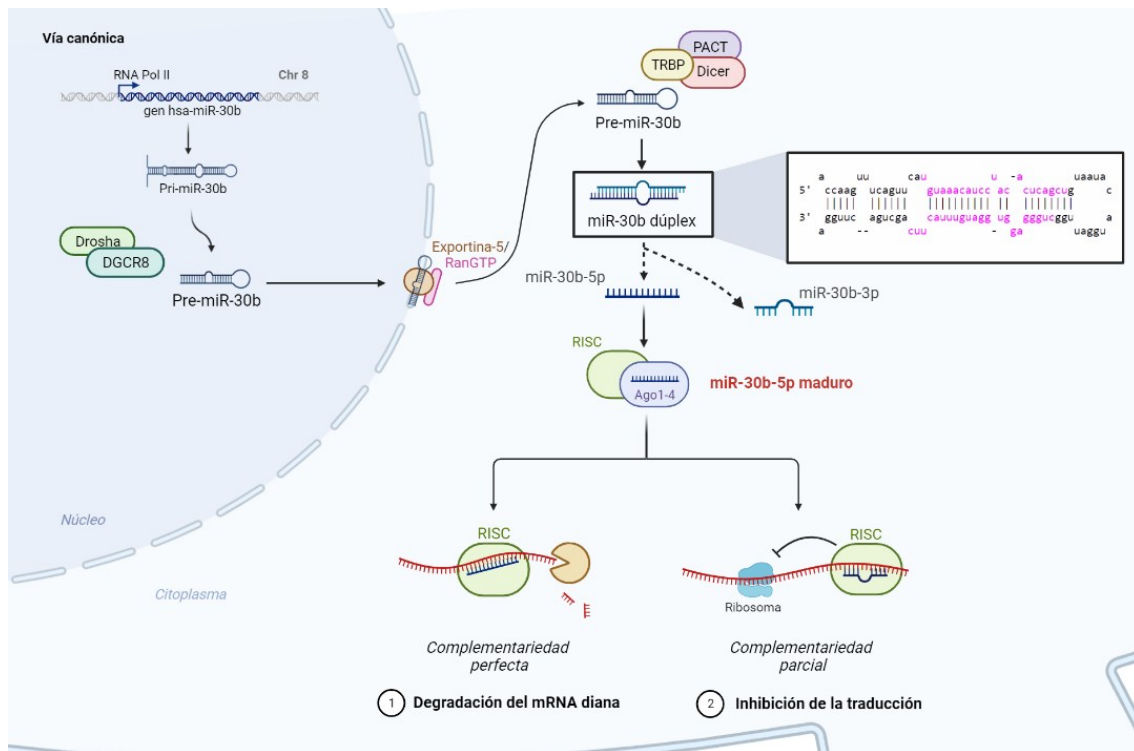


Figura 2. Vía canónica de biogénesis de miR-30b-5p. Imagen desarrollada con el programa Biorender (<https://app.biorender.com>).

Aunque bien es cierto que la mayoría de los miRNAs conocidos siguen la vía canónica de maduración, el sistema de biogénesis de miRNAs presenta una cierta flexibilidad adicional gracias a la existencia de rutas de biogénesis alternativas. Se distinguen vías de maduración no canónicas independientes de Drosha y Dicer (Zaporozhchenko et al., 2020). En estas vías alternativas es la endonucleasa Argonauta 2 la que lleva a cabo el procesamiento del pre-miRNA y la formación del complejo RISC (MacFarlane & R. Murphy, 2010).

1.4. Análisis de los perfiles de expresión de los miRNAs.

Resulta interesante conocer los niveles de expresión de los miRNAs, puesto que desempeñan un rol transcendental en la regulación celular. En la actualidad existen varios métodos para medir los niveles de expresión de los miRNAs. Entre ellos se encuentran la reacción en cadena polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR), que combina *primers* específicos de la retrotranscripción con el análisis TaqMan PCR (Applied Biosystems); la qPCR con *primers* de ácido nucleico bloqueados (Exiqon); la qPCR que emplea la cola de poli(A) (Qiagen, Stratagene), la secuenciación masiva de alto rendimiento de próxima generación (NGS) y el análisis de microarrays (Ach et al., 2008; Git et al., 2010).

Tanto las técnicas ómicas, secuenciación masiva y *microarrays*, como la RT-qPCR son las técnicas de análisis más comunes para cuantificar los miRNAs en una muestra de RNA total. Los perfiles de miRNAs obtenidos por ambos métodos en distintos ensayos se correlacionan bastante bien, por lo que se pueden emplear indistintamente (Ach et al., 2008). No obstante, la secuenciación y los microarrays pueden no detectar aquellos miRNAs que se expresan en menor abundancia. Mientras que la qPCR es una técnica de cuantificación mucho más sensible y precisa capaz de percibir una expresión mínima (Chen et al., 2005).

En la qPCR la reacción de amplificación se monitoriza a medida que transcurre el proceso. La incorporación de sondas fluorogénicas específicas permite detectar el producto de la PCR conforme se acumula a lo largo de los sucesivos ciclos de la qPCR (THERMO FISHER SCIENTIFIC, s. f.).

En los primeros ciclos de la qPCR, la señal de fluorescencia debida al ruido de fondo apenas varía, sirviendo de referencia para establecer una línea base. A medida que avanza la amplificación, aumenta la fluorescencia detectada debido a la acumulación del producto. Por tanto, la cantidad de analito inicial se determina en base al tiempo que tarda en detectarse un aumento significativo de fluorescencia. Para lo cual se establece un umbral de fluorescencia fijo por encima de la línea de base. (THERMO FISHER SCIENTIFIC, s. f.).

1.5. Aproximaciones In Silico en el estudio de miRNAs.

El vertiginoso descubrimiento de nuevos miRNAs y sus correspondientes dianas ha llevado a los investigadores a preguntarse qué acciones desempeñan en la célula y cuáles son sus mecanismos reguladores. Las aproximaciones bioinformáticas resultan clave para comprender el procesamiento y la función biológica de estas moléculas de RNA no codificante.

Las características estructurales particulares de los miRNAs han permitido diseñar toda una serie de herramientas bioinformáticas -miRScan, miRSeeker o miRank- capaces de predecir miRNAs a través de secuencias genómicas. Estos algoritmos determinan posibles secuencias precursoras de miRNAs identificando estructuras de horquilla en regiones no codificantes y no repetitivas del genoma (Liu et al., 2014).

Durante los últimos años se han desarrollado métodos biológicos y enfoques computacionales para descubrir miRNAs, identificar sus dianas e inferir sus funciones. Toda la información es recopilada en bases de datos que se actualizan habitualmente (Liu et al., 2014), siendo miRBase (<http://www.mirbase.org/>), el principal repositorio de secuencias y anotaciones de miRNAs, extraídos de la literatura o pendientes de validar (Kozomara & Griffiths-Jones, 2011).

2. Objetivo

El estradiol y el envejecimiento influyen en la regulación de los miRNAs y por tanto en su papel modulador del endotelio vascular (Pérez-Cremades et al., 2018b).

En estudios previos del grupo se realizó un análisis del perfil transcriptómico mediante *microarrays* en células endoteliales tratadas con E2, y se identificaron cambios en la expresión de miR-30b, lo cual indica su posible sensibilidad al estrógeno (Pérez-Cremades et al., 2021). Sin embargo, aún debe seguir estudiándose la relación entre la expresión de miRNAs dependientes del estradiol y la función cardiovascular. Además, la técnica de qPCR puede ayudar a comprender mejor la influencia de los estrógenos sobre la expresión de miR-30b.

Este trabajo pretende ayudar a esclarecer la implicación y regulación de los miRNAs dependientes de estrógenos en el sistema cardiovascular a través de los siguientes objetivos específicos:

1. Realizar un estudio bioinformático de la secuencia y localización genómica del miR-30b-5p, así como de los posibles mecanismos reguladores de su expresión, en humano y ratón.

2. Evaluar la expresión del miR-30b-5p mediante qPCR en 8 tejidos procedentes de ratones intactos, identificando posibles diferencias entre sexos.
3. Analizar la expresión del miR-30b-5p mediante qPCR en los corazones de un modelo de menopausia murino.
4. Validar las muestras procedentes del modelo experimental de menopausia determinando la expresión del gen del óxido nítrico sintasa endotelial (NOS3), estrechamente relacionada con los niveles de estrógenos.

3. Materiales y Métodos

3.1. Análisis bioinformáticos

3.1.1. Estudio de miR-30b-5p.

En primer lugar, se estudió la localización genómica de miR-30b-5p en humano y ratón. Además, se analizaron las secuencias de los respectivos miRNAs ortólogos, hsa-miR-30b-5p y mmu-miR-30b-5p. La información se extrajo de la base de datos miRBase (<http://www.mirbase.org/>).

3.1.2. Identificación de factores de transcripción reguladores del miR-30b-5p.

Las relaciones regulatorias entre factores de transcripción (FT) y el miRNA se obtuvieron de la base de datos TransmiR (<http://cmbi.bjmu.edu.cn/transmir>). La última versión v2.0 contiene 3.730 regulaciones FT-miRNA procedentes de 1.349 publicaciones y 1.785.998 regulaciones TF-miRNA derivadas de pruebas ChIP-seq. Los datos de regulación FT-miRNA derivados de ChIP-seq se clasifican en niveles de evidencia (1 y 2), según la fiabilidad de la anotación de la región reguladora transcripcional (J. Wang et al., 2010).

3.1.3. Predicción de los genes diana del miR-30b-5p.

Existen diversos métodos computacionales para predecir posibles dianas de miRNA como miRanda, miRDB, TargetScan o microT-CDS. Todos estos algoritmos emplean diferentes técnicas y criterios de predicción, en cuanto al emparejamiento de bases, la accesibilidad de la diana y su conservación evolutiva.

Con el objetivo de determinar los genes diana del miR-30b-5p se ha comparado la información obtenida por tres programas de predicción diferentes: miRDB, TargetScan y microT-CDS.

MiRDB (<http://mirdb.org/miRDB/>) es una base de datos online de dianas predichas mediante la herramienta bioinformática MirTarget, desarrollada a partir del análisis de miles de interacciones miRNA-diana procedentes de experimentos de secuenciación de alto rendimiento (Chen & Wang, 2020).

TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) predice las dianas biológicas de los miRNA identificando sitios conservados de 8, 7 y 6 nucleótidos que coincidan con la región semilla de cada miRNA

(Lewis et al., 2005). Como opciones, también proporciona predicciones con sitios mal conservados o sitios de interacción débil que se compensan con el emparejamiento 3'.

DIANA-microT-CDS (<http://www.microrna.gr/webServer>) es la quinta versión del algoritmo microT, diseñado para predecir interacciones miRNA-mRNA *in silico*, es capaz de identificar dianas en regiones 3'UTR y codificantes (CDS) (Paraskevopoulou et al., 2013).

Se obtuvo una lista de posibles dianas humanas contrastando los datos obtenidos por los tres programas de predicción seleccionados. Mediante la herramienta comparativa Venny del CNB-CSIC (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) se seleccionaron las dianas compartidas por los tres programas. Posteriormente se realizó el mismo procedimiento para obtener una lista de dianas del miR-30b-5p en ratón. Finalmente se seleccionaron las dianas del miRNA presentes tanto en humano como en ratón, haciendo uso de la herramienta Venny de nuevo.

3.1.4. Anotación funcional de miR-30b-5p.

La anotación funcional de los miRNAs se lleva a cabo mediante un análisis bioinformático de enriquecimiento funcional de sus genes diana.

Diversas interfaces de predicción de dianas de acceso libre (miRDB, miRò, MAGIA) proporcionan también información sobre las vías biológicas reguladas por los miRNAs. La anotación funcional depende de las dianas predichas empleadas para el análisis y, por tanto, de los algoritmos de predicción empleados (Liu et al., 2014).

Se realizó un análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA) sobre las dianas obtenidas, para determinar los procesos biológicos cuya expresión genética está regulada por miR-30b-5p en humanos. El GSEA se ejecutó con la herramienta proporcionada por miRwalk, que ofrece un análisis de enriquecimiento estándar basado en las pruebas hipergeométricas (algoritmo de selección chi-cuadrado)(Sticht et al., 2018).

A través del GSEA se pudo llevar a cabo la anotación funcional de miR-30b-5p mediante ontologías como la categoría Proceso Biológico de Ontología Génica (GO:BP, de sus siglas en inglés) y la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG, de sus siglas en inglés). Las funciones biológicas y rutas metabólicas enriquecidas en el conjunto de genes diana analizados (Tablas S1 y S2, Anexo I), se representaron en un mapa de burbujas mediante el servidor web SRPlot (<http://www.bioinformatics.com.cn/srplot>).

3.2. Análisis *in vitro* de hsa-miR-30b-5p.

3.2.1. Animales del estudio.

Se utilizaron ratones albinos de la cepa pura AKR/J (n=6) para poder determinar como el sexo afecta a la expresión del miR-30b en diferentes tejidos. Se estudiaron ratones (n=3) y ratonas (n=3).

La cepa AKR/J sirve como reserva genética para establecer las cepas SAMP (del inglés, *Senescence Accelerated Mouse Prone*) y SAMR (del inglés, *Senescence Accelerated Mouse Resistant*), que presentan diferentes fenotipos de envejecimiento. Ambas cepas proceden de un proceso de selección fenotípica llevado a cabo por Takeda et al. desde 1968 a 1973. Mientras que las cepas SAMP se caracterizan por poseer un envejecimiento acelerado y manifiestan cambios patológicos

relacionados con la edad similares a los de los humanos, las cepas SAMR presentan resistencia al proceso de senescencia acelerada y exhiben un fenotipo de envejecimiento normal (Teter, 2009). Concretamente, en este estudio se emplearon ratones SAMR1, elegidos a menudo como control del envejecimiento normal para las cepas SAMP, pues posibilitan la continuidad del estudio en un modelo de senescencia acelerada.

Los ratones empleados para el estudio fueron criados y preservados en el recinto de animales de la Unidad Central de Investigación de Medicina en la Universitat de València, bajo unas condiciones reguladas de acuerdo con las políticas institucionales (temperatura estable de 22 °C, alternancia entre períodos de luz y oscuridad de 12 horas, humedad del 60%, pienso estándar y acceso libre al agua).

Todos los protocolos experimentales realizados en el presente estudio fueron evaluados por el Comité de Ética de Investigación y Bienestar Animal habilitado por la Dirección General de Medioambiente, de acuerdo con el Real decreto 53/2013 en el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación. Los experimentos fueron aprobados por la Comisión de Ética en Investigación Experimental de la Universitat de València, con número de autorización 2020/VSC/PEA/0128.

3.2.2. Modelo experimental de menopausia.

Con el fin de investigar el efecto de los estrógenos se analizaron en paralelo 3 clases de grupos experimentales. El grupo de ovariectomizadas (Ovx), constituido por ratonas (n=4) a las que se extirparon quirúrgicamente los ovarios, el oviducto y la grasa peri ovárica. El grupo de ovariectomizadas y tratadas con estrógenos (OvE), incluye a ratonas (n=4) que recibieron un tratamiento de reemplazo hormonal con E2 tras la ovariectomía. Por último, un grupo de ratonas (n=4) control de la cirugía (Sham), que fueron sometidas a la misma intervención quirúrgica, pero mantuvieron intactos sus ovarios.

3.2.2.1. Extirpación quirúrgica de los ovarios.

La ovariectomía se llevó a cabo en ratonas de la cepa SAMR1 de 5 meses de edad. Los animales recibieron como tratamiento analgésico isoflurano por vía inhalatoria. Paralelamente, se les administró 0.05 mg/kg de buprenorfina por vía subcutánea como analgésico. Para poder llevar a cabo la intervención, el animal se posicionó en decúbito lateral derecho. Tras desinfectar la zona a operar y comprobar el efecto de la anestesia asegurando la pérdida de reflejos podales, se realizó una incisión de 0.5 cm en el borde dorsal de la última costilla. La incisión cutánea y muscular permitió extraer el ovario junto al infundíbulo y el ligamento ovárico. Seguidamente, se efectuó una ligadura transfixiante por debajo del infundíbulo, suturando con monofilamento reabsorbible de 5/0 (Monosyn, Braun). El mismo procedimiento se realizó en el lado izquierdo del animal, finalizando la intervención desinfectando la zona. Durante los 3 días posteriores se proporcionaron 0.3 mg/kg de meloxicam (cada 24 horas) como analgésico postoperatorio para aliviar el dolor.

3.2.2.2. Tratamiento de reemplazo de estrógenos.

El grupo de ratonas OVE recibió una dosis continua de E2 (10 g/Kg/día) durante 28 días a través de bombas osmóticas (Alzet Osmotic Pumps® Model 2004, Durect Corporation). Cada una de las bombas fue implantada en un bolsillo subcutáneo, creado en la zona subescapular con la ayuda

de una pinza hemostática, situando el orificio moderador del flujo en dirección a la cabeza del animal. La membrana semipermeable que contienen estas bombas, junto con el reservorio de polietilenglicol, garantizan la difusión pasiva de la solución hacia el animal. El E2 liberado por la bomba pasa a la circulación sistémica del individuo a través de los capilares de la zona de implantación.

La solución osmótica cargada en cada bomba contenía E2 (Sigma-Aldrich) a una concentración de 40 g/mL por mg de peso del animal. La solución stock de 8 mg/mL de E2 en dimetilsulfóxido (DMSO) absoluto (Sigma-Aldrich) se diluyó en una solución salina fisiológica (NaCl 0,9 %, Sigma Aldrich) con DMSO al 50%. Finalmente se introdujeron 200 mL de solución filtrada a cada una de las bombas.

3.2.3. Extracción de RNA de tejidos.

Para analizar la variación de expresión de miR-30b-5p, se extrajo el RNA de 8 tejidos procedentes de ratones intactos, hembra y macho, así como ratonas Ovx, OvE y Sham. Primero se descongelaron las muestras de los diferentes tejidos almacenadas en tubos de microcentrifuga de 1.5 mL (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) con RNAlater RNA Stabilization Reagent a -80°C. Todo el proceso se llevó a cabo con la mayor eficiencia posible, en un ambiente estéril y manteniendo el tejido a baja temperatura para evitar la degradación del RNA.

Tras la descongelación a 4°C en hielo, los tejidos se diseccionaron en una placa Petri estéril. El procedimiento se realizó sobre una caja de hielo para evitar la degradación del RNA. Se seccionaron en fragmentos pequeños -aproximadamente 1-2 mm de tamaño- empleando tijeras y pinzas estériles, para evitar la contaminación del tejido con microorganismos y RNAsas.

Los fragmentos obtenidos se transfirieron inmediatamente a tubos de microcentrifuga de 2 ml (Eppendorf). De manera previa, se añadió una perla de acero inoxidable de 5 mm de diámetro (Qiagen, Hilden, Alemania) a cada uno de los tubos.

Antes de comenzar con la extracción, se congelaron los tubos a una temperatura de -196 °C, depositándolos en una caja de corcho con nitrógeno líquido. Inmediatamente, se añadió 1 mL del reactivo de lisis TRIzol G (Panreac Química S.L.U., Castellar del Vallès, España) a cada tubo y se aseguró el cierre con Parafilm.

La mezcla se homogeneizó mediante el TissueLyser LT (Qiagen) a una velocidad de 25 Hz durante 5 minutos hasta su completa disgregación. Cabe destacar que las frecuencias superiores a 25 Hz pueden provocar la degradación del RNA.

A continuación, se indujo la precipitación de proteínas adicionando 200 µl de Cloroformo (Panreac Química). Tras agitar vigorosamente con vórtex (Heidolph Instruments, Schwabach, Alemania) durante 15 segundos, los homogeneizados se incubaron a temperatura ambiente durante 3 minutos. Para promover la disociación de los complejos nucleoproteicos.

Seguidamente, se realizó una centrifugación de 15 minutos a 12,000 x g y 4°C, empleando para ello la centrífuga 5415R (Eppendorf), con el objetivo de separar la mezcla en tres fases: una fase orgánica roja que contiene las proteínas, una interfase blanca donde se encuentra el DNA y una fase superior acuosa que alberga el RNA.

Se transfirieron aproximadamente 400 µl de la fase acuosa a un tubo de microcentrifuga nuevo de 1.5 mL para poder precipitar el RNA. Añadiendo Isopropanol (2-propanol, Panreac Química),

1.5 veces el volumen de fase recuperada, y mezclando cuidadosamente por inversión (10x), se dejó incubar 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugó 10 minutos a 12,000 x g y 4°C. De este modo, el RNA precipitó en el fondo del tubo en forma de pellet.

Posteriormente se eliminó cuidadosamente el sobrenadante, tratando de no tocar el pellet. Para lavarlo, se adicionó 1 mL de etanol 75% (diluido con agua libre de RNAsas) y centrifugó 10 minutos a 12,000 x g y 4°C.

Por último, se descartó el sobrenadante y las muestras se dejaron secar con el eppendorf abierto (5-10 min), evitando la disecación del pellet. El RNA extraído se eluyó en 20 µl de agua libre de RNAsas. Las muestras se conservaron a -20 °C.

3.2.3.1. Determinación de la calidad y cantidad de RNA extraído.

La concentración y pureza del RNA extraído se midieron utilizando el espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Vilna, Lituania). Prestando especial atención a las ratios de pureza A260/A280 y A260/A230. El primero determina la pureza del RNA extraído en base a la presencia de proteínas, contaminantes o restos de reactivos presentes en la muestra. Un valor de 2.0 indica que la contaminación no es significativa. Por otra parte, la ratio A260/A230 mide la presencia de contaminantes orgánicos que pueden interferir en la posterior amplificación del RNA, como es el caso del etanol. El valor ideal se encuentra en torno al 1.8.

3.2.4. Cuantificación de la expresión de hsa-miR-30b-5p.

Se empleó un sistema RT-qPCR de dos pasos (Figura 3) con el propósito de cuantificar el miR-30b en las muestras de RNA extraído de los diferentes tejidos. A través de un primer paso de transcripción inversa, se obtuvo el DNA complementario (cDNA) necesario para un segundo paso de qPCR (Chen et al., 2005). Todos los reactivos empleados para la RT-qPCR proceden del kit TaqMan para ensayos de microRNAs avanzados (Thermo Fisher Scientific).

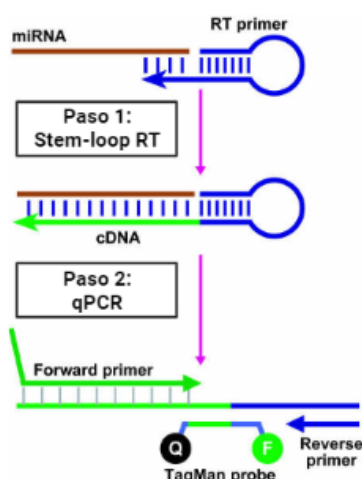


Figura 3. Descripción del ensayo RT-PCR. Basado en el kit para ensayos de miRNAs de Applied Biosystems TaqMan (C. Chen et al., 2005).

El *primer* de transcripción inversa del paso 1 (Figura 3) proporcionado por TaqMan presenta una estructura en tallo-bucle idónea para la restrotranscripción y posterior detección de ácidos nucleicos de corta longitud, como son los miRNAs maduros.

La sonda incorporada por el sistema de reacción TaqMan (Thermo Fisher Scientific) en el paso 2 (Figura 3) contiene un fluoróforo en su extremo 5' (reporter) y un represor (quencher) en el extremo 3'. Al inicio de la reacción, mientras la sonda permanece intacta, la proximidad del supresor reduce notablemente la fluorescencia emitida por el reporter. El apantallamiento sucede debido al fenómeno de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET). Tras la desnaturación del cDNA obtenido en la restrotranscripción, los primers (forward y reverse) y la sonda hibridan específicamente con el cDNA. Durante la fase de extensión de los primers, la polimerización llevada a cabo por la DNA polimerasa conduce a la disociación de la sonda, separación de ambos colorantes y el consiguiente aumento de la señal fluorescente. En cada ciclo de PCR se disocian las correspondientes sondas, generando una intensidad de fluorescencia proporcional a la cantidad de amplicones obtenidos (Chen et al., 2005; Forero et al., 2019).

Existe una serie de sesgos asociados a la cuantificación por qPCR que exigen la incorporación de un control endógeno, como la variación en la cantidad de material de partida, recogida de muestras, preparación y calidad del RNA, o eficiencia de la restrotranscripción. El control endógeno se caracteriza principalmente por mantener una expresión constante en una amplia variedad de tipos celulares, tejidos y condiciones experimentales (Wong et al., 2007). Para la cuantificación del miR-30b se eligió el RNA nuclear pequeño (snRNA) U6 como control endógeno. Se trata de un RNA no codificante que forma parte de la proteína ribonuclear pequeña (snRNP) U6, un componente del espliceosoma eucariota (Mroczek & Dziembowski, 2013). Su análisis permite normalizar los datos de expresión del miRNA corrigiendo los sesgos descritos.

3.2.4.1. Retrotranscripción.

El *primer* de transcripción inversa proporcionado por TaqMan presenta una estructura en tallo-bucle idónea para la restrotranscripción y posterior detección de ácidos nucleicos de corta longitud, como son los miRNAs maduros. El sistema de reacción de transcripción inversa (RT) contiene 15 μ l por muestra: 1.5 μ l tampón de restrotranscripción 10x, 1 μ l de restrotranscriptasa multiscribe (500U/ μ l), 0.19 μ l de inhibidor de RNAsas (20U/ μ l), 0.15 μ l de desoxirribonucleótidos (100 Mm), 1 μ l de cada *primer* específico de miRNA y agua libre de RNAsas hasta completar el mix. En un único mix se restrotranscribió el hsa-miR-30b-5p, utilizando el primer específico de TaqMan miRNA Assays (ID: 000602) y el control U6 (ID: 001973). Se preparó un mix de restrotranscripción para n +1 muestras. Posteriormente, se mezclaron 15 μ l del mix con 5 μ l de muestra de RNA total (100 ng), en tubos de 0.2 ul libres de RNAsas.

La restrotranscripción tuvo lugar a 16°C durante los primeros 30 minutos, a 42°C los siguientes 30 minutos y a 85° C los últimos 5 minutos. Al finalizar, los productos de cDNA obtenidos se conservaron a 4°C para utilizarse de inmediato o se almacenaron a -20°C de manera indefinida.

3.2.4.2. qPCR

El sistema de reacción de la PCR cuantitativa en tiempo real utilizado contiene 9 μ l por muestra: 3.5 μ l de agua libre de RNAsas, 5 μ l de TaqMan Gene Expression Mastermix y 0.5 μ l de la sonda TaqMan TM específica del miRNA de interés. Se prepararon diferentes sistemas específicos de diana, tantos como moléculas de RNA se testaron. En este caso se necesitaron dos mixes, para analizar la expresión del hsa-miR-30b-5p y el snRNA U6. Se calculó la cantidad de mix necesaria para $2n + 1$ muestras, puesto que se realizaron duplicados técnicos de cada muestra.

La qPCR se llevó a cabo en una placa de 384 pocillos, depositando en cada uno 9 μ l de mix y 1 μ l del cDNA obtenido en la retrotranscripción previa. En el análisis también se incluyó el blanco de la transcripción inversa, así como un blanco del mix de PCR. Tras tapar la placa con “optical adhesive film”, se realizó un spin a 1000 g durante 1 min para que el volumen, tanto de mix como de muestra, fueran al fondo del pocillo. Finalmente se inició la qPCR de 41 ciclos, de acuerdo con las condiciones térmicas sugeridas para el ensayo TaqMan (Tabla 1). El primer ciclo o “hold stage” es necesario para la activación de la DNA polimerasa Thermo-Start proporcionada por TaqMan.

Tabla 1. Condiciones térmicas de la qPCR realizada en QuantStudio 5.

Hold Stage (1 Ciclo)	2 min	50 °C
	15 min	95 °C
qPCR (40 ciclos)	15 s	95 °C
	60 s	60 °C

Se configuró el equipo de manera previa empleando el software de diseño y análisis QuantStudio Design and Analysis Software. Al elaborar la plantilla, se asignó a cada pocillo el nombre de la muestra y sonda de miRNA correspondientes. Al finalizar la qPCR el software proporcionó el valor Ct (ciclo umbral, de sus siglas en inglés) de cada pocillo. El parámetro Ct, empleado como medida indirecta de cuantificación, se corresponde con el número de ciclo de amplificación a partir del cual la fluorescencia supera el umbral preestablecido. Cuanto mayor es el número de copias iniciales del miRNA a determinar, antes se observa un incremento de fluorescencia significativo y menor será el Ct. Los resultados se relativizaron frente al control endógeno empleando el método de cuantificación comparativa $2^{-\Delta Ct}$. La comparación entre los distintos grupos experimentales permitió calcular el grado de cambio en la expresión (Fold Change).

3.2.5. Determinación de la expresión de NOS3.

La operación de ovariectomía se validó determinando el nivel de expresión de NOS3 en los corazones de ratonas OvX (n=4), OvE (n=4) y Sham (n=4) para lo cual también se empleó el sistema RT-qPCR Taqman de dos pasos.

Se realizaron los mismos pasos del ensayo de expresión descrito en el apartado 2.4. Ambos ensayos de expresión son muy similares, exceptuando ciertas particularidades. Por ejemplo, el cDNA se obtuvo empleando random *primers*, en lugar de *primers* específicos.

3.2.5.1. Retrotranscripción.

El sistema de RT consta de 15 μ l por muestra: 9.2 μ l agua libre de RNAsas, 2 μ l tampón de retrotranscripción 10x, 1 μ l de retrotranscriptasa multiscibe (500U/ μ l), 0.8 μ l de desoxirribonucleótidos (100 Mm) y 2 μ l de random *primers*. En este caso no fue necesario añadir inhibidores de RNAsas.

3.2.5.2. qPCR

El sistema de qPCR para el análisis de genes empleado es idéntico al sistema de análisis de miRNAs TaqMan. Para relativizar los resultados se seleccionó como gen control la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Se emplearon las sondas TaqMan específicas de NOS3 Mm00435217_m1 y GAPDH Mm03302249_g1.

3.2.6. Análisis estadísticos.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Graphpad Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, www.graphpad.com). En primer lugar, se identificaron los valores atípicos, y se comprobó la normalidad de los datos mediante la prueba estadística de Kolmogorov-Smirnov. La distribución normal de los datos obtenidos permitió realizar posteriormente pruebas de análisis paramétrico. Para determinar las diferencias específicas de sexo entre ratones y ratonas de la misma cepa, se utilizó un T-test múltiple. Los grupos de estudio (Sham, OvX, OvE) se compararon empleando el análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Se considero significativa una probabilidad menor o igual a 0,05 (* $p \leq 0,05$).

4. Resultados

4.1. Estudio bioinformático de miR-30b.

4.1.1. Secuencias de hsa-miR-30b-5p y mmu-miR-30b-5p.

El hsa-miR-30b-5p está codificado por un único gen muy conservado a lo largo de la evolución. El gen MIR30b humano se localiza en el cromosoma 8q24.22, en una región intragénica, dentro

del gen ZFAT (Yang et al., 2017). Mientras que el gen MIR30b murino que codifica mmu-miR-30b-5p se encuentra en el cromosoma 15q29.44.

A continuación, se muestran las secuencias humanas y murinas del miR-30b-5p maduro y su precursor extraídas de la base de datos miRBase (Tabla 2). A pesar de que ambos precursores no son exactamente idénticos, hsa-miR-30b-5p y mmu-miR-30b-5p coinciden en su secuencia. Por ello, para analizar la expresión en ratones se ha podido emplear el primer específico de hsa-miR-30b-5p.

Tabla 2. Secuencias del miR-30b-5p obtenidas a partir de miRBase.

Especie	Secuencia Pre-miR-30b	pb	Secuencia miR-30b-5p maduro	pb	Accesión miRBase
<i>Homo Sapiens</i>	<pre> a uu cau u -a uaaua 5' ccaag ucaguu guaaacaucc ac cucagcug c 3' gguuc agucga cauuuguagg ug gggucggu a a -- cuu - ga uaaggu </pre>	88	5'-UGUAAACAUCUACACUCAGCU	22	>Hsa-miR-30b-5p MI0000441
<i>Mus musculus</i>	<pre> c ag uuu c u - u aua 5' ua ccaag caguu auguaacaucc aca cucagcug c c 3' au gguuc gucga ugcauuuguagg ugu gggucggu g a u ga --u c - a u cgu </pre>	96	5'-UGUAAACAUCUACACUCAGCU	22	>Mmu-mir-30b-5p MI0000145

4.1.2. Genes dianas de miR-30b-5p.

Al comparar las dianas de hsa-miR-30b-5p predichas por miRDB, TargetScan y microT-CDS, se obtuvieron 897 dianas comunes (Figura 4A). Mientras que en el caso de mmu-miR-30b-5p, coincidieron 232 dianas (Figura 4B).

Tras contrastar ambas listas, se identificaron 173 dianas compartidas entre hsa-miR-30b-5p y mmu-miR-30b-5p (Figura 4C). De este modo, se acotó el número de posibles genes regulados por miR-30b-5p en humano y ratón.

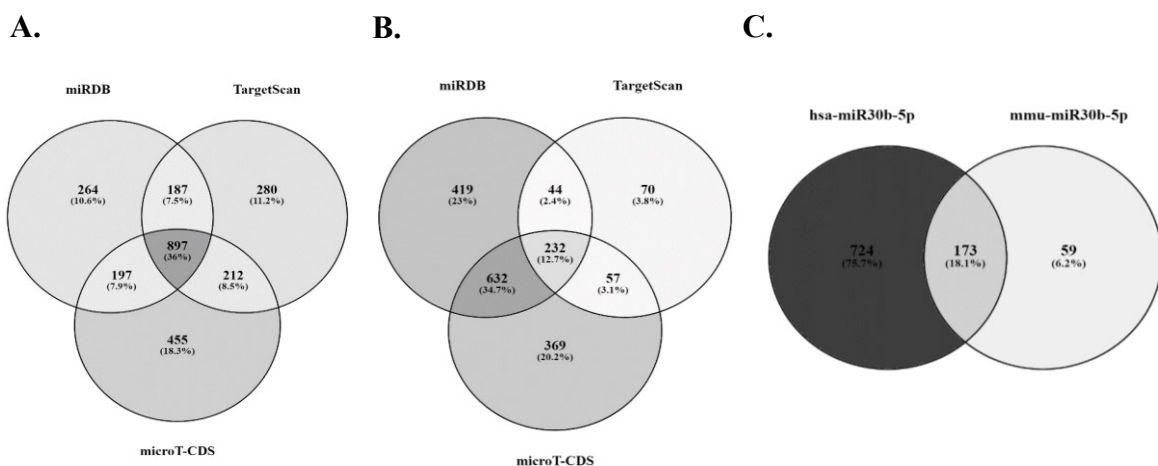


Figura 4. Diagramas de Venn obtenidos a partir de las dianas predichas a través de miRDB, TargetScan y microT-CDS. A) Dianas comunes de hsa-miR-30b-5p. B) Dianas comunes de mmu-miR-30b-5p. C) Dianas compartidas por hsa-miR-30b-5p y mmu-miR-30b-5p. Gráficos desarrollados mediante la herramienta Venny del CNB-CSIC.

4.1.3. Factores de transcripción reguladores del miR-30b.

Son varios los factores de transcripción (FT) capaces de regular la expresión de hsa-miR-30b-5p (Figura 5). Sin embargo, se desconoce el tipo de regulación concreta que ejecutan la mayoría.

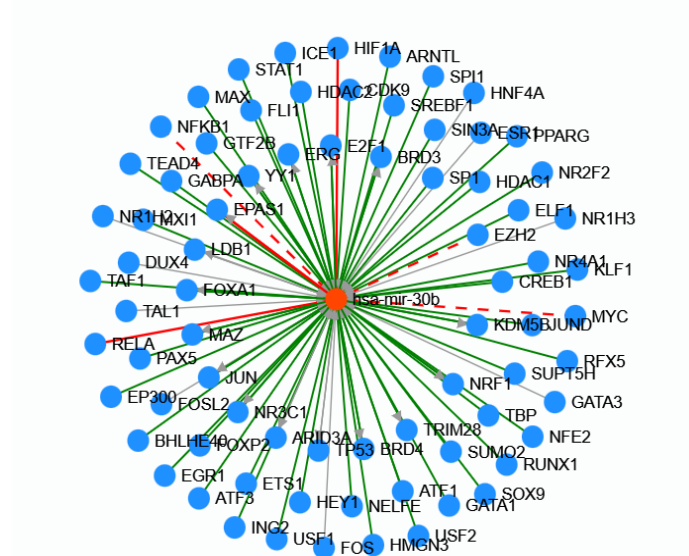


Figura 5. Factores de transcripción que regulan la expresión de hsa-miR-30b-5p. Ilustración obtenida de TransmiR.

Para comprender el mecanismo regulador que controla la expresión del miRNA, se seleccionaron los FT capaces de activar o reprimir la transcripción de miR-30b-5p (Tabla 3).

Tabla 3. Factores de transcripción de hsa-miR-30b obtenidos de la base de datos TransmiR v2.0

FT	Tipo de regulación	Tejido	Condición clínica / Tratamiento	SRAID/PMID
EZH2	Represión	Células epiteliales de cáncer de próstata	Cáncer de próstata	23728339
MYC	Represión	Linfoma de células B	Linfoma	18066065
NFKB1 (p105)	Represión	Células HeLa	Tratamiento con TNF α	24418602
EPAS1	Activación	Línea celular MCF-7	Cáncer de mama	24517586
HIF1A	Activación	Línea celular MCF-7	Cáncer de mama	24517586
NFKB (p65/RelA)	Activación	Células epiteliales biliares humanas	-	20144951

Entre los FT capaces de regular la expresión de hsa-miR-30b se encuentran varios miembros de la familia NF- κ B, p105 y p65. Esta familia de FT controla un amplio espectro de funciones biológicas. Se ha descrito su participación en diversos procesos, por ejemplo, la supervivencia celular, proliferación, diferenciación, inflamación, inmunidad o tumorigénesis (Hayden & Ghosh, 2008). Puede que el miR-30b-5p actúe como un mediador central de la vía NF-KB, contribuyendo a los efectos de esta.

En lo referente a ratón, solo se encontraron 2 FT capaces de regular mmu-miR-30b (Tabla 4).

Tabla 4. Factores de transcripción de mmu-miR-30b obtenidos de la base de datos TransmiR v2.0

FT	Tipo de regulación	Tejido	Condición clínica / Tratamiento	SRAID/PMID
E2F1	Represión	Cardiomiocitos	-	25301066
FOXF1	Regulación	Pulmón	-	SRX1585633 SRX1585634 SRX1585633

Destaca la represión transcripcional de mmu-miR-30b llevada a cabo por el factor de transcripción E2F1 (E2F1) en cardiomiocitos. En estas células, miR-30b es capaz de inhibir la muerte celular necrótica mediada por la ciclofilina D (CypD), al suprimir la traducción de CypD. De hecho, la expresión de miR-30b en cardiomiocitos reduce la necrosis y el tamaño del infarto de miocardio tras la lesión por isquemia/reperfusión (I/R) en ratones. Por tanto, E2F1 interrumpe la actividad antinecrótica de miR-30b reprimiendo su transcripción en las células musculares cardíacas. Por lo que, E2F1/miR-30b/CypD constituye un eje de regulación de la necrosis (K. Wang et al., 2015).

4.1.4. Rutas biológicas reguladas por miR-30b.

A continuación, se muestran las principales rutas biológicas reguladas por el miRNA de interés, determinadas a partir de un análisis de enriquecimiento de las dianas anteriormente predichas mediante la base de datos miRwalk. Destaca el papel que presenta miR-30b-5p en los procesos de apoptosis, inflamación, angiogénesis e hipoxia, que suceden en el endotelio vascular. A través de ellos, miR-30b-5p participa en el mantenimiento del estado fisiológico del sistema vascular y, por tanto, en la prevención del desarrollo de patologías cardíacas (Figuras 6 y 7).

Una de las dianas de miR-30b-5p es la caspasa 3, una proteasa mortal que desempeña un papel crucial en la apoptosis o muerte celular programada (Porter & Jänicke, 1999). De modo que, el miRNA puede participar en el control de la apoptosis celular, regulando la expresión de caspasa-3. Las propiedades antiapoptóticas de miR-30b fueron demostradas por Li et al. en células endoteliales de arterias coronarias humanas (HCAEC), donde observaron una reducción significativa de miR-30b en el modelo de apoptosis inducida por homocisteína (Hcy). Hcy es un factor de riesgo independiente para una variedad de enfermedades cardiovasculares capaz de inducir la apoptosis en las células endoteliales. Sin embargo, la sobreexpresión de miR-30b en HCAEC fue capaz de revertir la apoptosis inducida por Hcy, a través de la regulación negativa de la caspasa-3 (Li et al., 2015). Lo cierto es que, la apoptosis de las células endoteliales vasculares se encuentra estrechamente relacionada con la patología cardiovascular (Li et al., 2015). La ruta Hcy/miR-

30b/Caspasa-3 sustenta el posible papel cardioprotector que presenta el miRNA en el sistema vascular cardíaco.

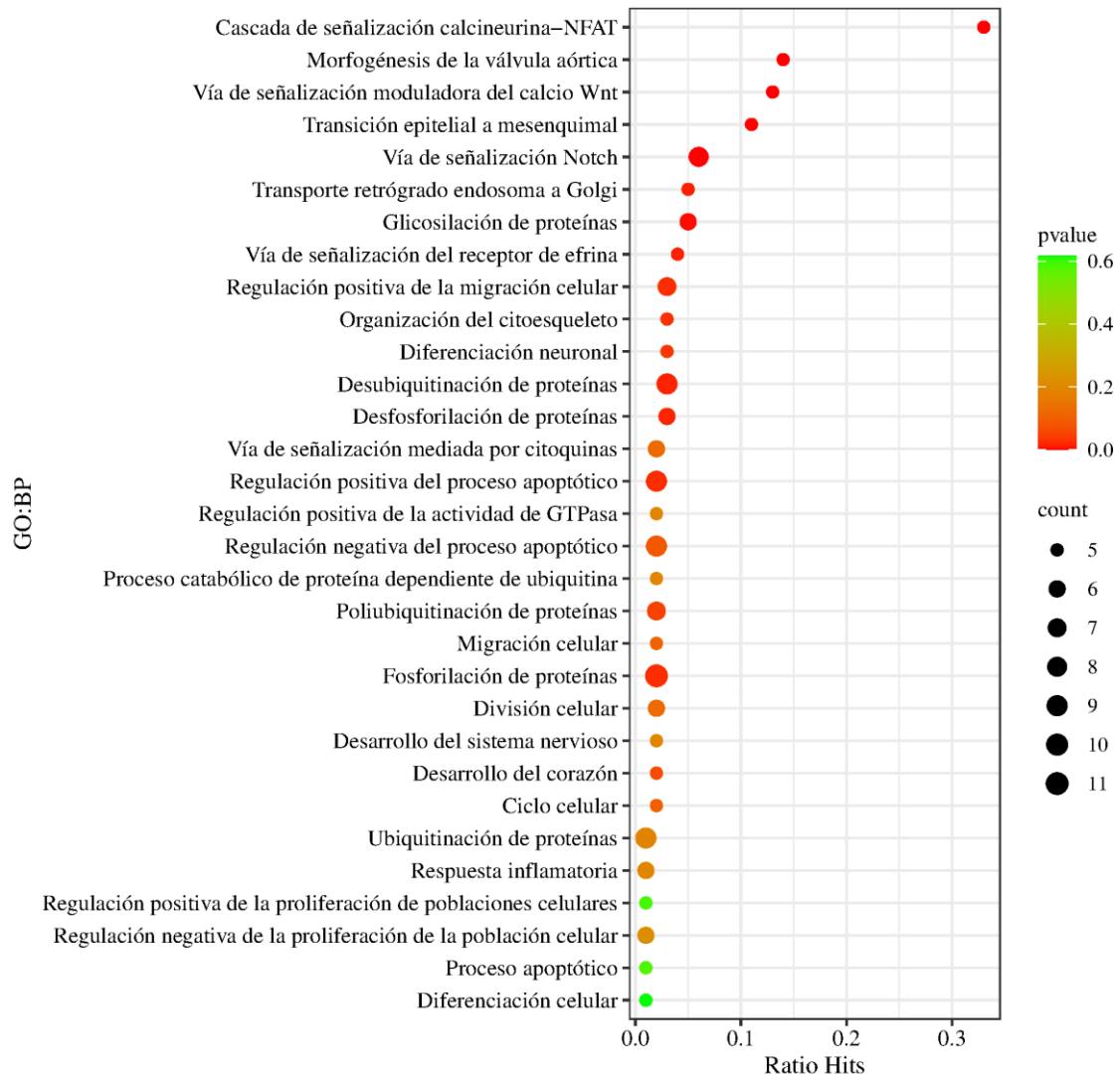


Figura 6. Procesos biológicos asociados en humanos a los genes diana de miR-30b-5p. Procesos biológicos enriquecidos anotados a 156 genes detectados de los 173 genes diana predichos. GO:BP, del inglés, *Gene Ontology:Biological Process*; Ratio hits = Hits/Pop Hits; *Hits*, número de genes diana anotados en el proceso biológico; *Pop Hits*, número de genes de toda la población de dianas predichas que coinciden con el conjunto de genes proporcionado para el análisis. Mapa de burbujas trazado mediante SRPlot.



Figura 7. Rutas KEGG asociadas en humanos a los genes diana de miR-30b-5p. Vías KEGG enriquecidas anotadas a 71 genes identificados de los 173 genes diana predichos. KEGG, del inglés, *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway*; Ratio hits= Hits/Pop Hits. Hits, número de genes diana anotados en el proceso biológico; Pop Hits, número de genes de toda la población de dianas predichas que coinciden con el conjunto de genes proporcionado para el análisis. El mapa de burbujas se trazó mediante SRPlot.

La angiopoyetina 2 (ANG-2) es otra de las dianas de miR-30b-5p. Ang-2 actúa como regulador autocrino de las respuestas inflamatorias de las células endoteliales modulando la expresión de moléculas de adhesión como VCAM1 o ICAM1. (Fiedler et al., 2006). MiR-30b-5p es capaz de reducir indirectamente la expresión de VCAM1 a través de la represión de ANG-2 (Demolli et al., 2015). De este modo, miR-30b-5p exhibe propiedades antiinflamatorias al inducir una menor adhesión de células inflamatorias al endotelio.

Cabe destacar la participación de miR-30b-5p en la regulación de la angiogénesis, mediante mecanismos antiangiogénicos o proangiogénicos. Por un lado, regula negativamente la morfogénesis capilar en células endoteliales humanas de cordón umbilical humano (HUVEC), induciendo la expresión del factor antiangiogénico TGFB2 de manera indirecta. El miRNA es capaz de regular la expresión de JDP2, que actúa como represor del regulador positivo de TGFB2, ATF2 (Howe et al., 2017). Por otro lado, puede promover la angiogénesis a través de la regulación a la baja de DLL4, un ligando del receptor NOTCH (Bridge et al., 2012).

El papel proangiogénico de miR-30b-5p puede verse favorecido también en condiciones de hipoxia. Pues, el factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF) es capaz de activar la expresión de miR-30b-5p, según han confirmado experimentos de ChIP-Seq (Camps et al., 2014). Además, el miR-30b-5p es capaz de regular otras proteínas implicadas en los procesos de angiogénesis, como las enzimas activadoras de ubiquitina E2 (UBE2s) (Pérez-Cremades et al., 2021). Dichas enzimas posibilitan la ubiquitinación de HIF y, por tanto, impiden los efectos proangiogénicos mediados por este factor (Bui et al., 2021).

4.2. Expresión de miR-30b-5p en diferentes tejidos murinos.

Tras analizar 8 tejidos procedentes de ratones SAMR1 de 6 meses de edad, se detectó expresión del miRNA en todos los tejidos. Obteniéndose una mayor expresión en riñón, pulmón y grasa perivascular. También se observó expresión, aunque en menor grado, en corazón, músculo esquelético e hígado (Figura 8). Otros estudios han detectado la expresión de miR-30b en hígado de ratones a través de RT-qPCR o secuenciación de RNA (Hand et al., 2009; Schmitt et al., 2014). Asimismo, su expresión en el músculo cardíaco ha sido reportada con anterioridad en ratones a través de un ensayo de inmunofluorescencia (Schneider et al., 2011). Cabe indicar que los resultados difieren con los obtenidos en humanos, dónde la abundancia de miR-30b-5p es mayor en músculo y pulmón (Ludwig et al., 2016).

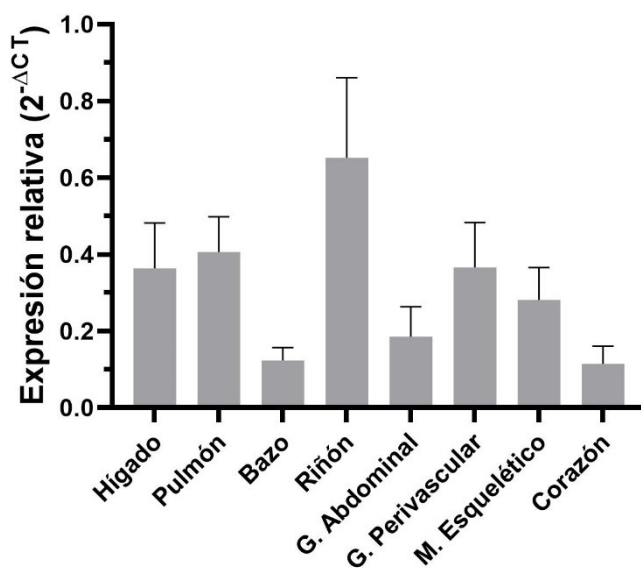


Figura 8. Expresión génica de hsa-miR-30b-5p mediante qPCR en tejidos de ratones SAMR1 macho y hembra. Se estudiaron hígado, pulmón, bazo, riñón, grasa abdominal, grasa perivascular, músculo esquelético y corazón. Expresión relativizada mediante análisis comparativo $2^{-\Delta CT}$ frente a U6. Las barras representan la media \pm SEM. $n=12$ ratones macho y hembra.

Al comparar la expresión entre machos y hembras, se observaron diferencias específicas de sexo en los tejidos analizados. Sin embargo, al realizar el análisis estadístico, solo resultaron ser significativas las diferencias encontradas en corazón y músculo esquelético. En ambos tejidos, aumentó la expresión de miR-30b-5p en hembras (Figura 9). Los resultados concuerdan con la presunta sensibilidad del miRNA a los estrógenos.

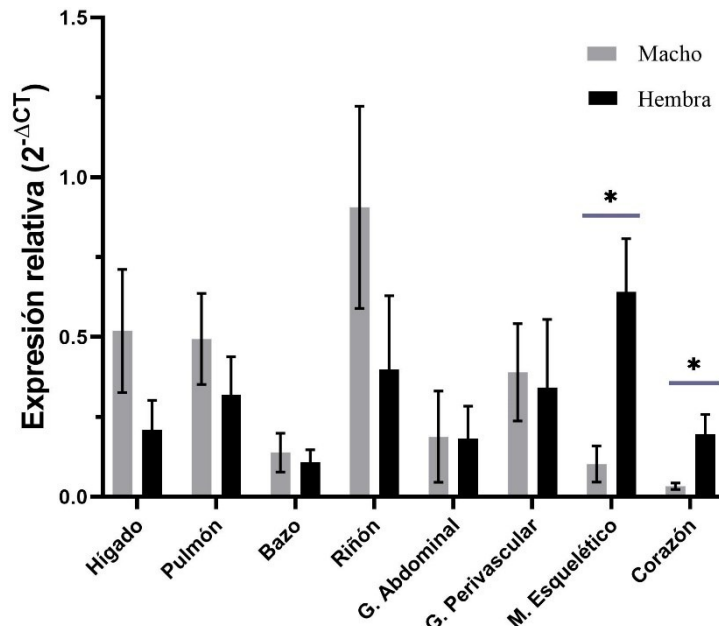


Figura 9. Expresión diferencial de hsa-miR-30b-5p mediante qPCR en tejidos de ratones SAMR1 macho y hembra. Se compararon los niveles de expresión en hígado, pulmón, bazo, riñón, grasa abdominal, grasa perivascular, músculo esquelético y corazón mediante análisis comparativo $2^{-\Delta CT}$ frente a U6. Las barras representan la media \pm SEM. * $p \leq 0.05$.

Diversos estudios han demostrado que la concentración fisiológica de estrógenos interfiere en la regulación del miR-30b-5p. Se ha detectado un aumento de expresión en células HUVEC y células de cáncer de mama tratadas con E2 (Bhat-Nakshatri et al., 2009; Vidal-Gómez et al., 2018). Su expresión también se ha visto alterada en las células epiteliales del endometrio entre las dos fases fisiológicas del ciclo menstrual (Kuokkanen et al., 2010). A su vez, también se han detectado cambios específicos de sexo en la corteza prefrontal humana de pacientes esquizofrénicos. En el caso de ratones, su expresión en el cerebro es mayor en ratones hembra y además fluctúa a lo largo de las fases del ciclo estral, siendo mayor en los períodos asociados a una mayor producción de estrógenos (Mellios et al., 2012). Todos los resultados indican que miR-30b-5p es un miRNA regulado por estrógenos.

El aumento de expresión cardíaca en hembras resulta particularmente interesante dado el posible papel cardioprotector que pueden ejercer los estrógenos a través de miR-30b-5p. Por ello, se decidió focalizar el estudio a analizar la expresión de miR-30b-5p en los corazones de los distintos grupos de estudio (Sham, Ovx, OvE).

4.3. Expresión de miR-30b-5p en el modelo murino de menopausia.

A fin de evaluar en profundidad el efecto de los estrógenos sobre la expresión de miR-30b-5p, se estudiaron los corazones de 12 ratonas de 6 meses de edad, distribuidas en los grupos experimentales Sham, Ovx y OvE. Los resultados de los grupos Ovx y OvE se compararon con los del grupo control Sham, siguiendo el método de cuantificación relativa $2^{-\Delta CT}$ (Figura 10).

La expresión de miR-30b-5p disminuyó en el grupo de ratonas Ovx en comparación a los niveles obtenidos en el grupo control (Sham). Por otra parte, los niveles disminuidos en las ratonas ovariectomizadas se volvían a restaurar en el grupo de ratonas tratadas con E2 tras la ovariectomía (OvE). No obstante, las diferencias entre los distintos grupos de estudio no fueron significativas en el test ANOVA, probablemente por la elevada dispersión de datos en el grupo de las ratonas OvE (Figura 10).

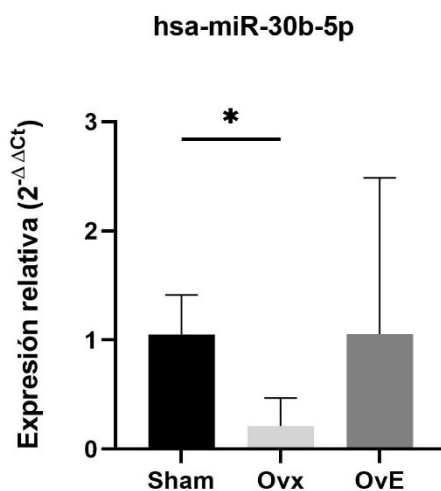


Figura 10. Expresión génica de hsa-miR-30b-5p mediante qPCR en corazones de ratonas SAMR1 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx, OvE). La expresión fue determinada mediante análisis comparativo $2^{-\Delta\Delta C_T}$ respecto al grupo control Sham y relativizada frente a U6. Las barras representan la media \pm SEM. Se emplearon $n=4$ ratonas por grupo de estudio. * $p \leq 0.05$ Sham vs Ovx.

A pesar de que el análisis estadístico no haya sido concluyente, otros experimentos muestran resultados similares. También se detectó una disminución de la expresión del miRNA en suero de ratas Ovx y mujeres osteoporóticas posmenopáusicas (Chen et al., 2016). Por otro lado, miR-30b-5p resultó estar presente en menor nivel en el cerebro de mujeres esquizofrénicas en comparación a mujeres sanas, mientras que, en los pacientes masculinos no se observaron diferencias respecto a los individuos sanos. En este caso, la expresión del miRNA disminuyó al comparar las pacientes enfermas frente a las sanas. Los cambios observados se correlacionaron con la presencia de ciertos polimorfismos en el receptor $ER\alpha$, demostrando el papel regulador de los estrógenos sobre la expresión del miRNA y la manifestación de la enfermedad. De hecho, la manifestación de un episodio esquizofrénico se encuentra estrechamente asociada a periodos de actividad reducida de estrógenos como el postparto o la menopausia (Mellios et al., 2012).

Los resultados indican que el déficit de estrógenos que caracteriza la menopausia influye en la expresión de miR-30b-5p. Como consecuencia las acciones antiinflamatorias, antiapoptóticas y proangiogénicas de miR-30b-5p pueden verse entorpecidas. Por tanto, la desregulación hormonal que sufren las mujeres tras la menopausia puede afectar a la reparación del daño cardiovascular mediada miR-30b-5p y contribuir al aumento de prevalencia de enfermedades cardiovasculares

4.4. Validación del origen de las muestras analizadas.

Debido a la elevada dispersión de resultados obtenidos en el grupo de las ratonas OvE, decidimos corroborar los cambios en los niveles de estrógenos tras la ovariectomía (Ovx) y el grupo tratado con E2 exógeno (OvE), analizando la expresión génica de eNOS, ampliamente descrita como una expresión regulada por E2. Para ello se realizó una qPCR, tal y como se describe en el apartado de métodos, siguiendo el método de cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta CT}$. Se compararon los resultados de los grupos OvX y OvE con los del grupo control Sham (Figura 11).

La expresión de génica de eNOS disminuyó en los corazones de ratonas OvX. Mientras que en el grupo de ratonas OvE aumentó, por lo que los efectos de la ovariectomía se vieron revertidos mediante el tratamiento con estradiol, validando por ello la técnica quirúrgica (Figura 11). Los resultados coinciden con los obtenidos en corazones de ratas OvX y OvE (Wang & Abdel-Rahman, 2002). Diversos estudios muestran resultados similares en ratonas y otros modelos animales (Grohé et al., 2004; Magness et al., 2001), sin embargo, ciertos estudios no detectan cambios en la expresión de la eNOS. Las diferencias encontradas en la expresión de eNOS pueden deberse a sesgos técnicos durante la realización de la intervención y procesamiento de las muestras o a sesgos biológicos como las diferencias entre los distintos tejidos vasculares y especies animales.

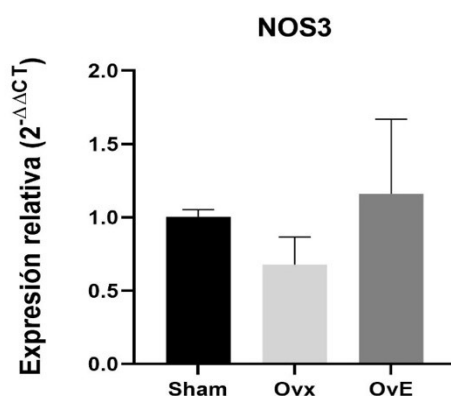


Figura 11. Expresión génica de eNOS mediante qPCR en corazones de ratonas de los diferentes grupos de estudio (Sham, OvX, OvE). Resultados determinados mediante análisis comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$ y relativizados frente a GAPDH. Las barras representan la media \pm SEM. Se emplearon $n=4$ ratonas por grupo de estudio, en total $n=12$ ratonas.

La disminución de la expresión de eNOS debida a la falta de estrógenos evidencia la contribución de estas hormonas sexuales a la modulación del tono vascular. Los estrógenos son capaces de regular la biodisponibilidad del factor vasodilatador NO a través de múltiples mecanismos (Mon-salve et al., 2007; Rubio-Gayosso et al., 2000). En este trabajo se ha estudiado particularmente el efecto directo de los estrógenos sobre la expresión de la enzima constitutiva eNOS encargada de su síntesis.

El análisis de expresión de eNOS, además de servir para validar el modelo experimental, permite valorar los efectos endoteliales derivados de la falta de estrógenos. En base a los resultados obtenidos, el déficit de estrógenos contribuye a la disfunción endotelial observada durante la menopausia y responsable del aumento de riesgo cardiovascular, junto con el envejecimiento que también la caracteriza.

5. Discusión

En primer lugar, se ha realizado un análisis bioinformático de miR-30b-5p en humano y ratón. La comparación de los miRNAs ortólogos, hsa-miR-30b-5p y mmu-miR-30b-5p, ha demostrado lo conservado que están los miRNAs entre diferentes especies y ha permitido diseñar el ensayo de expresión *in vitro* realizado con posterioridad. Además, el estudio de redes regulatorias FT/miR-30b-5p y sus posibles dianas, ha ayudado a inferir las funciones celulares de miR-30b-5p en el sistema cardiovascular.

Tras evaluar la expresión diferencial de hsa-miR-30b-5p en diversos tejidos murinos, se ha tratado de dilucidar el papel regulador de los estrógenos sobre su expresión. Un primer estudio realizado en células endoteliales ya identificó el miR-30b-5p como un miRNA sensible a los estrógenos, al observar un aumento de su expresión tras el tratamiento con E2 (Vidal-Gómez et al., 2018). Además, los sitios ERE encontrados por Vidal-Gómez et. al. en la región promotora del precursor pre-miR-30b-5p, apoyan el posible papel regulador que ejercen los estrógenos, a través de sus receptores, sobre la transcripción de miR-30b-5p (Vidal-Gómez et al., 2018). El actual estudio ha permitido corroborar la regulación estrogénica de miR-30b-5p a partir del análisis de expresión llevado a cabo en el corazón de los distintos grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE).

El análisis *in silico* funcional de las dianas predichas para el miRNA ha permitido identificar múltiples procesos biológicos involucrados en el desarrollo de la función cardiovascular, entre los cuales destacan, la supervivencia y muerte celular, la diferenciación y movilidad celular, o el metabolismo de lípidos.

El E2 afecta a la mayoría de estas rutas biológicas modulando la expresión génica a nivel transcripcional, bien de manera directa o indirecta (Arnal et al., 2010; Novella et al., 2019). Entre los genes que esta hormona esteroidea es capaz de regular, se encuentran los genes codificantes de ciertos miRNAs, como miR-30b-5p. De modo que, el miR-30b-5p podría formar parte del mecanismo regulatorio activado por E2. En consecuencia, los efectos antiapoptóticos, antiinflamatorios y proangiogénicos que presenta el E2 en el sistema cardiovascular, podrían estar mediados por miR-30b-5p.

Childs et al. determinaron que el E2 ejercía un papel antiapoptótico inhibiendo la expresión de la caspasa 3 en la microvasculatura mesentérica (Childs et al., 2010). Además, el miR-30b-5p podría estar involucrado en dicha represión, tal y como describieron Li et al. en células endoteliales de arterias coronarias humanas (Li et al., 2015). Por otro lado, la apoptosis cardiaca observada por Liou et. al. en ratas ovariectomizadas podría deberse a una menor expresión de miR-30b-5p debido a la falta de estrógenos (Liou et al., 2010).

Simoncini et al. demostraron la acción antiinflamatoria del E2, al observar una menor expresión de VCAM1 en células endoteliales tratadas con E2 (Simoncini et al., 2000). Dicha inhibición de la expresión podría estar mediada por miR-30b-5p. Dado que, Demolli et al. confirmaron el papel regulador negativo que ejerce miR-30b-5p sobre VCAM1 en células endoteliales (Demolli et al., 2015).

Por último, la vía de señalización de la hipoxia también se encuentra significativamente regulada por E2, según el análisis realizado por Pérez-Cremades et al. en células HUVEC tratadas con E2 (Pérez-Cremades et al., 2021). Según los estudios desarrollados por George et al., el E2 es capaz de mimetizar los efectos de la hipoxia y promover la angiogénesis, induciendo un aumento de expresión de HIF (George et al., 2012). Precisamente en HUVEC, Sutter et al. observaron una

disminución de los niveles de UBE2s tras el tratamiento de las células con E2 (Sutter et al., 2000). Dichas enzimas han sido identificadas en el presente trabajo como dianas del miR-30b-5p, gracias al análisis *in silico* realizado. Puede que E2 sea capaz de inhibir la degradación de HIF1 en el proteosoma, al inducir la expresión de miR-30b-5p que actúa como regulador negativo de UBE2s. De modo que, el miR-30b-5p podría estar implicado en la inducción de HIF1 y promoción de la angiogénesis por parte de E2.

5.1. Limitaciones del estudio

En el presente estudio se ha trabajado con ratonas jóvenes ovariectomizadas y, por tanto, no se ha contemplado el proceso de envejecimiento asociado a la menopausia, lo que constituye una limitación importante de este modelo de menopausia. El hecho de trabajar con esta cepa de ratonas, radica en la posibilidad de disponer de su homóloga SAMP propensa a desarrollar senescencia acelerada. En futuros trabajos está previsto incluir como modelo de menopausia las dos cepas de ratonas SAM: las ratonas SAMR1, que presentan resistencia al desarrollo de la senescencia acelerada, por lo que envejecen acorde al proceso de envejecimiento fisiológico y es la cepa AKR/J estudiada en el presente trabajo; y las SAMP8 que desarrollan senescencia acelerada y manifiestan diversos trastornos relacionados con el envejecimiento, tales como cataratas, osteoporosis, amiloidosis senil y pérdida de memoria. Este modelo SAMR1 y SAMP8 se ha descrito adecuado para realizar estudios cardiovasculares en los que se evalúa el efecto combinado del déficit de estrógenos y envejecimiento vascular que caracterizan a la menopausia (Novella et al., 2010; Vidal Gómez, 2018; Vidal-Gómez et al., 2016).

6. Conclusión

A través del estudio *in silico* e *in vitro* de miR-30b-5p se han podido extraer una serie de conclusiones:

1. El miR-30b-5p se expresa en corazón, músculo esquelético, grasa abdominal, hígado y bazo de ratones macho y hembra SAMR1 y en mayor medida en riñón, pulmón y grasa perivascular.
2. Las ratonas exhiben niveles más elevados de miR-30b-5p en corazón y músculo esquelético, en comparación con los ratones
3. La depleción de hormonas ováricas causada por la ovariectomía afecta a la expresión de miR-30b-5p en el corazón de ratonas. Se expresa de manera diferencial en los distintos grupos de estudio analizados (Sham, Ovx, OvE), siendo menor su expresión en el grupo de ratonas Ovx respecto al grupo control (Sham). La expresión diferencial observada en ratones y ratonas, y en el modelo de menopausia evaluado, evidencia la acción reguladora que desempeñan los estrógenos en la expresión de miR-30b-5p.
4. Los resultados del estudio *in vitro*, respaldados por las aproximaciones computacionales realizadas, indican que miR-30b-5p puede actuar como regulador postranscripcional de la expresión génica en las acciones vasculares mediadas por E2, participando como mediador en las vías de señalización de estrógenos que inducen acciones cardioprotectoras.
5. El análisis integrativo realizado en el presente trabajo confirma la contribución directa de los estrógenos en el mecanismo de protección cardiovascular. Lo que a su vez avala que

las hormonas sexuales son, en parte, responsables de las diferencias de sexo encontradas en las ECV.

6.1. Proyecciones futuras

Las conclusiones extraídas ayudan a conocer mejor la implicación y regulación de los miRNAs dependientes de estrógenos en el sistema cardiovascular. Sirven de base para futuros proyectos en los que se quiera ampliar el modelo de menopausia con ratones SAM. De este modo, se podrá evaluar la contribución conjunta del envejecimiento vascular y la falta de estrógenos sobre la expresión de miR-30b-5p. Asimismo, se podrán realizar experimentos para analizar la acción combinada del E2 y el miR-30b-5p en todas aquellas rutas donde se ha descrito una participación individual de ambos. Todo ello, con el objetivo de comprender mejor la implicación que tienen el déficit de estrógenos y el envejecimiento vascular, sobre la disfunción endotelial y el desarrollo de ECV durante la menopausia.

7. Anexo I

Tabla S1. Procesos biológicos asociados en humanos a los genes diana del miR-30b-5p predichos mediante miRDB, TargetScan y microT-CDS. Tabla extraída del análisis GSEA realizado a través de miRwalk sobre las 173 dianas predichas. GO:BP, del inglés, *Gene Ontology:Biological Process*; Hits, número de genes diana anotados en el proceso biológico; Pop Hits, número de genes de toda la población de dianas predichas que coinciden con el conjunto de genes proporcionado para el análisis; Genes, genes diana asociados al proceso biológico.

GO:BP	Proceso Biológico	Ratio Hits	Hits	Pop Hits	pValue (BH)	Genes
GO:0033173	Cascada de señalización calcineurina-NFAT	0,33	5	15	0	PPP3CA ; PPP3R1; NFAT5
GO:0003180	Morfogénesis de la válvula aórtica	0,14	5	35	0	SOX9; SNAI1; NOTCH1
GO:0007223	Vía de señalización moduladora del calcio Wnt	0,13	5	39	0	PPP3CA ; PPP3R1; TNRC6B; TNRC6C; TNRC6A
GO:0001837	Transición epitelial a mesenquimal	0,11	5	47	0,001	SOX9; SNAI1; NOTCH1
GO:0007219	Vía de señalización Notch	0,06	8	127	0,000	SOX9; MAML1; SPEN; NOTCH1
GO:0006486	Glicosilación de proteínas	0,05	6	119	0,003	EXTL2; ST8SIA4; MAN1A2; NUS1
GO:0042147	Transporte retrógrado endosoma a Golgi	0,05	5	109	0,013	STX16; TMEM87A; TBC1D10B
GO:0048013	Vía de señalización del receptor de efrina	0,04	5	115	0,014	RASA1; EFNA3
GO:0006470	Desfosforilación de proteínas	0,03	6	178	0,017	PPP3CA ; PPP3R1; PPP1R12A; LRR40
GO:0007010	Organización del citoesqueleto	0,03	5	155	0,028	SOX9; LARP4; DPYSL2; STRIP1; FGD6
GO:0030182	Diferenciación neuronal	0,03	5	164	0,033	ATP2B2; LHX9; HDAC9; DNMT3A; NEUROD1
GO:0030335	Regulación positiva de la migración celular	0,03	7	266	0,026	PPP3CA; ACVR1 ; GNAI2; PIK3CD; SNAI1; SEMA3A; NOTCH1
GO:0016579	Desubiquitinación de proteínas	0,03	9	350	0,015	USP48; SKP2; USP2; DESI2; JOSD1; INO80D
GO:0007507	Desarrollo del corazón	0,02	5	207	0,064	SOX9; ACVR1; BCOR; HDAC9; NOTCH1
GO:0043065	Regulación positiva del proceso apoptótico	0,02	9	393	0,026	RARB; MCF2L; BCL6; MAPK8; ARHGFE6; FRZB; NEUROD1; DCUN1D3
GO:0000209	Poliubiquitinación de proteínas	0,02	7	324	0,050	FBXL20; SKP2; NEDD4; HECW1; LONRF1 ; UBE3C
GO:0007049	Ciclo celular	0,02	5	245	0,101	CSNK1A1; CCNK; GNAI2; USP2; FIGN
GO:0006468	Fosforilación de proteínas	0,02	11	546	0,026	CSNK1A1; CCNK; ACVR1; ERG; MAPK8; PIK3CD; MAML1; TAOK1; STK35
GO:0016477	Migración celular	0,02	5	255	0,109	NDEL1; DGKZ; PIK3CD; SNAI1; AVL9
GO:0051301	División celular	0,02	6	351	0,124	REEP3; CSNK1A1; STAG2; CCNK; GNAI2; FIGN
GO:0019221	Vía de señalización mediada por citoquinas	0,02	6	352	0,124	BCL6; IRF4; PIK3CD; KRAS; SOCS3; RORA
GO:0043066	Regulación negativa del proceso apoptótico	0,02	9	544	0,085	SOX9; RARB; MAPK8; ATG5; RNF157; SOCS; RASA1; SIX4
GO:0006511	Proceso catabólico de proteína dependiente de ubiquitina	0,02	5	328	0,197	USP48; USP2; NEDD4; UBE3C
GO:0007399	Desarrollo del sistema nervioso	0,02	5	330	0,197	RBFOX1; DPYSL2; DOC2A; TTLL7; ST8SIA4
GO:0043547	Regulación positiva de la actividad de GTPasa	0,02	5	332	0,197	NDEL; SNX18; ARHGFE6 ; RASA1; ELMOD2
GO:0006954	Respuesta inflamatoria	0,01	6	410	0,194	AFAP1L2; BCL6; HDAC9; PIK3CD; SCN9A
GO:0008285	Regulación negativa de la proliferación de la población celular	0,01	6	442	0,220	RARB; BCL6; PBRM1; FRZB; NOTCH1; CAMK2N1

GO:0016567	Ubiquitinación de proteínas	0,01	9	678	0,189	NEDD4; HECW1; RNF220; RNF157; SOCS3; SOCS6
GO:0006915	Proceso apoptótico	0,01	5	571	0,584	NSG1; MAGI3; ATG5; ARHGEF6; SEMA3A
GO:0008284	Regulación positiva de la proliferación de poblaciones celulares	0,01	5	584	0,591	SOX9; GNAI2; KRAS; NOTCH1
GO:0030154	Diferenciación celular	0,01	5	611	0,618	RARB; ERG; TLL7; STX2 ; NUS1

Tabla S2. Rutas KEGG asociadas en humanos a los genes diana del miR-30b-5p predichos mediante miRDB, TargetScan y microT-CDS. Tabla extraída del análisis GSEA realizado a través de miRwalk sobre las 173 dianas predichas. KEGG, del inglés, *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway*; Ratio Hits = Hits/Pop Hits; Hits, número de genes diana anotados en el proceso biológico; Pop Hits, número de genes de toda la población de dianas predichas que coinciden con el conjunto de genes proporcionado para el análisis; Genes, genes diana asociados a la ruta KEGG.

ID KEGG	Ruta KEGG	Ratio hits	Hits	Pop Hits	pValue (BH)	Genes
hsa04917	Vía de señalización de la prolactina	0,07	5	70	0,014	MAPK8; PIK3CD; KRAS; SOCS3; SOCS6
hsa04625	Vía de señalización del receptor de lectina tipo C	0,06	6	104	0,014	PPP3CA; PPP3R1; MAPK8; PIK3CD; KSR1; KRAS
hsa04658	Diferenciación celular Th1 y Th2	0,05	5	92	0,022	PPP3CA ; PPP3R1; MAPK8; MAML1; NOTCH1
hsa04914	Maduración de ovocitos mediada por progesterona	0,05	5	99	0,022	GNAI2; MAPK8; CPEB4; PIK3CD; KRAS
hsa04660	Vía de señalización del receptor de células T	0,05	5	104	0,023	PPP3CA; PPP3R1; MAPK8; PIK3CD; KRAS
hsa04659	Diferenciación celular Th17	0,05	5	107	0,024	PPP3CA; PPP3R1; IRF4; MAPK8; RORA
hsa04310	Vía de señalización Wnt	0,04	7	160	0,019	PPP3CA; PPP3R1; CSNK1A1; PRICKLE1; MAPK8; TBL1XR1; FZD3
hsa04935	Secreción y acción de la síntesis de la hormona del crecimiento	0,04	5	119	0,027	MAPK8; PIK3CD; KRAS; SOCS3
hsa04380	Diferenciación de osteoclastos	0,04	5	128	0,031	PPP3CA; PPP3R1; MAPK8; PIK3CD; SOCS3
hsa04068	Vía de señalización FoxO	0,04	5	131	0,031	BCL6; SKP2; MAPK8; PIK3CD; KRAS
hsa04728	Sinapsis dopaminérgica	0,04	5	132	0,031	GRIA2; PPP3CA; SCN1A; GNAI2; MAPK8
hsa04810	Regulación del citoesqueleto de actina	0,04	8	213	0,019	ITGA6; PPP1R12A; CFL2; ARHGEF6; PIP4K2A; PIK3CD; KRAS; PIP4K2B
hsa04140	Autofagia	0,04	5	137	0,032	MAPK8; ATG5; PIK3CD; KRAS; RAB8A
hsa04921	Vía de señalización de oxitocina	0,03	5	153	0,041	PPP3CA; PPP3R1; PPP1R12A; GNAI2; KRAS
hsa04024	Vía de señalización de cAMP	0,03	7	216	0,027	SOX9; GRIA2; ATP2B2; PPP1R12A; GNAI2; MAPK8; PIK3CD
hsa04218	Senescencia celular	0,03	5	160	0,046	PPP3CA; PPP3R1; TRPM7; PIK3CD; KRAS
hsa04014	Vía de señalización Ras	0,03	7	232	0,031	MAPK8; RASA2; PIK3CD; KSR1; KRAS; RASA1; EFNA3
hsa04022	Vía de señalización cGMP-PKG	0,03	5	167	0,050	PPP3CA ; PPP3R1; ATP2B2; PPP1R12A; GNAI2
hsa04010	Vía de señalización MAPK	0,03	8	295	0,031	PPP3CA; PPP3R1; MAPK8; RASA2; KRAS; RASA1; EFNA3; TAOK1
hsa04015	Vía de señalización Rap1	0,02	5	210	0,091	MAGI3; GNAI2; PIK3CD; KRAS; EFNA3

8. Bibliografía

- Ach, R. A., Wang, H., & Curry, B. (2008). Measuring microRNAs: Comparisons of microarray and quantitative PCR measurements, and of different total RNA prep methods. *BMC Biotechnology*, 8(1), 69. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-8-69>
- Arnal, J.-F., Fontaine, C., Billon-Galés, A., Favre, J., Laurell, H., Lenfant, F., & Gourdy, P. (2010). Estrogen Receptors and Endothelium. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(8), 1506-1512. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.191221>
- Arnal, J.-F., Lenfant, F., Metivier, R., Flouriot, G., Henrion, D., Adlanmerini, M., Fontaine, C., Gourdy, P., Chambon, P., Katzenellenbogen, B., & Katzenellenbogen, J. (2017). Membrane and Nuclear Estrogen Receptor Alpha Actions: From Tissue Specificity to Medical Implications. *Physiological Reviews*, 97(3), 1045-1087. <https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2016>
- Arora, S., Rana, R., Chhabra, A., Jaiswal, A., & Rani, V. (2013). miRNA–transcription factor interactions: a combinatorial regulation of gene expression. *Molecular Genetics and Genomics*, 288(3-4), 77-87. <https://doi.org/10.1007/s00438-013-0734-z>
- Barton, M., Filardo, E. J., Lolait, S. J., Thomas, P., Maggiolini, M., & Prossnitz, E. R. (2018). Twenty years of the G protein-coupled estrogen receptor GPER: Historical and personal perspectives. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 176, 4-15. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.03.021>
- Bellino, F. L., & Wise, P. M. (2003). Nonhuman Primate Models of Menopause Workshop1. *Biology of Reproduction*, 68(1), 10-18. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.005215>
- Bhat-Nakshatri, P., Wang, G., Collins, N. R., Thomson, M. J., Geistlinger, T. R., Carroll, J. S., Brown, M., Hammond, S., Srour, E. F., Liu, Y., & Nakshatri, H. (2009). Estradiol-regulated microRNAs control estradiol response in breast cancer cells. *Nucleic Acids Research*, 37(14), 4850-4861. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp500>
- Bimonte-Nelson, H. A., Daniel, J. M., & Koebele, S. V. (2015). *The maze book: theories, practice, and protocols for testing rodent cognition*. Springer.
- Bridge, G., Monteiro, R., Henderson, S., Emuss, V., Lagos, D., Georgopoulou, D., Patient, R., & Boshoff, C. (2012). The microRNA-30 family targets DLL4 to modulate endothelial cell behavior during angiogenesis. *Blood*, 120(25), 5063-5072. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-423004>
- Bui, Q. T., Hong, J. H., Kwak, M., Lee, J. Y., & Lee, P. C.-W. (2021). Ubiquitin-Conjugating Enzymes in Cancer. *Cells*, 10(6), 1383. <https://doi.org/10.3390/cells10061383>
- Camps, C., Saini, H. K., Mole, D. R., Choudhry, H., Reczko, M., Guerra-Assunção, J., Tian, Y.-M., Buffa, F. M., Harris, A. L., Hatzigeorgiou, A. G., Enright, A. J., & Ragoussis, J. (2014). Integrated analysis of microRNA and mRNA expression and association with HIF binding reveals the complexity of microRNA expression regulation under hypoxia. *Molecular Cancer*, 13(1), 28. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-28>
- Chambliss, K. L., & Shaul, P. W. (2002). Rapid activation of endothelial NO synthase by estrogen: evidence for a steroid receptor fast-action complex (SRFC) in caveolae. *Steroids*, 67(6), 413-419. [https://doi.org/10.1016/S0039-128X\(01\)00177-5](https://doi.org/10.1016/S0039-128X(01)00177-5)
- Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., Barbisin, M., Xu, N. L., Mahuvakar, V. R., Andersen, M. R., Lao, K. Q., Livak, K. J., & Guegler, K. J.

- (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 33(20). <https://doi.org/10.1093/nar/gni178>
- Chen, J., Li, K., Pang, Q., Yang, C., Zhang, H., Wu, F., Cao, H., Liu, H., Wan, Y., Xia, W., Wang, J., Dai, Z., & Li, Y. (2016). Identification of suitable reference gene and biomarkers of serum miRNAs for osteoporosis. *Scientific Reports*, 6(1), 36347. <https://doi.org/10.1038/srep36347>
- Chen, Y., & Wang, X. (2020). miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D127-D131. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz757>
- Childs, E. W., Tharakan, B., Hunter, F. A., & Smythe, W. R. (2010). 17 β -ESTRADIOL MEDIATED PROTECTION AGAINST VASCULAR LEAK AFTER HEMORRHAGIC SHOCK. *Shock*, 34(3), 229-235. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3181d75b50>
- Correia de Sousa, M., Gjorgjieva, M., Dolicka, D., Sobolewski, C., & Foti, M. (2019). Deciphering miRNAs' Action through miRNA Editing. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24), 6249. <https://doi.org/10.3390/ijms20246249>
- Davezac, M., Buscato, M., Zahreddine, R., Lacolley, P., Henrion, D., Lenfant, F., Arnal, J.-F., & Fontaine, C. (2021). Estrogen Receptor and Vascular Aging. *Frontiers in Aging*, 2. <https://doi.org/10.3389/fragi.2021.727380>
- Demolli, S., Doebele, C., Doddaballapur, A., Lang, V., Fisslthaler, B., Chavakis, E., Vinciguerra, M., Sciacca, S., Henschler, R., Hecker, M., Savant, S., Augustin, H. G., Kaluza, D., Dimmeler, S., & Boon, R. A. (2015). MicroRNA-30 mediates anti-inflammatory effects of shear stress and KLF2 via repression of angiopoietin 2. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 88, 111-119. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.10.009>
- Fiedler, U., Reiss, Y., Scharpfenecker, M., Grunow, V., Koidl, S., Thurston, G., Gale, N. W., Witznath, M., Rosseau, S., Suttorp, N., Sobke, A., Herrmann, M., Preissner, K. T., Vajkoczy, P., & Augustin, H. G. (2006). Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF- α and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nature Medicine*, 12(2), 235-239. <https://doi.org/10.1038/nm1351>
- Finch, C. E. (2014). The menopause and aging, a comparative perspective. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 142, 132-141. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.03.010>
- Forero, D. A., González-Giraldo, Y., Castro-Vega, L. J., & Barreto, G. E. (2019). qPCR-based methods for expression analysis of miRNAs. *BioTechniques*, 67(4), 192-199. <https://doi.org/10.2144/btn-2019-0065>
- Friedman, R. C., Farh, K. K.-H., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*, 19(1), 92-105. <https://doi.org/10.1101/gr.082701.108>
- George, A. L., Rajoria, S., Suriano, R., Mittleman, A., & Tiwari, R. K. (2012). Hypoxia and estrogen are functionally equivalent in breast cancer-endothelial cell interdependence. *Molecular Cancer*, 11(1), 80. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-11-80>
- Git, A., Dvinge, H., Salmon-Divon, M., Osborne, M., Kutter, C., Hadfield, J., Bertone, P., & Caldas, C. (2010). Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression. *RNA*, 16(5), 991-1006. <https://doi.org/10.1261/rna.1947110>

- Goldman, J. M., Murr, A. S., & Cooper, R. L. (2007). The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, *80*(2), 84-97. <https://doi.org/10.1002/bdrb.20106>
- Grohé, C., Kann, S., Fink, L., Djoufack, P. C., Paehr, M., Eickels, M. van, Vetter, H., Meyer, R., & Fink, K. B. (2004). 17 β -Estradiol regulates nNOS and eNOS activity in the hippocampus. *NeuroReport*, *15*(1), 89-93. <https://doi.org/10.1097/00001756-200401190-00018>
- Hand, N. J., Master, Z. R., Eauclaire, S. F., Weinblatt, D. E., Matthews, R. P., & Friedman, J. R. (2009). The microRNA-30 Family Is Required for Vertebrate Hepatobiliary Development. *Gastroenterology*, *136*(3), 1081-1090. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.12.006>
- Hao, L., Li, J., Tian, Y., & Wu, J. (2016). Changes in the MicroRNA Profile of the Mandible of Ovariectomized Mice. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *38*(4), 1267-1287. <https://doi.org/10.1159/000443074>
- Harlow, S. D., Gass, M., Hall, J. E., Lobo, R., Maki, P., Rebar, R. W., Sherman, S., Sluss, P. M., & de Villiers, T. J. (2012). Executive summary of the Stages of Reproductive Aging Workshop +10: addressing the unfinished agenda of staging reproductive aging. *Climacteric*, *15*(2), 105-114. <https://doi.org/10.3109/13697137.2011.650656>
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2008). Shared Principles in NF- κ B Signaling. *Cell*, *132*(3), 344-362. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.020>
- Hayward, C. (2000). The roles of gender, the menopause and hormone replacement on cardiovascular function. *Cardiovascular Research*, *46*(1), 28-49. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(00\)00005-5](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(00)00005-5)
- Howe, G. A., Kazda, K., & Addison, C. L. (2017). MicroRNA-30b controls endothelial cell capillary morphogenesis through regulation of transforming growth factor beta 2. *PLoS ONE*, *12*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185619>
- Iorga, A., Cunningham, C. M., Moazeni, S., Ruffenach, G., Umar, S., & Eghbali, M. (2017). The protective role of estrogen and estrogen receptors in cardiovascular disease and the controversial use of estrogen therapy. En *Biology of sex differences* (Vol. 8, Número 1, p. 33). <https://doi.org/10.1186/s13293-017-0152-8>
- Kermath, B. A., & Gore, A. C. (2012). Neuroendocrine Control of the Transition to Reproductive Senescence: Lessons Learned from the Female Rodent Model. *Neuroendocrinology*, *96*(1), 1-12. <https://doi.org/10.1159/000335994>
- Klinge, C. M. (2001). Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Research*, *29*(14), 2905-2919. <https://doi.org/10.1093/nar/29.14.2905>
- Kozomara, A., & Griffiths-Jones, S. (2011). miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Research*, *39*(Database), D152-D157. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1027>
- Kuokkanen, S., Chen, B., Ojalvo, L., Benard, L., Santoro, N., & Pollard, J. W. (2010). Genomic profiling of microRNAs and messenger RNAs reveals hormonal regulation in microRNA expression in human endometrium. *Biology of Reproduction*, *82*(4), 791-801. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.081059>
- Lerner, D. J., & Kannel, W. B. (1986). Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: A 26-year follow-up of the Framingham population. *American Heart Journal*, *111*(2), 383-390. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(86\)90155-9](https://doi.org/10.1016/0002-8703(86)90155-9)

- Lewis, B. P., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2005). Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. *Cell*, *120*(1), 15-20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.035>
- Li, F., Chen, Q., Song, X., Zhou, L., & Zhang, J. (2015). MiR-30b Is Involved in the Homocysteine-Induced Apoptosis in Human Coronary Artery Endothelial Cells by Regulating the Expression of Caspase 3. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(8), 17682-17695. <https://doi.org/10.3390/ijms160817682>
- Li, X., Wei, Y., & Wang, Z. (2018). microRNA-21 and hypertension. En *Hypertension Research* (Vol. 41, Número 9, pp. 649-661). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41440-018-0071-z>
- Liou, C.-M., Yang, A.-L., Kuo, C.-H., Tin, H., Huang, C.-Y., & Lee, S.-D. (2010). Effects of 17beta-estradiol on cardiac apoptosis in ovariectomized rats. *Cell Biochemistry and Function*, *28*(6), 521-528. <https://doi.org/10.1002/cbf.1687>
- Liu, B., Li, J., & Cairns, M. J. (2014). Identifying miRNAs, targets and functions. *Briefings in Bioinformatics*, *15*(1), 1-19. <https://doi.org/10.1093/bib/bbs075>
- Ludwig, N., Leidinger, P., Becker, K., Backes, C., Fehlmann, T., Pallasch, C., Rheinheimer, S., Meder, B., Stähler, C., Meese, E., & Keller, A. (2016). Distribution of miRNA expression across human tissues. *Nucleic Acids Research*, *44*(8), 3865-3877. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw116>
- Maas, A. H. E. M., Rosano, G., Cifkova, R., Chieffo, A., Van Dijken, D., Hamoda, H., Kuna-dian, V., Laan, E., Lambrinou-daki, I., MacLaran, K., Panay, N., Stevenson, J. C., Van Trotsenburg, M., & Collins, P. (2021). Cardiovascular health after menopause transition, pregnancy disorders, and other gynaecologic conditions: A consensus document from European cardiologists, gynaecologists, and endocrinologists. *European Heart Journal*, *42*(10), 967-984. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa1044>
- MacFarlane, L.-A., & R. Murphy, P. (2010). MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Current Genomics*, *11*(7), 537-561. <https://doi.org/10.2174/138920210793175895>
- Magness, R. R., Sullivan, J. A., Li, Y., Phernetton, T. M., & Bird, I. M. (2001). Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. VI. Ovarian and pregnancy effects on eNOS and NO(x). *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *280*(4), H1692-H1698. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.280.4.H1692>
- Mao, L., Liu, S., Hu, L., Jia, L., Wang, H., Guo, M., Chen, C., Liu, Y., & Xu, L. (2018). MiR-30 Family: A Promising Regulator in Development and Disease. En *BioMed Research International* (Vol. 2018). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2018/9623412>
- Mellios, N., Galdzicka, M., Ginns, E., Baker, S. P., Rogae, E., Xu, J., & Akbarian, S. (2012). Gender-specific reduction of estrogen-sensitive small RNA, miR-30b, in subjects with schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, *38*(3), 433-443. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbq091>
- Mitra, R., Lin, C.-C., Eischen, C. M., Bandyopadhyay, S., & Zhao, Z. (2015). Concordant dysregulation of miR-5p and miR-3p arms of the same precursor microRNA may be a mechanism in inducing cell proliferation and tumorigenesis: a lung cancer study. *RNA*, *21*(6), 1055-1065. <https://doi.org/10.1261/rna.048132.114>
- Monsalve, E., Oviedo, P. J., García-Pérez, M. A., Tarín, J. J., Cano, A., & Hermenegildo, C. (2007). Estradiol counteracts oxidized LDL-induced asymmetric dimethylarginine production by cultured human endothelial cells. *Cardiovascular Research*, *73*(1), 66-72.

- Mroczek, S., & Dziembowski, A. (2013). U6 RNA biogenesis and disease association. *WIREs RNA*, 4(5), 581-592. <https://doi.org/10.1002/wrna.1181>
- Neves-e-Castro, M., Birkhauser, M., Samsioe, G., Lambrinoudaki, I., Palacios, S., Borrego, R. S., Llana, P., Ceausu, I., Depypere, H., Erel, C. T., Pérez-López, F. R., Schenck-Gustafsson, K., van der Schouw, Y. T., Simoncini, T., Tremollieres, F., & Rees, M. (2015). EMAS position statement: The ten point guide to the integral management of menopausal health. *Maturitas*, 81(1), 88-92. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2015.02.003>
- Newson, L. (2018). Menopause and cardiovascular disease. *Post Reproductive Health*, 24(1), 44-49. <https://doi.org/10.1177/2053369117749675>
- Novella, S., Dantas, A. P., Segarra, G., Novensà, L., Bueno, C., Heras, M., Hermenegildo, C., & Medina, P. (2010). Gathering of aging and estrogen withdrawal in vascular dysfunction of senescent accelerated mice. *Experimental Gerontology*, 45(11), 868-874. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.07.007>
- Novella, S., Pérez-Cremades, D., Mompeón, A., & Hermenegildo, C. (2019). Mechanisms underlying the influence of oestrogen on cardiovascular physiology in women. *The Journal of Physiology*, 597(19), 4873-4886. <https://doi.org/10.1113/JP278063>
- Paraskevopoulou, M. D., Georgakilas, G., Kostoulas, N., Vlachos, I. S., Vergoulis, T., Reczko, M., Filippidis, C., Dalamagas, T., & Hatzigeorgiou, A. G. (2013). DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows. *Nucleic Acids Research*, 41(W1), W169-W173. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt393>
- Pérez-Cremades, D., Mompeón, A., Vidal-Gómez, X., Hermenegildo, C., & Novella, S. (2018a). miRNA as a New Regulatory Mechanism of Estrogen Vascular Action. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 473. <https://doi.org/10.3390/ijms19020473>
- Pérez-Cremades, D., Mompeón, A., Vidal-Gómez, X., Hermenegildo, C., & Novella, S. (2018b). Role of miRNA in the regulatory mechanisms of estrogens in cardiovascular ageing. En *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2018). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2018/6082387>
- Pérez-Cremades, D., Paes, A. B., Vidal-Gómez, X., Mompeón, A., Hermenegildo, C., & Novella, S. (2021). Regulatory network analysis in estradiol-treated human endothelial cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15). <https://doi.org/10.3390/ijms22158193>
- Porter, A. G., & Jänicke, R. U. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, 6(2), 99-104. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400476>
- Rubio-Gayosso, I., Sierra-Ramirez, A., García-Vázquez, A., Martínez-Martínez, A., Muñoz-García, O., Morato, T., & Ceballos-Reyes, G. (2000). 17β-Estradiol Increases Intracellular Calcium Concentration Through a Short-Term and Nongenomic Mechanism in Rat Vascular Endothelium in Culture. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 36(2), 196-202. <https://doi.org/10.1097/00005344-200008000-00009>
- Schmitt, B. M., Rudolph, K. L. M., Karagianni, P., Fonseca, N. A., White, R. J., Talianidis, I., Odom, D. T., Marioni, J. C., & Kutter, C. (2014). High-resolution mapping of transcriptional dynamics across tissue development reveals a stable mRNA-tRNA interface. *Genome Research*, 24(11), 1797-1807. <https://doi.org/10.1101/gr.176784.114>
- Schneider, M., Andersen, D. C., Silahiroglu, A., Lyngbæk, S., Kauppinen, S., Hansen, J. L., & Sheikh, S. P. (2011). Cell-specific detection of microRNA expression during cardiomyogenesis by combined in situ hybridization and immunohistochemistry. *Journal of Molecular Histology*, 42(4), 289-299. <https://doi.org/10.1007/s10735-011-9332-8>

- Shapiro, M. (2012). Menopause practice: A clinician's guide. *Canadian Family Physician*, 58(9), 989.
- Simoncini, T., Maffei, S., Basta, G., Barsacchi, G., Genazzani, A. R., Liao, J. K., & De Caterina, R. (2000). Estrogens and Glucocorticoids Inhibit Endothelial Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression by Different Transcriptional Mechanisms. *Circulation Research*, 87(1), 19-25. <https://doi.org/10.1161/01.RES.87.1.19>
- Sticht, C., De La Torre, C., Parveen, A., & Gretz, N. (2018). miRWalk: An online resource for prediction of microRNA binding sites. *PLOS ONE*, 13(10), e0206239. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206239>
- Sumi, D., & Ignarro, L. J. (2003). Estrogen-related receptor $\alpha 1$ up-regulates endothelial nitric oxide synthase expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(24), 14451-14456. <https://doi.org/10.1073/pnas.2235590100>
- Sutter, C. H., Laughner, E., & Semenza, G. L. (2000). Hypoxia-inducible factor 1 α protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(9), 4748-4753. <https://doi.org/10.1073/pnas.080072497>
- Teter, B. (2009). Rodent Aging. En *Encyclopedia of Neuroscience* (pp. 397-406). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.00120-0>
- The North American Menopause Society. (2012). The 2012 Hormone Therapy Position Statement of The North American Menopause Society. *Menopause*, 19(3), 257-271. <https://doi.org/10.1097/gme.0b013e31824b970a>
- THERMO FISHER SCIENTIFIC. (s. f.). *Essentials of Real Time PCR*.
- Vidal Gómez, X. (2018). *Efecto de las ciclooxigenasas en la biodisponibilidad del óxido nítrico en la respuesta vascular al tromboxano A2 en un modelo murino de envejecimiento y menopausia*. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Valencia.
- Vidal-Gómez, X., Novella, S., Pérez-Monzó, I., Garabito, M., Dantas, A. P., Segarra, G., Hermenegildo, C., & Medina, P. (2016). Decreased bioavailability of nitric oxide in aorta from ovariectomized senescent mice. Role of cyclooxygenase. *Experimental Gerontology*, 76, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2016.01.006>
- Vidal-Gómez, X., Pérez-Cremades, D., Mompeón, A., Dantas, A. P., Novella, S., & Hermenegildo, C. (2018). MicroRNA as Crucial Regulators of Gene Expression in Estradiol-Treated Human Endothelial Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 45(5), 1878-1892. <https://doi.org/10.1159/000487910>
- Virani, S. S., Alonso, A., Aparicio, H. J., Benjamin, E. J., Bittencourt, M. S., Callaway, C. W., Carson, A. P., Chamberlain, A. M., Cheng, S., Delling, F. N., Elkind, M. S. V., Evenson, K. R., Ferguson, J. F., Gupta, D. K., Khan, S. S., Kissela, B. M., Knutson, K. L., Lee, C. D., Lewis, T. T., ... Tsao, C. W. (2021). Heart Disease and Stroke Statistics—2021 Update. *Circulation*, 143(8). <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000950>
- Wang, J., Lu, M., Qiu, C., & Cui, Q. (2010). TransmiR: a transcription factor-microRNA regulation database. *Nucleic Acids Research*, 38(suppl_1), D119-D122. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp803>
- Wang, K., An, T., Zhou, L.-Y., Liu, C.-Y., Zhang, X.-J., Feng, C., & Li, P.-F. (2015). E2F1-regulated miR-30b suppresses Cyclophilin D and protects heart from ischemia/reperfusion injury and necrotic cell death. *Cell Death & Differentiation*, 22(5), 743-754. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.165>

- Wang, X., & Abdel-Rahman, A. A. (2002). Estrogen modulation of eNOS activity and its association with caveolin-3 and calmodulin in rat hearts. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 282(6), H2309-H2315. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00772.2001>
- Wong, L., Lee, K., Russell, I., & Chen, C. (2007). Endogenous controls for real-time quantitation of miRNA using TaqMan microRNA assays. *Applied Biosystems Application Note*, P11-P01.
- Yang, S.-J., Yang, S.-Y., Wang, D.-D., Chen, X., Shen, H.-Y., Zhang, X.-H., Zhong, S.-L., Tang, J.-H., & Zhao, J.-H. (2017). The miR-30 family: Versatile players in breast cancer. *Tumor Biology*, 39(3), 101042831769220. <https://doi.org/10.1177/1010428317692204>
- Zaporozhchenko, I. A., Rykova, E. Yu., & Laktionov, P. P. (2020). The Fundamentals of miRNA Biology: Structure, Biogenesis, and Regulatory Functions. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 46(1), 1-13. <https://doi.org/10.1134/S106816202001015X>
- Zhang, X., Dong, S., Jia, Q., Zhang, A., Li, Y., Zhu, Y., Lv, S., & Zhang, J. (2019). The microRNA in ventricular remodeling: the miR-30 family. *Bioscience Reports*, 39(8). <https://doi.org/10.1042/BSR20190788>
- Zhu, H., & Fan, G.-C. (2011). Extracellular/circulating microRNAs and their potential role in cardiovascular disease. *American journal of cardiovascular disease*, 1(2), 138-149.