



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

Estudio de miR-28 en un modelo experimental de infarto
agudo de miocardio

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Palop Medina, María

Tutor/a: Jantus Lewintre, Eloisa

Cotutor/a externo: NOVELLA DEL CAMPO, SUSANA

Director/a Experimental: PEREZ CREMADES, DANIEL BERNARDO

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL
MEDI NATURAL

Trabajo Fin de Grado en Biotecnología



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

INCLIVA | VLC
Instituto de Investigación Sanitaria

**ESTUDIO DE MIR-28 EN UN MODELO
EXPERIMENTAL DE INFARTO AGUDO
DE MIOCARDIO**

Autor/a:

María Palop Medina

Tutor/a UPV: Eloisa Jantus Lewintre

Cotutor/a: Susana Novella del Campo

Director experimental: Daniel Bernardo Pérez Cremades

Curso académico 2022-2023

VALENCIA, JULIO 2023

Título

Estudio de miR-28 en un modelo experimental de infarto agudo de miocardio.

Resumen

El infarto agudo de miocardio es una de las principales causas de mortalidad de los países desarrollados. Es por ello por lo que se está potenciando la búsqueda de biomarcadores que permitan el diagnóstico temprano y el pronóstico de la enfermedad. Actualmente, los microRNAs (miRNA) poseen ciertas características que hacen de ellos potenciales biomarcadores como, por ejemplo, que son estables en la circulación, que tienen secuencias conservadas evolutivamente, tienen una expresión específica de tejido o de una patología, y se pueden detectar en base a una amplificación específica de secuencia como la qRT-PCR. En estudios previos desarrollados en el Laboratorio de Investigación en Células Endoteliales de la Universitat de València, uno de los miRNA circulantes afectados por el infarto de miocardio era el miR-28-3p. Por ello, se comprobará su expresión en diversos tejidos de un modelo murino de senescencia acelerada (SAM), empleando ratones macho y hembra. Para estudiar el efecto del infarto se utilizarán ratones en los que se les ha inducido una isquemia mediante la ligadura de la arteria coronaria (IAM), y el correspondiente control de cirugía (Sham). Además, evaluaremos las posibles dianas y funciones biológicas del miRNA por medio de herramientas bioinformáticas y bases de datos. Los resultados obtenidos permitirán conocer los cambios de expresión de este miRNA de forma diferencial en tejidos como la grasa perivascular, abdominal, corazón e hígado, implicados en el metabolismo lipídico y el sistema cardiovascular. Asimismo, se ampliará y demostrará esta información por medio de las dianas, Ontología Génica y rutas metabólicas encontradas en las diversas bases de datos de este miRNA. Finalmente, se obtuvo una disminución de la expresión del miR-28-3p en suero y corazón IAM respecto a Sham, siendo significativa en el caso del suero en Sham, siendo mayor en macho respecto a hembra, también entre machos, siendo mayor en Sham que en IAM y por último mayor en macho Sham que en IAM hembra. Por ello, el posible papel que este miRNA media en el infarto de miocardio requerirá una investigación más exhaustiva en estudios posteriores. Este trabajo se relaciona con los siguientes ODS de la Agenda 2030: “mejora de la salud y bienestar”, y el de “industria, innovación e infraestructura”.

Palabras clave

Envejecimiento vascular; infarto agudo de miocardio; miRNA.

Autor/a del TFG: María Palop Medina

Tutor/a UPV: Eloisa Jantus Lewintre

Cotutor/a: Susana Novella del Campo

Director experimental: Daniel Bernardo Pérez Cremades

Localidad y fecha: Valencia, Julio 2023

Title

Study of miR-28 in an experimental model of acute myocardial infarction.

Abstract

Acute myocardial infarction is one of the main causes of mortality in developed countries. That is why the search for biomarkers that enable early diagnosis and prognosis of the disease is being promoted. Currently, miRNAs possess certain characteristics that make them potential biomarkers, such as stability in circulation, evolutionary conserved sequences, tissue-specific or pathology-specific expression, and detectability through specific sequence amplification techniques like qRT-PCR. In previous studies conducted at the Endothelial Cell Research Laboratory of the University of Valencia, one of the circulating miRNAs affected by myocardial infarction was miR-28-3p. Therefore, its expression will be examined in various tissues of a murine model, Senescence Accelerated Mouse (SAM), using both male and female mice. To study the effect of infarction, mice in which ischemia has been induced through coronary artery ligation (AMI), as well as the corresponding surgical control (Sham), will be employed. Additionally, we will evaluate potential targets and biological functions of the miRNA using bioinformatics tools and databases. The results will allow us to know the differential expression changes of this miRNA in tissues such as perivascular fat, abdominal fat, heart and liver, involved in lipid metabolism and the cardiovascular system. Likewise, this information will be expanded and demonstrated by the targets, Gene Ontology and metabolic pathways that were found in diverse databases of this miRNA. Finally, a decrease in the expression of miR-28-3p in serum and AMI heart was obtained with respect to Sham, being significant in the case of serum in Sham, being higher in males compared to females, also among males, being higher in Sham than in AMI and finally greater in male Sham than in female AMI. Therefore, the possible role that this miRNA mediates in myocardial infarction will require further investigation in subsequent studies. This work is aligned with the following SDGs of the 2030 Agenda: "improving health and well-being" and "industry, innovation, and infrastructure".

Keywords

Acute myocardial infarction; miRNA; vascular senescence.

Author: María Palop Medina

Tutor: Eloisa Jantus Lewintre

Cotutor: Susana Novella del Campo

Collaborative Cotutor: Daniel Bernardo Pérez Cremades

City and date: Valencia, July 2023

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a todos los miembros del Laboratorio de Investigación en Células Endoteliales (LINCE) por haberme acogido durante estos dos años, haber colaborado en mi formación y ayudado durante toda mi estancia.

En especial me gustaría agradecer a Daniel Pérez Cremades por haberme supervisado e instruido en el día a día, corrigiendo mis errores y haciéndome aprender de ellos y, sobre todo, a la Dra. Susana Novella por haberme dejado ser partícipe de su investigación y haberme guiado. Gracias por los consejos y la paciencia que habéis tenido durante todo mi aprendizaje.

Gracias a la Dra. Eloísa Jantus por haber aceptado tutorizarme desde la UPV y haber resuelto mis dudas y supervisado en todo momento.

Me gustaría agradecer también a mis compañeras y amigas de carrera, con la que he compartido estos cuatro años, gracias por vuestra comprensión y ayuda en todo momento, ha sido un placer poder vivir este proceso de formación académica y personal a vuestro lado.

Por último, me gustaría agradecer a mi familia y amigos por haberme apoyado sin descanso, por la paciencia que han tenido conmigo en los momentos de estrés y bajón, gracias por haber hecho este proceso mucho más sencillo y alegre.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. miRNAs	3
1.1.1. Biosíntesis miRNAs	4
1.1.2. Mecanismos de acción de los miRNAs	5
1.1.3. Regulación de los miRNAs	5
1.2. miR-28-3p	6
1.2.1. Localización y función del miR-28	6
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	7
3. MATERIAL Y MÉTODOS	7
3.1. Obtención datos bioinformáticos	7
3.1.1. Búsqueda de las secuencias	7
3.1.2. Búsqueda de los términos GO (Gene Ontology)	8
3.1.3. Búsqueda de dianas	8
3.1.4. Búsqueda de las rutas biológicas y KEGG	8
3.2. Obtención datos experimentales	9
3.2.1. Modelos experimentales	9
3.2.2. Cirugía IAM/SHAM en ratones SAMR1	9
3.2.3. Recogida de muestras	10
3.2.4. Extracción RNA	10
3.2.5. Cuantificación RNA	11
3.2.6. Funcionamiento de los <i>primers</i> RT-PCR	11
3.2.7. Retrotranscripción	12
3.2.8. qPCR	12
3.2.9. Análisis estadístico	13
4. RESULTADOS	14
4.1. Análisis bioinformáticos	14
4.1.1. Secuencias	14
4.1.2. Ontología Génica	14
4.1.3. Dianas	15
4.1.4. Rutas biológicas y KEGG	17
4.2. Análisis datos experimentales	18
5. DISCUSIÓN	23
5.1. miR-28-3p como miRNA metabólico	23

5.2. Implicación del miR-28-3p en procesos cardiovasculares	24
5.3. Comparación miR-28-3p y miR-28-5p	26
6. CONCLUSIÓN.....	28
7. BIBLIOGRAFÍA	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de los pasos de la progresión aterosclerótica que conducen al infarto de miocardio.

Figura 2. Biosíntesis de los miRNA.

Figura 3. Diagrama de Venn que muestra las dianas del miR-28-3p en humanos comunes a las bases de datos de TargetScan, miRDB y microT-CDS.

Figura 4. Diagrama de Venn que muestra las dianas del miR-28-3p en ratones comunes a las bases de datos de TargetScan, miRDB y microT-CDS.

Figura 5. Diagrama de Venn que muestra las dianas coincidentes entre humanos y ratones del miR-28-3p para las tres bases de datos: TargetScan, miRDB y microT-CDS.

Figura 6. Diagrama de sectores con las rutas más enriquecidas para el miR-28-3p en la base de datos de KEGG.

Figura 7. Diagrama de sectores con los procesos biológicos más enriquecidas para el miR-28-3p.

Figura 8. Comparación del peso medio de ratones SAMR1 machos (n=3) y hembras (n=3).

Figura 9. Expresión relativa del miR-28-3p en tejidos intactos de ratones SAMR1 para n=6 mediante qPCR.

Figura 10. Diferencias en la expresión relativa del miR-28-3p en función en tejidos intactos de ratones y ratonas SAMR1.

Figura 11. Expresión relativa del miR-28-3p en corazones de ratones SAMR1 a los que se les ha inducido el infarto de agudo de miocardio (IAM) y su correspondiente control de cirugía (SHAM).

Figura 12. Diferencias en la expresión relativa del miR-28-3p en función del sexo en corazones de ratones SAMR1 IAM y SHAM.

Figura 13. Expresión relativa del miR-28-3p en sueros de ratones SAMR1 que se les ha inducido el infarto de agudo de miocardio (IAM) y su correspondiente control de cirugía (SHAM).

Figura 14. Diferencias en la expresión relativa del miR-28-3p en función del sexo en sueros de ratones SAMR1 IAM y SHAM.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes para realizar la retrotranscripción del mRNA extraído de diferentes tejidos del modelo experimental murino.

Tabla 2. Componentes necesarios para realizar la qPCR a partir de los cDNAs obtenidos de la retrotranscripción de los mRNA extraído de diferentes tejidos del modelo experimental murino.

Tabla 3. Función de las diez dianas del miR-28-3p coincidentes en humanos y ratones.

LISTADO DE ABREVIATURAS

miRNA: microRNA

SCA: Síndrome Coronario Agudo

IAM: Infarto Agudo de Miocardio

LDL: Lipoproteínas de Baja Densidad

NO: Óxido Nítrico

ncRNA: non-coding RNA

lncRNA: long non-coding RNA

PACT: Proteína activadora de la quinasa R

Ago2: argonauta 2

FT: Factor de Transcripción

RISC: complejo de silenciamiento inducido por RNA

miRNP: complejo miRNA ribonucleoproteico

TSS: sitios predichos de inicio de la transcripción

HDACs: histonas deacetilasas

SCASEST: síndrome coronario agudo sin elevación de ST

NCBI: National Center of Biotechnology Information

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

GeneCaRNA: Human ncRNA GENE DATABASE

MGI: Mouse Genome Informatics

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

eNOS: Óxido nítrico sintasa

FRET: Transferencia de energía de resonancia de la fluorescencia

RT: Retrotranscripción

cDNA: coding deoxyribonucleic acid

qPCR: quantitative Polymerase Chain Reaction

SEM: error estándar de la media

Ct: ciclo umbral

Hsa: Homo sapiens

Mmur: Mus musculus

DMT2: diabetes mellitus tipo 2

IMC: Índice de Masa Corporal

VEGF: Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular

ALDH2: Aldehído deshidrogenasa de tipo 2

4-HNE: 4-hidroxi-2-nonenal

GTN: nitroglicerina

PPAR α : receptor activado α para la proliferación de peroxisomas

MPTP: Complejo que forma el poro de transición para la permeabilidad mitocondrial

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).

1. INTRODUCCIÓN

El aumento de la esperanza de vida está favoreciendo el incremento de la incidencia de enfermedades relacionadas con el envejecimiento, siendo este un factor de riesgo no modificable de enfermedades cardiovasculares. Las enfermedades cardiovasculares son una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en el mundo tanto en hombres como en mujeres (Sayago-Silva et al., 2013). En las últimas décadas se ha producido un incremento progresivo de las muertes a causa de estas, en especial de las enfermedades coronarias cardíacas como la enfermedad isquémica del corazón y el infarto de miocardio. De los 2 millones de muertes observados a principios de los años 2000, se ha llegado hasta los 8,9 millones en el 2019, según fuentes de la Organización Mundial de la Salud (Organización Mundial de la Salud, 2020). Si bien es cierto que la supervivencia tras padecer infarto ha incrementado con el paso del tiempo, la tasa de mortalidad sigue siendo muy elevada, al igual que la probabilidad de que derive en otras patologías circulatorias (Vrints, 2012).

El infarto agudo de miocardio (IAM) es una forma de síndrome coronario agudo (SCA) que concretamente hace referencia a la muerte de parte del músculo cardíaco por la obstrucción total y súbita de la arteria coronaria que impide la llegada de oxígeno y nutrientes al miocardio. Esta patología es producto de una prolongada isquemia que genera la necrosis de los cardiomiocitos manifestándose clínicamente en el SCA (Roffi et al., 2016).

En relación con la etiología, la aterosclerosis y disfunción endotelial pueden acabar derivando en el infarto. La aterosclerosis consiste en un proceso inflamatorio iniciado por la acumulación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en el espacio subendotelial (Tabas et al., 2007). Este puede acabar afectando a las arterias del sistema cardiovascular al provocar disfunciones endoteliales por modificaciones de las LDL al oxidarse y agregarse. Estas actuarán como estimuladores crónicos de la respuesta inmune innata y adaptativa pues el endotelio induce la presentación de quimiocinas y la expresión de moléculas de adhesión que permitirán la infiltración de monocitos y su diferenciación a células dendríticas y macrófagos, siendo estos la población más extensa en la placa de ateroma (Bentzon et al., 2014). La migración hacia la región inflamada de células musculares lisas activará su proliferación y la producción de componentes de la matriz extracelular. El resultado es la síntesis de una capa fibromuscular donde los macrófagos se convertirán en células espumosas al ser depósitos de lípidos. La respuesta inflamatoria conducirá a la necrosis de estas células espumosas junto con los demás componentes como los lípidos oxidados que serán finalmente sustituidos por una capa fibrosa rica en colágeno. Cuando esta capa fibrosa se rompe se induce la formación de un trombo desencadenando la infiltración de monocitos, plaquetas y neutrófilos que terminan produciendo la oclusión de la arteria coronaria derivando en la isquemia cardíaca (Thygesen et al., 2012), lo que demuestra como el proceso inflamatorio es fundamental en el desarrollo de la aterosclerosis y el consecuente infarto.

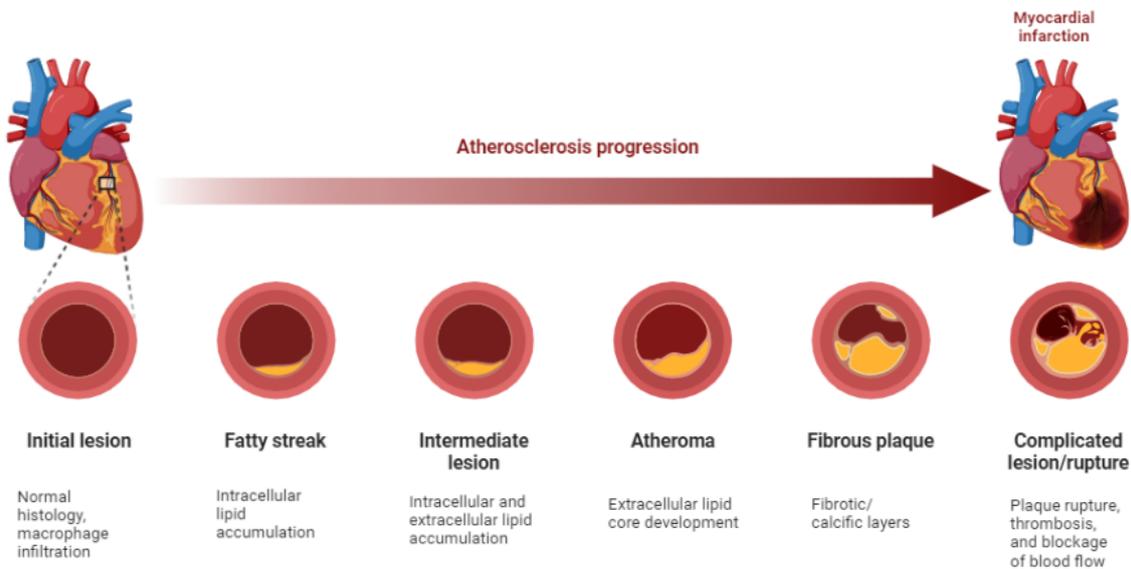


Figura 1. Esquema de los pasos de la progresión aterosclerótica que conducen al infarto de miocardio. (Fuente: Elaboración propia, diseñado por biorender (<https://www.biorender.com/>)).

Durante el envejecimiento, también se producen alteraciones moleculares a nivel celular que derivan en modificaciones funcionales y estructurales en el organismo (López-Otín et al., 2013). Dentro de los cambios estructurales, los vasos sanguíneos pueden verse afectados al variar sus propiedades elásticas y la regulación de su tono. El incremento de las fibras de colágeno produce la pérdida de elasticidad al aportar rigidez a la pared vascular reduciendo la constancia del flujo sanguíneo y favoreciendo su hipertrofia (O'Rourke et al., 2007). Por otro lado, relacionado con la funcionalidad, la síntesis de sustancias vasoactivas se ve modificada conduciendo a la disfunción endotelial, que tiene como consecuencia la inducción de procesos de agregación plaquetaria, inflamación, trombosis y al incremento de la permeabilidad vascular y vasoconstricción (Lakatta et al., 2003).

Otro de los factores etiológicos asociados a las enfermedades cardiovasculares y a los procesos de arteriosclerosis es la disfunción endotelial (Paneni et al., 2017). El endotelio vascular es una capa de células que recubre el interior de los vasos sanguíneos siendo un componente fundamental de la pared vascular y esencial para regular el flujo sanguíneo (Krüger-Genge et al., 2019). Las principales características de la disfunción endotelial son la disminución de la síntesis del vasodilatador óxido nítrico (NO), el incremento en la producción de citocinas proinflamatorias y la mayor adhesión a la pared celular de leucocitos (Cyr et al., 2020). Por ello, afecta a la regulación del tono vascular por una disminución de NO, molécula ateroprotectora y vasorelajante, producida por la NO sintasa endotelial (eNOS) que incrementa su expresión por factores de crecimiento como el VEGF o disminuye por hipoxia, ox-LDL o TNF- α (Vázquez-Rey et al., 2003).

Durante la patología cardiovascular y también durante el envejecimiento, se produce un proceso de inflamación vascular que implica la activación del endotelio vascular y la llegada de células inmunes donde se ha producido la infección o lesión. Cuando se da el proceso inflamatorio, las

quimiocinas y factores proinflamatorios son liberados, promoviendo la adhesión y el reclutamiento de células inmunitarias a la pared vascular. Esto también contribuye al desarrollo de la aterosclerosis por el incremento de la síntesis de moléculas inflamatorias por parte de las células inmunitarias que acaban dañando el tejido vascular (Davignon et al., 2004).

La búsqueda de nuevos biomarcadores para la prevención, diagnóstico temprano, pronóstico, e incluso el acercamiento a terapias personalizadas se está convirtiendo en uno de los ejes centrales de la investigación actual. Además, las enfermedades cardiovasculares pueden presentar síntomas que pueden ser fácilmente pasados por alto o dar lugar a un mal diagnóstico, complicando la evolución de la enfermedad. En consecuencia, este campo puede abrir nuevas oportunidades para entender en mejor medida los mecanismos subyacentes de la enfermedad, encontrar nuevas dianas de estudio y mejorar el pronóstico de los pacientes (Upadhyay, 2015).

Dentro de estos biomarcadores, los microRNA (miRNA) están demostrando su significancia debido a su papel regulador de la expresión génica. Aunque su estudio es relativamente reciente y aún se desconoce bastante debido a la gran cantidad de moléculas y vías que regulan, se ha visto que se encuentran desregulados en numerosos trastornos, incluidos los cardiovasculares. Así pues, su potencial uso como biomarcadores de diagnóstico temprano, pronóstico, distinción de condiciones o subtipos, monitoreo y evaluación de terapias dan esperanza para su empleo en la práctica clínica rutinaria (Zhou et al., 2018).

1.1 miRNAs

Las células eucariotas pueden transcribir hasta el 90% del DNA de su genoma, siendo tan sólo un 1-2% el que se traduce a proteínas. La mayoría restante se corresponde con RNA no codificante (ncRNA), los cuales pueden clasificarse en función de su longitud en RNA largos (*long non-coding RNA*, lncRNA) y los pequeños, entre los que encontramos a los miRNA (Ramón-Cajal et al., 2019). Además, también se encuentran dentro de los ncRNA los pequeños RNA de interferencia (*small interfering RNA*, siRNA) que son moléculas de doble cadena que participan en la regulación de la expresión génica post traduccional, interfiriendo con el RNA (Hu et al., 2020). Los RNA que interactúan con Piwi (*piwi-interacting RNA*, piRNA) son pequeños RNA que en las células germinales regulan la expresión génica, relacionados con la protección del genoma frente al daño por transposones (Iwasaki et al., 2015). Los RNA circulares (circRNA) son moduladores de la expresión génica al unirse a proteínas reguladoras o actuar como esponjas de miRNA (Zhou et al., 2020).

Los miRNAs son moléculas endógenas de ARN no codificante que se encuentran altamente conservadas, compuestas por aproximadamente 19-23 nucleótidos. El genoma humano codifica aproximadamente 2.000 de estas moléculas que se encargan de la regulación de la expresión génica a nivel de traducción o post-traducción, induciendo la represión o promoción del deterioro del mRNA. Esto es causado por medio de la unión en una región específica del miRNA llamada semilla (*seed sequence*) al extremo 3' UTR del RNA mensajero (mRNA) diana, provocando su silenciamiento (Kaikkonen et al., 2011).

1.1.1. Biosíntesis miRNAs

La síntesis de los miRNAs se desarrolla por diferentes endonucleasas tanto en el núcleo como en el citoplasma (Figura 2). El primer paso de su biogénesis es la transcripción de un locus genético para generar un pri-miRNA por parte de la RNA polimerasa II o en algunos casos III. Este transcrito con estructura larga de horquilla (*stem-loop*) presenta una caperuza 5' y cola poli-A en 3'. Posteriormente, sufre una escisión asimétrica para obtener el pre-miRNA por medio de un complejo formado por una RNAasa III endonucleasa (Drosha) y una proteína de unión a DNA de doble cadena (DGCR8) (Lee et al., 2003). Luego son transportados del núcleo al citoplasma por la exportina-5 y el complejo RanGTP, que reconoce los extremos cohesivos generados por el corte asimétrico anterior, evitando la degradación nuclear de los pre-miRNAs. A continuación, son incorporados en una endonucleasa RNAasa III (Dicer) que forma un complejo junto con la proteína de respuesta transactivadora de unión al RNA del virus de la inmunodeficiencia humana y la proteína activadora de la quinasa R (PACT). De manera que la hebra simple del pre-miRNA, opuesta a la cortada por Drosha, es escindida por este complejo, generando un dúplex de miRNA con extremos 3' protuberantes (Perron et al., 2008).

Además, la vía dependiente de la proteína Argonauta 2 (Ago 2) que es el componente catalítico del complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), genera una horquilla mellada al cortar una hebra simple del pre-miRNA. Después, es escindida por Dicer generando un miRNA dúplex, el cual contiene una "hebra guía" que se incorpora a RISC formando el complejo miRNA ribonucleoproteico (miRNP). Este da lugar al miRNA ya maduro, que puede proceder de un mismo bucle de pre-miARN que al separarse en sus dos brazos da las formas "5p" o "3p". Estas son diferentes a niveles biológicos en relación con su estabilidad y funcionalidad (Naeli et al., 2022).

Después, el miRNA maduro reconoce los mRNA diana a través del apareamiento de bases parcial o total, dando como resultado la inhibición de la traducción o la desestabilización y degradación del mRNA diana, respectivamente.

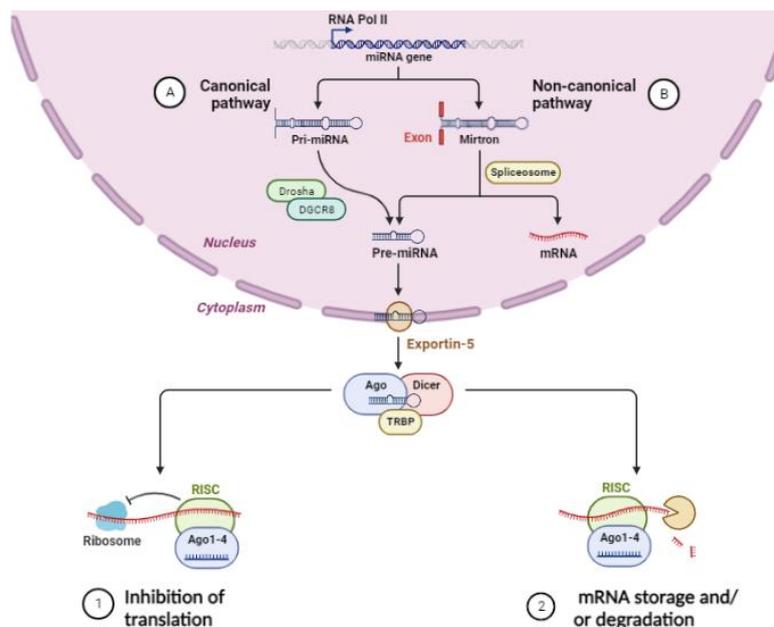


Figura 2. Biosíntesis de los miRNA. Estos pueden seguir la vía A) Canónica y B) No canónica, y su función represora por 1) Inhibición de la traducción y 2) Degradación del mRNA. (Fuente: Elaboración propia, diseñado por biorender (<https://www.biorender.com/>)).

Cabe destacar que, aunque la ruta de biosíntesis de la mayoría de miRNAs sigue la vía explicada anteriormente, la canónica, existen otros miRNA que son procesados por una vía no canónica, especialmente en plantas y en células de mamíferos. En esta, el procesamiento de las pequeñas horquillas de RNA se realiza directamente por Dicer, otras enzimas procesadoras de RNA o siRNAs para generar los miRNA maduros, evitando la escisión por Drosha (Deretic et al., 2013).

1.1.2. Mecanismos de acción de los miRNAs

La regulación de la diana del miRNA viene dada por su unión en el extremo 3' UTR de la secuencia de mRNA, aunque en ocasiones se ha observado la interacción con el 5'. Se ha visto que la secuencia semilla de 2 a 8 nucleótidos en el extremo 5' del miRNA interacciona con las regiones codificantes, produciendo la degradación del mRNA si se da de manera completa, o la represión traduccional si se hace parcialmente (Díaz Carrasco et al., 2016).

Cuando se da la disminución de las proteínas codificadas por el mRNA al ser degradado por la total complementariedad de bases, las estructuras de traducción son llevadas a la vía de degradación celular al ser guiadas por el miRNA. Tras adenilar el mRNA, eliminar la caperuza 5' y ser degradados por una exonucleasa 5'-3' citoplasmática, el miRNA puede continuar su función de reconocimiento y degradación de otros mRNA al permanecer intacto (Arora et al., 2013).

1.1.3. Regulación de los miRNAs

Los miRNA se encuentran regulados en varios puntos de su síntesis y procesamiento. Para prevenir las patologías derivadas de su desregulación se requiere un control íntegro, en el que intervienen factores de transcripción (FT), modificadores de la cromatina, complejas redes de señalización y secuencias reguladoras en sus promotores. Los mecanismos de regulación determinarán la expresión de los miRNAs, y serán característicos de un estado específico de tejido y desarrollo (Obernosterer et al., 2006).

La localización de los elementos reguladores que controlan la transcripción y procesamiento de los miRNA es aguas arriba de los genes del pre-miRNA en una región de aproximadamente 1 kb. En esta zona es donde se produce la unión de los FT y se dan solapamientos con los sitios predichos de inicio de la transcripción (del inglés, *transcription start site*, TSS). La interacción puede darse aguas arriba de la TSS con los motivos cis-reguladores para reprimir o activar la expresión génica de los miRNA. Los cambios epigenéticos también afectan a la síntesis, ya sea por metilación del DNA, o por la modulación de la acetilación de histonas en las regiones genómicas del miRNAs por histonas deacetilasas (HDACs) en las islas CpG cercanas al TSS, el cual también presentan una intensa actividad reguladora (Fazi et al., 2008). Además, durante su transcripción por la ARN polimerasa II participan diversos FT como ZEB, MYC, p53, factores de crecimiento como TGFβ o factores de crecimiento plaquetario, entre otros.

1.2. miR-28-3p

Este trabajo se va a focalizar en el estudio del miR-28-3p, pues a partir de los estudios realizados en el laboratorio del Grupo de Investigación en Células Endoteliales (Mompeón, 2018) se observó como en los pacientes que sufrían síndrome coronario agudo sin elevación de ST (SCASEST) se producía una desregulación a la baja de este miRNA.

En concreto, tanto utilizando la técnica de microarrays como la de qPCR se demostró que en el suero de los pacientes que habían sufrido infarto de miocardio disminuían los niveles de miR-28-3p en comparación con los sujetos sanos, y estos niveles revertían tras un año de evolución clínica. Además, se vio una correlación positiva entre los niveles del miRNA y los de la quimiocina proinflamatoria IL-8, mientras que correlacionaba negativamente en el caso de la quimiocina MDC. Esto sugirió la posible relación de este miRNA con la inflamación en pacientes que han sufrido un infarto agudo de miocardio.

Se ha visto como diversos miRNAs participan en este proceso al controlar la interacción de quimiocinas inflamatorias como la IL-8 o el factor activador de plaquetas, así como las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 o la E-selectina y factores proinflamatorios como el TNF- α y la IL-1. El NF- κ B es otro mediador clave en la disfunción endotelial que actúa como factor de transcripción para activar genes que codifican para las moléculas proinflamatorias mencionadas anteriormente (Csiszar et al., 2008).

1.2.1. Localización y función del miR-28

A partir de la información obtenida de la página web del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/407020>) en humanos encontramos el miR-28 en el gen MIR28 de 86 pares de bases en la hebra positiva y un sólo exón, el cual se encuentra en la región cromosómica 3q28. Esta región contiene el miRNA en una secuencia intrónica. Alteraciones en este gen se han visto fuertemente relacionado con el cáncer renal y gliomas. Además, se expresa fundamentalmente en tejidos musculares arteriales y secretores mamarios. Por otro lado, en el ratón (*Mus musculus*) se encuentra codificado en el cromosoma 16 por el gen MIR28a que contiene 86 pares de bases y un exón (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=Mus+musculus+Mir28a>).

Generalmente, las estructuras 3p y 5p de un miRNA suelen mediar funciones diferentes dentro de la regulación de la expresión génica, por lo que un mismo miRNA puede albergar distintas funciones, incluso llegar a ser contrarias. Sin embargo, a pesar de la creciente investigación en este campo, la literatura científica carece de estudios exhaustivos que abarquen las diferencias en la regulación de estas dos estructuras dentro de la misma molécula. Esto dificulta saber las diferencias funcionales pues la regulación es fundamental para comprender la función biológica.

En diversos estudios se ha observado como la desregulación del miRNA altera la homeostasis de la expresión génica. Por ejemplo, en algunas patologías neoplásicas se ha visto como la regulación a la baja de las dos estructuras conduce a fenotipos patológicos, aunque presentan distintos efectos biológicos. Respecto al miR-28, se ha descrito que el miR-28-5p inhibe la proliferación celular de las células cancerígenas, induce la apoptosis y el arresto del ciclo celular pero no tiene efecto en la migración celular y la invasión, mientras que el miR-28-3p acelera la

migración e invasión de las células tumorales al inhibir la expresión de la principal molécula de adhesión celular, la E-cadherina, pero no influye en la proliferación y apoptosis (Lv et al., 2019).

En relación con las patologías cardiovasculares se han encontrado evidencias de que la sobreexpresión del miR-28-5p en el músculo liso favorece la disminución de la proliferación (Liu et al., 2022) y la migración (Liu et al., 2016), relacionado con los procesos ateroscleróticos y de estenosis arterial. Por otro lado, los niveles circulatorios del miR-28-3p en pacientes con fallo cardíaco se han visto incrementados asociándose a un peor pronóstico, al estar relacionado con una desregulación de la supervivencia celular y su comunicación, al alterar la ruta de señalización PI3K-Akt (Zhao et al., 2020).

Es por ello que, al igual que el resto de miRNAs, el miR-28 podría convertirse en un prometedor biomarcador de enfermedades cardiovasculares o de otras patologías (Díaz Carrasco et al., 2016).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los niveles de miR-28-3p decrecen en suero en la fase aguda de un infarto de miocardio (Mompeón, 2018). Para determinar su posible función en esta y otras enfermedades cardiovasculares hemos comenzado un estudio de sus características y funciones de manera experimental y por medio de bases de datos. De este modo, los objetivos que nos planteamos en el presente trabajo son:

1. Mediante estudios bioinformáticos, predecir los genes diana del miR-28-3p y las rutas biológicas en las que están involucrados.
2. Estudiar las diferencias de sexo en la expresión del miR-28-3p en diferentes tejidos en un modelo de infarto experimental en ratones.
3. Estudiar la influencia del IAM en la expresión de miR-28-3p en tejido cardíaco tanto de macho como de hembra.
4. Estudiar la influencia del IAM en los niveles de miR-28-3p circulantes en ratones macho y hembra.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Obtención datos bioinformáticos

3.1.1. Búsqueda de las secuencias

Para obtener información del miRNA-28 en humanos y ratón se buscó el gen de interés para ambos casos en la base de datos del *National Center of Biotechnology Information* (NCBI). Aquí, además de presentar datos generales de la síntesis y procesos que median, se obtuvo la región cromosómica codificadora de cada uno. Para poder conseguir tanto las secuencias de los miRNA de *Homo sapiens* como de *Mus musculus* se accedió a la base de datos de miRBase de donde se extrajeron las secuencias del *stem-loop* completo como de las dos estructuras, 3p y 5p.

Empleando la herramienta de *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) se alinearon las secuencias 3p y 5p para analizar la similitud entre ellas y ver si se encontraban grandes diferencias que pudiesen dificultar la extrapolación de datos del modelo animal murino a humanos.

3.1.2. Búsqueda de los términos GO (*Gene Ontology*)

A través de la *Human ncRNA GENE DATABASE* (GeneCaRNA) se obtuvo información detallada del gen MIR-28: promotores, amplificadores que controlan su expresión (*enhancers*), enfermedades relacionadas con su alteración, así como los términos GO para la anotación de genes (<https://www.genecards.org/genecarna>). En esta página queda detallada las tres categorías principales que comprenden los términos GO: procesos biológicos, componentes celulares y función molecular.

Para buscar este tipo de datos en ratón se empleó la base de datos *Mouse Genome Informatics* (MGI) (<https://www.informatics.jax.org/>).

Para detallar datos acerca de los órganos y regiones de mayor expresión del miRNA en ambas especies, se empleó la base de datos *Atlas Tissues* (<https://ccb-web.cs.uni-saarland.de/tissueatlas/>).

3.1.3. Búsqueda de dianas

Los genes diana de la regulación del miRNA se buscaron en tres bases de datos distintas para lograr una mayor concordancia y reproducibilidad del proceso. Se emplearon TargetScan (https://www.targetscan.org/vert_80/), miRDB (<https://mirdb.org/cgi-bin/search.cgi>) y microT-CDS (https://dianalab.e-ce.uth.gr/html/dianauniverse/index.php?r=microT_CDS) para ambas especies.

A continuación, para comparar los resultados y extraer las dianas comunes de las tres bases de datos se empleó la página web Venny (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) que ofrece un diagrama de Venn con las dianas coincidentes a las tres bases de datos.

3.1.4. Búsqueda de las rutas biológicas y KEGG

Con la base de datos de miRWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>) se pudo conseguir información sobre las vías metabólicas a través de la información de anotación de los genomas proporcionada por la *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG), así como las listas y rutas biológicas en las que participan por medio del Análisis de Enriquecimiento de Conjuntos de Genes (GSEA) de las dianas predichas.

3.2 Obtención datos experimentales

3.2.1. Modelos experimentales

La cría y el mantenimiento de las colonias de ratones y ratonas fueron realizadas en el animalario de la Unidad Central de Investigación de Medicina de la Universitat de València. Las condiciones fueron acordes con las directrices institucionales de ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, humedad 60%, temperatura constante de 22°C, agua ad libitum y pienso estándar.

Para estudiar la influencia del envejecimiento se emplearon ratones con senescencia acelerada SAM (del inglés, *Senescence Accelerated Mouse*), obtenidos por selección fenotípica a partir de una colonia de ratones AKR/J. La cepa AKR/J sirve como reserva genética para establecer las cepas con senescencia acelerada SAMP (del inglés, *Senescence-Accelerated Mouse-Prone*) y resistentes al desarrollo de senescencia SAMR (*Senescence-Accelerated Mouse-Resistant*), que presentan diferentes fenotipos. Ambas cepas proceden de un proceso de selección fenotípica llevado a cabo por Takeda et al. (Takeda et al., 1981). Las cepas SAMR presentan resistencia al proceso de senescencia acelerada y exhiben un fenotipo de envejecimiento normal. Los ratones SAMR1 son elegidos a menudo como control del envejecimiento.

En este estudio se han utilizado ratones (n = 3) y ratonas (n = 3) SAMR1 que fueron sacrificados el dos de marzo de 2023. Por otro lado, se emplearon ratones con infarto experimental (grupo IAM), empleado para simular la evolución y características del infarto de miocardio en humanos. Este modelo requiere la ligación permanente de la arteria coronaria, induciendo la isquemia y el infarto en el tejido miocárdico (Kaski, 2021). También se utilizaron ratones (n = 3) y ratonas (n = 3) del (Kaski, 2021) grupo de control de cirugía (grupo SHAM). Este grupo es sometido a un proceso quirúrgico parecido al IAM pero sin la ligadura de la arteria coronaria, permitiendo evaluar los efectos del tratamiento y descartar efectos del procedimiento en sí mismo.

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 Medio Ambiente, 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. Cirugía IAM/SHAM en ratones SAMR1

Consiste en la realización de una ligadura permanente de la arteria coronaria descendente anterior izquierda para inducir un infarto agudo de miocardio (IAM). Para ello, tras introducir el ratón en la cámara de anestesia, se utiliza analgesia intraperitoneal, se realiza un electrocardiograma (ECG) basal, y se accede al corazón por una toracotomía izquierda para hacer la ligadura utilizando un portaagujas para microcirugía e hilo de sutura monofilamento no reabsorbible. El punto de oclusión debe pasar aproximadamente 1-2 mm desde el vértice de la aurícula izquierda cuando está en su posición normal. En el grupo control de cirugía (SHAM), la aguja se pasa alrededor de la arteria sin ligadura. En cuanto al post-operatorio, se vigila la recuperación del ratón en una jaula con papel secante y lámpara de calor para detectar posibles hemorragias. El IAM se confirmó visualmente por la decoloración inmediata del ventrículo

izquierdo tras la ligadura por la pérdida de irrigación sanguínea y la elevación del segmento ST en el electrocardiograma (ECG) de BIOPAC MP36 (BIOPAC Systems Inc, Santa Barbara, USA).

3.2.3. Recogida de muestras

Los ratones fueron sacrificados con isoflurano vaporizado al 5% a las 4h después del IAM y se recogieron las muestras de los diferentes órganos a analizar. Todos los tejidos fueron conservados en *RNA later* (Ambion) y a -80°C en las instalaciones de la Unidad Central de Investigación de Medicina (UCIM) de la Universitat de València.

3.2.4. Extracción de RNA

Una vez descongelados los órganos procedentes del sacrificio de ratones R1 intactos, R1 IAM, R1 SHAM tanto hembras como machos, se procedió a cortar una pequeña fracción de los órganos analizar: hígado, pulmón, grasa abdominal y perivascular, bazo, riñón, músculo esquelético y corazón. Esto se realizó en una placa sobre hielo con tijeras y bisturí depositando cada fragmento en un eppendorf de 2 mL correctamente rotulado en el que se introduce una bola magnética (Quiagen, Hilden, Alemania) que permite disgregar con mayor facilidad el tejido. Las muestras se colocan en una caja de corcho en la que se deposita nitrógeno líquido para que las muestras se congelen (-196°C) y sean más fáciles de homogeneizar posteriormente.

Transcurridos unos segundos se trasladan con pinzas a un soporte para añadirles 1 mL del reactivo de lisis TRIzol G (Panreac Química S.L.U., Castellar del Vallès, España). A continuación, se enrollan con parafilm (Parafilm, EEUU) las tapas y parte del tubo, siendo recomendable además que el volumen del tejido no sobrepase el 10% del reactivo de lisis añadido.

Las muestras se homogenizan en un TissueLyser LT (Qiagen, Hilden, Alemania) durante 5 minutos a una velocidad de 25 Hz ya que a velocidades superiores podrían degradar el RNA. Generalmente, se requiere una segunda ronda de 5 minutos hasta que se complete la homogeneización.

Después se añaden 200 µL de cloroformo para que las proteínas precipiten y se agitan durante 15 segundos con el vórtex (Heidolph Instruments, Schwabach, Alemania). Para conseguir la disociación de los complejos núcleo-proteicos se incuban los tubos con el homogeneizado durante 3 minutos a temperatura ambiente. En este punto, se pueden observar diferentes fases, pero para optimizar la separación se centrifuga de nuevo (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) durante 15 minutos a una velocidad de 16.000 r.p.m y 4°C. A continuación, se transfiere cuidadosamente la fase superior acuosa a un nuevo tubo de 1,5 mL, tratando de evitar transferir la interfase.

Para precipitar el RNA se añade isopropanol 100%, a razón de 1,5 veces la cantidad del sobrenadante recuperado de cada muestra, mezclando el contenido por inversión unas 10 veces. Se incuban 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga 10 minutos a 16.000 r.p.m a 4°C, obteniendo un pellet de RNA en el fondo del tubo. Seguidamente, se elimina el sobrenadante evitando tocar el pellet y se lava con 1 mL de etanol al 75% diluido con agua libre de RNasas. Después se centrifuga por última vez a 16.000 r.p.m, 4°C durante 10 minutos. Por último, se

elimina el sobrenadante sin quitar el pellet y se dejan secar las muestras con el tubo abierto y hacia arriba, sin que llegue a secarse por completo. El RNA se diluye en 15-25 μ L de agua libre de RNasas y en caso de no utilizarlo inmediatamente se guarda a -20°C .

3.2.5. Cuantificación RNA

Para cuantificar y realizar un control de calidad del RNA extraído se obtiene la ratio A260/280 y A260/230. en el espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). La concentración buscada es de aproximadamente $500\mu\text{g}/\text{mL}$ para tener una cantidad adecuada a la hora de hacer la qPCR. En los casos en los que era superior las muestras se diluían con agua libre de nucleasas. La ratio A260/280 se relaciona con la pureza del RNA y debe encontrarse entre los valores 1,7 y 2,2 para asegurar la ausencia con contaminaciones de proteínas. La ratio A260/230 está referida a la contaminación por etanol y debe encontrarse entre 1,8 y 2,2 mostrando la ausencia de contaminación de las muestras.

3.2.6. Funcionamiento de los *primers* RT-PCR

Los *primers* de la retrotranscripción (RT) (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific) son, generalmente, una secuencia de oligonucleótidos cortos complementarios que se unen al miRNA molde para iniciar la retrotranscripción y están diseñados específicamente para la retrotranscripción de miRNAs.

El kit TaqMan MicroRNA Reverse Transcription de esta empresa incluye un set de bucle (*stem-loop*) de RT *primers* que se unen a la secuencia madura de miRNA selectivamente. La estructura de bucle permite evitar la amplificación residual de miRNAs y mRNAs, así como asegurar la unión específica. La composición química de la sonda Taqman permite la detección del producto de PCR específico por fluorescencia al acumularse durante los ciclos de PCR. Este sistema de detección de PCR en tiempo real se mejoró al introducir sondas con marcación fluorogénica para detectar productos amplificados específicos y eliminar el proceso posterior de eliminación de la sonda.

Para ello, los oligonucleótidos de la sonda contienen un fluoróforo en el extremo 5' como indicador y una molécula supresora de la fluorescencia en el 3'. Cuando la sonda está intacta, el indicador reduce la fluorescencia por transferencia de energía de resonancia de la fluorescencia (FRET), mientras que cuando se encuentra la secuencia objetivo, la actividad 5' nucleasa de la Taq DNA polimerasa hace que se disocie conforme se amplifica el miRNA. La disociación de la sonda incrementa la señal del indicador al separarlo del supresor y permite amplificar el *primer* para llegar hasta el extremo al retirar la sonda de la cadena objetivo, sin inhibir el proceso general de la PCR. El aumento de la intensidad de la fluorescencia es proporcional a la cantidad de amplificaciones producidas como consecuencia de la disociación de las moléculas adicionales del indicador en cada ciclo.

3.2.7. Retrotranscripción

Una vez cuantificado el RNA se preparan las cantidades necesarias para n+1 muestras de manera que los mix de RT se obtendrán al multiplicar las cantidades indicadas en la Tabla 1 por el número de muestras más uno:

Tabla 1. Componentes para realizar la retrotranscripción del mRNA extraído de diferentes tejidos del modelo experimental murino con los correspondientes volúmenes necesarios.

Componente	Volumen
Nuclease free water	9,16 μ L
10 x RT buffer	1,5 μ L
Multiscribe RT (500u/ μ l)	1 μ L
RNase Inhibitor, 20 U/ μ l	0,19 μ L
100 Mm dNTPs	0,15 μ L
Primers (u6, miR-28)	3 μ L/primer

A cada tubo de 200 μ L se le añaden los microlitros de muestra correspondientes para retrotranscribir 100 ng de RNA. Después, se adicionan 15 μ L del mix de manera que cada reacción contenga 20 μ L. El blanco contiene las mismas cantidades del mix pero en lugar de muestra se le adiciona agua libre de nucleasas. El primer u6 se emplea como control endógeno ya que se encuentra expresado en abundancia en el núcleo celular y no varía su expresión ante condiciones experimentales diferentes. Consecuentemente, permite normalizar la cantidad de RNA utilizado para la RT-PCR y la eficiencia de la amplificación, permitiendo la comparación de los diferentes niveles de expresión de los miRNA.

Las muestras se mezclan, se incuban en hielo (4°C) durante 5 minutos y se introducen en un termociclador de PCR (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) siguiendo un programa de 30 minutos a 16°C, 30 minutos a 42°C, 5 minutos a 85°C y 4°C hasta que se recojan las muestras y se guarde el cDNA obtenido a -20°C.

3.2.8. qPCR

Una vez descongeladas las muestras y las sondas en hielo, se preparan las cantidades adecuadas del mix para cada sonda, 3 réplicas por el número de muestras más 2. De manera que por sonda se preparan las cantidades de la tabla por el número de eppendorfs:

Tabla 2. Componentes necesarios para realizar la qPCR a partir de los cDNAs obtenidos de la retrotranscripción de los mRNA extraído de diferentes tejidos del modelo experimental murino con los correspondientes volúmenes necesarios.

Componente	Volumen
Nuclease free water	3,5 μ L
TaqMan Mastermix (4°C)	5 μ L
Sonda TaqMan	0,5 μ L

A continuación, en una placa de 384 pocillos se cargan en primer lugar 9 μ L del mix (sin cDNA) en los pocillos horizontales, dos filas por sonda. Después, se carga 1 μ L de la muestra de cDNA en vertical, haciendo un duplicado por columna.

Se añade un blanco por cada sonda amplificada (9 μ L de mix más 1 μ L de agua libre de nucleasas) además del blanco de RT. Seguidamente, la placa se tapa con un film adhesivo, se le da un *spin* de 1 minuto a 1000 g para asegurar que el volumen se sitúa al final del pocillo y se inicia la PCR en el dispositivo QuantStudio (Applied Biosystems, Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). El programa que sigue consiste en 30 minutos a 16°C, 30 minutos a 42°C y 5°C a 85°C. Previamente al inicio de la qPCR se debe haber preparado la plantilla indicando el contenido de cada pocillo para posteriormente recoger y analizar los resultados por medio del programa QuantStudio.

El análisis de la expresión relativa del miRNA se llevó a cabo por el método de $2^{-\Delta Ct}$, que permite comparar la expresión del miRNA en diferentes muestras. Se basa en la comparación del ciclo umbral (Ct, de sus siglas en inglés) del miRNA de interés con el ciclo umbral de la referencia endógena, u6. Primero se calcula la diferencia de Ct entre el miRNA y la referencia en cada muestra (ΔCt) y después se utiliza la fórmula de 2 elevado al $-\Delta Ct$ calculado anteriormente. Así se puede obtener la expresión relativa del miRNA en la muestra de interés en comparación con el resto de condiciones.

3.2.9. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron empleando GraphPad Prism 8.0.2 (*GraphPad Software*). Los datos fueron representados en gráficas como media \pm error estándar de la media del número de datos (SEM) de cada grupo experimental. Antes de realizar las pruebas estadísticas, el propio programa informático determinaba los valores que se desviaban mucho del conjunto (atípicos) y que debían ser eliminados para obtener un intervalo ajustado. También se comprobó la normalidad de los datos por el test de Kolmogorov-Smirnov.

En el caso de la comparación de los datos de diferentes tejidos en machos y hembras se realizó un t-test múltiple no-pareado. Para analizar los datos de manera global de SHAM vs IAM en

ambos sexos se realizó un ANOVA de dos factores con grupo (SHAM vs IAM) y sexo (machos vs hembras) como factores independientes y la expresión del miRNA como dependiente. Para evaluar las diferencias significativas respecto al sexo tanto en IAM como en SHAM, se empleó un t-test no pareado independiente para cada grupo. Las diferencias significativas fueron establecidas como $p < 0,05$, siendo indicados por asteriscos las comparaciones de datos que presentaban p-valores significativos.

4. RESULTADOS

4.1. Análisis bioinformáticos

4.1.1. Secuencias

La secuencia del hsa-mir-28, que se muestra a continuación, es una molécula de ARN no codificante de 86 nucleótidos que presenta secuencias homólogas en humanos, ratones o perros entre otros.

5'-GGUCCUUGCCCUCAAGGAGCUCACAGUCUAUUGAGUUACCUUUCUGACUUUCCACUAGAUUGAGCUCCUGGAGGGCAGGCACU-3'

A partir de la escisión de la *stem-loop* de esta secuencia se generan las secuencias de hsa-mir-28-3p y hsa-mir-28-5p de 22 nucleótidos cada una. La primera es originada a partir del brazo 3' del precursor del miRNA mientras que la 5p, mostrada en segundo lugar, proviene del brazo 5' del precursor del miRNA.

5'-CACUAGAUUGUGAGCUCCUGGA-3'

5'-AAGGAGCUCACAGUCUAUUGAG-3'

La secuencia del mmur-mir-28^a de 86 pares de bases y de las estructuras 3p y 5p, ambas de 22 nucleótidos, son las siguientes respectivamente:

5'-GGUCCUACCUUCAAGGAGCUCACAGUCUAUUGAGUUCCUUCUGAUUCCACUAGAUUGAGCUGCUGGAGGGCAGGCACU-3'

5'-CACUAGAUUGUGAGCUGCUGGA-3'

5'-AAGGAGCUCACAGUCUAUUGAG-3'

Tras realizar un BLAST en la base de datos del NCBI con la secuencia del 3p de *Mus musculus* se obtiene una identidad del 95,45% al contener un cambio de nucleótido respecto a la de *Homo sapiens* en la posición 17, al portar una G en lugar de C. En cambio, se obtiene una identidad del 100% entre la secuencia 5p de *Mus musculus* y *Homo sapiens*.

4.1.2. Ontología Génica

El análisis de la Ontología Génica es comúnmente utilizado para identificar las funciones, procesos y componentes celulares que se asocian a un gen en particular, en este caso para analizar el MIR28. En relación con el componente celular, MIR28 se localiza fundamentalmente en el espacio extracelular mientras que su función molecular consiste en permitir la unión al 3'-UTR del mRNA y la represión de la actividad traduccional por la complementariedad de bases con el mRNA.

Dentro de los procesos biológicos, MIR28 está relacionado con el silenciamiento génico mediado por la inhibición de la traducción o por miRNA, la regulación negativa de la producción de interleucina (IL) 34 y la actuación aguas arriba en la regulación positiva del proceso de apoptosis de las células del músculo liso.

La IL- 34, junto con IL-32, se han visto asociada a enfermedades cardiovasculares y se está estudiando su posible uso como biomarcador de enfermedad de arteria coronaria y fallo cardíaco. La IL-34 también se ha vinculado a la obesidad, inflamación crónica y la resistencia insulina que a su vez está implicada en la aterosclerosis. La liberación masiva de IL-34 en la cascada de citocinas que se produce por una respuesta inmunitaria exacerbada frente a una infección o desorden puede derivar en la producción de citocinas proinflamatorias que contribuyan al proceso de formación de la placa de ateroma explicado anteriormente. Esto refuerza la implicación del miR-28-3p en la regulación de procesos vinculados con enfermedades cardiovasculares que pueden conducir a un aumento del riesgo de padecer un infarto (Kaufmann et al., 2023).

Otros estudios también han encontrado dianas génicas relacionadas con la angiogénesis, rutas de señalización de insulina y proliferación celular. No obstante, cabe recalcar que estos datos pueden variar en función del tejido o tipo celular.

4.1.3. Dianas

Después de haber conseguido las dianas con los programas TargetScan, miRDB y microT-CDS, y con el fin de homogenizar datos, se seleccionaron aquellas que eran comunes a los tres, obteniendo 24 genes diana para el miR-28-3p en humanos como se observa en la Figura 3. El mismo proceso se llevó a cabo para los ratones, consiguiendo en este caso 21 dianas comunes para el mismo miRNA, Figura 4.

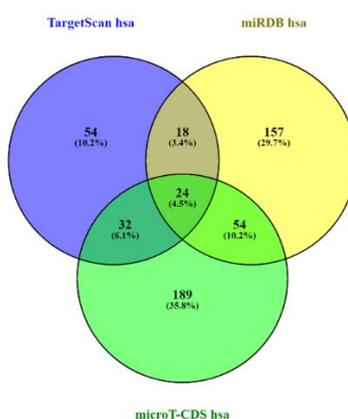


Figura 3. Diagrama de Venn que muestra las dianas del miR-28-3p en humanos comunes a las bases de datos de TargetScan, miRDB y microT-CDS. Gráfico desarrollado mediante la herramienta Venny del CNB-CSIC.

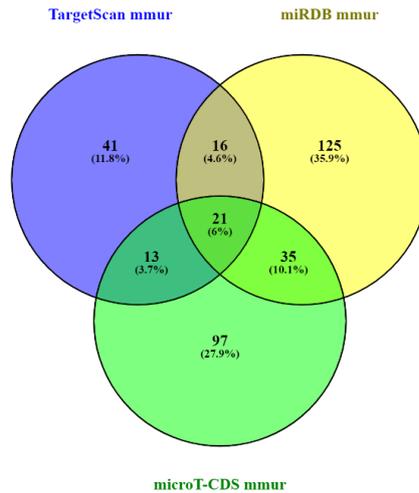


Figura 4. Diagrama de Venn que muestra las dianas del miR-28-3p en ratones comunes a las bases de datos de TargetScan, miRDB y microT-CDS. Gráfico desarrollado mediante la herramienta Venny del CNB-CSIC.

Como el objetivo era validar la expresión del miRNA en un modelo murino para extrapolar resultados a humanos, se compararon las dianas comunes en los dos diagramas superiores obteniendo la Figura 5 donde se muestran 10 dianas comunes para ambas especies. En la Tabla 3 se especifican las dianas comunes junto a la función de cada una de ellas.

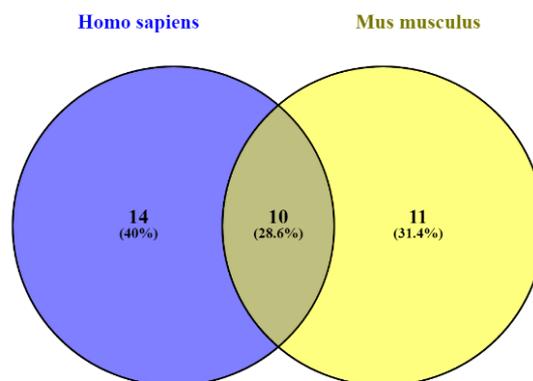


Figura 5. Diagrama de Venn que muestra las dianas coincidentes entre humanos y ratones del miR-28-3p para las tres bases de datos: TargetScan, miRDB y microT-CDS. Gráfico desarrollado mediante la herramienta Venny del CNB-CSIC.

Tabla 3. Función de las diez dianas del miR-28-3p coincidentes en humanos y ratones. Obtenidas a partir de la página web GeneCaRNA (<https://www.genecards.org/genecarna>).

Diana	Función
PARP8	-Mediador apoptosis celular -Vía granzimas -Señalización MAPK inducida por UVA
RBMS1	-Progresión ciclo celular, apoptosis -Interacción con MYC -Expresión génica, replicación DNA

WASL	-Organización citoesqueleto de actina -División celular
MARCH6	-Ubiquitín ligasa E3 -Procesos catabólicos proteosomales
FUBP3	-Mediador policariocitosis -Regulador transcripción y traducción
RNF216	-Ubiquitín ligasa E3 -Interacción con treonín/serín quinasas -Inhibición TNF-alfa y IL-1
ARF6	-Proteína unión GTP y transporte membrana -Señalización Ras, CCL18, insulina -Mediador de endocitosis y fagocitosis
NR3C2	-Relacionado con receptor mineralcorticoide
TRAF3	-Receptor asociado al factor TNF -Traducción de la señal CD40
UNKL	-Señalización Rac -Vía procesamiento MHC I -Ubiquitín ligasa E3

4.1.4. Rutas biológicas y KEGG

Dentro de las rutas en KEGG que presenta mayor participación, se encuentra la de biosíntesis de glicosfingolípidos, elongación de ácidos grasos, la regulación de lipólisis en los adipocitos o la resistencia a la insulina demostrando su importancia como mediador del metabolismo lipídico y de la obesidad (Figura 6).

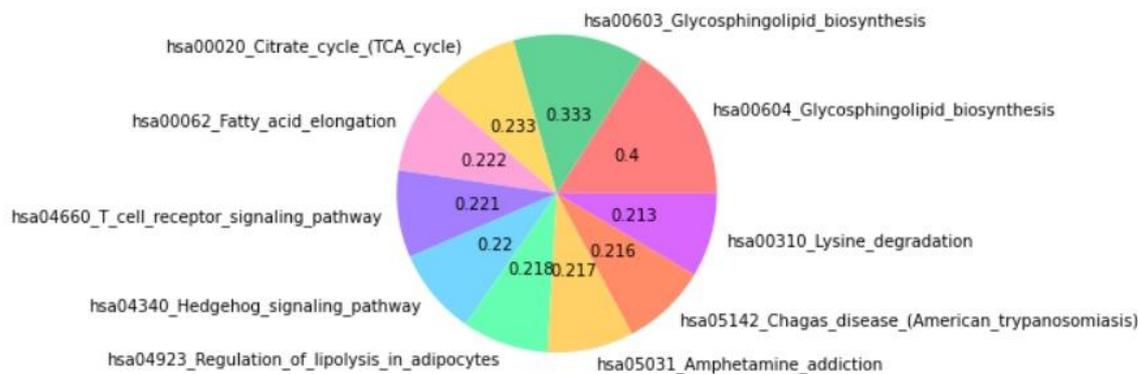


Figura 6. Diagrama de sectores con las rutas más enriquecidas para el miR-28-3p en la base de datos de KEGG. Las rutas más enriquecidas presentan mayor ratio de hits = Hits/PopHits; siendo los Hits, el número de genes diana anotados en el proceso biológico; Pop Hits, número de genes de toda la población de dianas predichas que coinciden con el conjunto de genes proporcionado para el análisis (Fuente: Elaboración propia).

Tanto la esfingomielina como sus metabolitos están presentes en las lipoproteínas y el plasma en condiciones fisiológicas. No obstante, su concentración se ve alterada en diversas patologías como las renales o cardiovasculares (Jiang et al., 2000). Estos metabolitos se localizan a su vez en el músculo cardíaco y esquelético, en las arterias y tejido adiposo de pacientes con enfermedad arterial coronaria u obesidad (Klevstig et al., 2016). Es por ello por lo que las modificaciones de la expresión de miR-28-3p en condiciones patológicas pueden estar causando

alteraciones en la expresión y actividad de enzimas metabólicas que conducen a la acumulación de glucoesfingolípidos (Samad et al., 2006).

Por otro lado, más directamente vinculado a la fisiología y senescencia cardiovascular se hallan rutas implicadas en la regulación de la longevidad, la cardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho, la activación de plaquetas o la contracción del músculo cardíaco. Además, en la misma base de datos encontramos dentro de los términos GO, los procesos biológicos en los que el miRNA participa con mayor significancia.

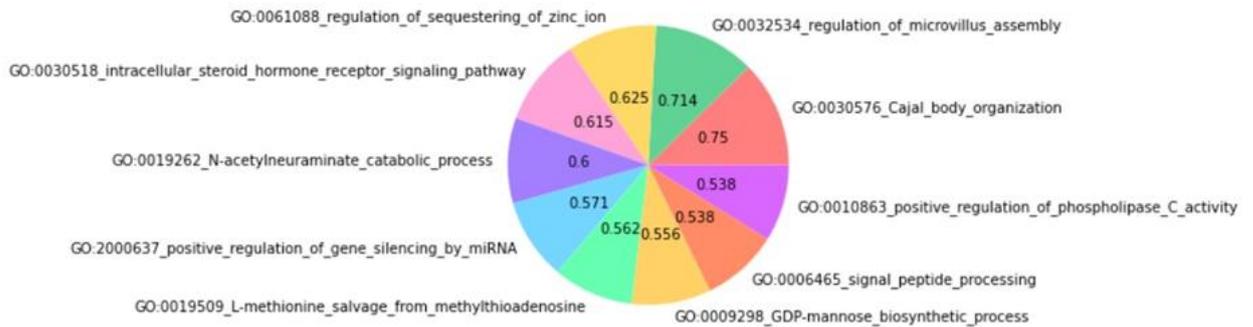


Figura 7. Diagrama de sectores con los procesos biológicos más enriquecidos para el miR-28-3p. Las rutas más enriquecidas presentan mayor ratio de hits = Hits/PopHits; siendo los Hits, el número de genes diana anotados en el proceso biológico; Pop Hits, número de genes de toda la población de dianas predichas que coinciden con el conjunto de genes proporcionado para el análisis (Fuente: Elaboración propia).

4.2. Análisis datos experimentales

Como en el análisis de las rutas metabólicas se veía que el miR-28-3p estaba muy implicado en el metabolismo lipídico y de acumulación de grasas, previamente al sacrificio, los ratones SAMR1 fueron pesados y se calculó la media del peso para cada sexo (Figura 8). Se observó que los ratones macho presentaban una diferencia significativa de peso, siendo el peso de estos mayor respecto al de las hembras.

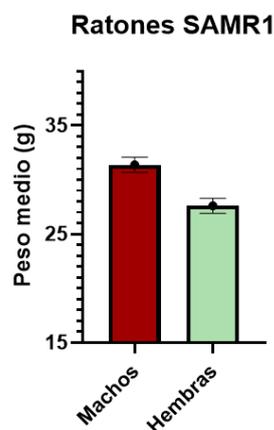


Figura 8. Comparación del peso medio de ratones SAMR1 machos (n=3) y hembras (n=3) (Fuente: Elaboración propia).

Antes de comenzar con el análisis experimental en muestras de infarto, se quiso comprobar la expresión de miR-28-3p en diferentes tejidos intactos de ratones no envejecidos SAMR1: hígado, pulmón, grasa abdominal y perivascular, bazo, riñón, músculo esquelético y corazón. Se trabajó con una n=3 para machos y n=3 para hembras.

Como se puede observar en la Figura 9, los tejidos que presentan mayor expresión en condiciones normales son la grasa perivascular y abdominal, el músculo esquelético, el corazón y en menor medida el hígado. Esto corrobora la importancia de este miRNA en el control de la fisiología y regulación cardiovascular al estar expresado en gran medida tanto en grasa perivascular y corazón. Asimismo, los datos sugieren una función como microRNA metabólico al estar expresado en el hígado, uno de los órganos centrales del metabolismo al regular el procesamiento y almacenamiento de nutrientes, la detoxificación y producción de biomoléculas como proteínas. También, el hecho de que esté presente en gran medida tanto en la grasa abdominal como en la perivascular permite relacionarlo con el índice de masa corporal y la regulación de la acumulación de lípidos y el balance energético, alterado en casos de obesidad.

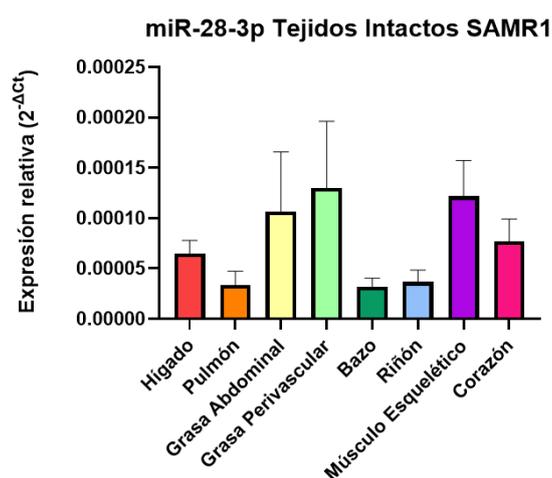


Figura 9. Expresión relativa del miR-28-3p en tejidos intactos de ratones SAMR1 para n=6 mediante qPCR. Los órganos analizados fueron hígado, pulmón, grasa abdominal y perivascular, bazo, riñón, músculo esquelético y corazón. Expresión relativizada mediante análisis comparativo 2^{-ΔCT} frente a U6. Las barras representan la media ± SEM. (Fuente: Elaboración propia con GraphPad Prism 8.0.2).

Si estos datos se comparan en muestras de ratones y ratonas, podemos estudiar las diferencias de sexo en la expresión del miR-28-3p (Figura 10). En el caso del hígado y del riñón se observa una tendencia al alza en la expresión del miRNA-28-3p en machos más que en hembras, mientras que, en el caso del pulmón, es significativa (p-valor=0,027). Tanto en la grasa abdominal como en grasa perivascular, se aprecia una clara tendencia a una diferencia de expresión, siendo también superior en machos. En cambio, en el caso del bazo a pesar de haber poca diferencia, la tendencia de la expresión es mayor en hembras, como ocurre de manera más notable en el músculo esquelético (p-valor=0,029) y el corazón (p-valor=0,05).

Aunque se han observado algunas diferencias significativas entre la expresión del miRNA entre machos y hembras, en la bibliografía no se ha manifestado que la regulación de este miRNA esté vinculado a las diferencias de sexo. Si bien es cierto que se ha visto que la acción de esta molécula puede llegar a estar controlada en cierta medida por estrógenos (Pérez-Cremades et al., 2018), los cuales tienen cierta importancia en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, atribuyéndoles un rol de protección. No obstante, el papel de este miRNA y su relación con los estrógenos en este tipo de enfermedades aún no está del todo esclarecido. En consecuencia, no se puede asegurar que alguno de los dos sexos presente un beneficio mayor por la mayor o menor expresión del miRNA, suponiendo que la regulación afecta a ambos de igual manera.

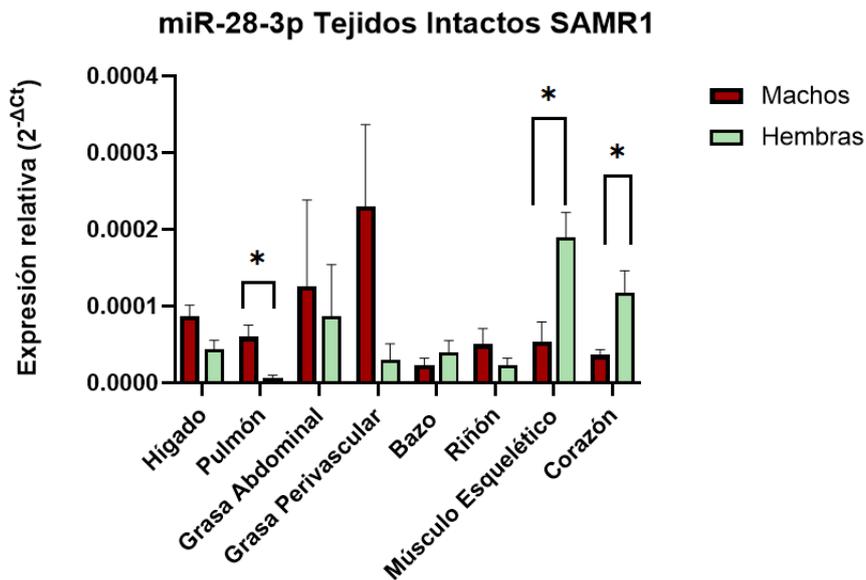


Figura 10. Diferencias en la expresión relativa del miR-28-3p en función en tejidos intactos de ratones y ratonas SAMR1. Representando en rojo los machos y verde las hembras (con n=3 tanto para hembras como para machos). Análisis comparativo 2^{-ΔCT} frente a U6 mediante qPCR donde las barras representan la media ± SEM (* p < 0,05) (Fuente: Elaboración propia con GraphPad Prism 8.0.2).

A continuación, para ver la influencia de la regulación del miRNA en casos de infarto de miocardio se analizaron los corazones y sueros de ratones IAM y sus respectivos controles SHAM. En el caso de los corazones, no se observaron diferencias significativas en la expresión del miR-28-3p en el grupo IAM respecto al control de cirugía SHAM, Figura 11.

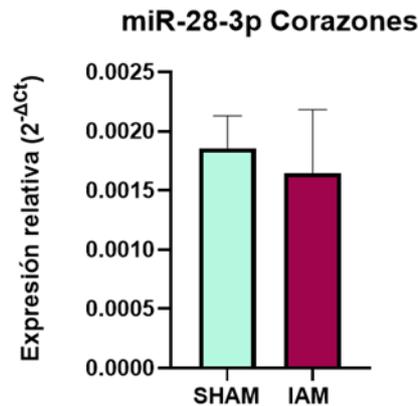


Figura 11. Expresión relativa del miR-28-3p en corazones de ratones SAMR1 a los que se les ha inducido el infarto de agudo de miocardio (IAM) y su correspondiente control de cirugía (SHAM). En color morado IAM y su control de cirugía (SHAM) en azul con n=3 tanto para machos como hembras. Análisis comparativo 2^{-ΔCT} frente a U6 mediante qPCR donde las barras representan la media ± SEM (Fuente: Elaboración propia con GraphPad Prism 8.0.2).

Asimismo, si se comparan ambos sexos la expresión de miR-28-3p es similar en machos y parece que en hembras esta diferencia es un poco más notable. Además, tanto en el caso de SHAM como IAM la expresión es superior en machos que, en hembras, Figura 12. No obstante, ninguna de las relaciones presentadas anteriormente presenta valores cercanos a p<0,05, siendo no significativas y, por lo tanto, no se muestran realmente las diferencias.

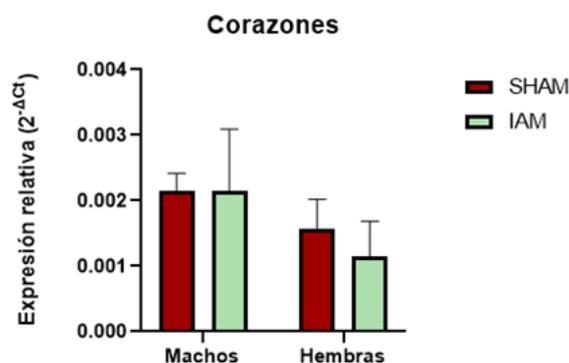


Figura 12. Diferencias en la expresión relativa del miR-28-3p en función del sexo en corazones de ratones SAMR1 IAM y SHAM. Representando en rojo los machos (n=3) y verde las hembras (n=3). Análisis comparativo 2^{-ΔCT} frente a U6 mediante qPCR donde las barras representan la media ± SEM (Fuente: Elaboración propia con GraphPad Prism 8.0.2).

En el análisis del suero, al igual que en corazones, los ratones a los que se les practicó la ligadura en la arteria coronaria presentaban una menor expresión del miR-28-3p respecto al grupo SHAM, aunque no alcanzaban una diferencia significativa, no pudiendo establecer esta relación (Figura 13).

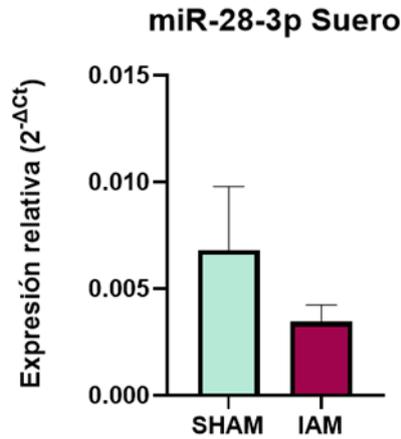


Figura 13. Expresión relativa del miR-28-3p en suero de ratones SAMR1 a los que se les ha inducido el infarto de agudo de miocardio (IAM) y su correspondiente control de cirugía (SHAM). En color morado IAM y su control de cirugía (SHAM) en azul con n=3 tanto para machos como hembras. Análisis comparativo 2^{-ΔCT} frente a U6 mediante qPCR donde las barras representan la media ± SEM (Fuente: Elaboración propia con GraphPad Prism 8.0.2).

Respecto a las diferencias de sexo, los machos que habían sufrido un infarto de miocardio experimental presentaban una disminución significativa de la expresión del miRNA en comparación con el grupo control SHAM (p-valor=0,025), mientras que en hembras no se observaron diferencias entre el grupo IAM y el grupo SHAM (Figura 14). Además, si se comparan ambos sexos, se presenta una diferencia significativa en la expresión en SHAM, siendo mayor en machos que en hembras (p-valor=0,012). Además, se produce una diferencia significativa entre los machos SHAM y las hembras IAM (p-valor=0,022).

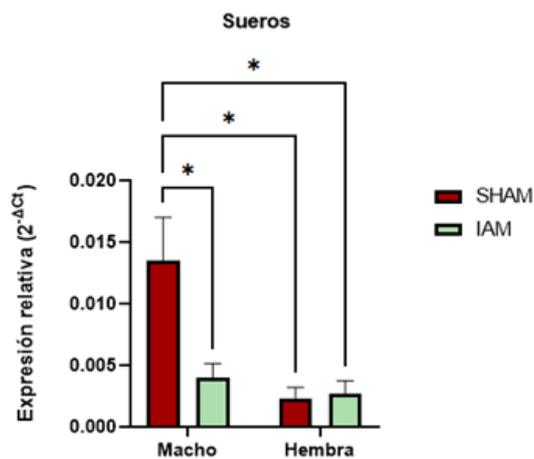


Figura 14. Diferencias en la expresión relativa del miR-28-3p en función del sexo en sueros de ratones SAMR1 IAM y SHAM. Representando en rojo los machos (n=3) y verde las hembras (n=3). Análisis comparativo 2^{-ΔCT} frente a U6 mediante qPCR donde las barras representan la media ± SEM. El asterisco indica las diferencias de expresión significativas, p-valor<0,05 (Fuente: Elaboración propia con GraphPad Prism 8.0.2).

5. DISCUSIÓN

El punto de partida de este trabajo experimental es el trabajo realizado en una tesis doctoral del grupo LINCE (Mompeón, 2018) en el que se realizó un estudio por medio de arrays de expresión en muestras de suero de pacientes recogidas en el momento agudo del infarto de miocardio y tras un año de recuperación. El miR-28-3p disminuía su expresión y, además, se observó una correlación positiva de la expresión del miR-28-3p y la IL-8, y negativa con la quimiocina MDC.

Se ha sugerido que la quimiocina MDC recluta células inmunes al lugar de la inflamación y ejerce un papel protector ante el infarto. Contrariamente, la IL-8 es una molécula proinflamatoria que produce la inflamación de la pared arterial y contribuye al desarrollo de la aterosclerosis (Marcos-Gómez et al., 2008).

Cabe destacar que las muestras de suero del estudio fueron tomadas de pacientes que mayoritariamente padecían obesidad. Esto sugirió la posible relación de este miRNA en los casos de obesidad e inflamación crónica propios de pacientes con síndrome metabólico.

5.1 miR-28-3p como miRNA metabólico

Una de las razones que puede conducir a la aterosclerosis y su derivación en infarto agudo de miocardio es el síndrome metabólico. Este se caracteriza por un conjunto de desórdenes que implican el incremento del riesgo de padecer diabetes de tipo 2 y problemas cardiovasculares. Dentro de estas se encuentran la hiperglucemia, la obesidad, niveles bajos de HDL o la hipertensión. Algunos factores como la hipoxia, la glucolipotoxicidad o el estrés del retículo endoplasmático parecen ser la causa de la inflamación crónica del tejido adiposo en el caso de la obesidad. Estos producen la infiltración de macrófagos atraídos por moléculas proinflamatorias de tejido adiposo, que secretan más mediadores proinflamatorios que inducen resistencia a la insulina como el TNF- α (Ge et al., 2014).

La obesidad como enfermedad multifactorial se caracteriza por una inflamación crónica de bajo grado en el tejido adiposo que acaba implicando negativamente a las funciones fisiológicas y biológicas del organismo. Se ha comprobado que los miRNA son reguladores de la diferenciación, desarrollo y función de los adipocitos, donde se produce la acumulación excesiva de grasa que conduce a un incremento de la producción de citoquinas proinflamatorias y la infiltración de células inmunes como macrófagos y células T (Rakib et al., 2022).

El envejecimiento tiene un papel importante en este proceso ya que con la edad se incrementa la adiposidad y el porcentaje de grasa corporal. A su vez, la acumulación de células senescentes induce el aumento de citoquinas y quimiocinas que pueden estimular procesos patológicos. Cada vez hay más evidencias que relacionan la regulación del miR-28-3p con vías de señalización como la de insulina o la de la diana en mamíferos de la rapamicina (mTOR) que están asociadas al envejecimiento y el ciclo celular (Lucena, 2019).

La Figura 9 muestra como la expresión del miR-28-3p es elevada en el hígado, órgano central en el metabolismo lipídico y biosíntesis de ácidos grasos y lipoproteínas, donde está notablemente implicado, concretamente en la biosíntesis de glicoesfingolípidos (Figura 6), los cuales en los casos de obesidad se ven alterados en el tejido adiposo (Samad et al., 2006). Por ello, se puede confirmar su relevancia como miRNA metabólico al mediar en procesos anabólicos, así como su

implicación en la acumulación de grasas al estar notablemente expresado tanto en la grasa abdominal y, sobre todo, perivascular (Figura 8).

Aunque su repercusión en estos requiere una investigación más exhaustiva, se ha asociado al miR-28-3p en plasma con el metabolismo de la obesidad infantil y la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2). En el caso de la obesidad infantil se observó una disminución en la expresión del miRNA circulante en plasma, relacionando la desregulación con el índice de masa corporal (IMC) y otros parámetros de obesidad o resistencia a la insulina. En los casos en los que el IMC disminuía a lo largo del tiempo, se producía un incremento de la concentración del miR-28-3p, asociando estas variaciones de manera significativa con la presión sanguínea sistólica (Prats-Puig et al., 2013).

Cabe destacar que una de las dianas predichas para este miRNA es FOS, que es un componente clave para la respuesta al estrés celular. Esto toma cierta relevancia ya que una de las causas principales de la acumulación de grasas es la alteración en la actividad autónoma neural. La expresión de FOS en las neuronas puede estar catalizada por el estrés inducido por el ayuno, por lo que una regulación a la baja del miR-28-3p que se dirige a este gen no estaría reduciendo la expresión de FOS. Esto puede derivar en un incremento de la participación de FOS en la resistencia hipotalámica al factor de saciedad, incrementando el apetito y en consecuencia la ingesta de alimentos (Kim et al., 2005).

Contrariamente, se identificó un modesto incremento de este miRNA en el plasma de pacientes diabéticos. Tanto este resultado como el anterior están relacionados, pues la reducción del miRNA en circulación de niños obesos se encontraba asociado a un nivel mayor de adiponectina, importante adipocina antidiabética. Consecuentemente, una bajada en la expresión del miR-28-3p puede producir hasta cierto punto, un aumento de la síntesis de esta adipocina que conlleva un beneficio al ejercer protección en la sensibilidad a la insulina en edades tempranas y así evitar la diabetes adulta. Por tanto, se observa un perfil alterado de este miRNA circulante en niños obesos prepuberales donde se ve disminuida su expresión. Este perfil se puede deber a un mecanismo compensatorio donde el miRNA trata de atenuar las alteraciones producidas por la obesidad (Zampetaki et al., 2010). Mientras que el incremento ligero del miRNA en pacientes con DMT2 puede no conducir al incremento de adiponectina que tiende a ser menor que las concentraciones normales en los casos de diabetes (Martos-Moreno et al., 2013).

Centrándose en los resultados obtenidos experimentalmente, los machos, que presentan mayor peso medio que las hembras (Figura 8), presentaban mayor expresión del miRNA en suero (Figura 14), lo que en principio se contradice con los resultados de la bibliografía donde en un principio el IMC presenta una correlación inversa con el miR-28-3p. Esto puede deberse a que en el presente trabajo se ha estudiado la expresión en suero y no plasma, pudiendo dar lugar a alteraciones en la expresión del miRNA circulante por la presencia de coagulación y hematíes presentes en la muestra, así como la falta de estandarización en la metodología de análisis empleada (Caparrós, 2017).

5.2. Implicación del miR-28-3p en procesos cardiovasculares

Tras demostrar que el miR-28-3p es un miRNA metabólico implicado en la regulación de importantes factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares como la diabetes o la

obesidad, queda vinculado por tanto al desarrollo de desórdenes cardiovasculares cuando se ve alterada su expresión. Como se observa en la Figura 9 presenta una expresión notable en corazón y en grasa perivascular, la cual se encuentra rodeando tanto la arteria coronaria como el lecho circulatorio de diversos órganos (Gómez-Hernández et al., 2013). Se ha demostrado que en el síndrome metabólico como en la obesidad la grasa perivascular no mantiene sus propiedades vasorreguladoras al secretar menos adipoquinas vasodilatadoras (Greenstein et al., 2009). Consecuentemente es entendible que la expresión del miR-28-3p sea más elevada en tejidos de órganos implicados en procesos metabólicos y cardiovasculares (Figura 9).

De manera que este miRNA se ha relacionado con patologías circulatorias que pueden derivar en procesos que conlleven al infarto. Por ejemplo, el miR-28-3p se encontraba desregulado en el plasma de pacientes que padecían embolia pulmonar, que es una manifestación de tromboembolismo venoso, siendo la tercera causa de muerte cardiovascular (Goldhaber, 2012). Este miRNA se encontraba sobreexpresado en las muestras tomadas, así como en los modelos animales caninos que se tomaron para comprobar la fiabilidad del estudio (Zhou et al., 2016). El motivo de este cambio en la expresión parece deberse a la implicación que tiene en mecanismos patológicos que producen el tromboembolismo como el metabolismo del fosfoinositol o la señalización del fosfatidilinositol, rutas encontradas en la búsqueda bioinformática en KEGG. Este podría ser secretado por el tejido pulmonar dañado, donde se expresa el miRNA en condiciones normales (Figura 9), pudiendo ahondar más en futuras investigaciones relacionadas con la expresión diferencial en relación con el sexo, al mostrarse una diferencia significativa, mayor en el macho, en este tejido (Figura 10).

En el análisis llevado a cabo el miRNA se encuentre infraexpresado en IAM respecto a SHAM (Figura 14), contradiciéndose con la información encontrada. Sin embargo, en un estudio que analizaba la implicación de este miRNA liberado por exosomas de células madre mesenquimales en la apoptosis de las células endoteliales pulmonares que derivaban en tromboembolismo pulmonar, se produjeron diferencias en la expresión entre el plasma de pacientes y ratones, y las células endoteliales pulmonares (PECs). No obstante, en este caso, la expresión en plasma era mayor en los pacientes que en condiciones normales y el miR-28-3p se hallaba regulado a la baja en las PECs. Se demostró como el miR-28-3p al interactuar en menor medida con API5, factor antiapoptótico en el fibroblasto de ratón, producía una disminución de la apoptosis en las PECs (Mao et al., 2020). Estas variaciones en la expresión que también ocurren en cánceres como el de próstata, pueden deberse al aún existente desconocimiento acerca de los mecanismos de liberación de miRNA al medio extracelular (Zedan et al., 2018) así como el hecho de que en el estudio llevado a cabo se trabajó con suero y no plasma, requiriendo una mayor investigación en este campo para que demuestre la reproducibilidad de los hallazgos.

Además, otro estudio reveló que el potencial uso del miR-28-3p como biomarcador del síndrome coronario agudo al relacionar el aumento del miRNA circulante con un incremento en el GRACE risk score, que es un modelo de riesgo cuantitativo que predice eventos adversos intrahospitalarios, ampliamente validado, a partir del Registro Global de Eventos Coronarios Agudos (Wang et al., 2017). Esta correlación positiva se demostró por la secuenciación del RNA de muestras completas de sangre de los pacientes, que mostraban una tendencia opuesta a los obtenidos por Mompeón (Mompeón, 2018). Esto demuestra la necesidad de realizar estudios funcionales que demuestren la causalidad de los datos obtenidos, así como técnicas diagnósticas

más reproducibles que permitan el análisis de muestras de sangre de manera más comparable (Vaca, 2014).

Por otro lado, entre las dianas encontradas en la base de datos de microT-CDS está ADAM17, una proteína transmembrana que actúa como metaloproteasa, implicada en el proceso angiogénico al promover la proliferación de pericitos y el brotado de capilares (Lin et al., 2011). Esta proteína a su vez actúa sobre la proteína transmembrana ACE2, que regula negativamente el sistema renina-angiotensina-aldosterona, escindiéndola (J. Xu et al., 2017). Este proceso ha sido muy estudiado recientemente al descubrir que es iniciado por la proteína viral S del SARS-CoV2 y cómo desregulaciones en este pueden conducir a un incremento de la presión arterial y al desarrollo de hipertensión, enfermedades cardiovasculares, diabetes y enfermedad crónica pulmonar (Romanelli et al., 2020). De modo que en este estudio se observó que en células 293T el miR-28-3p se encontraba regulado a la baja y estaba correlacionado negativamente con ADAM17, cuando eran tratadas con la proteína viral S. El bloqueo por parte del miRNA a ADAM17, inhibía la escisión del ectodominio de ACE2, pero no se llegó a concluir si era tan sólo producto de la infección del SARS-CoV2 o si también se podía dar en condiciones patológicas cardiovasculares independientes (Y. Xu et al., 2021). De manera que la menor expresión del miR-28-3p en casos patológicos, como se obtuvo la Figura 13 y 14, podría beneficiar a la proliferación de la infección, así como procesos angiogénicos que puedan conducir a alteraciones cardiovasculares.

Es importante resaltar que muchos de los estudios encontrados bibliográficamente se realizan en plasma de pacientes o en cultivos in vitro de células como HUVEC y no en corazones. La expresión del miRNA puede variar entre tejidos cardíacos y el plasma pues la liberación del miRNA por parte del corazón puede suponer un aumento de su concentración en el plasma. Otra posibilidad es que este miRNA sea en realidad sintetizado por otros tipos celulares del organismo y que circule hasta el corazón donde presente una menor concentración. Las diferencias de expresión también se pueden deber a la distinta vida media que puede tener el miRNA en circulación o ubicado en los tejidos. Los miRNAs aparte de regular dianas intracelulares se encuentran en sangre en condiciones normales. Aunque no se conoce a la perfección los motivos de su liberación al torrente sanguíneo, son transportados por exosomas, partículas de HDL, cuerpos apoptóticos o moléculas de AGO2 de manera estable (Guardiola et al., 2016). Dentro de estos se encuentra el miR-28-3p, de manera que su actuación como miRNA circulante puede suponer su mayor presencia en los fluidos circulatorios que en los tejidos.

5.3. Comparación miR-28-3p y miR-28-5p

Si se comparan las funciones y procesos que median las dos estructuras del miR-28 se encontrarán diferencias notables. En cáncer existe una gran distinción entre los perfiles de expresión, por ejemplo, el miR-28-3p se encuentra sobreexpresado en el cáncer de células renales, así como en el cáncer colorrectal mientras que, en estos, el miR-28-5p se encuentra regulado a la baja (Hosseini et al., 2023).

En relación con patologías cardiovasculares, la aparición de procesos aterogénicos y el infarto de miocardio están asociados con factores multifactoriales y un proceso inflamatorio. Un estudio realizado en células endoteliales senescentes de vena de cordón umbilical humano (HUVEC)

relacionó el incremento de ciertos miRNAs en exosomas con la aterosclerosis, entre ellos el miR-28 en sus estructuras 3p y 5p. Se encontró que estos miRNAs son regulados por el factor de transcripción NRF2 en presencia de fosfolípidos oxidados, lo cual contribuye a la permeabilidad vascular y la respuesta inflamatoria. La desregulación del miR-28 se asocia con el proceso angiogénico y la ruptura de la placa de ateroma, debido a su regulación negativa sobre las vías de señalización de mTOR, MYC y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Linna-Kuosmanen et al., 2021). Por otro lado, se observó que, en cardiomiocitos sometidos a estrés oxidativo, el miR-28-5p se regulaba al alza y su aumento contribuía a la muerte celular apoptótica. La causa se debía a que el miR-28-5p suprimía la activación de la vía Akt/mTOR al inhibir su quinasa activadora PDK1, lo que lleva a la muerte de los cardiomiocitos. Esto sugiere que modulando los niveles de miR-28 se podría mediar el daño celular causado por el estrés oxidativo y la apoptosis en el corazón (Zhu et al., 2016).

Se ha observado que el miR-28-5p está vinculado con la diabetes, siendo la angiogénesis un proceso fundamental para la cicatrización de heridas de los pacientes con esta enfermedad. Este proceso se veía alterado por el incremento del miRNA en el endotelio ya que su regulación positiva inhibía la expresión del mRNA de NRF2, mencionado anteriormente. Por otro lado, inhibía la traducción del receptor de la trombopoyetina (TPOR), dificultando el proceso de migración y angiogénesis. La activación de TPOR en HUVEC promovía una mayor motilidad y producción de PAF (factor de activación plaquetario), IL-8, que promueve la infiltración de monocitos en la placa de ateroma, y la fosforilación de STAT1 y STAT5B (Tam et al., 2015).

La regulación de la ruta Akt/mTOR y la vía de autofagia de las MAPK por parte del miR-28-5p también se produce a través de la aldehído deshidrogenasa 2 (ALDH2). Esta enzima desempeña un papel clave en la protección del corazón contra la isquemia al desintoxicar aldehídos como el etanalaldehído y el 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), y bioactivar la nitroglicerina (GTN). Se ha observado en ratones que el miR-28-5p interactúa con el extremo 3'UTR del mRNA de la ALDH2 en condiciones de hipoxia que simulan el ambiente isquémico. Así, la sobreexpresión del miR-28 inhibe la ALDH2, lo que promueve el daño por isquemia al no poder atenuar los aldehídos cardíacos, la isoenzima MB creatín quinasa y la formación de carbonilos en proteínas, conduciendo a la apoptosis y daño del miocardio (Li et al., 2015).

En un estudio, se investigó la regulación del receptor activado α para la proliferación de peroxisomas (PPAR α) en el remodelado mitocondrial y la hipertrofia en cardiomiocitos hipertróficos. Se observó que la expresión de varios miRNAs, incluido el miR-28, estaba alterada en estos cardiomiocitos. Se demostró que el miR-28 regulaba a la baja el canal aniónico dependiente de voltaje VDAC-I, presente en la membrana mitocondrial externa. La disminución de la señalización del receptor PPAR α , debido a la regulación a la baja por el miR-28, dificultaba la β -oxidación de ácidos grasos y la disfunción mitocondrial. Se concluyó que el miR-28 desempeña un papel importante en el mantenimiento del complejo del poro de transición para la permeabilidad mitocondrial (MPTP) a través de la regulación de la expresión de VDAC. La interacción con VDAC reduce su actividad, lo que a su vez conduce a la disfunción mitocondrial debido al estrés oxidativo, el desbalance iónico de calcio y la pérdida del potencial de membrana. Estos hallazgos destacan la implicación crítica de la señalización de PPAR α y el miR-28 en la disfunción mitocondrial en cardiomiocitos hipertróficos (Kar et al., 2018).

Por el contrario, se ha determinado que el miR-28-3p induce la proliferación celular e inhibe la apoptosis, a diferencia del miR-28-5p. Esto se debe a que la sobreexpresión del miRNA produce

que se incremente el bloqueo que ejerce sobre Sox6, factor de transcripción que inhibe la proliferación celular. Asimismo, su sobreexpresión regula al alza los niveles de fosforilación de PI3K y Akt, en contraposición con la acción del 5p (W. Li et al., 2020).

Por último, cabe destacar que existe una gran disparidad de en el estudio e investigación entre el miR-28-5p y el miR-28-3p. Esto genera que en la literatura científica haya un gran desequilibrio al que se le suma la falta de especificación en muchos artículos sobre que estructura del miR-28 se trata. Esto puede derivar en confusiones y falta de interpretar los resultados. Además, aunque ambos proceden del mismo miRNA poseen funciones distintas y en muchas ocasiones, perfiles diferentes de expresión tanto en condiciones normales como patológicas. Es por ello, que en futuras investigaciones convendría estudiar las diferencias de expresión entre ambas estructuras del miR-28 para ver como influyen ambas en la regulación del IAM y su posible uso como biomarcador.

6. CONCLUSIÓN

Este trabajo experimental basado en estudios previos que demostraron la disminución en la expresión del miR-28-3p en muestras de suero de pacientes con IAM ha permitido establecer su expresión diferencial en distintos tejidos, siendo mayor en los implicados en el metabolismo lipídico y procesos cardiovasculares como grasa perivascular y abdominal, corazón e hígado. Esto ha permitido relacionarlo con enfermedades como la diabetes y el síndrome metabólico que son importantes factores de riesgo que pueden conducir a problemas cardiovasculares. Esto ha sido demostrado bioinformáticamente por medio de la búsqueda en bases de datos que confirman que sus dianas, las rutas metabólicas en las que participan y los elementos de su Ontología Génica lo hacen ser un miRNA metabólico con una importante implicación en el metabolismo y sistema cardiovascular. Además, presentan expresión diferencial en función del sexo en el caso del músculo esquelético y corazón, siendo mayor la expresión en hembras; y en pulmón, siendo mayor en machos.

Sin embargo, aunque en principio una mayor expresión de este miRNA induciría el desarrollo de procesos patológicos para la fisiología cardiovascular, se ha observado experimentalmente, una disminución del miR-28-3p en suero y corazón IAM respecto a SHAM. Destacar que en el caso del suero se encontraron diferencias significativas entre la expresión del miR-28-3p en SHAM, siendo mayor en macho respecto a hembra, también entre machos, siendo mayor en SHAM que en IAM y por último mayor en macho SHAM que en IAM hembra. Sin embargo, debido a la variación en el patrón de expresión y la bibliografía encontrada, se debería hacer más estudios que corroboren los datos obtenidos. De esta forma, se podría llegar a emplear el miR-28-3p como biomarcador para un rápido diagnóstico y monitorización del infarto. Asimismo, el conocimiento de su relación con la obesidad y la acumulación de grasas puede suponer una mejora en la prevención de la obesidad en edades tempranas, reduciendo la probabilidad de sufrir enfermedades relacionadas con esta.

Además, este trabajo puede servir como punto de partida para futuros proyectos que permitan estudiar la relación del miR-28-3p con la senescencia vascular empleando modelos murinos SAMP8 de senescencia acelerada y que manifiestan cambios patológicos relacionados con la edad similares a los de los humanos. También, convendría realizar nuevos estudios acerca de las diferencias funcionales entre las estructuras 3p y 5p que diluciden su regulación y papel en los

diferentes procesos biológicos, de modo que podamos utilizarlos como posibles dianas terapéuticas en las enfermedades cardiovasculares.

7. BIBLIOGRAFÍA

Arora, S., Rana, R., Chhabra, A., Jaiswal, A., & Rani, V. (2013). MiRNA-transcription factor interactions: A combinatorial regulation of gene expression. In *Molecular Genetics and Genomics*, 288(3–4), 77–87. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00438-013-0734-z>

Bentzon, J. F., Otsuka, F., Virmani, R., & Falk, E. (2014). Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circulation Research*, 114(12), 1852–1866. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.302721>

Caparrós, E. (2017). Hemostasia del Desarrollo: Nuevos Mecanismos de Regulación de la Reactividad Plaquetaria en Neonatos. Universidad de Murcia.

Csiszar, A., Wang, M., Lakatta, E. G., & Ungvari, Z. (2008). Inflammation and endothelial dysfunction during aging: role of NF-Kb. *Journal of Applied Physiology*, 105(4), 1333–1341. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.90470.2008>

Cyr, A. R., Huckaby, L. V., Shiva, S., & Zuckerbraun, B. S. (2020). Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. *Critical Care Clinics*, 36(2), 307–321. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2019.12.009>

Davignon, J., & Ganz, P. (2004). Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis. *Circulation*, 109(23_suppl_1). <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000131515.03336.f8>

Deretic, V., Saitoh, T., & Akira, S. (2013). Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology*, 13(10), 722–737. <https://doi.org/10.1038/nri3532>

Díaz Carrasco, I., Guisado Rasco, A., & Ordoñez Fernández, A. (2016). ¿Qué son los micro-RNA? ¿Para qué sirven? ¿Qué potenciales beneficios podrían tener en el contexto asistencial? *Cardiocore*, 51(4), 161–166. <https://doi.org/10.1016/j.carcor.2015.02.002>

Fazi, F., & Nervi, C. (2008). MicroRNA: basic mechanisms and transcriptional regulatory networks for cell fate determination. *Cardiovascular Research*, 79(4), 553–561. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvn151>

Ge, Q., Brichard, S., Yi, X., & Li, Q. (2014). MicroRNAs as a New Mechanism Regulating Adipose Tissue Inflammation in Obesity and as a Novel Therapeutic Strategy in the Metabolic Syndrome. *Journal of Immunology Research*, 2014, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2014/987285>

Goldhaber, S. Z. (2012). Venous thromboembolism: Epidemiology and magnitude of the problem. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 25(3), 235–242. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2012.06.007>

Gómez-Hernández, A., Perdomo, L., Escribano, Ó., & Benito, M. (2013). Papel del tejido adiposo marrón y perivascular en las complicaciones vasculares asociadas a la obesidad. *Clínica e Investigación En Arteriosclerosis*, 25(1), 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2012.11.002>

- Greenstein, A. S., Khavandi, K., Withers, S. B., Sonoyama, K., Clancy, O., Jeziorska, M., Laing, I., Yates, A. P., Pemberton, P. W., Malik, R. A., & Heagerty, A. M. (2009). Local Inflammation and Hypoxia Abolish the Protective Anticontractile Properties of Perivascular Fat in Obese Patients. *Circulation*, 119(12), 1661–1670. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.821181>
- Guardiola, M., Vallvé, J. C., Zaina, S., & Ribalta, J. (2016). Epigenética en la arteriosclerosis. In *Clinica e Investigacion en Arteriosclerosis*, Elsevier Doyma, 28(2), 102–119. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2015.04.002>
- Hosseini, S. F., Javanshir-giv, S., Soleimani, H., Mollaei, H., Sadri, F., & Rezaei, Z. (2023). The importance of hsa-miR-28 in human malignancies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 161, 114453. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114453>
- Hu, B., Zhong, L., Weng, Y., Peng, L., Huang, Y., Zhao, Y., & Liang, X. (2020). Therapeutic siRNA: state of the art. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1):101. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0207-x>
- Iwasaki, Y. W., Siomi, M. C., & Siomi, H. (2015). PIWI-Interacting RNA: Its Biogenesis and Functions. *Annual Review of Biochemistry*, 84(1), 405–433. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034258>
- Jiang, X., Paultre, F., Pearson, T. A., Reed, R. G., Francis, C. K., Lin, M., Berglund, L., & Tall, A. R. (2000). Plasma Sphingomyelin Level as a Risk Factor for Coronary Artery Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(12), 2614–2618. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.20.12.2614>
- Kaikkonen, M. U., Lam, M. T. Y., & Glass, C. K. (2011). Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovascular Research*, 90(3), 430–440. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr097>
- Kar, D., & Bandyopadhyay, A. (2018). Targeting Peroxisome Proliferator Activated Receptor α (PPAR α) for the Prevention of Mitochondrial Impairment and Hypertrophy in Cardiomyocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 49(1), 245–259. <https://doi.org/10.1159/000492875>
- Kaski, J. C. (2021). Documento de consenso de MINOCA: Un punto de inflexión en el diagnóstico y tratamiento de una afección intrigante. *Revista Argentina de Cardiología*, 89(6), 491–493. <https://doi.org/10.7775/rac.es.v89.i6.20455>
- Kaufmann, C. C., Ahmed, A., Muthspiel, M., Rostocki, I., Pogran, E., Zweiker, D., Burger, A. L., Jäger, B., Aicher, G., Spiel, A. O., Vafai-Tabrizi, F., Gschwantler, M., Fasching, P., Wojta, J., & Huber, K. (2023). Association of Interleukin-32 and Interleukin-34 with Cardiovascular Disease and Short-Term Mortality in COVID-19. *Journal of Clinical Medicine*, 12(3), 975. <https://doi.org/10.3390/jcm12030975>
- Kim, M.-J., CHANG, U.-J., CHUNG, J.H., KIM, H. K., LIM, B. O., YAMADA, K., LIM, Y., & KANG, S. A. (2005). Dissimilarity in Fos and Jun Immunoreactivity in Hypothalamic Regions between Obese and Lean Zucker Rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69(10), 1982–1984. <https://doi.org/10.1271/bbb.69.1982>

- Klevstig, M., Ståhlman, M., Lundqvist, A., Scharin Täng, M., Fogelstrand, P., Adiels, M., Andersson, L., Kolesnick, R., Jeppsson, A., Borén, J., & Levin, M. C. (2016). Targeting acid sphingomyelinase reduces cardiac ceramide accumulation in the post-ischemic heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 93, 69–72. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.02.019>
- Krüger-Genge, A., Blocki, A., Franke, R., & Jung, F. (2019). Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4411. <https://doi.org/10.3390/ijms20184411>
- Lakatta, E. G., & Levy, D. (2003). Arterial and cardiac aging: Major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: Aging arteries: A “set up” for vascular disease. In *Circulation*, Lippincott Williams and Wilkins, 107(1), 139–146. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000048892.83521.58>
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kang, Y. C., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., & Kim, V. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956), 415–419. <https://doi.org/10.1038/nature01957>
- Li, S.-P., Liu, B., Song, B., Wang, C.-X., & Zhou, Y.-C. (2015). miR-28 promotes cardiac ischemia by targeting mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) in mus musculus cardiac myocytes. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 19(5), 752–758.
- Li, W., Dong, X., & Zhao, J. (2020). MiR-28-3p enhances healing of fracture via negative regulation of the target gene Sox6 and activation of PI3K/Akt signaling pathway. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 19(10), 2061–2066. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v19i10.6>
- Lin, J., Lemke, C., Redies, C., Yan, X., Mix, E., Rolfs, A., & Luo, J. (2011). ADAM17 overexpression promotes angiogenesis by increasing blood vessel sprouting and pericyte number during brain microvessel development. *The International Journal of Developmental Biology*, 55(10-11-12), 961–968. <https://doi.org/10.1387/ijdb.103210jl>
- Linna-Kuosmanen, S., Tomas Bosch, V., Moreau, P. R., Bouvy-Liivrand, M., Niskanen, H., Kansanen, E., Kivelä, A., Hartikainen, J., Hippeläinen, M., Kokki, H., Tavi, P., Levonen, A. L., & Kaikkonen, M. U. (2021). NRF2 is a key regulator of endothelial microRNA expression under proatherogenic stimuli. *Cardiovascular Research*, 117(5), 1339–1357. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa219>
- Liu, J., LIU, X.-Q., LIU, Y., SUN, Y. N., LI, S., LI, C.-M., LI, J., TIAN, W., SHANG, X.-M., & ZHOU, Y.-T. (2016). MicroRNA 28-5p regulates ATP-binding cassette transporter A1 via inhibiting extracellular signal-regulated kinase 2. *Molecular Medicine Reports*, 13(1), 433–440. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4563>
- Liu, Q., Yan, S., Yuan, Y., Ji, S., & Guo, L. (2022). miR-28-5p improved carotid artery stenosis by regulating vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Vascular*, 30(4), 764–770. <https://doi.org/10.1177/17085381211019510>
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell*, 153(6), 1194–1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>

- Lucena, R. J. (2019). DOCTORAL THESIS Identification of new biomarkers to predict the risk of Type 2 Diabetes Mellitus in patients with Cardiovascular Disease CORDIOPREV-DIAB study. <https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>
- Lv, Y., Yang, H., Ma, X., & Wu, G. (2019). Strand-specific miR-28-3p and miR-28-5p have differential effects on nasopharyngeal cancer cells proliferation, apoptosis, migration and invasion. *Cancer Cell International*, 19(1), 187. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0915-x>
- Mao, H., Liu, L., & Hu, Y. (2020). Mesenchymal stem cells-derived exosomal miRNA-28-3p promotes apoptosis of pulmonary endothelial cells in pulmonary embolism. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-36047/v1>
- Marcos-Gómez, B., Bustos, M., Prieto, J. L., Martínez, J. A., & Moreno-Aliaga, M. J. (2008). Obesidad, inflamación e insulino-resistencia: papel de los ligandos del receptor gp 130. *Anales Del Sistema Sanitario De Navarra*, 31(2), 113-123. <https://doi.org/10.4321/s1137-66272008000300002>
- Martos-Moreno, G. A., Kopchick, J. J., & Argente, J. (2013). [Adipokines in healthy and obese children]. *Anales de Pediatría (Barcelona, Spain: 2003)*, 78(3), 189.e1-189.e15. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2012.10.008>
- Mompeón, A. (2018). Análisis de la expresión de miRNA circulantes en pacientes con infarto agudo de miocardio y su relación con citoquinas. Repercusión funcional en cultivos de células endoteliales humanas. Universitat de València. Facultad de Medicina y Odontología.
- Naeli, P., Winter, T., Hackett, A. P., Alboushi, L., & Jafarnejad, S. M. (2022). The intricate balance between microRNA-induced mRNA decay and translational repression. In *FEBS Journal*, 290(10), 2508-2524. <https://doi.org/10.1111/febs.16422>
- Obernosterer, G., Leuschner, P. J., Alenius, M., & Martinez, J. (2006). Post-transcriptional regulation of microRNA expression. *RNA*, 12(7), 1161-1167. <https://doi.org/10.1261/rna.2322506>
- Organización Mundial de la Salud. (2020). Estadísticas sanitarias mundiales 2020: monitoreando la salud para los ODS, objetivo de desarrollo sostenible. Organización Mundial de la Salud.
- O'Rourke, M. F., & Hashimoto, J. (2007). Mechanical Factors in Arterial Aging. *Journal of the American College of Cardiology*, 50(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.12.050>
- Paneni, F., Canestro, C. D., Libby, P., Lüscher, T. F., & Camici, G. G. (2017). The Aging Cardiovascular System. *Journal of the American College of Cardiology*, 69(15), 1952-1967. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.01.064>
- Pérez-Cremades, D., Mompeón, A., Vidal-Gómez, X., Hermenegildo, C., & Novella, S. (2018). miRNA as a New Regulatory Mechanism of Estrogen Vascular Action. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 473. <https://doi.org/10.3390/ijms19020473>
- Perron, M. P., & Provost, P. (2008). Protein interactions and complexes in human microRNA biogenesis and function. *Frontiers in Bioscience*, 13(13), 2537. <https://doi.org/10.2741/2865>

- Prats-Puig, A., Ortega, F. J., Mercader, J. M., Moreno-Navarrete, J. M., Moreno, M., Bonet, N., Ricart, W., López-Bermejo, A., & Fernández-Real, J. M. (2013). Changes in Circulating MicroRNAs Are Associated With Childhood Obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98(10), E1655–E1660. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-1496>
- Rakib, A., Kiran, S., Mandal, M., & Singh, U. P. (2022). MicroRNAs: a crossroad that connects obesity to immunity and aging. *Immunity & Ageing*, 19(1), 64. <https://doi.org/10.1186/s12979-022-00320-w>
- Ramón-Cajal, S., & Hümmel, S. (2019). Beyond genes: Understanding the function of non coding DNA. *ANALES RANM*, 135(03), 230–236. <https://doi.org/10.32440/ar.2018.135.03.rev04>
- Roffi, M., Patrono, C., Collet, J.-P., Mueller, C., Valgimigli, M., Andreotti, F., Bax, J. J., Borger, M. A., Brotons, C., Chew, D. P., Gencer, B., Hasenfuss, G., Kjeldsen, K., Lancellotti, P., Landmesser, U., Mehilli, J., Mukherjee, D., Storey, R. F., & Windecker, S. (2016). 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *European Heart Journal*, 37(3), 267–315. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv320>
- Romanelli, M. G., Da Fonseca Palmeira, J., Argañaraz, G. A., & Argañaraz, E. R. (2020). ACE2/ADAM17/TMPRSS2 Interplay May Be the Main Risk Factor for COVID-19. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.576745>
- Samad, F., Hester, K. D., Yang, G., Hannun, Y. A., & Bielawski, J. (2006). Altered Adipose and Plasma Sphingolipid Metabolism in Obesity. *Diabetes*, 55(9), 2579-2587. <https://doi.org/10.2337/db06-0330>
- Sayago-Silva, I., García-López, F., & Segovia-Cubero, J. (2013). Epidemiología de la insuficiencia cardiaca en España en los últimos 20 años. *Revista Española de Cardiología*, 66(8), 649–656. <https://doi.org/10.1016/j.recesp.2013.03.014>
- Tabas, I., Williams, K. J., & Borén, J. (2007). Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: Update and therapeutic implications. *Circulation*, 116(16), 1832–1844. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.676890>
- Tam, J. C. W., Ko, C. H., Koon, C. M., Cheng, Z., Lok, W. H., Lau, C. P., Leung, P. C., Fung, K. P., Chan, W. Y., & Lau, C. B. S. (2015). Identification of target genes involved in wound healing angiogenesis of endothelial cells with the treatment of a Chinese 2-herb formula. *PLoS ONE*, 10(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139342>
- Takeda, T., Hosokawa, M., Takeshita, S., Irino, M., Higuchi, K., Matsushita, T., Tomita, Y., Yasuhira, K., Hamamoto, H., Shimizu, K., Ishii, M., & Yamamuro, T. (1981). A new murine model of accelerated senescence. *Mechanisms of Ageing and Development*, 17(2), 183-194. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(81\)90084-1](https://doi.org/10.1016/0047-6374(81)90084-1)
- Thygesen, K., Alpert, J. S., Jaffe, A. S., Simoons, M. L., Chaitman, B. R., White, H. D., Thygesen, K., Alpert, J. S., White, H. D., Jaffe, A. S., Katus, H. A., Apple, F. S., Lindahl, B., Morrow, D. A., Chaitman, B. R., Clemmensen, P. M., Johanson, P., Hod, H., Underwood, R., ... Wagner, D. R. (2012). Third universal definition of myocardial infarction. *European Heart Journal*, 33(20), 2551–2567. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs184>

- Upadhyay, R. K. (2015). Emerging Risk Biomarkers in Cardiovascular Diseases and Disorders. *Journal of Lipids*, 2015, 1–50. <https://doi.org/10.1155/2015/971453>
- Vaca, L. (2014). Point-of-care Diagnostic Tools to Detect Circulating MicroRNAs as Biomarkers of Disease. *Sensors*, 14(5), 9117–9131. <https://doi.org/10.3390/s140509117>
- Vázquez-Rey Juan Carlos Kaski, E., & Kaski Director, J. (2003). Síndrome X cardiovascular y disfunción endotelial Cardiovascular Syndrome X and Endothelial Dysfunction. In *Revista Española de Cardiología*, 56(2). <https://www.revespcardiol.org/?ref=2017450709>,
- Vrints, C. J. M. (2012). Improving quality of care of acute myocardial infarction: More focus needed on long-term optimal medical treatment and secondary prevention. *Revista Española de Cardiología*, 65(5), 401–402. <https://doi.org/10.1016/j.recesp.2011.12.004>
- Wang, A., Kwee, L. C., Grass, E., Neely, M. L., Gregory, S. G., Fox, K. A. A., Armstrong, P. W., White, H. D., Ohman, E. M., Roe, M. T., Shah, S. H., & Chan, M. Y. (2017). Whole blood sequencing reveals circulating microRNA associations with high-risk traits in non-ST-segment elevation acute coronary syndrome. *Atherosclerosis*, 261, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.03.041>
- Xu, J., Sriramula, S., Xia, H., Moreno-Walton, L., Culicchia, F., Domenig, O., Poglitsch, M., & Lazartigues, E. (2017). Clinical Relevance and Role of Neuronal AT 1 Receptors in ADAM17-Mediated ACE2 Shedding in Neurogenic Hypertension. *Circulation Research*, 121(1), 43–55. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.310509>
- Xu, Y., & Li, Y. (2021). MicroRNA 28 3p inhibits angiotensin converting enzyme 2 ectodomain shedding in 293T cells treated with the spike protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 by targeting A disintegrin and metalloproteinase 17. *International Journal of Molecular Medicine*, 48(4), 189. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.5022>
- Zampetaki, A., Kiechl, S., Drozdov, I., Willeit, P., Mayr, U., Prokopi, M., Mayr, A., Weger, S., Oberhollenzer, F., Bonora, E., Shah, A., Willeit, J., & Mayr, M. (2010). Plasma MicroRNA Profiling Reveals Loss of Endothelial MiR-126 and Other MicroRNAs in Type 2 Diabetes. *Circulation Research*, 107(6), 810–817. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.226357>
- Zedan, A. H., Hansen, T. F., Assenholt, J., Pleckaitis, M., Madsen, J. S., & Osther, P. J. S. (2018). microRNA expression in tumour tissue and plasma in patients with newly diagnosed metastatic prostate cancer. *Tumor Biology*, 40(5), 1010428318775864. <https://doi.org/10.1177/1010428318775864>
- Zhao, X., Wang, S., & Sun, W. (2020). Expression of miR 28 3p in patients with Alzheimer's disease before and after treatment and its clinical value. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 20(3), 2218-2226. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8920>
- Zhou, S., Jin, J., Wang, J., Zhang, Z., Freedman, J. H., Zheng, Y., & Cai, L. (2018). miRNAs in cardiovascular diseases: potential biomarkers, therapeutic targets and challenges. *Acta pharmacologica Sinica*, 39(7), 1073-1084. <https://doi.org/10.1038/aps.2018.30>
- Zhou, X., Wen, W., Shan, X., Qian, J., Li, H., Jiang, T., Wang, W., Cheng, W., Wang, F., Qi, L., Ding, Y., Liu, P., Zhu, W., & Chen, Y. (2016). MiR-28-3p as a potential plasma marker in diagnosis of

pulmonary embolism. *Thrombosis Research*, 138, 91–95.
<https://doi.org/10.1016/j.thromres.2015.12.006>

Zhou, W., Cai, Z., Liu, J., Wang, D. S., Ju, H., & Xu, R. (2020). Circular RNA: metabolism, functions and interactions with proteins. *Molecular Cancer*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01286-3>

Zhu, R. Y., Zhang, D., Zou, H. D., Zuo, X. S., Zhou, Q. S., & Huang, H. (2016). MiR-28 inhibits cardiomyocyte survival through suppressing PDK1/Akt/mTOR signaling. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 52(10), 1020–1025. <https://doi.org/10.1007/s11626-016-0065-6>