



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología
Departamento de Fisiología

TESIS DOCTORAL

**Modificación de miRNAs circulantes por infarto
agudo de miocardio experimental en el modelo
murino de senescencia SAMR1/SAMP8 y su
relación con las diferencias de sexo.**

PROGRAMA DE DOCTORADO: 3127 FISIOLÓGIA

Doctoranda:

Ana Belén Paes Martí

Directores:

Dra. Susana Novella del Campo

Dr. Carlos Hermenegildo Caudevilla

Dr. Julio Núñez Villota

Valencia, junio 2023

Dra. Susana Novella del Campo, Profesora Titular del Dpto. de Fisiología de la Universidad de Valencia, Dr. Carlos Hermenegildo Caudevilla, Catedrático del Dpto. de Fisiología de la Universidad de Valencia, y Dr. Julio Núñez Villota, Profesor Titular del Dpto. de Medicina de la Universidad de Valencia.

CERTIFICAN:

Que Dña. Ana Belén Paes Martí ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado **“Modificación de miRNAs circulantes por infarto agudo de miocardio experimental en el modelo murino de senescencia SAMR1/SAMP8 y su relación con las diferencias de sexo.”** para alcanzar el Grado de Doctor por la Universidad de Valencia.

Y para que conste firman el presente certificado en Valencia.

Fdo.: Dra Susana Novella

Tutora y directora

Fdo.: Dr Carlos Hermenegildo

Director

Fdo.: Dr Julio Núñez Villota

Director

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis tres directores, la Dra. Susana Novella, el Dr. Carlos Hermenegildo y el Dr. Julio Núñez, por haberme brindado la oportunidad para desarrollar esta Tesis en vuestro grupo de investigación. Gracias por haberme guiado y enseñado durante estos años, por vuestros consejos, ánimos y paciencia.

A todo el grupo Lince, los miembros temporales como Nuria, Marce, Laura, gracias por todos los buenos momentos. A Dani, por tu positividad permanente, tu entusiasmo y tu ayuda siempre que lo necesitaba. A las nuevas Linces, Cris y Bianca, por vuestra alegría y compañerismo.

A mis otros compañeros de laboratorio de 'enfrente' que me acompañaron desde el primer día, Santi, Marta, Rebe y Jesús. Muchas gracias por haberme ayudado con los westerns y PCRs, por abrirme los brazos, aunque no fuera una 'rarita', por las largas charlas en la hora del café, las excursiones y las quejas compartidas.

A la Dra. Carmen Martínez, y todo el grupo del INSERM (Montpellier). Gracias a Xavi también por tu paciencia y apoyo en mi estancia.

Al grupo de la Dra. Artemis Hatzigeorgiou en su asesoramiento bioinformático junto con todo el equipo 'Diana Tools'.

Al equipo bioinformático de EpiDisease S.L. por su paciencia en resolver todas mis dudas.

Al Dr. Pascual Medina y la Dra. Gloria Segarra, por sus divertidas anécdotas entre pasteles y celebraciones.

A Mari, secretaria del departamento de Fisiología, por tu paciencia y ayuda con todas mis dudas.

A Inma, por tus ánimos y comentarios cada vez que pasas por el laboratorio.

Al servicio de genómica de la Universitat de València, Úrsula y Jessica, por ayudarme siempre que lo he necesitado.

Al Animalario de la Universitat de València, a Ana, Eva y Aida, además de los técnicos, sin los que no habría podido llevar a cabo esta Tesis, muchas gracias por vuestra profesionalidad y ayuda.

A todos los donantes del Hospital Clínico y del Biobanco, gracias por vuestra colaboración. Y, a los ratones, por su papel imprescindible en la investigación.

A Iván, por apoyarme en las decisiones fáciles y difíciles, por hacerme reír todos los días y estar siempre a mi lado.

A la meua família, Papà, Mamà i Moni, gràcies per haver-me animat en els moments difícils, per obrir-me els ulls a noves oportunitats i per ser el meu suport continu, gràcies a vosaltres he arribat fins ací, seguirem junts allà on ens porte la vida.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABLAS	11
RESUMEN.....	16
ABSTRACT	22
1. INTRODUCCIÓN	29
1.1. DIFERENCIAS DE SEXO EN ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES	30
1.2. INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO.....	34
1.2.1. DIFERENCIAS DE SEXO EN EL INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO.....	36
1.2.2. EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO EN EL DESARROLLO DEL INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO.....	38
1.3. miRNAs EN EL INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO.....	41
1.3.1. BIOGÉNESIS DE LOS miRNAs.....	42
1.3.2. MECANISMO DE ACCIÓN	45

1.3.3. miRNAs CIRCULANTES COMO BIOMARCADORES DEL INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO.....	48
1.3.4. miRNAs EN MODELOS EXPERIMENTALES	54
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	59
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	63
3.1. MODELO MURINO DE INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO Y SENESCENCIA	65
3.1.1. GRUPOS DE ESTUDIO.....	66
3.1.2. INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO	67
3.1.3. RECOGIDA DE MUESTRAS	70
3.1.4. EXTRACCIÓN DE RNA	71
3.1.5. qRT-PCR.....	72
3.2. SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN.....	75
3.2.1. PREPARACIÓN DE LIBRERÍAS	77
3.2.2. SECUENCIACIÓN CON ILLUMINA.....	79
3.2.3. PROCESAMIENTO DE LOS DATOS DE SECUENCIACIÓN.....	80
3.3. ESTUDIO EN PACIENTES	86
3.3.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO Y RECOGIDA DE MUESTRA.....	86

3.3.2. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	87
3.4. ANÁLISIS FUNCIONAL DE GENES DIANA.....	89
3.5. ANALISIS ESTADÍSTICO	92
4. RESULTADOS	94
4.1. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO MURINO DE INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO Y SENESCENCIA.....	95
4.1.1. VALIDACIÓN DEL INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO.....	97
4.1.2. ANÁLISIS DE CALIDAD DEL SUERO SANGUÍNEO	100
4.1.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE miRNAs DESCRITOS COMO POTENCIALES BIOMARCADORES DE INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO.....	102
4.2. ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE miRNAs EN SUERO DE RATONES SAMR1/SAMP8 TRAS UN IAM	113
4.2.1. miRNAs DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN EL MODELO MURINO SAMR1/SAMP8.....	115

4.2.2. ENRIQUECIMIENTO FUNCIONAL DE LOS miRNAs DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS TRAS EL ANÁLISIS MEDIANTE DESeq2	117
4.3. IDENTIFICACIÓN DE LOS miRNAs CIRCULANTES RELACIONADOS CON EL IAM ..	142
4.3.1. NIVELES DE EXPRESIÓN DE miRNAs EN UNA NUEVA COHORTE DE RATONES SAMR1/SAMP8	144
4.3.2. ANÁLISIS DE LA CONSERVACIÓN DE SECUENCIA ENTRE ESPECIES DE LOS miRNAs	151
4.3.3. NIVELES DE EXPRESIÓN DE miRNAs EN PACIENTES CON IAM Y EN EL GRUPO CONTROL, EXPLORACIÓN DEL SUERO TOTAL Y LA FRACCIÓN EN VESÍCULAS EXTRACELULARES	153
4.4. ENRIQUECIMIENTO FUNCIONAL DE LOS miRNAs CIRCULANTES RELACIONADOS CON EL IAM	163
5. DISCUSIÓN.....	172
5.1. SAMR1/SAMP8 COMO MODELO MURINO DE INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO.....	173
5.2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE miRNAs BIOMARCADORES DE INFARTO AGUDO DE	

MIOCARDIO EN EL MODELO SAMR1/SAMP8 MEDIANTE qRT-PCR	183
5.3. ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE miRNAs EN EL MODELO SAMR1/SAMP8 MEDIANTE SECUENCIACIÓN.....	189
5.4. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL miR-30e, miR-148a, miR-149 Y miR-423 MEDIANTE qRT-PCR	202
6. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	226
7. REFERENCIAS.....	234
8. ANEXOS.....	275
8.1. miRNAs DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN EL ESTUDIO DE SECUENCIACIÓN	276
8.2. ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO FUNCIONAL DEL RESULTADO DE LA SECUENCIACIÓN	286
8.3. ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO FUNCIONAL DEL miR-30e-3p, miR-148a-3p, miR-149-5p y miR- 423-5p	310
8.4. SUMMARY	314
8.4.1. Introduction.....	314
8.4.2. Hypothesis and Objectives.....	331
8.4.3. Materials and Methods	333

8.4.4. Results.....345

8.4.5. Discussion366

LISTA DE ABREVIATURAS

A414	Absorbancia a 414 nm
ACDI	Arteria coronaria descendente anterior izquierda
Ago2	Argonauta 2
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de la varianza de una vía
Arg1	Arginasa endotelial 1
CAM	Concentración alveolar mínima
cDNA	DNA complementario
CEIC	Comité Ético de Investigación Clínica
circRNA	RNA circular
CK-MB	Creatina quinasa MB
Ct	Threshold cycle o ciclo umbral
cTnI	Troponina I cardiaca
cTnT	Troponina T cardiaca
DGCR8	DiGeorge Syndrome Critical Region 8
ECG	Electrocardiograma
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
GEO	Gene Expression Omnibus

GO	Gene Ontology
IAM	Infarto agudo de miocardio
ICP	Intervención coronaria percutánea
IECA	Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina
IL-1β	Interleuquina 1 beta
IMC	Índice de masa corporal
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LTD	Depresión a largo plazo
miRNAs	microRNAs
mRNA	RNA mensajero
ncRNA	RNA no codificante
NGS	Secuenciación de nueva generación
NIH	Instituto Nacional de Salud
NPM1	Nucleofosmina 1
ORA	Over representation analysis
PCA	Análisis de componentes principales
PDGFR	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas
pre-miRNA	miRNA precursor

pri-miRNA	miRNA primario
qRT-PCR	PCR cuantitativa en tiempo real
RhoA	Proteína Ras homóloga de la familia A
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA
RT	Retrotranscripción
SAM	Senescence Accelerated Mouse
SBS	Secuenciación por síntesis
SCSIE	Servicio de la sección de microscopía electrónica
SEM	Error estándar de la media
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alpha
TRBP	TAR RNA-binding protein
tRNA	RNA de transferencia
TTC	Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio
U.A.	Unidades arbitrarias
UCIM	Unidad Central de Investigación de Medicina
VE	Vesículas extracelulares
VI	Ventrículo izquierdo
yRNA	RNA-Y

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Biogénesis de los miRNAs.....	44
Figura 2. Ligadura permanente de la arteria coronaria descendente anterior izquierda.	69
Figura 3. Esquema del procedimiento de la secuenciación de nueva generación Illumina.	76
Figura 4. Esquema del procedimiento del estudio bioinformático de los datos crudos obtenidos de la secuenciación de miRNAs mediante NextSeq550 de Illumina.	81
Figura 5. Procedimiento seguido para el enriquecimiento funcional de los miRNAs validados de la secuenciación.....	91
Figura 6. Representación esquemática del diseño experimental del estudio.	96
Figura 7. Confirmación del infarto de miocardio.	98
Figura 8. Peso de los ratones SAMR1 y SAMP8 machos y hembras.....	99
Figura 9. Representación gráfica de la absorbancia a 414 nm del suero extraído de los ratones SAMR1 y SAMP8.	101
Figura 10. Evolución temporal de la expresión de los miRNAs biomarcadores de infarto en el grupo sham de los ratones SAMR1 y SAMP8.	104
Figura 11. Niveles de expresión de los miRNAs biomarcadores de infarto de los grupos IAM	

sacrificados a las 1, 4 y 24 horas después de la cirugía.....	111
Figura 12. Análisis de Componentes Principales (PCA) de los ratones SAMR1 y SAMP8, machos y hembras, sometidos a cirugías de IAM y control (Sham).....	118
Figura 13. Distribución de los miRNAs diferencialmente expresados en el grupo SAMR1 macho mediante el análisis DESeq2.	121
Figura 14. Resultados del análisis funcional mediante las rutas KEGG y los términos GO de los 93 miRNAs diferencialmente expresados por el método DESeq2 en los ratones SAMR1 macho, en los grupos IAM vs sham.....	123
Figura 15. miRNAs diferencialmente expresados en las ratonas SAMR1 tras el análisis DESeq2, en la comparación de los grupos IAM vs sham.	126
Figura 16. Resultados del análisis funcional mediante los términos GO de los 9 miRNAs diferencialmente expresados del método DESeq2 en las ratonas SAMR1, en los grupos IAM vs sham.	127
Figura 17. miRNAs diferencialmente expresados en los ratones SAMR1 machos y hembras tras una comparación 2vs2 mediante DESeq2 de los grupos IAM vs sham.....	129

Figura 18. Resultados del análisis funcional mediante rutas KEGG y términos GO de los 14 miRNAs diferencialmente expresados en los ratones SAMR1 machos y hembras mediante un análisis 2vs2 mediante DESeq2 de los grupos IAM vs sham..	130
Figura 19. miRNAs diferencialmente expresados en los ratones SAMP8 macho tras el análisis DESeq2, en la comparación de los grupos IAM vs sham.	133
Figura 20. miRNAs diferencialmente expresados en las ratonas SAMP8 tras el análisis DESeq2, en la comparación de los grupos IAM vs sham.	136
Figura 21. Resultados del análisis funcional mediante rutas KEGG y términos GO de los 19 miRNAs diferencialmente expresados en las ratonas SAMP8 de los grupos IAM vs sham.	137
Figura 22. miRNAs diferencialmente expresados en los ratones SAMP8 machos y hembras tras una comparación 2vs2 mediante DESeq2 de los grupos IAM vs sham.	139
Figura 23. Resultados del análisis funcional mediante rutas KEGG y términos GO de los 30 miRNAs diferencialmente expresados en los ratones SAMP8 machos y hembras mediante un análisis 2vs2 mediante DESeq2 de los grupos IAM vs sham..	141
Figura 24. Análisis de expresión de miR-30e-3p en suero de ratones y ratonas SAMR1/SAMP8 en los grupos	

IAM vs sham, mediante (A) la técnica de análisis de secuenciación y (B) qRT-PCR.	145
Figura 25. Análisis de expresión de miR-148a-3p en suero de ratones y ratonas SAMR1/SAMP8 en los grupos IAM vs sham, mediante (A) la técnica de análisis de secuenciación y (B) qRT-PCR.	147
Figura 26. Análisis de expresión de miR-149-5p en suero de ratones y ratonas SAMR1/SAMP8 en los grupos IAM vs sham, mediante (A) la técnica de análisis de secuenciación y (B) qRT-PCR.	148
Figura 27. Análisis de expresión de miR-423-5p en suero de ratones y ratonas SAMR1/SAMP8 en los grupos IAM vs sham, mediante (A) la técnica de análisis de secuenciación y (B) qRT-PCR.	150
Figura 28. Secuencia madura de los miR-30e-3p, miR-148a-3p, miR-149-5p y miR-423-5p entre la especie <i>Mus musculus</i> y <i>Homo sapiens</i>	152
Figura 29. Caracterización de las pequeñas vesículas extracelulares.	156
Figura 30. Expresión relativa del miR-30e-3p en vesículas extracelulares de muestras de suero de pacientes con IAM y controles sanos.....	158
Figura 31. Expresión relativa del miR-148a-3p en vesículas extracelulares de muestras de suero de pacientes con IAM y controles sanos.....	159

Figura 32. Expresión relativa del miR-149-5p en vesículas extracelulares de muestras de suero de pacientes con IAM y controles sanos.....	160
Figura 33. Expresión relativa del miR-423-5p en suero total y vesículas extracelulares de muestras de suero de pacientes con IAM y controles sanos..	162
Figura 34. Diagrama de cuerdas del enriquecimiento funcional del miR-30e-3p, con sus genes diana y rutas KEGG asociadas obtenidos mediante miRwalk.....	165
Figura 35. Diagrama de cuerdas del enriquecimiento funcional del miR-148a, con sus genes diana y rutas KEGG asociadas obtenidos mediante miRwalk.	167
Figura 36. Diagrama de cuerdas del enriquecimiento funcional del miR-149, con sus genes diana y rutas KEGG asociadas obtenidos mediante miRwalk.	169
Figura 37. Diagrama de cuerdas del enriquecimiento funcional del miR-423, con sus genes diana y rutas KEGG asociadas obtenidos mediante miRwalk.	170

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. miRNAs biomarcadores de IAM.....	50
Tabla 2. Sondas TaqMan específicas utilizadas para la determinación de la expresión de miRNAs mediante qRT-PCR.	74
Tabla 3. Comparaciones de grupos 1 vs. 1 para el análisis diferencial de miRNAs.....	83
Tabla 4. Comparaciones de grupos 2 vs. 2 de contraste complejo.	84
Tabla 5. Grupos de estudio para el establecimiento del modelo murino de infarto agudo de miocardio y envejecimiento.....	96
Tabla 6. Comparación de los niveles de expresión de los miRNAs descritos como biomarcadores de IAM tras 1, 4 y 24 horas de la cirugía control sham.	105
Tabla 7. Comparación de los niveles de expresión de los miRNAs biomarcadores de infarto de los grupos IAM sacrificados tras 1, 4 y 24 horas de la cirugía.	112
Tabla 8. Grupos de estudio para el análisis del perfil de expresión de miRNAs mediante NGS.....	114
Tabla 9. Número de miRNAs diferencialmente expresados en ratones SAMR1/SAMP8 tras un IAM mediante la utilización de diferentes algoritmos de análisis.....	116

Tabla 10. Características basales de los grupos de pacientes IAM y controles sanos a estudio.....	154
Tabla 11. miRNAs diferencialmente expresados obtenidos mediante el análisis DESeq2, en ratones SAMR1/SAMP8, machos y hembras, comparando sus grupos IAM vs sham.	281
Tabla 12. miRNAs diferencialmente expresados obtenidos mediante el análisis edgeR, en ratones SAMR1/SAMP8, machos y hembras, comparando sus grupos IAM vs sham.	282
Tabla 13. miRNAs diferencialmente expresados mediante el análisis limma, en ratones SAMR1/SAMP8, comparando sus grupos IAM vs sham.....	283
Tabla 14. miRNAs diferencialmente expresados mediante el análisis voom, en ratones SAMR1/SAMP8, comparando sus grupos IAM vs sham.....	285
Tabla 15. Rutas KEGG asociadas a los genes diana de los 93 miRNAs diferencialmente expresados de los ratones SAMR1 machos, en la comparación de sus grupos IAM vs sham mediante el análisis DESeq2.	289
Tabla 16. Términos GO asociados a los genes diana de los 93 miRNAs diferencialmente expresados de los ratones SAMR1 machos, en la comparación de sus	

grupos IAM vs sham mediante el análisis DESeq2.	296
Tabla 17. Términos GO asociados a los genes diana de los 9 miRNAs diferencialmente expresados de los ratones SAMR1 hembras, en la comparación de sus grupos IAM vs sham mediante el análisis DESeq2.	298
Tabla 18. Términos KEGG asociados a los genes diana de los 14 miRNAs diferencialmente expresados en el contraste complejo de los ratones SAMR1 machos y hembras, en la comparación de sus grupos IAM vs sham mediante el análisis DESeq2.	299
Tabla 19. Términos GO asociados a los genes diana de los 14 miRNAs diferencialmente expresados en el contraste complejo de los ratones SAMR1 machos y hembras, en la comparación de sus grupos IAM vs sham mediante el análisis DESeq2.	300
Tabla 20. Rutas KEGG asociadas a los genes diana de los 19 miRNAs diferencialmente expresados de los ratones SAMP8 hembras, en la comparación de sus grupos IAM vs sham mediante el análisis DESeq2.	302
Tabla 21. Términos GO asociados a los genes diana de los 19 miRNAs diferencialmente expresados de los ratones SAMP8 hembras, en la comparación de sus	

grupos IAM vs sham mediante análisis DESeq2.	306
Tabla 22. Rutas KEGG asociadas a los genes diana de los 14 miRNAs diferencialmente expresados en el contraste complejo de los ratones SAMP8 machos y hembras, en la comparación de sus grupos IAM vs sham mediante el análisis DESeq2.	307
Tabla 23. Términos GO asociados a los genes diana de los 14 miRNAs diferencialmente expresados en el contraste complejo de los ratones SAMP8 machos y hembras, en la comparación de sus grupos IAM vs sham mediante DESeq2.	309
Tabla 24. Rutas KEGG asociadas a los genes diana del miR-30e-3p obtenidas mediante la herramienta online miRwalk.	310
Tabla 25. Rutas KEGG asociadas a los genes diana del miR-148a-3p obtenidas mediante la herramienta online miRwalk.	312
Tabla 26. Rutas KEGG asociadas a los genes diana del miR-149-5p obtenidas mediante la herramienta online miRwalk.	313
Tabla 27. Rutas KEGG asociadas a los genes diana del miR-423-5p obtenidas mediante la herramienta online miRwalk.	313

RESUMEN

El infarto agudo de miocardio (IAM) es causado por la obstrucción de una arteria coronaria, lo que provoca la muerte de células del músculo cardíaco por una disminución aguda del flujo sanguíneo. Tras el daño cardíaco se cree que se genera una liberación de RNA no codificantes (ncRNA), entre los cuales prevalecen los microRNAs, que son pequeñas moléculas de RNA que regulan procesos biológicos y además se investigan como biomarcadores para el diagnóstico y la prognosis del IAM.

Los estudios preclínicos en modelos animales son esenciales para el descubrimiento de nuevos fármacos y terapias avanzadas. Aunque los modelos animales de gran tamaño, como los modelos caninos y primates, simulan las características patológicas de los pacientes humanos, los modelos de roedores son los más comunes y ofrecen ventajas como la abundante variedad de cepas genéticamente modificadas y su bajo coste para la cría y el mantenimiento.

Para establecer el modelo de infarto agudo de miocardio en ratones en el presente estudio, se usó una cepa de ratones con senescencia acelerada llamada SAM, que se seleccionó a partir de una colonia de

ratones AKR/J en 1981. Varios subtipos de ratones SAM han sido identificados y se caracterizan por mostrar cambios fenotípicos relacionados con el envejecimiento acelerado. En este estudio, se utilizaron ratones SAMR1 como grupo control, que presentan un envejecimiento biológico normal, y ratones SAMP8, que presentan una senescencia acelerada y muestran alteraciones asociadas con el envejecimiento.

A los ratones se les realizó la ligadura de la arteria coronaria descendente izquierda para el grupo IAM y a los controles Sham se les hizo el mismo procedimiento quirúrgico sin ligar la arteria. Todos los ratones IAM de este estudio mostraron evidencia de isquemia miocárdica confirmada gracias al electrocardiograma (ECG). Con el objetivo de determinar el tiempo óptimo tras el infarto en el que se observan mayores diferencias cuantificables en la expresión de miRNAs se analizó la expresión de miRNAs en diferentes tiempos (1, 4 y 24 horas) después de la cirugía. Se seleccionaron cuatro miRNAs que se habían identificado previamente en la literatura consultada como posibles biomarcadores de IAM en modelos experimentales de roedores o en pacientes de síndrome coronario agudo, el miR-1-3p, el miR-133-3p, el miR-208-3p y el miR-499-5p.

Se encontró que el procedimiento sham alteró la expresión de estos biomarcadores generando una disminución asociada al paso del tiempo tras la cirugía. En el grupo IAM, en general se detectó un aumento de la expresión de estos miRNAs respecto a sus grupos control, estableciéndose el tiempo óptimo de sacrificio para la toma de muestras y estudio de los miRNAs de 4 horas, ya que se observan mayores diferencias respecto a los grupos control, en especial en SAMP8, descartando el tiempo de 1 hora por escasos cambios en la expresión de los miRNAs y el tiempo de 24 horas por presentar una disminución de la expresión de los miRNAs en todos los grupos.

Una vez establecido el tiempo óptimo después del infarto, se analizó el perfil de expresión de miRNAs circulantes en ratones macho y hembras SAMR1/SAMP8, 4 horas después de la cirugía, utilizando la tecnología de microRNAseq Illumina NextSeq550. Se compararon los miRNAs diferencialmente expresados mediante diferentes algoritmos, DESeq2, edgeR, limma y voom, obteniendo un número mayor de miRNAs por DESeq2, por lo que se realizó también un análisis de enriquecimiento funcional para identificar de manera bioinformática las rutas biológicas relacionadas con los miRNAs afectados tras un IAM, describiendo las rutas KEGG y los términos GO

que incluyen genes diana de estos miRNAs. De esta manera se descubrieron rutas relacionadas con la 'resistencia al inhibidor de la tirosina quinasa EGFR', la 'ruta de señalización ErbB' y la 'ruta de regulación de la longevidad'.

Para determinar la influencia del sexo en la expresión diferencial de miRNAs tras un IAM, se realizó un análisis de contraste complejo, obteniendo aquellos miRNAs con cambios opuestos en machos y hembras, estos miRNAs se relacionaron bioinformáticamente con rutas biológicas como la 'ruta de señalización FoxO' y la 'ruta de regulación de la longevidad' en los ratones SAMR1, y la 'ruta de depresión a largo plazo' y las 'uniones gap' en los ratones SAMP8.

Tras el análisis de secuenciación, se llevó a cabo un estudio para comprobar mediante qRT-PCR estos resultados en una nueva cohorte de ratones, seleccionando 4 miRNAs diferencialmente expresados en los grupos IAM obtenidos mediante el algoritmo DESeq2, tres miRNAs sobreexpresados (miR-30e-3p, miR-148a-3p y miR-149-5p) y un miRNA infraexpresado (miR-423-5p). También se comprobó la conservación de secuencia entre ratones y humanos, para poder realizar la validación de estos miRNAs en pacientes con IAM, en

la fracción total del suero y en el contenido de las pequeñas vesículas extracelulares (VE).

El estudio mediante qRT-PCR del miR-30e-3p en ratones mostró una expresión aumentada y una expresión sin cambios tras el IAM en muestras de pacientes con IAM. En el caso del miR-148a-3p, los resultados fueron opuestos en los análisis de secuenciación y qRT-PCR en los ratones SAMR1, y sin cambios en el resto, mientras que mostró un aumento significativo en pacientes con IAM, especialmente en mujeres, mostrando una regulación dependiente del sexo. Por otro lado, el miR-149-5p mostró un incremento significativo en ratonas SAMP8 mediante qRT-PCR y una tendencia en las VE aisladas de pacientes con IAM, especialmente en mujeres. En cuanto al miR-423-5p, se observó una disminución en los ratones SAMR1 machos mediante la técnica de qRT-PCR tras el infarto, y lo mismo en el suero de pacientes con IAM.

Tras el estudio de los miRNAs miR-30e-3p, miR-148a-3p, miR-149-5p y miR-423-5p mediante qRT-PCR, se utilizaron herramientas bioinformáticas de predicción de genes diana para seleccionar aquellos genes repetidos en al menos 2 bases de datos y conservados en humano y ratón. Se obtuvieron las rutas KEGG de las que formaban parte y se representaron en diagramas de

cuerdas las rutas más significativas. La ruta PI3-Akt destaca por estar directamente relacionada con los dos miRNAs diferencialmente expresados tras un IAM y dependientes del sexo, el miR-148a-3p y miR-149-5p, y haber sido relacionada con procesos de hipertrofia, necrosis, fibrosis e inflamación en el miocardio tras un IAM.

Por primera vez se establece el modelo murino SAMR1/SAMP8 como modelo de infarto de miocardio y senescencia, además de analizarse el perfil de expresión de miRNAs circulantes a las 4 horas del IAM utilizando la tecnología de microRNAseq Illumina NextSeq550. Se realizaron diferentes análisis de enriquecimiento funcional y se identificaron rutas biológicas y genes diana implicados en la patología del IAM. Finalmente, se validaron los resultados mediante qRT-PCR. En conclusión, el estudio destaca la importancia de los modelos experimentales para el estudio de miRNAs circulantes, y como la variable del sexo debe ser incluida en estos estudios para la posible identificación de nuevos biomarcadores potenciales para el IAM.

ABSTRACT

Acute myocardial infarction (AMI) is caused by the obstruction of a coronary artery, leading to the death of cardiac muscle cells due to an acute decrease in blood flow. Following cardiac damage, it is believed that a release of non-coding RNA (ncRNA) occurs, among which microRNAs (miRNAs) prevail. MicroRNAs are small RNA molecules that regulate biological processes and are also investigated as biomarkers for the diagnosis and prognosis of AMI.

Preclinical studies in animal models are essential for the discovery of new drugs and advanced therapies. Although large animal models such as canine and primate models simulate the pathological characteristics of human patients, rodent models are the most common and offer advantages such as abundant variety of genetically modified strains and low cost for breeding and maintenance.

To establish the model of acute myocardial infarction in mice in the present study, a strain of mice with accelerated senescence called SAM (Senescence Accelerated Mouse) was used. SAM mice were selected from an AKR/J mouse colony in 1981. Several subtypes of SAM mice have been identified and are characterized by phenotypic changes related to accelerated aging. In

this study, SAMR1 mice were used as the control group, which exhibit normal biological aging, and SAMP8 mice, which exhibit accelerated senescence and show age-related alterations.

Left descending coronary artery ligation was performed on the AMI group mice, while the Sham control group underwent the same surgical procedure without ligating the artery. All AMI mice in this study showed evidence of myocardial ischemia confirmed by electrocardiogram (ECG). In order to determine the optimal time after infarction in which quantifiable differences in miRNA expression are observed, miRNA expression was analyzed at different time points (1, 4, and 24 hours) after surgery. Four miRNAs that had been previously identified in the literature as potential biomarkers for AMI in experimental rodent models or patients with acute coronary syndrome were selected: miR-1-3p, miR-133-3p, miR-208-3p, and miR-499-5p.

It was found that the sham procedure altered the expression of these biomarkers, resulting in a time-dependent decrease after surgery. In the AMI group, an overall increase in the expression of these miRNAs was detected compared to their control groups. The optimal sacrifice time for sample collection and miRNA study was established at 4 hours, as greater differences were

observed compared to the control groups, especially in SAMP8 mice. The 1-hour time point was discarded due to minimal changes in miRNA expression, and the 24-hour time point was discarded due to decreased miRNA expression in all groups.

Once the optimal time after infarction was established, the expression profile of circulating miRNAs was analyzed in male and female SAMR1/SAMP8 mice 4 hours after surgery using Illumina NextSeq550 microRNAseq technology. Differentially expressed miRNAs were compared using different algorithms, namely DESeq2, edgeR, limma, and voom. DESeq2 yielded a higher number of miRNAs, so a functional enrichment analysis was also performed to bioinformatically identify the biological pathways related to the affected miRNAs after AMI, describing the KEGG pathways and GO terms that include target genes of these miRNAs. This analysis revealed pathways related to "EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance," "ErbB signaling pathway," and "regulation of longevity."

To determine the influence of sex on the differential expression of miRNAs after AMI, a complex contrast analysis was performed. The miRNAs with opposite changes in males and females after AMI were bioinformatically related to biological pathways such as

the "FoxO signaling pathway" and "regulation of longevity" in SAMR1 mice, and "long-term depression" and "gap junctions" in SAMP8 mice.

After the sequencing analysis, a study was carried out to validate these results using qRT-PCR in a new cohort of mice. Four differentially expressed miRNAs were selected in the AMI groups obtained using the DESeq2 algorithm: three overexpressed miRNAs (miR-30e-3p, miR-148a-3p, and miR-149-5p) and one underexpressed miRNA (miR-423-5p). Sequence conservation between mice and humans was also checked to enable the validation of these miRNAs in patients with AMI, in the total serum fraction and the content of small extracellular vesicles (EVs).

The qRT-PCR study of miR-30e-3p in mice showed increased expression and unchanged expression after AMI in samples from patients with AMI. For miR-148a-3p, the results were opposite in the sequencing and qRT-PCR analyses in SAMR1 mice, and no changes were observed in the other groups. However, miR-148a-3p showed a significant increase in patients with AMI, especially in women, indicating sex-dependent regulation. On the other hand, miR-149-5p showed a significant increase in SAMP8 females using qRT-PCR and a trend in the EVs isolated from patients with AMI,

especially in women. As for miR-423-5p, a decrease was observed in male SAMR1 mice using qRT-PCR after the infarction, and the same trend was observed in the serum of patients with AMI.

After the qRT-PCR analysis of miR-30e-3p, miR-148a-3p, miR-149-5p, and miR-423-5p, target gene prediction bioinformatics tools were used to select genes that were repeated in at least 2 databases and conserved in humans and mice. The KEGG pathways in which they were involved were obtained, and the most significant pathways were represented in chord diagrams. The PI3-Akt pathway stood out as being directly related to the two differentially expressed miRNAs dependent on sex, miR-148a-3p and miR-149-5p, and has been associated with processes such as hypertrophy, necrosis, fibrosis, and inflammation in the myocardium after AMI.

For the first time, the SAMR1/SAMP8 mouse model has been established as a model for myocardial infarction and senescence. Furthermore, the expression profile of circulating miRNAs at 4 hours post-AMI was analyzed using Illumina NextSeq550 microRNAseq technology. Different functional enrichment analyses were performed, identifying biological pathways and target genes involved in AMI pathology. Finally, the results were validated using qRT-PCR. In conclusion,

this study emphasizes the importance of experimental models in the study of circulating miRNAs and the inclusion of sex as a variable in these studies for the potential identification of new biomarkers for AMI.

1. INTRODUCCIÓN

1.1.DIFERENCIAS DE SEXO EN ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

Las enfermedades cardiovasculares siguen siendo una de las principales causas de mortalidad en España, según el Instituto Nacional de Estadística (INE) en 2021, el 26.4% de las defunciones se debieron a enfermedades del sistema circulatorio. En concreto, de las muertes por infarto agudo de miocardio (IAM), el 61% fueron hombres y el 39% mujeres (INE, 2023), estas diferencias en la incidencia de la enfermedad se extienden también a años anteriores, siendo visible esta tendencia también en los años previos a la pandemia COVID.

Las diferencias existentes en la incidencia de mortalidad del IAM entre hombres y mujeres, pueden estar debidas a las diferencias cardiovasculares entre ambos sexos, entre ellos existen diferencias en la estructura cardíaca y su función, también a nivel celular y sus mecanismos moleculares, además de, en los procesos inflamatorios y el sistema inmune.

En cuanto a la estructura cardíaca y su función, las mujeres y hombres sanos tienen dimensiones y funciones distintas del ventrículo izquierdo (VI), incluso después de ajustar por tamaño corporal, las mujeres tienen cámaras del VI más pequeñas y, en

consecuencia, volúmenes de eyección más bajos, aunque su frecuencia cardíaca en reposo es más alta, y, por tanto, mantiene un gasto cardíaco similar al de los hombres (Redfield *et al*, 2005). Aunque la fracción de eyección del VI aumenta con la edad en ambos sexos, esto se observa en mayor medida en mujeres (Chung *et al*, 2006).

A nivel celular, el número de cardiomiocitos es similar entre los dos sexos al nacer, pero las mujeres de mayor edad tienen una disminución relativamente atenuada en el número y la masa de los cardiomiocitos, con menos tendencia a la hipertrofia y remodelación excéntrica del VI en comparación con los hombres (Kajstura *et al*, 2010).

Aunque se sabe poco acerca de los mecanismos moleculares subyacentes en la predisposición de las mujeres a patologías cardiovasculares, se han estudiado diferencias en algunos de ellos. Entre otros, se encuentra el sistema renina-angiotensina-aldosterona activado en respuesta a niveles bajos de estrógeno, lo que aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno y, en conjunto con una disminución de óxido nítrico durante la menopausia, aumenta la síntesis de colágeno y la disfunción diastólica (Beale *et al*, 2018).

La regulación del calcio también podría contribuir a las diferencias de sexo, ya que las mujeres tienen corrientes de calcio más pequeñas y menor ganancia de acoplamiento excitación-contracción que los hombres (Parks *et al*, 2014). Por último, las diferencias de sexo en el metabolismo del sustrato en el miocardio también son relevantes, las mujeres tienen menor captación y utilización de glucosa, y una mayor captación de ácidos grasos e ineficiencia metabólica en comparación con los hombres (Peterson *et al*, 2008).

La inflamación y el sistema inmune también representan un papel importante en el diferente desarrollo de las enfermedades cardiovasculares en cuanto al sexo. Además, existen diferencias de género en la biología del sistema inmunológico. Las mujeres tienen respuestas inmunitarias más fuertes que los hombres, lo que se traduce en una recuperación más rápida de enfermedades infecciosas, una mayor eficacia de las vacunas y una mejor supervivencia al cáncer. Sin embargo, la desventaja de una inmunidad más fuerte es que las mujeres tienen una mayor expresión de genes proinflamatorios, mayores niveles de citoquinas inflamatorias, una mayor activación de células T CD4 y CD8, y una inflamación sistémica generalmente más elevada (Klein & Flanagan, 2016). Asimismo, las mujeres

tienen niveles más altos de proteína C reactiva que los hombres (Khera *et al*, 2005).

La inflamación también es impulsada por una serie de comorbilidades no cardíacas, particularmente prevalentes en mujeres, incluyendo la hipertensión arterial, la diabetes mellitus, la enfermedad renal crónica, la obesidad, la deficiencia de hierro y la preeclampsia, lo que podría tener su impacto en el miocardio (Paulus & Tschöpe, 2013; Redman *et al*, 1999).

De esta manera, los mecanismos patogénicos de la inflamación cardíaca difieren entre hombres y mujeres (Regitz-Zagrosek & Kararigas, 2017). Por ejemplo, la polarización de los macrófagos en la miocarditis, es decir, la diferenciación en el fenotipo M1 o M2 es específica del sexo, ya que se ha encontrado una mayor expresión de macrófagos activados M1 en machos y macrófagos con fenotipo M2 en ratonas (Li *et al*, 2009).

1.2. INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO

El IAM es una enfermedad cardiovascular caracterizada por la muerte de células miocárdicas debido a una disminución aguda del flujo sanguíneo coronario, generalmente causado por la obstrucción de una arteria coronaria. La interrupción del suministro sanguíneo al miocardio da lugar a un proceso de isquemia, las células del miocardio no reciben suficiente oxígeno y nutrientes por lo que sufren un daño irreversible (Mechanic *et al*, 2022). El IAM se diagnostica mediante la presencia de un aumento en los biomarcadores de daño miocárdico, como la troponina, junto con la presencia de cambios isquémicos en el electrocardiograma (ECG) (Perera *et al*, 2018; Alquézar Arbé *et al*, 2015).

La disminución del flujo sanguíneo coronario es un proceso multifactorial, ya que la enfermedad subyacente más común detrás del IAM es la aterosclerosis, pero existen otras causas como la embolia de la arteria coronaria, la isquemia inducida por cocaína, la disección coronaria y el vasoespasma coronario (Stratmann & Tschoepe, 2009; Massberg & Polzin, 2018; Mechanic *et al*, 2022).

La aterosclerosis es un proceso inflamatorio que afecta a las arterias de tamaño mediano y grande en todo el sistema cardiovascular. El proceso de desarrollo de aterosclerosis comienza con la acumulación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en el espacio subendotelial, estas pueden ser modificadas mediante oxidación y agregación, provocando un desequilibrio en la biodisponibilidad de sustancias activas y generando una disfunción endotelial (Dai *et al*, 2004).

Las LDL modificadas actúan como estimuladores crónicos de la respuesta inmune, activando el endotelio de forma temporal mediante citoquinas proinflamatorias y la expresión de moléculas de adhesión que estimulan la adhesión de monocitos y su diferenciación a macrófagos, los cuales promueven la acumulación de lípidos (Gerhardt & Ley, 2015). Además, se produce una migración de células musculares lisas hacia la capa íntima inflamada, generando una capa fibromuscular (Bentzon *et al*, 2014). La rotura de la placa aterosclerótica es la causa más frecuente de trombosis, lo que da lugar a la oclusión de la arteria coronaria y la isquemia miocárdica (Libby *et al*, 2014).

1.2.1. DIFERENCIAS DE SEXO EN EL INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO

Una de las principales diferencias de sexo en el IAM es su mayor incidencia en hombres ya comentada anteriormente, pero existen otros aspectos de relevancia para la investigación de la enfermedad, como son las diferencias en su sintomatología y desenlace de la enfermedad, comorbilidades y factores de riesgo. En un reciente meta-análisis realizado por Van Oosterhout, se profundizó en las diferencias de sexo existentes en la presentación de los síntomas del IAM, confirmando que las mujeres tienen mayor probabilidad de experimentar dolor entre los omóplatos, náuseas o vómitos, y dificultad para respirar, y menor probabilidad de sufrir dolor en el pecho o diaforesis (sudoración abundante). Además, se remarca que estas diferencias llevan establecidas en la literatura más de una década (van Oosterhout *et al*, 2020).

En cuanto a las diferencias de sexo en el desenlace de la enfermedad, se ha demostrado que las mujeres jóvenes con IAM experimentan más resultados adversos que los hombres en el año posterior al alta (Sawano *et al*, 2023). Además de una mayor incidencia de readmisión en mujeres por problemas adversos, también es relevante la elevada cantidad de comorbilidades presentadas por mujeres tras un IAM en

comparación con los hombres, principalmente diabetes, hipertensión, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y fallo renal (Humphries *et al*, 2022).

Gracias a un estudio en mujeres y hombres de mediana edad se comprobó que determinados factores de riesgo para el IAM estaban más asociados a un mayor riesgo en mujeres que en hombres, entre los que destacaban fumar, hipertensión y diabetes tipo 2 (Millett *et al*, 2018).

A lo largo de las décadas, las mujeres han estado infrarrepresentadas en los ensayos clínicos y terapéuticos, lo que ha resultado en un menor conocimiento de la enfermedad en las mujeres, incluso en las investigaciones básicas a menudo se desconocía la procedencia de las células, los fluidos y los tejidos utilizados (Wenger, 2020). Afortunadamente, desde el 1994, con la guía del Instituto Nacional de Salud (NIH) para la inclusión de la mujer como sujeto en la investigación (NIH Guide, 1994), ha ido actualizándose la legislación en este aspecto (NIH Guide, 2001), con el objetivo de conseguir la inclusión igualitaria de muestras masculinas y femeninas en la investigación básica, además de que en los ensayos clínicos se determine la seguridad y eficacia de nuevos medicamentos en ambos sexos.

1.2.2. EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO EN EL DESARROLLO DEL INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO

Como se ha comentado anteriormente, la incidencia del IAM depende del sexo, pero la edad también juega un papel muy importante, ya que como demostró el estudio de Framingham, la incidencia del IAM es 2.5 veces mayor en hombres que en mujeres antes de los 45 años, sin embargo, esta diferencia desaparece después de los 55 años (Egred *et al*, 2005), en edades superiores a los 60 años, las mujeres pasan a tener una probabilidad 2 veces mayor que los hombres (Benjamin *et al*, 2019).

Por otro lado, el pronóstico del IAM suele ser peor en pacientes más jóvenes, debido a la ausencia de antecedentes de isquemia crónica y desarrollo colateral secundario, y también porque un IAM temprano suele deberse a la presencia de varios factores de riesgo, como diabetes, tabaquismo, síndrome metabólico y consumo de drogas recreativas (DeFilippis *et al*, 2020; Arora *et al*, 2019; Cole *et al*, 2003).

En cuanto al papel del envejecimiento en la fisiopatología del IAM, la edad juega un papel vital en el deterioro de la funcionalidad cardiovascular, lo que resulta en un mayor riesgo de sufrir un IAM en adultos de mayor edad (Curtis *et al*, 2018a; North & Sinclair, 2012).

Los corazones sufren cambios funcionales y eléctricos con el envejecimiento, estos cambios están causados por una serie de factores, como el aumento de la producción de estrés oxidativo, la inflamación, el deterioro y degeneración del miocardio (Curtis *et al*., 2018). El aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno y de marcadores proinflamatorios está vinculado con el envejecimiento, lo que contribuye al aumento de depósitos de colágeno y el desarrollo de hipertrofia y fibrosis cardíaca (Curtis *et al*, 2018b; Meschiari *et al*, 2017).

El estrés oxidativo también conduce a la disfunción mitocondrial (Steenman & Lande, 2017), ya que el metabolismo aeróbico cardíaco depende del ATP producido por las mitocondrias. Además, también se ve afectada la vía de señalización del calcio (Xie *et al*, 2015), y se produce un aumento en la oxidación de lípidos, promoviendo el desarrollo de la aterosclerosis (Rodgers *et al*, 2019).

Conjuntamente, el estrés oxidativo relacionado con el envejecimiento da como resultado cambios celulares y estructurales significativos, y estos eventualmente conducen a un deterioro de la función cardíaca y el posible desarrollo de IAM (Rodgers *et al*, 2019). Y dado que el número de pacientes de edad avanzada seguirá aumentando, es sumamente necesario seguir profundizando en el impacto del envejecimiento y las diferencias de sexo en futuros estudios clínicos y de investigación, para mejorar los resultados en la población de edad avanzada.

1.3.miRNAs EN EL INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO

Los microRNAs (miRNAs) son un tipo de RNA no codificante (ncRNA), de 17-22 nucleótidos de longitud que disminuyen la expresión génica al inhibir la traducción o inducir la degradación del RNA mensajero (mRNA) (Bartel, 2018). El genoma humano codifica aproximadamente 2000 miRNAs, cada uno de los cuales puede controlar la expresión de cientos de mRNA codificadores de proteínas (Naeli *et al*, 2023), lo que permite que estén implicados en multitud de procesos fisiológicos y patológicos, regulando entre otros, el desarrollo cardiovascular, la inflamación, la hipertrofia y la función vascular (Poller *et al*, 2018).

También se han descubierto miRNAs en el sistema circulatorio, lo que abre nuevas posibilidades para su uso como potenciales biomarcadores para el diagnóstico de enfermedades cardiovasculares (Zhang *et al*, 2018; Wang *et al*, 2011).

En comparación con las estrategias actuales de diagnóstico para el IAM, como el ECG o la angiografía coronaria, los miRNAs prometen ser marcadores bioquímicos no invasivos, inocuos e inofensivos, estableciendo así un futuro prometedor para su estudio como biomarcadores del IAM (Zhang *et al*, 2020).

1.3.1. BIOGÉNESIS DE LOS miRNAs

La mayoría de los miRNAs se generan a partir de los intrones de genes funcionales (Sibley et al., 2012), aunque también pueden localizarse en regiones intergénicas y exónicas del gen huésped (Olena & Patton, 2010).

Los miRNAs maduros y funcionales se producen y procesan mediante múltiples pasos (**Figura 1**), que empiezan con la transcripción del miRNA primario (pri-miRNA) mediante la RNA polimerasa II. La enzima RNAsa III Drosha y la región crítica 8 del síndrome de DiGeorge (DGCR8) son los encargados de procesar y escindir los pri-miRNAs para dar lugar a los miRNAs precursores (pre-miRNA), los cuales son exportados al citoplasma mediante la exportina-5 donde Dicer (un complejo enzimático de RNAsa III) los escinde y genera los miRNAs maduros de aproximadamente 22 nucleótidos (Bartel, 2018). Gracias al complejo formado por Dicer, Argonauta 2 (Ago2) y la proteína de unión a RNA de doble cadena TRBP (del inglés, TAR RNA-binding protein) se produce la selección de la hebra y el ensamblaje del miRNA maduro con el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC).

La estabilidad termodinámica de los dos extremos del dúplex permite elegir la hebra con el extremo 5' menos estable, anteriormente se creía que la cadena no seleccionada (miRNA*), por lo general miR-3p, quedaba relegada como subproducto y era degradada. De modo que, la mayoría de los estudios solo consideraban los efectos reguladores de la hebra más frecuentemente encontrada, miR-5p. Sin embargo, la cadena miRNA* también es capaz de ejercer una acción reguladora. Por ello, ahora un miRNA maduro se designa con el sufijo "-3p" o "-5p" dependiendo de la cadena de origen (Camps *et al*, 2014).

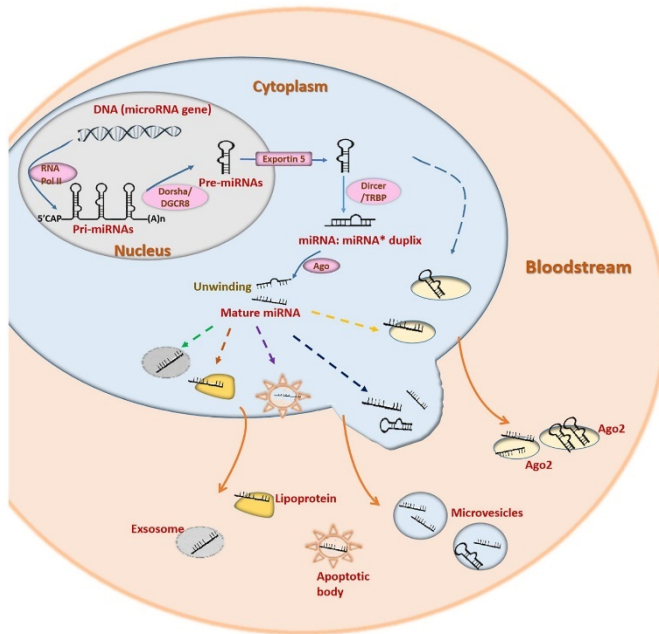


Figura 1. Biogénesis de los miRNAs. Los pri-miRNAs se generan a partir de genes de miRNAs con la ayuda de la RNA polimerasa II y Drosha/DGCR8 los escinde para formar pre-miRNAs. Luego, los pre-miRNAs se transportan al citoplasma y se escinden mediante Dicer/TRBP. Los dúplex de miRNAs producidos se traducen luego en miRNAs maduros. Sin embargo, solo una hebra del dúplex de miRNA se traduce en el miRNA maduro. Tanto los pre-miRNAs como los miRNAs maduros pueden liberarse en el torrente sanguíneo por varias vías. Los miRNAs pueden liberarse por asociación con partículas, como complejos de lipoproteínas (HDL) y proteínas de unión a RNA (Ago2), o por empaquetamiento en vesículas. Imagen tomada de (Zhang *et al*, 2020).

1.3.2. MECANISMO DE ACCIÓN

Los miRNA circulantes se secretan a la circulación principalmente de dos formas: encapsulados en vesículas lipídicas (pequeñas y grandes vesículas extracelulares, y cuerpos apoptóticos) y asociados a proteínas de unión a RNA como la nucleofosmina 1 (NPM1) y la proteína Ago2 o complejos de lipoproteínas (Fritz *et al*, 2016). Las vesículas lipídicas tienen diferentes tamaños, orígenes y modos de liberación. Las pequeñas vesículas (30 a 100 nm) se originan a partir de los endosomas y se secretan a la circulación cuando los cuerpos multivesiculares se fusionan con la membrana plasmática (Raposo & Stoorvogel, 2013). Las grandes vesículas (0.1–1 µm) se liberan a través de la gemación hacia el exterior (Fritz *et al*, 2016). Los cuerpos apoptóticos (0.5–2 µm) se secretan durante la apoptosis (Fritz *et al*, 2016).

Se estima que hasta el 60% de los genes codificadores de proteínas humanas son regulados post-transcripcionalmente por miRNAs, los cuales se han investigado cada vez más en los últimos años, revelando su papel tanto en el control de funciones biológicas clave, como en enfermedades cardiovasculares (Colpaert & Calore, 2019; Novella *et al*, 2021). En consecuencia, la variación en la expresión de cientos de mRNA puede ser

reflejada en cierta medida por los perfiles de expresión de unos pocos miRNAs que actúan como reguladores, ofreciendo información biológica valiosa (Pritchard *et al*, 2012).

Las últimas dos décadas han presenciado un asombroso nivel de progreso en la comprensión de los diversos aspectos de la maquinaria de silenciamiento inducido por miRNAs, incluyendo la multitud de proteínas y complejos involucrados en este proceso (Naeli *et al*, 2023). De manera más específica, hay numerosos miRNAs relacionados directamente con la patología del IAM, ya que como está recogido en la revisión de Zhang L. *et al.*, los miR-21 y miR-92a promueven el daño y la disfunción endotelial, el miR-223, miR-155, miR-205 y miR-147 participan en la inflamación de células endoteliales, además del miR-122 y el miR-370 que facilitan la acumulación de triglicéridos, los miR-221 y miR-222 estimulan la proliferación y migración de células de músculo liso vascular, y el miR-33 aumenta el tamaño de la placa aterosclerótica y su contenido de lípidos (Zhang *et al*, 2020). Todos estos miRNAs están involucrados en la formación de la placa aterosclerótica y por tanto en el desarrollo del IAM.

También hay numerosos miRNAs que producen el efecto contrario, evitando el proceso de aterosclerosis, como el miR-30c y el miR-146a disminuyendo la acumulación de lípidos, y el miR-145/143 reduce el tamaño de la placa aterosclerótica (Zhang *et al*, 2018). En general, los miRNAs participan en todos los eventos del desarrollo de la aterosclerosis, lo que indica su importante papel en el IAM.

1.3.3. miRNAs CIRCULANTES COMO BIOMARCADORES DEL INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO

Desde su descubrimiento hace poco más de 20 años, los miRNAs se han identificado como reguladores clave de procesos biológicos complejos relacionados con múltiples patologías cardiovasculares, incluyendo la hipertrofia ventricular izquierda, la enfermedad cardíaca isquémica, la insuficiencia cardíaca, la hipertensión y las arritmias (Romaine *et al*, 2015). Además, desde el descubrimiento de que los miRNAs están presentes en la circulación, se han investigado como nuevos biomarcadores cardiovasculares, especialmente en el contexto del IAM y la insuficiencia cardíaca (Zhang *et al*, 2020).

Para que una molécula pueda ser considerada como biomarcador de diagnóstico ideal para el IAM, debe cumplir muchos criterios, incluido que la muestra de origen sea accesible de manera no invasiva, que posea un alto grado de sensibilidad y especificidad para la enfermedad, que su detección sea rápida y precisa, y en la etapa temprana de la enfermedad, además de una vida media larga (Weber *et al*, 2010). Los miRNAs circulantes tienen varias ventajas porque cumplen muchos de estos criterios, la forma en la que se obtienen es simple e inofensiva, son extremadamente estables en

circulación, poseen una notable resistencia a la degradación por la actividad de la RNAsa endógena, y, además pueden detectarse en tiempo real mediante la PCR (Tsui *et al*, 2002). Por lo tanto, los miRNAs circulantes tienen un gran potencial para ser biomarcadores de diagnóstico del IAM.

Gracias a que numerosos estudios han investigado el papel de los miRNAs en la clasificación de pacientes con infarto agudo de miocardio se han identificado algunos candidatos prometedores como biomarcadores (**Tabla 1**), entre ellos destacan el miR-1, miR-133a/b, miR-208a/b y el miR-499 (Zhang *et al*, 2020). Todos ellos son miRNAs específicos de miocardio, están altamente expresados en músculo esquelético y se han encontrado elevados en circulación en modelos experimentales y pacientes con infarto agudo de miocardio, esta información se ha resumido en diversos artículos (Almaghrbi *et al.*, 2023; Gidlöf *et al.*, 2011; Y. Q. Li *et al.*, 2013; Wang G. K. *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2021).

miRNA	Ctr./Pac.	Referencia
miR-1	66/93 IM	(Ai <i>et al</i> , 2010)
	20/31 IAM	(Cheng <i>et al</i> , 2010)
	11/25 IM	(Gidlöf <i>et al</i> , 2011)
	32/67 IAM	(Li Y. Q. et al., 2013)
miR-133a/b	11/25 IM	(Gidlöf <i>et al</i> , 2011)
	28/51 IAM	(Wang R. et al., 2011)
	32/67 IAM	(Li Y. Q. et al., 2013)
miR-208a/b	30/33 IAM	(Wang G. K. et al., 2010)
	11/25 IM	(Gidlöf <i>et al</i> , 2011)
	32/67 IAM	(Li Y. Q. et al., 2013)
	243/116 IAM	(Lv <i>et al</i> , 2014)
	72/70 IAM	(Liu X. et al., 2015)
miR-499	36/32 IAM	(Corsten <i>et al</i> , 2010a)
	11/25 IM	(Gidlöf <i>et al</i> , 2011)
	32/67 IAM	(Li Y. Q. et al., 2013)
	89/28 IAM	(Yao <i>et al</i> , 2014)
	72/70 IAM	(Liu X. et al., 2015)
	100/142 IAM	(Zhang <i>et al</i> , 2015b)

Tabla 1. miRNAs biomarcadores de IAM. Resumen de los estudios donde se han encontrado sobreexpresados los miRNAs miR-1, miR-133a/b, miR-208 y miR-499. En la segunda columna aparecen el número de controles sanos y pacientes incluidos en el estudio de miRNAs circulantes. Las abreviaturas hacen referencia a los siguientes términos: IM, infarto de miocardio; IAM, infarto agudo de miocardio; Ctr, controles; Pac, pacientes. Tabla adaptada de (Zhang *et al*, 2020).

Los niveles aumentados de miR-1 tras el IAM también se asociaron positivamente con el tamaño del infarto de miocardio (Cheng *et al*, 2010). En pacientes que habían sufrido un IAM, el miR-1 se correlacionó significativamente con el cambio absoluto en el tamaño del infarto, mostró una tendencia a una correlación positiva con la fracción de eyección del ventrículo izquierdo y se asoció con una mayor mortalidad por IAM (Grabmaier *et al*, 2017; Widera *et al*, 2011). Además, también se detectó un nivel mayor de miR-1 en pacientes con IAM, asociado negativamente con arritmia (Ai *et al*, 2010).

Similar al miR-1, el miR-133 es un regulador crucial del desarrollo muscular cardíaco y esquelético y está involucrado en la biología de las células musculares lisas vasculares (Kondkar & Abu-Amero, 2015; Chen *et al*, 2006). También se ha encontrado que los pacientes con IAM tenían un nivel plasmático de miR-133-3p 4.4 veces mayor que los sujetos de control, y que volvió a niveles basales después de 7 días (Wang G. K. *et al.*, 2010). Además, el miR-133-3p se correlacionó significativamente con la mortalidad (Wang R. *et al.*, 2011; Widera *et al.*, 2011).

En pacientes con infarto agudo de miocardio, se observó un nivel más alto de miR-208a-3p, el cual alcanzó su punto máximo a las 3 horas después de la reperfusión, en comparación con los pacientes con angina inestable (Bialek *et al*, 2015). Además, se encontró que el aumento del miR-208a estaba significativamente asociado con un mayor riesgo de mortalidad o insuficiencia cardíaca dentro de los 6 meses posteriores al infarto, y a su vez, los niveles circulantes de miR-208a-3p se correlacionaron con cTnI (troponina I cardíaca) y CK-MB (creatina quinasa MB) liberados del área (Widera *et al*, 2011; Bialek *et al*, 2015; Lv *et al*, 2014). Wang G. K. *et al*. (2010) informaron de niveles significativamente mayores de miR-1, miR-133a, miR-208a y miR-499 en plasma en ratas con IAM, en las que miR-208a mostró la mejor sensibilidad y especificidad de detección (Wang G. K. *et al.*, 2010). Liu X. *et al*. (2015) revelaron que el miR-208, junto con miR-499, mostró un valor más seguro que el miR-1 en el diagnóstico de IAM (Liu X. *et al.*, 2015).

El papel del miR-499-5p como biomarcador diagnóstico de IAM ha sido recopilado en varios artículos (Zhao *et al*, 2019; Vengatapathy *et al*, 2019). Concretamente, los niveles de miR-499-5p asociados a miocitos cardíacos humanos se detectaron en plasma de manera elevada y correlacionados con cTnI en pacientes

con infarto agudo de miocardio, lo que sugiere su liberación de cardiomiocitos lesionados (Corsten *et al*, 2010a). En otro estudio, miR-499-5p tuvo un valor predictivo más preciso que fue significativamente mayor que la mayoría de los biomarcadores confiables de IAM, como cTnI y CK-MB (Liu X. *et al.*, 2015). Los cambios en los niveles de miR-499 circulantes se asociaron con angina inestable e infarto de miocardio sin elevación del segmento ST en pacientes que se presentaron dentro de las 3 horas posteriores al inicio de los síntomas (Shalaby *et al*, 2016). Li *et al.* (2013) ilustraron que miR-499 fue más preciso que cTnT (troponina T cardíaca) para el diagnóstico de IAM en pacientes de edad avanzada (Li Y. Q. *et al.*, 2013). Otros estudios clínicos han descrito niveles elevados de miR-499 circulante en pacientes con IAM (Yao *et al*, 2014; Zhang *et al*, 2015b).

Si bien actualmente hay poca evidencia de que los miRNAs puedan superar a los biomarcadores tradicionales, como la troponina cardíaca, en el diagnóstico del IAM, existe el potencial de que los miRNAs complementen los modelos existentes de predicción de riesgos y actúen como valiosos marcadores del momento agudo de la enfermedad.

1.3.4. miRNAs EN MODELOS EXPERIMENTALES

Cómo se ha comentado anteriormente, se ha demostrado el papel de los miRNAs en diferentes patologías y su uso como biomarcador o posible herramienta terapéutica está en continuo estudio. Pero es relevante comentar que, para que todo esto pueda llevarse a cabo, es necesario realizar un estudio previo en modelos experimentales.

Los estudios preclínicos en modelos animales de infarto de miocardio son necesarios para el descubrimiento y validación de nuevas moléculas relevantes en el proceso fisiológico de la enfermedad. Los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), por ejemplo, demostraron ser beneficiosos en un modelo de rata con infarto de miocardio inducido por ligadura de la arteria coronaria (Pfeffer *et al*, 1985b, 1985a), transformando las perspectivas de los pacientes con insuficiencia cardíaca. Sin embargo, los resultados en modelos experimentales no siempre se traducen bien en la clínica, especialmente en intervenciones diseñadas para proteger el corazón de la isquemia aguda (Schwarz *et al*, 2000).

Aunque las innovaciones en imagen no invasiva han abierto una nueva ventana sobre la enfermedad miocárdica humana, incluyendo el infarto de miocardio

(Curley *et al*, 2018), todavía dependemos de modelos preclínicos para una comprensión molecular más profunda y para probar la validez de nuevos agentes terapéuticos.

Los modelos animales de gran tamaño, como los modelos caninos y primates, se han utilizado durante mucho tiempo en la investigación de enfermedades cardiovasculares. Aunque son buenos para simular las características patológicas de los pacientes humanos, tienen limitaciones inevitables, como los altos costes de alimentación, las dificultades en la modificación genética, el gran espacio necesario para su manipulación y cuestiones éticas en cuando a su uso. Por otro lado, los modelos de roedores son los más comunes en la investigación de enfermedades cardiovasculares y son herramientas indispensables para estudiar las características patológicas, los síntomas clínicos y el desarrollo de fármacos para enfermedades humanas.

A pesar de que los modelos de roedores no son perfectos, ofrecen ventajas como, el gran conocimiento de su genoma, la abundante variedad de cepas genéticamente modificadas, su corta gestación y su relativo bajo coste para la cría y el mantenimiento, lo que proporciona una mayor comodidad para la investigación científica (MacAskill *et al*, 2021; Curley *et al*, 2018).

Para enfermedades cardiovasculares comunes se han desarrollado y utilizado modelos de roedores que simulan varias características e indicadores de enfermedades cardiovasculares humanas y han contribuido enormemente a la investigación científica (Jia *et al*, 2020).

Un método comúnmente utilizado para simular el infarto de miocardio en modelos experimentales es la oclusión quirúrgica permanente de la arteria coronaria descendente anterior izquierda. La ligadura permanente evita la perfusión distal causando hipoxia irreversible en una gran proporción del ventrículo izquierdo, lo que resulta en la muerte celular de los cardiomiocitos, la apoptosis y la formación de la cicatriz del infarto. Este modelo permite investigar los mecanismos celulares y moleculares que proceden a la lesión tisular y a la cicatrización de las heridas. Esta técnica presenta considerables desafíos en ratones, debido al pequeño tamaño del corazón de ratón, se requiere de personal altamente capacitado para llevar a cabo la ligadura de la arteria (Martin *et al*, 2022).

En general, el uso de modelos animales para estudiar el infarto de miocardio es altamente valorado en tres áreas amplias de investigación cardiovascular: (i) estudios moleculares (que involucran, por ejemplo, la

reparación del infarto, el remodelado cardíaco adverso, la muerte celular y las arritmias); (ii) estudios de traducción (por ejemplo, evaluación de intervenciones farmacológicas en el contexto de la enfermedad para mejorar los resultados); y (iii) estudios con terapias avanzadas para mejorar la función cardíaca, el remodelado tisular y la regeneración (por ejemplo, terapia génica, celular e ingeniería tisular) (Martin *et al*, 2022).

En el caso de la presente tesis, nuestro modelo experimental de infarto de miocardio permite estudiar el aspecto molecular en la fase aguda del infarto en el modelo murino SAMR1/SAMP8, el cual permite descubrir el papel del envejecimiento en el perfil de expresión de miRNAs tras un IAM, y además, con el uso de ratones machos y hembras, permite determinar la implicación de la variable sexo y su efecto sobre los miRNAs desregulados.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Se ha comprobado que el infarto agudo de miocardio (IAM) modifica los niveles de miRNAs circulantes capaces de regular distintos procesos biológicos. El conocimiento de este cambio en el perfil de expresión de miRNAs en la circulación, podría permitir la identificación de nuevos biomarcadores de diagnóstico y pronóstico de la enfermedad, así como establecer un punto de partida para el estudio e intervención de las vías de señalización celular afectadas.

El IAM está generalmente asociado a procesos de envejecimiento, la edad avanzada es el principal determinante del pronóstico del IAM y existen, además, diferencias de sexo en su incidencia en la población.

La hipótesis de este trabajo es que la senescencia y el sexo regulan diferencialmente el perfil de expresión de miRNAs en un modelo de infarto experimental en las cepas de ratones SAMR1/SAMP8, lo que trascendería en la regulación de las vías de señalización celular implicadas en el IAM.

Por tanto, el objetivo principal de este trabajo fue determinar el perfil de expresión de miRNAs en el modelo murino de infarto experimental en las cepas SAMR1/SAMP8 y estudiar la influencia del sexo y la senescencia.

Para ello, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Establecer el modelo de IAM experimental y senescencia con ratones y ratonas SAMR1/SAMP8, determinando el tiempo óptimo que debería transcurrir tras la inducción del infarto para la toma de muestras.
2. Analizar la influencia del sexo y la senescencia en el perfil de expresión de miRNAs en suero de ratones y ratonas SAMR1/SAMP8 y determinar bioinformáticamente las rutas biológicas afectadas.
3. Comprobar la expresión de los miRNAs circulantes desregulados en IAM y relacionados con el envejecimiento y el sexo en una nueva cohorte de ratones y ratonas, y en muestras de suero de pacientes con IAM, hombres y mujeres.
4. Estudiar bioinformáticamente la implicación funcional de los miRNAs diferencialmente expresados en IAM relacionados con el envejecimiento y el sexo.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio ha sido realizado bajo la aprobación del Comité de Experimentación y Bienestar Animal de la Universidad de Valencia (número de procedimiento: 2020/VSC/PEA/0128); y los protocolos experimentales se realizaron de acuerdo con el Real Decreto 53/2013 por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación.

Todos los sujetos con infarto agudo de miocardio (IAM) proporcionaron el consentimiento informado para participar en el estudio bajo la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Clínico de Valencia (2019/060), conforme a los principios de la Declaración de Helsinki.

Las muestras y datos de los controles incluidos en el estudio fueron proporcionados por el Biobanco Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda (HUPHM)/Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro-Segovia de Arana (IDIPHISA) (PT17/0015/0020 de la Red Nacional de Biobancos) con la aprobación de sendos Comités Ético y Científico, y han sido procesados siguiendo procedimientos normalizados.

3.1. MODELO MURINO DE INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO Y SENESCENCIA

Para el establecimiento del modelo murino de IAM se utilizó un modelo de ratones con senescencia acelerada, ratones SAM (del inglés, *Senescence Accelerated Mouse*), que se obtuvieron a través de la selección fenotípica de una colonia de ratones AKR/J. Este modelo fue descrito por Takeda y sus colaboradores en 1981. Varios subtipos de ratones SAM han sido identificados y se caracterizan por desarrollar cambios fenotípicos relacionados con el envejecimiento acelerado (Takeda *et al*, 1981). En este estudio, se utilizaron ratones de la cepa SAMR1 como grupo control, que presentan un envejecimiento biológico normal. También se usaron ratones de la cepa SAMP8, que presentan una senescencia acelerada y muestran alteraciones asociadas con el envejecimiento, como cataratas, osteoporosis, amiloidosis senil y pérdida de memoria.

Fueron criados y mantenidos en el animalario de la Unidad Central de Investigación de Medicina de la Universidad de Valencia (UCIM), en un ambiente controlado con condiciones estándar de temperatura constante a 22°C, ciclos luz/oscuridad de 12 horas, humedad del 60%, pienso y agua *ad libitum*.

3.1.1. GRUPOS DE ESTUDIO

El estudio destinado al establecimiento del tiempo óptimo de sacrificio en el modelo murino de infarto agudo de miocardio se realizó en ratones SAMR1 (n = 36) y ratones SAMP8 (n = 36). Para el estudio del perfil transcriptómico mediante microRNAseq se utilizaron ratones SAM R1 (n = 24) y ratones SAMP8 (n = 24). Los ratones de ambos estudios se distribuyeron en los siguientes grupos experimentales:

- Controles de cirugía (sham): grupo control al que se realizó el mismo procedimiento quirúrgico que a los demás, pero sin ligar la arteria coronaria.
- Infarto agudo de miocardio (IAM): grupo experimental al que se realizó la oclusión de la arteria coronaria.

3.1.2. INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO

Antes del procedimiento quirúrgico se administraron analgésicos de manera intraperitoneal para el manejo del dolor, meloxicam (0.3 mg/kg) y buprenorfina (0.1 mg/kg). Seguidamente se anestesió a los ratones mediante la inhalación de isoflurano al 5 % de la CAM (concentración alveolar mínima) para la inducción (Abbot Laboratories, Chicago, IL, Estados Unidos), administrado en aire de calidad médica con oxígeno al 100 % en una cámara anestésica.

Para la cirugía, mientras que en otros estudios implementan una traqueotomía invasiva, en este caso se utilizó un método menos invasivo de intubación endotraqueal, usando iluminación cenital de la orofaringe, se intuba sin crear incisiones, brindando una experiencia más segura y menos traumática para el animal. Se coloca al ratón en la tabla quirúrgica y se conecta a un ventilador para roedores (Minivent tipo 845, Panlab Harvard Apparatus, Barcelona, España) ajustado a un volumen tidal de 200 μ L y una frecuencia de 110 respiraciones por minuto complementado con oxígeno al 100%, e isoflurano (2% de la CAM para mantenimiento) a un caudal de 0.2 L/min.

Tras comprobar la profundidad anestésica por pérdida de reflejos podales, se procedió a realizar el IAM, accediendo al corazón a través de una toracotomía izquierda entre el cuarto y quinto espacio intercostal. Después de abrir el pericardio, se realizó una ligadura permanente de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (ACDI) utilizando un portaagujas para microcirugía e hilo de sutura monofilamento no reabsorbible (Monosyn 6/0 Braun) (**Figura 2**).

El punto de oclusión pasó aproximadamente 1-2 mm desde el vértice de la aurícula izquierda cuando estaba en su posición normal. En el grupo control de cirugía (Sham), la aguja se pasó alrededor de la arteria sin ligadura.

Después de la ligadura, se cerró por planos el tórax de los ratones con sutura monofilamento reabsorbible (monosyn 5/0 Braun), cerrando el espacio intercostal, subcutáneo y la piel de los animales. Se colocaron en una jaula de recuperación limpia, bajo una lámpara de calor para recuperar la conciencia. 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).

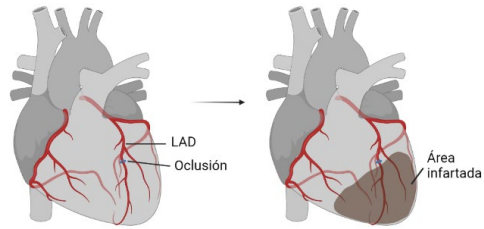


Figura 2. Ligadura permanente de la arteria coronaria descendente anterior izquierda. Mediante la oclusión de la ACDI se produce el IAM, generando una gran área de tejido cicatricial en el ventrículo izquierdo. Imagen creada con BioRender.

3.1.3. RECOGIDA DE MUESTRAS

Los ratones fueron sacrificados con isoflurano vaporizado al 5% al tiempo estipulado tras la cirugía según el estudio, y se recogieron muestras de sangre. Las muestras de sangre se recogieron de la vena cava con una jeringa de 1 ml y una aguja de 25 G en un tupo Eppendorf estéril de 1.5 ml. Tras reposar 30 min a temperatura ambiente, se centrifugaron a 1500 g durante 15 min a 4°C para obtener el suero que se transfirió a tubos libres de RNasa/DNasa.

Para descartar las muestras de sangre hemolizadas no aptas para el estudio de ácidos nucleicos se realizó un control de hemólisis mediante espectrofotometría. Se determinó la absorbancia de 1 μ l de suero a una longitud de onda de 414 nm mediante el NanoDrop One (ThermoScientific, Rockford, IL, USA) y se estableció el límite de 0.5 UA por encima del cual la muestra queda descartada para su posterior uso. Las muestras no hemolizadas se conservaron a -80°C hasta su uso.

Los corazones se aislaron en una placa Petri con solución salina fisiológica (0.9% NaCl) a 4°C. Se limpiaron cuidadosamente de grasa y adherencias con tijeras de microdisección, bajo un microscopio estereoscópico iluminado con luz fría, LEICA S9E (Leica

Microsystems). Los corazones destinados a la tinción histológica con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) para evaluar la viabilidad del tejido y el tamaño del infarto se cortaron con una hoja de bisturí en secciones de 1 mm. Cada sección se incubó en la solución de TTC-PBS al 1%, pH 7.4 a temperatura ambiente durante 20 min y se fijaron en formalina tamponada con PBS al 10 % durante 18 horas a 2-8 °C.

3.1.4. EXTRACCIÓN DE RNA

El RNA total se aisló a partir del suero utilizando el kit miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se mezclaron 200 µl de suero con 700 µl de reactivo de lisis, seguido de la adición de cloroformo, etanol y tampón de lavado. El RNA depositado en la membrana de la columna giratoria fue eluido con agua libre de RNAsas.

La cantidad total de RNA y su pureza se midieron con NanoDrop One (ThermoScientific, Rockford, IL, USA). Las muestras de RNA se almacenaron a -80 °C hasta su uso en posteriores ensayos.

3.1.5. qRT-PCR

La expresión individual de los miRNA se determinó mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), mediante el sistema de ensayo de miRNA TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) en el que se amplifican, detectan y cuantifican secuencias específicas gracias a la fluorescencia liberada después de la hidrólisis del fluoróforo de la sonda de su desactivador (*quencher*), que permite la cuantificación de la señal lumínica.

Antes de la realización de la PCR, se realizó la retrotranscripción (RT) del RNA a DNA complementario (cDNA) mediante el kit transcripción inversa de microRNA TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) según indicaciones del fabricante. La RT se realizó a partir 200 ng de RNA para un volumen de reacción de 20 µL y se llevó a cabo en un termociclador (MasterCycler 5891T13, Eppendorf) programado con las condiciones de temperatura óptimas. Las muestras se conservaron a 4°C hasta su uso.

Las PCR en tiempo real se llevaron a cabo mediante el sistema ABI Prism 7900 HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) con soporte para placa de 384 pocillos (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) conectado a un ordenador con el software QuantStudio

5 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Se utilizaron sondas de expresión Taqman Gene Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) para cada uno de los miRNA de interés (**Tabla 2**). Como control endógeno para normalizar las diferencias en la cantidad de RNA, la calidad del RNA y la eficiencia de la transcripción inversa se utilizó el U6 snRNA en las muestras de ratones, y el miR-484 en las muestras de pacientes.

En la PCR se denomina ciclo umbral (Ct o *threshold cycle*) al ciclo en el que la curva de amplificación supera el umbral de señal de fluorescencia, sirviendo como medida relativa de la concentración inicial del miRNA en la muestra. Cada muestra se analizó por duplicado y la expresión relativa se calculó según el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

$$\Delta Ct_{\text{muestra}} = Ct_{\text{miR de interés}} - Ct_{\text{miR control endógeno}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{muestra}} - \text{promedio} \Delta Ct_{\text{grupo control}}$$

miRNA	Referencia
U6 snRNA	001973
miR-1-3p	002222
miR-133-3p	002246
miR-208-3p	000511
miR-499-5p	001352
miR-30e-3p	000422
miR-148a-3p	000470
miR-149-5p	002255
miR-423-5p	002340
miR-484	001821

Tabla 2. Sondas TaqMan específicas utilizadas para la determinación de la expresión de miRNAs mediante qRT-PCR.

3.2. SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN

El perfil de expresión de miRNAs se determinó mediante la plataforma de secuenciación de nueva generación NGS (del inglés, *Next-generation sequencing*) NextSeq550 de Illumina (Illumina, San Diego, CA, EE.UU.) en el Servicio de Genómica y Epigenética de la UCIM, donde se realizó el procesado de las muestras, la preparación de las librerías y su secuenciación (**Figura 3**). La técnica NGS permite el análisis de un gran número de muestras con una gran sensibilidad, una mayor profundidad de lectura que la ofrecida por la tecnología de hibridación de microarrays y la detección de nuevas secuencias desconocidas.

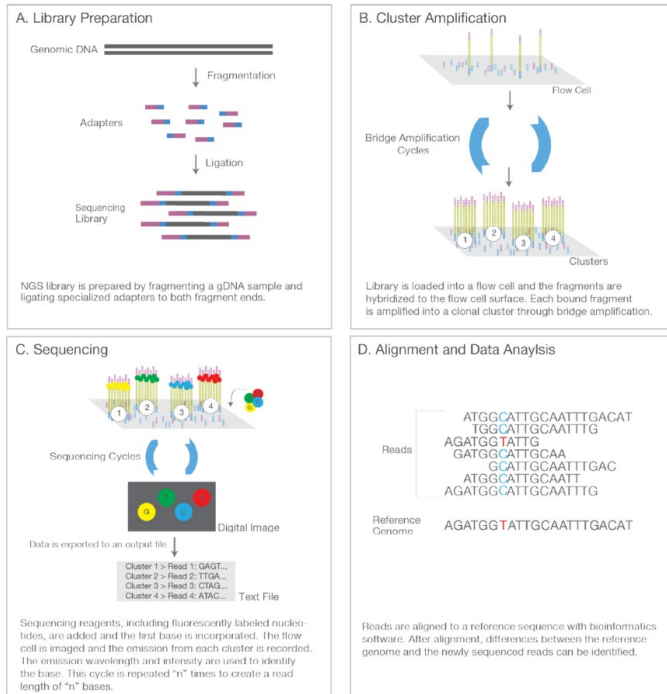


Figura 3. Esquema del procedimiento de la secuenciación de nueva generación Illumina. (A) Preparación de la librería mediante la unión de adaptadores y retro transcripción a cDNA. **(B)** Amplificación mediante la generación de grupos o *clustering*. **(C)** Secuenciación mediante la lectura de la unión de bases a los fragmentos monocatenarios de cDNA. **(D)** Análisis de los datos y a su alineación a un genoma de referencia. Imagen tomada de (Illumina Next-Generation Sequencing (NGS) | Explore the Technology).

3.2.1. PREPARACIÓN DE LIBRERÍAS

La preparación de librerías consiste en seleccionar del material inicial de RNA total las moléculas de microRNAs y añadir adaptadores con sitios para la unión de la celda de flujo y la del cebador de secuenciación, mediante el kit NEXTFLEX® Small RNA-Seq v3 para Illumina Platforms (Bioo Scientific® Corporation, Texas, EE. UU.).

Siguiendo el protocolo del fabricante, en primer lugar las moléculas de pequeños RNA se ligan, en presencia de bloqueadores de los tRNA/YRNA (NOVA-513122 NEXTFLEX tRNA/YRNA Blockers) a los adaptadores adenilados 3'- 4N con bases aleatorias del kit NETFLEX® small RNA sequencing (NOVA-5132-24 NEXTFLEX SMALL RNA KIT WITH UDI BARCODES 97-144 (48rxn)), el cual reduce el sesgo asociado a la ligasa, aprovechando el grupo fosfato de su extremo terminal lo que permite seleccionar exclusivamente estas moléculas.

Mientras que los fragmentos de YRNA (88-112 nt) y tRNA pueden tener funciones inexploradas como marcadores de diagnóstico, en este estudio pueden actuar como contaminantes reduciendo el número relativo de lecturas de mapeo, por lo que la inclusión de bloqueadores contra YRNA y tRNA en el proceso de preparación de la librería puede aumentar las lecturas de secuenciación de miRNAs.

En segundo lugar, se ligan los adaptadores 5'-4N. Tras la ligación de los adaptadores se lleva a cabo la retrotranscripción de la molécula a cDNA. Los fragmentos de cDNA generados se amplifican e indexan por PCR usando cebadores con códigos de barras distintos para cada muestra.

El control de calidad y la concentración de las librerías se verifican con el bioanalizador Agilent Technologies 2100 (Agilent Technologies, California, Estados Unidos) usando chips para DNA de alta sensibilidad. Posteriormente se prepara un *pool* equimolecular de cada librería para su secuenciación.

Finalmente se realizó la purificación de este *pool* mediante el uso del sistema automatizado *Sage Pippin Prep* para la selección del tamaño de las librerías. El protocolo está diseñado para recuperar productos finales de ~150 pb, que representan los miRNAs y siRNAs.

3.2.2. SECUENCIACIÓN CON ILLUMINA

Las librerías obtenidas se cargan en una celda de flujo y se colocan en el secuenciador. Los fragmentos de DNA se amplifican al unirse a oligos complementarios en la celda de flujo en un proceso llamado generación de grupos (*clustering*), lo que da como resultado millones de copias de DNA monocatenario.

La tecnología Illumina de secuenciación por síntesis (SBS, del inglés Sequencing By Synthesis) utiliza un método patentado basado en un terminador reversible que detecta bases individuales a medida que se incorporan a las hebras monocatenarias de la plantilla de DNA. La señal fluorescente indica qué nucleótido se ha agregado y el terminador se escinde para que la siguiente base pueda unirse.

El resultado es una secuenciación *single read* de 50 ciclos (1 x 50 pb) altamente precisa que prácticamente elimina errores específicos del contexto de secuencia, incluso dentro de regiones de secuencia repetitivas y homopolímeros.

3.2.3. PROCESAMIENTO DE LOS DATOS DE SECUENCIACIÓN

Los datos obtenidos de la secuenciación contienen millones de pequeñas lecturas almacenadas en archivos de texto en formato FASTQ. Estos archivos contienen 4 líneas por lectura, la primera empezando con el símbolo “@” seguido de un código único identificador de la lectura, la segunda línea contiene la secuencia de nucleótidos leída, la tercera línea contiene otra vez el identificador de lectura con el símbolo “+”, y la cuarta línea consiste en una serie de índices de calidad que especifican la probabilidad de que la lectura del nucleótido sea incorrecta para cada nucleótido en la secuencia de lectura. El procesamiento de los archivos FASTQ y su posterior análisis bioinformático se realizó por EpiDisease S.L. (Paterna, Valencia) (**Figura 4**).

Para el preprocesado y el control de calidad se implementaron una serie de programas informáticos: FastQC (análisis de múltiples archivos FASTQ a la vez), Cutadapt (elimina los adaptadores de secuenciación), Subread (alineamiento de secuencias) y Multiqc (herramienta modular para agregar resultados de análisis bioinformáticos a través de muchas muestras en un solo informe).

Los miRNAs presentes en las muestras se anotaron con miRbase usando la versión 38 del genoma de ratón (mm10). La normalización del número de lecturas por muestra de cada miRNA (cuentas o counts en inglés) se realizó calculando TMM6 (del inglés, Trimmed Mean M-values).



Figura 4. Esquema del procedimiento del estudio bioinformático de los datos crudos obtenidos de la secuenciación de miRNAs mediante NextSeq550 de Illumina. Después de procesar los datos mediante controles de calidad y normalización de los datos, se anotaron los miRNAs contra el genoma de referencia de ratón. Se realizó el estudio de expresión diferencial y se analizaron los datos, tras lo cual se hizo el enriquecimiento y un informe final. Imagen creada con BioRender.

Para el estudio de los miRNAs diferencialmente expresados entre grupos experimentales se aplicaron 4 algoritmos bioinformáticos con test distintos: edgeR, limma, limma-voom y DESeq2.

Los algoritmos edgeR y DESeq2 son los más usados en el análisis de expresión diferencial tras una secuenciación. Son muy similares y ambos asumen que ningún gen se expresa de manera diferencial. Aunque existe cierta similitud a nivel conceptual entre estos métodos, hay diferencias en la normalización de datos con un gran efecto sobre los resultados. Por ello, al ser diferentes métodos de análisis que utilizan funciones estadísticas complejas se espera que los resultados obtenidos sean diferentes pero complementarios.

Se realizó un análisis de expresión diferencial 1 vs. 1 entre todos los grupos de estudio (**Tabla 3**). Teniendo en cuenta las tres variables (IAM, envejecimiento y sexo) se analizaron un total de 12 comparaciones. Además, se realizó un análisis de contraste complejo 2 vs. 2 que ofrece la posibilidad de obtener grupos de miRNAs con una tendencia de expresión opuesta en la cirugía entre los grupos de las comparaciones (**Tabla 4**).

Variable	Grupos
INFARTO Sham vs IAM	R1 Macho
	R1 Hembra
	P8 Macho
	P8 Hembra
ENVEJECIMIENTO SAM R1 vs SAM P8	Macho sham
	Macho IAM
	Hembra sham
	Hembra IAM
SEXO Macho vs Hembra	R1 sham
	R1 IAM
	P8 sham
	P8 IAM

Tabla 3. Comparaciones de grupos 1 vs. 1 para el análisis diferencial de miRNAs. En total se analizaron 12 comparaciones entre los 8 grupos de ratones en relación con las 3 variables a estudio, infarto (IAM/sham), envejecimiento (ratones SAM R1/SAM P8), y sexo (machos/hembras).

Variable	Grupos
Sexo vs cirugía	R1 macho (sham-IAM) R1 hembra (sham-IAM)
	P8 macho (sham-IAM) P8 hembra (sham-IAM)
Envejecimiento vs cirugía	R1 macho (sham-IAM) P8 macho (sham-IAM)
	R1 hembra (sham-IAM) P8 hembra (sham-IAM)

Tabla 4. Comparaciones de grupos 2 vs. 2 de contraste complejo. Comparaciones de 2 grupos vs. 2 grupos estudiando el sexo (macho/hembra) o envejecimiento (SAM R1/SAM P8) contra la cirugía (sham/IAM). El resultado son miRNAs que se comportan con una tendencia opuesta en la cirugía.

Tras la obtención de los miRNAs diferencialmente expresados en las comparaciones 1 vs. 1 y 2 vs. 2, se utilizaron diferentes métodos de representación gráfica de los resultados, como el análisis de componentes principales (PCA), un algoritmo que describe las muestras de cada grupo de acuerdo con nuevas variables no correlacionadas. Los PCA se generan con R studio (2022.12.0 Posit Software, PBC) y el paquete *ggplot2*, mientras que los *Heatmaps* son representaciones en 2 dimensiones donde la información de cada miRNA está codificada mediante una escala de color, el cual se genera con el software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., California, Estados Unidos).

3.3. ESTUDIO EN PACIENTES

3.3.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO Y RECOGIDA DE MUESTRA

Las muestras de suero humano se obtuvieron de pacientes con IAM (4 hombres y 4 mujeres) procedentes del Servicio de Cardiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia, recogidas durante el periodo comprendido entre abril de 2014 y octubre de 2016 y conservadas a -80°C.

Como controles, se incluyeron muestras de suero de un grupo de 23 sujetos sanos proporcionadas por el Biobanco Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda (HUPHM)/Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro-Segovia de Arana (IDIPHISA) (PT17/0015/0020 de la Red Nacional de Biobancos) con la aprobación de sendos Comités Ético y Científico, que fueron procesados siguiendo procedimientos normalizados.

Las muestras de sangre venosa periférica de los pacientes (10 ml) se recogieron antes de la intervención coronaria percutánea (ICP) para el restablecimiento del suministro sanguíneo al corazón, en tubos BD Vacutainer SST (Becton Dickinson, Nueva Jersey, Estados Unidos) con activador de coagulación y gel de

polímeros separador de suero, evitando así la hemólisis, y se enviaron inmediatamente (≤ 1 h) al laboratorio. Las muestras se centrifugaron a 1500 g para la obtención de suero. El sobrenadante fue cuidadosamente transferido a un tubo estéril y centrifugado nuevamente con el fin de precipitar cualquier desecho y componentes insolubles. El suero fue alicuotado en tubos eppendorf DNA/RNA Lobind (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) de 1.5 ml libres de RNasas y fueron congelados inmediatamente a -80°C hasta su análisis.

3.3.2. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES

Las pequeñas vesículas extracelulares (VE) de suero fueron aisladas de los pacientes con IAM y de los controles mediante el kit exoEasy de Qiagen (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo instrucciones del fabricante. Su purificación se basa en un procedimiento rápido de centrifugación (5 min, 3000 g) en el que las vesículas de suero se unen a una columna de afinidad. Posteriormente se eluyen en un tampón acuoso adecuado y almacenan a 4°C hasta su utilización.

Su caracterización se realizó mediante la técnica de *Western Blot*, para la identificación de las proteínas de membrana características de las pequeñas vesículas extracelulares. Resumidamente, se utilizó una cantidad igual de proteína (20 µg) de cada muestra y una vez desnaturalizadas se separaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida con gradiente al 4-15%. Se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, las cuales se bloquearon con BSA al 5% y se utilizaron anticuerpos específicos para Flotilina-1 (sc-74566), Tsg101 (sc-7964), Alix (sc-53538) y β -Actina (sc-47778). La señal quimio luminiscente se detectó con el equipo LAS-3000 Imaging System (Fujifilm).

Para la caracterización de su morfología se utilizó el microscopio electrónico de transmisión HITACHI HT7800 (Hitachi High-Tech Corporation, Tokio, Japón). Las muestras fueron fijadas con formol, y seguidamente teñidas con azul de metileno para su observación de acuerdo con los procedimientos habituales en el servicio de la sección de microscopía electrónica (S.C.S.I.E.) de la Universidad de Valencia.

3.4. ANÁLISIS FUNCIONAL DE GENES DIANA

Para realizar el análisis funcional de los genes diana de los miRNAs obtenidos como diferencialmente expresados en nuestros grupos de estudio recurrimos al análisis de sobrerrepresentación (ORA, del inglés Overrepresentation Analysis). El cual comprueba la sobrerrepresentación estadística de una lista de genes de interés en una lista de referencia, obtenida de bases de datos públicas recopiladas en diferentes repositorios online. En concreto se llevó a cabo el análisis de los términos *Gene Ontology* (GO) y de las rutas KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*).

El análisis de enriquecimiento funcional de los sets de miRNAs diferencialmente expresados en las comparaciones de ratones SAM R1/SAM P8, machos y hembras, estudiando la variable IAM vs. sham se llevó a cabo mediante la herramienta en línea miRwalk y la base de datos TargetScan. El algoritmo de predicción de genes se basa en dianas cuya complementariedad con el miRNA ha sido experimentalmente comprobada. Los términos GO y las rutas KEGG obtenidas se representaron en el gráfico Dotblot, realizado con el programa R studio (2022.12.0 Posit Software, PBC) y el paquete *ggplot2*.

Para la predicción de dianas de manera individual de aquellos miRNAs diferencialmente expresados seleccionados para posteriores estudios, se llevó a cabo el siguiente procedimiento (**Figura 5**). Primero se obtuvieron los genes dianas en las dos especies (humano y ratón) mediante las herramientas en línea de predicción de genes diana microT-CDS, TargetScan y miRDB. Las tres herramientas en línea operan buscando posibles sitios de unión entre los miRNAs y los extremos 3' UTR de los RNAm. Dependiendo del grado de complementariedad, esta unión puede provocar la degradación del RNAm diana o la represión de su traducción. Las tres herramientas utilizan algoritmos ligeramente diferentes, pero coinciden en basarse en predicciones realizadas a partir de datos experimentales. A continuación, se seleccionaron aquellos genes que aparecen en al menos dos bases de datos, para aumentar la confianza de predicción de estos. Los genes conservados entre las dos especies, humano y ratón se utilizaron para obtener las rutas KEGG en la herramienta en línea miRwalk. Los resultados se representaron en los gráficos tipo diagramas de cuerdas mediante R studio (2022.12.0 Posit Software, PBC) y el paquete *ggplot2*.

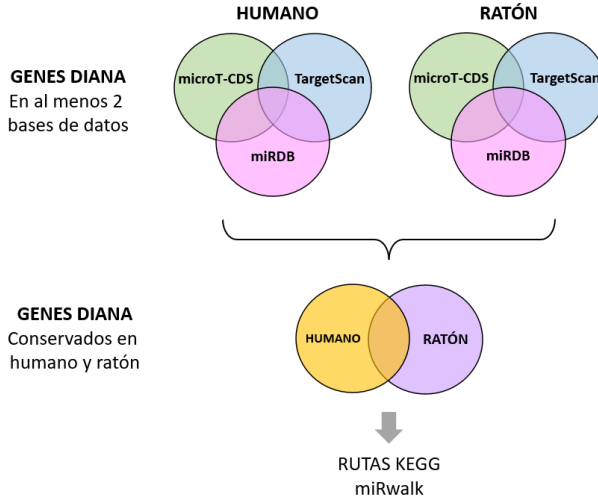


Figura 5. Procedimiento seguido para el enriquecimiento funcional de los miRNAs validados de la secuenciación. Se seleccionan aquellos genes diana conservados entre humano y ratón y que, además, han aparecido en al menos dos bases de datos de predicción (microT-CDS, TargetScan y miRDB). Con los genes diana conservados se obtienen las rutas KEGG mediante la herramienta online miRwalk.

3.5. ANALISIS ESTADÍSTICO

La obtención de los miRNAs diferencialmente expresados mediante diferentes algoritmos, DESeq2, edgeR, limma y voom se llevó a cabo utilizando como límite de corte un valor de $p \leq 0.1$.

Los resultados se expresaron como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM). Las comparaciones de los grupos 1 vs. 1 se realizaron mediante el test de la t de Student (T-Test). En las comparaciones entre más de 2 grupos se utilizó el test de análisis de la varianza de una vía (ANOVA), con el ajuste recomendado del test Tukey. Los resultados se analizaron mediante el programa GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., California, Estados Unidos). Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p \leq 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO MURINO DE INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO Y SENESCENCIA

Los estudios destinados al establecimiento del modelo murino de infarto agudo de miocardio (IAM) y envejecimiento se llevaron a cabo en machos y hembras, de ratones SAMR1 (n = 36) y SAMP8 (n = 36) (**Tabla 5**). Al grupo con IAM se le realizó la ligadura de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (ACDI) y a los controles de cirugía (Sham) se les realizó el mismo procedimiento quirúrgico sin ligar la arteria. Los ratones se sacrificaron a diferentes tiempos después de la cirugía, 1, 4 y 24 horas.

Se establecieron tres tiempos diferentes de sacrificio para determinar el tiempo óptimo tras el infarto en el que se observan mayores diferencias cuantificables en la expresión de miRNAs. Ya que el interés de la investigación radica en estudiar el infarto de miocardio en su momento agudo se escogieron dos tiempos cercanos a la operación, 1 y 4 horas, y otro tiempo para estudiar la tendencia de expresión de los miRNAs, 24 horas (**Figura 6**).

Animales	Cirugía	Sexo	Cepa	Sacrificio
3	Sham	Macho	SAMR1	1 – 4 – 24 horas
3	IAM			
3	Sham	Hembra		
3	IAM			
3	Sham	Macho	SAMP8	1 – 4 – 24 horas
3	IAM			
3	Sham	Hembra		
3	IAM			

Tabla 5. Grupos de estudio para el establecimiento del modelo murino de infarto agudo de miocardio y envejecimiento. 24 grupos de estudio (n = 3 por grupo) distribuidos según la cirugía (Sham o IAM), el sexo (macho o hembra), la cepa (SAMR1 o SAMP8) y el tiempo de sacrificio tras la operación (1, 4 o 24 horas).

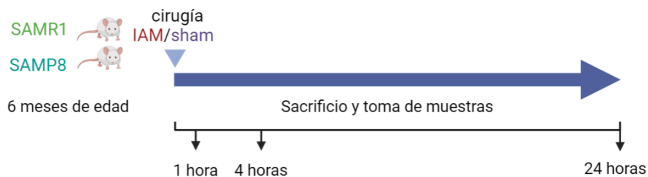


Figura 6. Representación esquemática del diseño experimental del estudio. Los ratones SAMR1 y SAMP8, machos y hembras, fueron sometidos a cirugías de IAM y control (Sham) y el sacrificio y toma de muestras se realizó transcurridas 1, 4 y 24 h. Imagen creada con BioRender.

4.1.1. VALIDACIÓN DEL INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO

En todos los ratones del grupo IAM se comprobó la existencia de isquemia miocárdica en el electrocardiograma (ECG) mediante la observación de la elevación del segmento ST en la derivación II, la cual empieza a aparecer en los 5 primeros minutos tras la ligadura de la arteria coronaria (**Figura 7A**). Asimismo, la tinción con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) permitió diferenciar el tejido miocárdico necrótico (zona blanquecina) del tejido viable confirmando así la zona infartada (zona roja) (**Figura 7B**). Otro indicativo claro de la oclusión es la observación de una palidez instantánea del miocardio por el cese del flujo sanguíneo en la zona afectada (**Figura 7C**).

El modelo murino de IAM se generó mediante la oclusión de la arteria coronaria y su tasa de supervivencia superó el 80%. Todas las muertes ocurrieron durante el procedimiento quirúrgico y no se consideraron en los análisis posteriores. No hubo diferencias entre las tasas de mortalidad de SAMR1 y SAMP8.

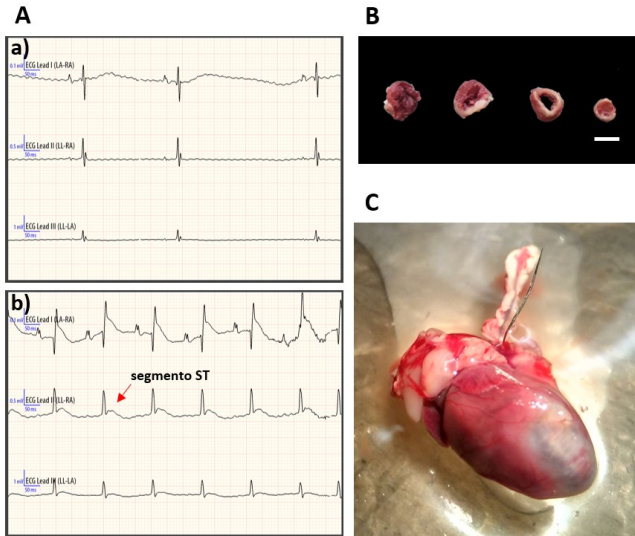


Figura 7. Confirmación del infarto de miocardio. El electrocardiograma, la tinción con TTC del corazón y la palidez confirman el éxito en la generación del modelo de IAM en los ratones SAMR1 y SAMP8. **(A)** Electrocardiograma representativo tras la ligadura de la arteria coronaria **(a)** y del grupo control **(b)**. **(B)** Imagen representativa de secciones teñidas con TTC de un corazón de ratón infartado (barra de escala = 5 mm). **(C)** Imagen representativa en la que se observa la isquemia del ventrículo izquierdo en un corazón aislado después del IAM.

En el momento previo a la cirugía se registraron los pesos de los ratones de los diferentes grupos, machos y hembras SAMR1 y SAMP8 (**Figura 8**). En ambos grupos de ratones, SAMR1/SAMP8, hay una disminución significativa ($p < 0.01$) en hembras respecto a machos. También se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) en machos y hembras de los ratones SAMP8, en comparación con los SAMR1.

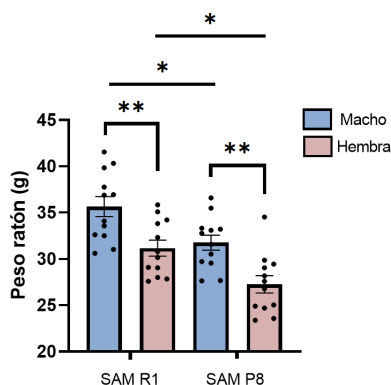


Figura 8. Peso de los ratones SAMR1 y SAMP8 machos y hembras. Los ratones se pesaron en el momento previo a la cirugía. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ (ANOVA de una vía y post-test de Tukey para comparaciones múltiples; $n = 12$ en todos los grupos).

4.1.2. ANÁLISIS DE CALIDAD DEL SUERO SANGUÍNEO

Uno de los inconvenientes principales del análisis de miRNAs circulantes es su interferencia con los miRNAs liberados por las células sanguíneas durante un proceso de hemólisis. La lisis de las células sanguíneas durante la flebotomía o la manipulación de muestras puede producir altos niveles de miRNAs que no se corresponden con los niveles reales presentes en el suero.

Analizamos la hemólisis de las muestras mediante la medida de la hemoglobina libre a una absorbancia de 414 nm (A414) mediante el NanoDrop One (ThermoScientific, Rockford, IL, USA). Las muestras se clasificaron como hemolizadas si la lectura a A414 sobrepasaba el valor de 0.5 unidades arbitrarias (U.A.). Todas las muestras de ratones que superaron este límite de absorbancia fueron descartadas para el posterior análisis de miRNAs. En la **Figura 9** se muestran los valores de absorbancia de los sueros de los ratones utilizados en el estudio de microRNAseq. Resulta especialmente llamativo que todas las muestras que sobrepasaron el límite establecido procedían de ratonas.

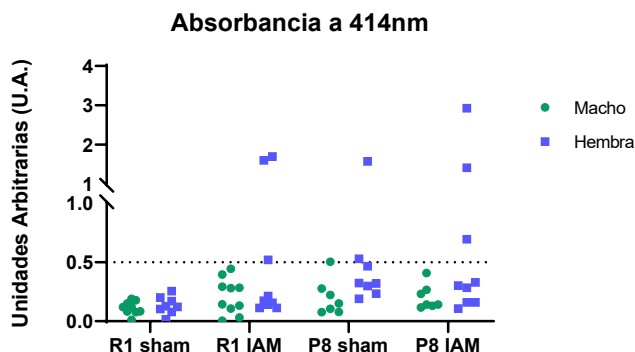
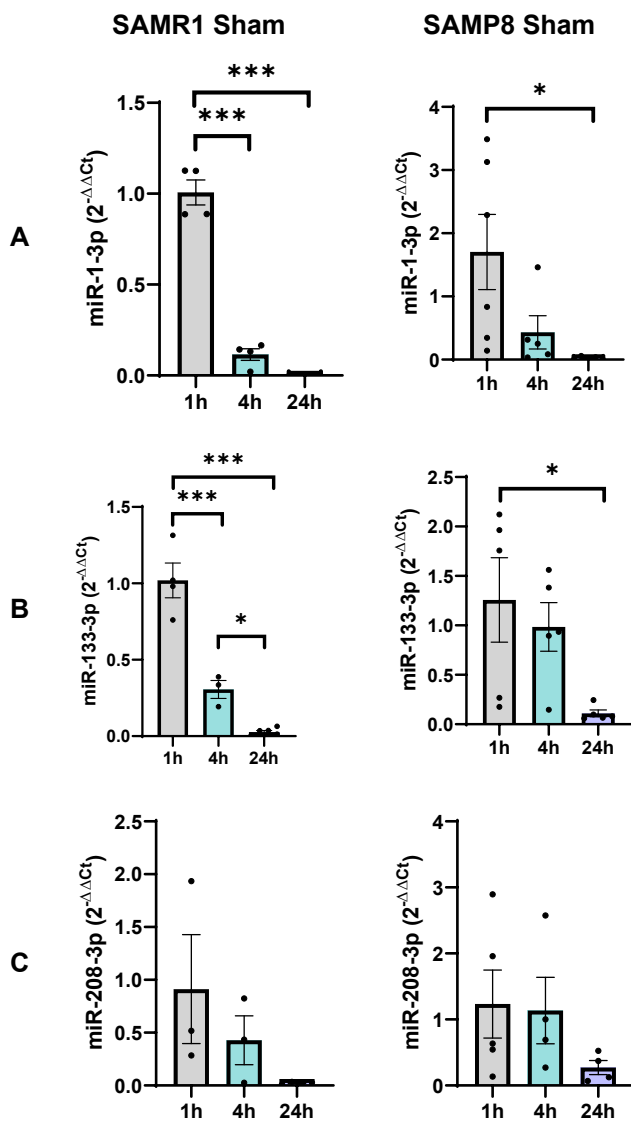


Figura 9. Representación gráfica de la absorbancia a 414 nm del suero extraído de los ratones SAMR1 y SAMP8. Todos los sueros de ratones con una absorbancia a 414 nm > 0.5 U.A. fueron descartados para el estudio de miRNAs. Los puntos verdes hacen referencia a los sueros procedentes de ratones y los puntos azules corresponden a ratonas (n = 7-9).

4.1.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE miRNAs DESCRITOS COMO POTENCIALES BIOMARCADORES DE INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO

Para comprobar el efecto del IAM sobre la expresión de miRNAs circulantes en nuestro modelo murino, elegimos 4 miRNAs que habían sido definidos anteriormente como potenciales biomarcadores de IAM en modelos experimentales de roedores o en pacientes de síndrome coronario agudo. La selección de estos miRNAs se llevó a cabo tras la revisión de diferentes publicaciones experimentales y fueron el miR-1-3p, miR-133-3p, miR-208-3p y miR-499-5p. Con el objetivo de establecer el tiempo óptimo de sacrificio tras la cirugía en el que los miRNAs tenían una expresión lo suficientemente diferenciable respecto a sus grupos control se establecieron tres tiempos, 1, 4 y 24 horas.

Para determinar si el procedimiento quirúrgico en sí tenía efecto sobre la expresión de los miRNAs, se realizó un estudio previo de la evolución temporal de su expresión en sueros del grupo control de cirugía (sham) en ratones SAMR1 y SAMP8 a los 3 tiempos (**Figura 10 y Tabla 6**).



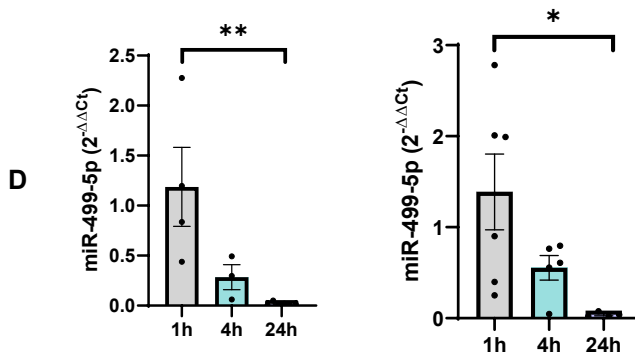


Figura 10. Evolución temporal de la expresión de los miRNAs biomarcadores de infarto en el grupo sham de los ratones SAMR1 y SAMP8. Comparación de la expresión de los miRNAs miR-1-3p, miR-133-3p, miR-208-3p y miR-499-5p en el suero de los ratones SAMR1 y SAMP8 sometidos a una cirugía control (sham) y sacrificados tras 1, 4 y 24 horas. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM del valor de expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) calculado respecto al grupo de 1 hora. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ (ANOVA de una vía y post-test de Tukey para comparaciones múltiples; $n = 3-6$).

	1 h	4 h	24 h	p -valor	
miR-1-3p R1 media ± SEM	1,007 ± 0,068	0,115 ± 0,032	0,003 ± 0,001	1-4 1-24 4-24	< 0,0001 < 0,0001 0,1637
miR-1-3p P8 media ± SEM	1,704 ± 0,594	0,430 ± 0,263	0,024 ± 0,010	1-4 1-24 4-24	0,1104 0,0319 0,7859
miR-133-3p R1 media ± SEM	1,019 ± 0,113	0,305 ± 0,058	0,027 ± 0,009	1-4 1-24 4-24	< 0,0001 < 0,0001 0,0353
miR-133-3p P8 media ± SEM	1,258 ± 0,427	0,983 ± 0,245	0,109 ± 0,034	1-4 1-24 4-24	0,7797 0,0364 0,1175
miR-208-3p R1 media ± SEM	0,912 ± 0,515	0,427 ± 0,230	0,023 ± 0,004	1-4 1-24 4-24	0,5248 0,1344 0,5933
miR-208-3p P8 media ± SEM	1,234 ± 0,515	1,135 ± 0,503	0,272 ± 0,106	1-4 1-24 4-24	0,9861 0,3083 0,4147
miR-499-5p R1 media ± SEM	1,187 ± 0,394	0,283 ± 0,124	0,016 ± 0,007	1-4 1-24 4-24	0,0563 0,0056 0,6811
miR-499-5p P8 media ± SEM	1,389 ± 0,416	0,554 ± 0,135	0,039 ± 0,012	1-4 1-24 4-24	0,1490 0,0246 0,5172

Tabla 6. Comparación de los niveles de expresión de los miRNAs descritos como biomarcadores de IAM tras 1, 4 y 24 horas de la cirugía control sham. Comparación de la expresión de los miRNAs miR-1-3p, miR-133-3p, miR-208-3p y miR-499-5p en el suero de los ratones SAMR1 y SAMP8 sometidos a una cirugía control (sham) y sacrificados tras 1, 4 y 24 horas. Los resultados se expresan como media ± SEM del valor de expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) calculado respecto a su grupo control, el grupo de 1 hora. * p < 0.05, ** p < 0.01 y *** p

< 0.001 (ANOVA de una vía y post-test de Tukey para comparaciones múltiples; $n = 3-6$).

La expresión de miR-1-3p, miR-133-3p y miR-499-5p en los ratones SAMR1 y SAMP8 disminuyó significativamente a las 24 horas de la cirugía sham ($p < 0.05$). En el caso del miR-1-3p y del miR-133-3p en los ratones SAMR1, también disminuye su expresión a las 4 horas de manera significativa ($p < 0.001$). Si bien la expresión de miR-208-3p muestra una tendencia a disminuir su expresión, sus cambios no son significativos. Estos resultados indican que antes de que se genere una isquemia miocárdica, el propio procedimiento quirúrgico genera un cambio en el perfil sérico de algunos de los miRNAs descritos previamente como biomarcadores de IAM.

Debido al efecto observado del procedimiento quirúrgico Sham, para analizar el efecto del infarto sobre la expresión de miRNAs se compararon los valores de su expresión en el grupo de ratones infartados (IAM) a los tres tiempos de sacrificio realizados (**Figura 11**). Los respectivos grupos sham sacrificados al mismo tiempo se normalizaron a 1 y están representados como una línea discontinua. Las diferencias de expresión de los miRNAs en los ratones IAM a diferentes tiempos de sacrificio están expresados en la **Tabla 7**.

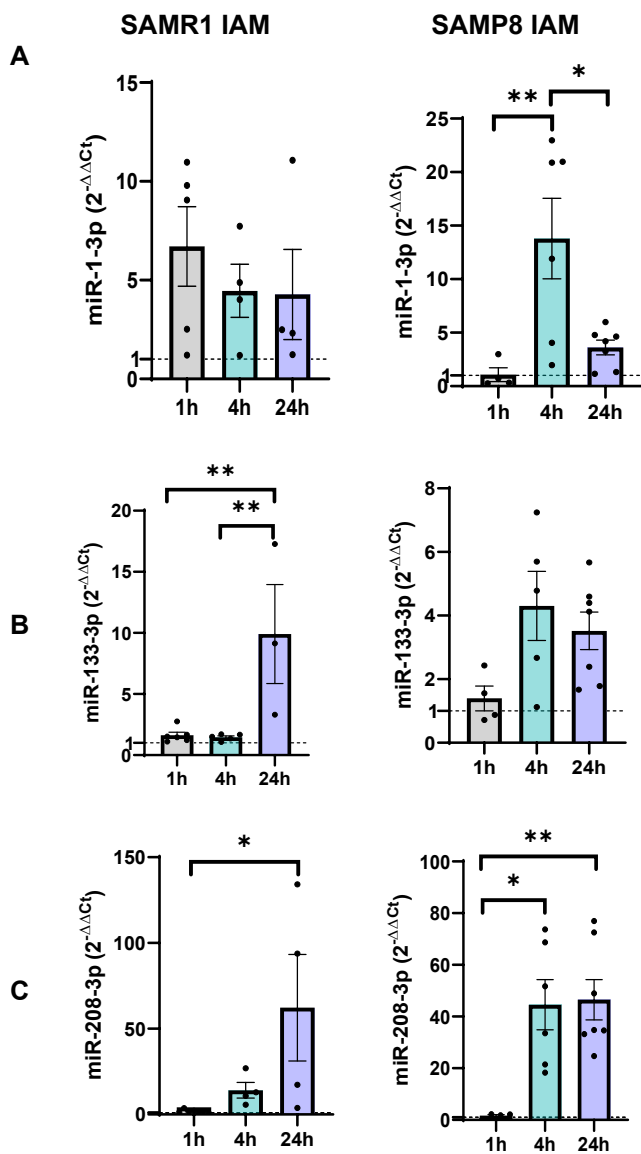
En ratones SAMR1, la expresión de miR-1-3p no varió en los tres tiempos analizados después del infarto y se mantuvo por encima del grupo Sham de manera constante (**Figura 11A**). En los ratones senescentes SAMP8, no se observaron diferencias con el grupo Sham en la expresión de miR-1-3p a 1 hora después del infarto, pero sí aumentó a las 4 horas y en menor medida a las 24 horas. Además, el aumento de su expresión a las 4 horas comparado con su expresión a 1 hora es significativo ($p < 0.01$), y la su disminución entre las 4 y 24 horas también ($p < 0.05$).

Respecto a la expresión del miR-133-3p en los ratones SAMR1 (**Figura 11B**), se observaron diferencias en el grupo infartado tras 24 horas comparado con el valor del grupo Sham, mientras que en la evolución temporal se vieron cambios significativos del grupo de 1 y 4 horas, con el grupo de 24 horas ($p < 0.01$). En los ratones SAMP8 se aprecia como a las 4 horas empieza a aumentar la expresión del miR tras el infarto comparado con los grupos Sham, mientras que no se detectan cambios significativos en la evolución temporal de su expresión.

De manera similar a la expresión del miR-133-3p, el aumento del miR-208-3p respecto al valor de los grupos Sham también se comenzó a detectar a partir de las 4 horas después del infarto en ratones SAMR1, mientras que el grupo infartado de 24 horas presenta un aumento significativo respecto del grupo de 1 hora ($p < 0.05$) (**Figura 11C**). En el caso de los SAMP8, también aumenta su expresión tras el infarto respecto a los ratones Sham en los grupos 4 y 24 horas, mostrando ambos cambios significativos respecto a la expresión a 1 hora ($p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente).

La expresión del miR-499-5p también aumentó mayoritariamente a partir de las 4 horas en todos los grupos después de la cirugía de IAM respecto a los grupos Sham (**Figura 11D**). En SAMR1 este aumento fue máximo a las 24 horas después del infarto, comparado con el grupo de 1 hora fue un cambio significativo ($p < 0.05$) y, en SAMP8 el aumento máximo también fue a las 24 horas, este aumento fue significativo comparado con el grupo de 1 hora ($p < 0.001$) y de 4 horas (0.01).

Con base a estos resultados, se estableció un tiempo óptimo de sacrificio a las 4 horas para la toma de muestras y estudio de los miRNAs, al ser el tiempo más cercano al momento agudo del infarto y en el que más diferencias comienzan a observarse respecto a los grupos control, especialmente, en SAMP8. Se descartó el tiempo de sacrificio de 1 hora tras la operación por los escasos cambios en la expresión de los miRNAs, y el tiempo de 24 horas por presentar una menor cantidad de miRNAs circulantes. Esta disminución con el paso del tiempo tras la cirugía puede apreciarse en la **Figura 10**.



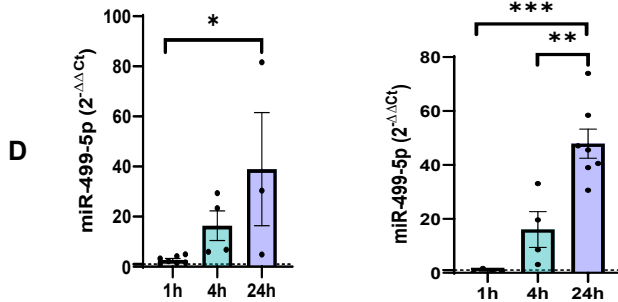


Figura 11. Niveles de expresión de los miRNAs biomarcadores de infarto de los grupos IAM sacrificados a las 1, 4 y 24 horas después de la cirugía. Comparación de la expresión de miRNAs circulantes en muestras de suero de ratones SAMR1 y SAMP8 en los grupos IAM. La línea discontinua indica el valor de los grupos control Sham normalizados al valor 1. Los resultados se muestran como media $\pm$ SEM, representando el valor de expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) calculado respecto a su grupo control sham. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ (ANOVA de una vía y post-test de Tukey para comparaciones múltiples; $n = 3-6$).

	1 h	4h	24h	p -valor	
miR-1 R1 media ± SEM	6,711 ± 2,012	4,459 ± 1,346	4,277 ± 2,280	1-4 1-24 4-24	0,6960 0,6566 0,9978
miR-1 P8 media ± SEM	1,069 ± 0,6466	13,79 ± 3,761	3,617 ± 0,6877	1-4 1-24 4-24	0,0097 0,7574 0,0157
miR-133 R1 media ± SEM	1,628 ± 0,2414	1,462 ± 0,1167	9,907 ± 4,048	1-4 1-24 4-24	0,9955 0,0067 0,0073
miR-133 P8 media ± SEM	1,395 ± 0,3897	4,302 ± 1,086	3,518 ± 0,5905	1-4 1-24 4-24	0,0679 0,1697 0,7310
miR-208 R1 media ± SEM	1,887 ± 0,3391	14,10 ± 4,544	62,27 ± 31,10	1-4 1-24 4-24	0,8123 0,0247 0,1179
miR-208 P8 media ± SEM	1,611 ± 0,4383	44,57 ± 9,720	46,53 ± 7,783	1-4 1-24 4-24	0,0114 0,0069 0,9824
miR-499 R1 media ± SEM	2,697 ± 0,5660	16,38 ± 5,899	38,97 ± 22,57	1-4 1-24 4-24	0,4629 0,0325 0,2626
miR-499 P8 media ± SEM	0,7023 ± 0,3332	16,10 ± 6,629	47,89 ± 5,405	1-4 1-24 4-24	0,2111 0,0001 0,0033

Tabla 7. Comparación de los niveles de expresión de los miRNAs biomarcadores de infarto de los grupos IAM sacrificados tras 1, 4 y 24 horas de la cirugía.

Comparación de la expresión de miRNAs circulantes en muestras de suero de ratones SAMR1 y SAMP8, en los grupos IAM. Los resultados se muestran como media ± SEM, representando el valor de expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) calculado respecto a su grupo control sham (ANOVA de una vía y post-test de Tukey para comparaciones múltiples; n = 3-6).

4.2. ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE miRNAs EN SUERO DE RATONES SAMR1/SAMP8 TRAS UN IAM

Una vez establecido el tiempo óptimo después del infarto para estudiar la expresión de miRNAs, analizamos el perfil de expresión diferencial de miRNAs circulantes tras un IAM en el modelo murino SAMR1/SAMP8, machos y hembras, 4 horas después de la cirugía. Para ello se utilizó la tecnología de microRNAseq Illumina NextSeq550 (NGS), tal como se ha descrito anteriormente en Materiales y Métodos. Los grupos a estudio están descritos en la **Tabla 8**.

En los siguientes apartados se amplía el resultado del análisis mediante secuenciación, comparando el número de miRNAs diferencialmente expresados según el algoritmo utilizado para su obtención, además del análisis detallado de los miRNAs obtenidos mediante DESeq2 en la comparación de los ratones IAM vs Sham, en los 4 grupos de ratones a estudio: machos y hembras, SAMR1 y SAMP8.

Animales	Cirugía	Sexo	Cepa	Sacrificio
6	Sham	Macho	SAMR1	4 horas
6	IAM			
6	Sham	Hembra		
6	IAM			
6	Sham	Macho	SAMP8	4 horas
6	IAM			
6	Sham	Hembra		
6	IAM			

Tabla 8. Grupos de estudio para el análisis del perfil de expresión de miRNAs mediante NGS. Los ratones se dividieron en 8 grupos de estudio (n = 6). Los ratones SAMR1 y SAMP8, machos y hembras, fueron sometidos a cirugías de IAM y control (Sham), y el sacrificio y toma de muestras se realizó transcurridas 4 horas.

En este análisis se describe en primer lugar los miRNAs diferencialmente expresados obtenidos para cada grupo, y seguidamente se realiza un análisis bioinformático de enriquecimiento funcional, con el objetivo de identificar aquellas rutas biológicas en las que están implicados los miRNAs afectados tras un IAM, para ello se describen las rutas KEGG y los términos GO que incluyen genes diana de los miRNAs.

4.2.1. miRNAs DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN EL MODELO MURINO SAMR1/SAMP8

Dependiendo del algoritmo utilizado para el análisis de miRNAs diferencialmente expresados tras la secuenciación, edgeR, limma, voom o DESeq2, obtenemos un resultado diferente en el número de miRNAs modificados en el perfil de expresión de miRNAs tras un IAM con un p-valor de corte de 0.1 (**Tabla 9**). Tras analizar el resultado de cada uno de ellos, que, sin ser excluyentes, aportan información complementaria, en el análisis de secuenciación seguimos adelante con DESeq2, puesto que es el algoritmo que más miRNAs diferencialmente expresados aporta por cada comparación, seguido por edgeR.

El análisis de expresión diferencial mediante DESeq2 permite un mejor estudio funcional al contar con 93 miRNAs en el caso de los ratones SAMR1 machos y 9 miRNAs en las hembras, mientras que en los ratones SAMP8 son 13 miRNAs en los machos y 19 miRNAs en las hembras. En el **Anexo 8.1**, se pueden encontrar las tablas de miRNAs diferencialmente expresados mediante el análisis DESeq2 (**Tabla 11**), al igual que las referentes al análisis edgeR (**Tabla 12**), limma (**Tabla 13**) y voom (**Tabla 14**).

	Número de miRNAs diferencialmente expresados			
INFARTO IAM vs sham	edgeR	DESeq2	limma	voom
R1 Machos	8	93	1	12
R1 Hembras	9	9	2	2
P8 Machos	1	13	0	2
P8 Hembras	5	19	2	3

Tabla 9. Número de miRNAs diferencialmente expresados en ratones SAMR1/SAMP8 tras un IAM mediante la utilización de diferentes algoritmos de análisis. Los diferentes métodos de análisis son edgeR, DESeq2, limma y voom. La variable a estudio en estas comparaciones es el infarto, donde se estudian los miRNAs diferencialmente expresados entre los grupos IAM y sham de los ratones SAMR1 machos (n = 6) y hembras (n = 6), y SAMP8 machos (n = 6) y hembras (n = 6). En todos los casos se ha utilizado un p-valor de corte de $p < 0.1$.

4.2.2. ENRIQUECIMIENTO FUNCIONAL DE LOS miRNAs DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS TRAS EL ANÁLISIS MEDIANTE DESeq2

Existe una gran diferencia entre el número de miRNAs diferencialmente expresados entre los diferentes grupos de ratones a estudio cuando se utiliza el método DESeq2, desde 93 miRNAs en el caso de SAMR1 machos hasta 9 miRNAs en SAMR1 hembras (**Tabla 9**). Para interpretar estas diferencias se realizó un examen de Análisis de Componentes Principales (PCA de sus siglas en inglés), una técnica de análisis multivariante que permite reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos, lo que significa prescindir de las variables menos importantes. Para ello, el PCA crea nuevas variables llamadas “componentes principales” a partir de una combinación lineal de variables originales y cada una representa una dirección en el espacio de datos, de manera que a mayor porcentaje de varianza de una variable mejor capacidad tiene de explicar el comportamiento de las muestras.

En el PCA se observa que los ratones SAMR1 machos son aquellos dónde se ha producido una mayor separación entre los grupos IAM y sham, por lo que es el grupo de ratones con más miRNAs diferencialmente expresados (**Figura 12A**), mientras que los SAMR1

hembras, junto con los SAMP8 muestran una peor separación de muestras (**Figura 12B, 7C y 7D**).

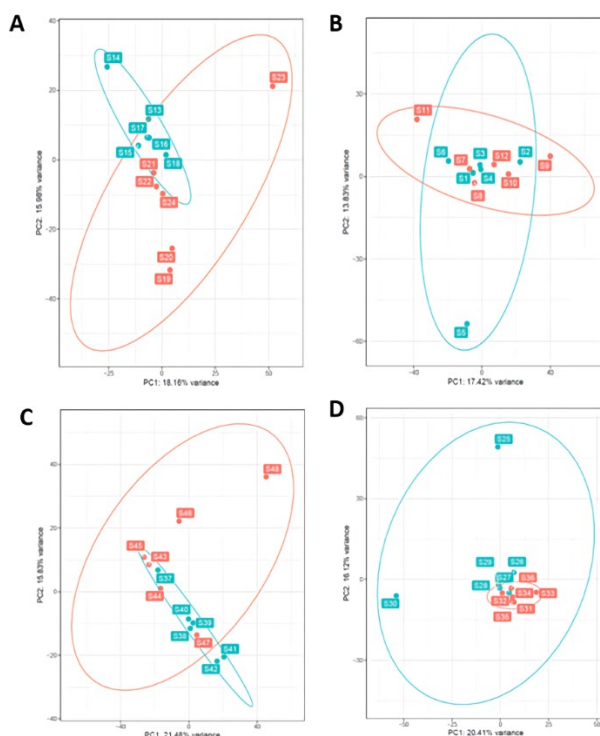


Figura 12. Análisis de Componentes Principales (PCA) de los ratones SAMR1 y SAMP8, machos y hembras, sometidos a cirugías de IAM y control (Sham). Los puntos hacen referencia a cada muestra con su número identificativo de la secuenciación; aquellas en color azul equivalen a las muestras del grupo control sham, mientras que los puntos rojos corresponden a los ratones del grupo IAM. **(A)** Ratones SAMR1. **(B)** Ratones SAMR1. **(C)** Ratones SAMP8. **(D)** Ratones SAMP8.

En la comparación de grupos IAM vs Sham en el grupo de ratones SAMR1 machos se obtienen 93 miRNAs diferencialmente expresados ($p < 0.1$), 54 están significativamente sobreexpresados y 39 están infraexpresados en el grupo IAM respecto al grupo control. Se puede observar su cambio en cuanto a su número de lecturas normalizadas en su representación mediante el gráfico tipo *Heatmap* (**Figura 13A**), en la **Figura 13B** se representan los 10 primeros miRNAs más aumentados y los 10 más disminuidos en cuanto a su valor de *foldchange*.

Entre los miRNAs más sobre expresados se encuentran el miR-6383, el miR-6965-3p y el miR-742-3p. En este grupo de miRNAs diferencialmente expresados también destaca el miR-499-5p, siendo el octavo miRNA más aumentado en este grupo de ratones, además aparece sobreexpresado en los 4 grupos de ratones cuyo cambio de expresión es el más significativo y que ya está establecido como uno de los biomarcadores típicos de IAM. Mientras que entre los miRNAs más infraexpresados están el miR-6939-3p, el miR-1929-5p, y el miR-6962-3p.

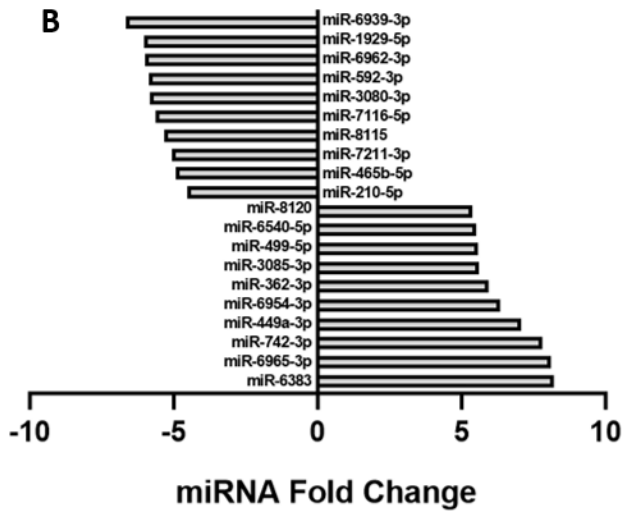
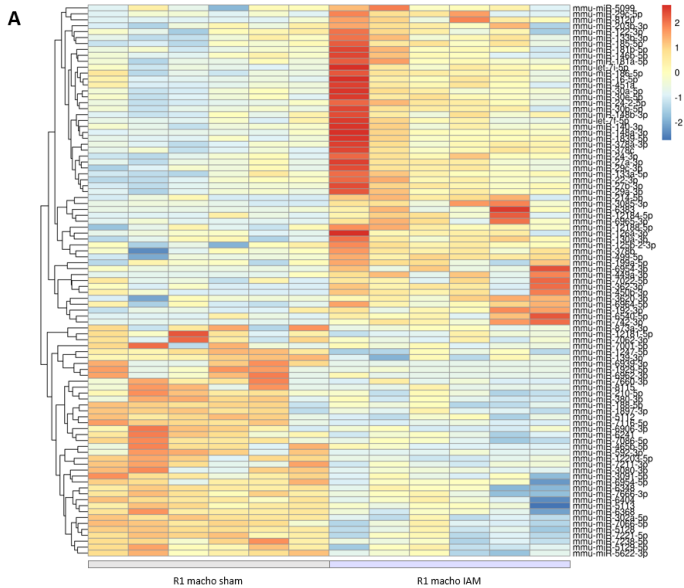


Figura 13. Distribución de los miRNAs diferencialmente expresados en el grupo SAMR1 macho mediante el análisis DESeq2. (A) *Heatmap* que muestra las lecturas normalizadas de los 93 miRNAs diferencialmente expresados en la comparación de los grupos IAM vs Sham, siendo el color rojo representativo de un mayor número de lecturas y el azul de un número menor. (B) Gráfico de barras según el *foldchange* de los 10 miRNAs más sobre expresados y los 10 más infra expresados, representado como el cambio de expresión del miRNA respecto al grupo sham.

Con el fin de abordar las implicaciones funcionales de los miRNAs diferencialmente expresados en el grupo de ratones SAMR1 machos, utilizamos la herramienta bioinformática en línea miRwalk para identificar los procesos biológicos claves que subyacen al IAM. Esta herramienta proporciona los genes diana de los miRNAs estudiados y transforma la información a rutas KEGG y términos GO, señalando las vías fisiológicas afectadas de manera significativa ($p < 0.5$) por el cambio de expresión de estos miRNAs tras un infarto.

El análisis de rutas KEGG (**Figura 14A**) reveló las rutas con un mayor ratio de genes diana respecto al número total de genes implicados fueron la 'ruta de señalización ErbB', la 'ruta de resistencia al inhibidor de la tirosina quinasa EGFR' y la 'ruta de señalización FoxO'. Por otro lado, las dos rutas con más cantidad de genes diana para los miRNAs afectados por el IAM, un

total de 70, fueron procesos relacionados con la 'ruta de señalización de las MAPK' y la 'ruta de señalización PI3-Akt'. Paralelamente, cuando se utiliza el análisis de los términos GO asociados a estos miRNAs diferencialmente expresados (**Figura 14B**), es la Fosforilación de proteínas la de mayor cantidad de genes diana implicados, con un total de 160, seguida de la Fosforilación, el Desarrollo del sistema nervioso, la Regulación de la expresión génica, la Regulación negativa de la proliferación celular y la Regulación positiva de la expresión génica.

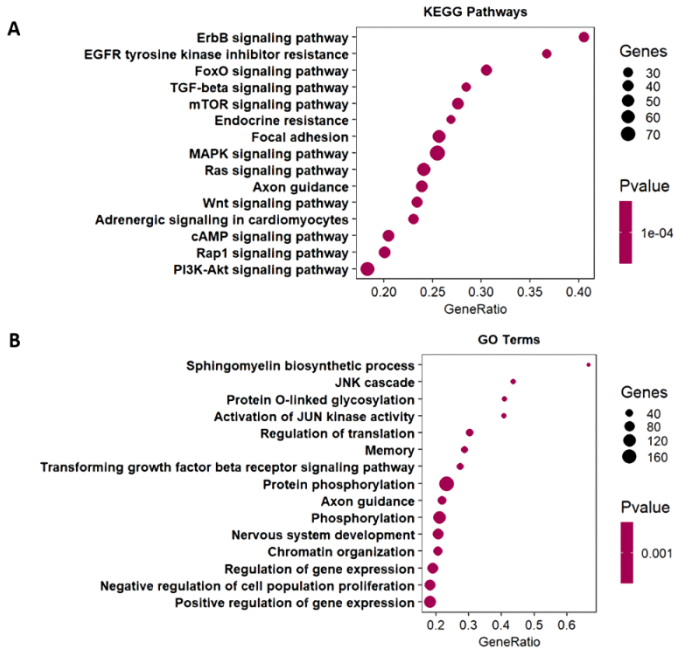


Figura 14. Resultados del análisis funcional mediante las rutas KEGG y los términos GO de los 93 miRNAs diferencialmente expresados por el método DESeq2 en los ratones SAMR1 macho, en los grupos IAM vs sham. Se representan las 15 rutas KEGG (**A**) y los 15 términos GO (**B**) más significativamente asociados a los 93 miRNAs diferencialmente expresados tras el análisis DESeq de los ratones SAMR1 machos, en la comparación de IAM vs sham. El color de los puntos viene definido por su valor de asociación estadística (p-valor), el tamaño de los puntos indica el número de genes implicados en esa ruta, y su posición en el eje X es la ratio de genes implicados en esa ruta que son diana de los miRNAs respecto al total de genes de esa ruta.

Como términos GO con mayor ratio de genes implicados respecto del total de su ruta aparecen: el Proceso biosintético de la esfingomielina, la Cascada JNK, o-Glicosilación de la proteína y Activación de la actividad kinasa de JUN.

Tras el análisis DESeq2, el grupo de las ratonas SAMR1 cuenta con 9 miRNAs sobre expresados en el grupo IAM vs sham. En la figura **Figura 15A** se representan las lecturas normalizadas de los estos miRNAs en la comparación de grupos IAM y sham, mientras que en la **Figura 15B** se puede observar su cambio en cuanto a *foldchange*, es decir el número de veces que aumenta su expresión en el grupo IAM respecto al Sham. El miR-3086 y el miR-879 son aquellos con un cambio de expresión mayor, mientras que el menor aumento significativo lo realiza el miR-149-5p con un incremento de 1,5 ($\log_2$ del *foldchange*). De igual manera ocurre con el miR-499-5p que vuelve a aparecer sobre expresado en el suero de las ratonas con IAM, coincidiendo con su característica de biomarcador de IAM previamente descrito en el apartado de Introducción.

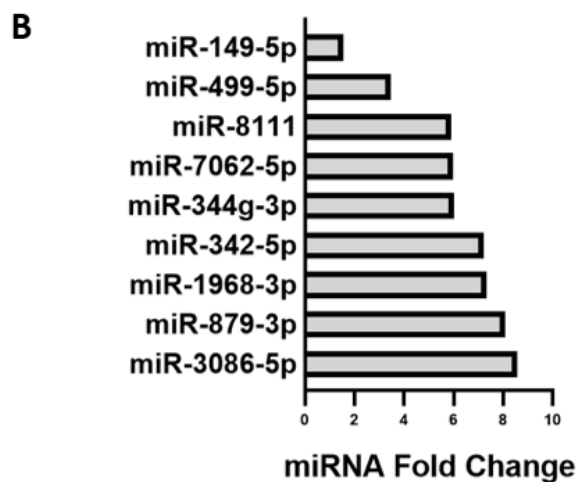
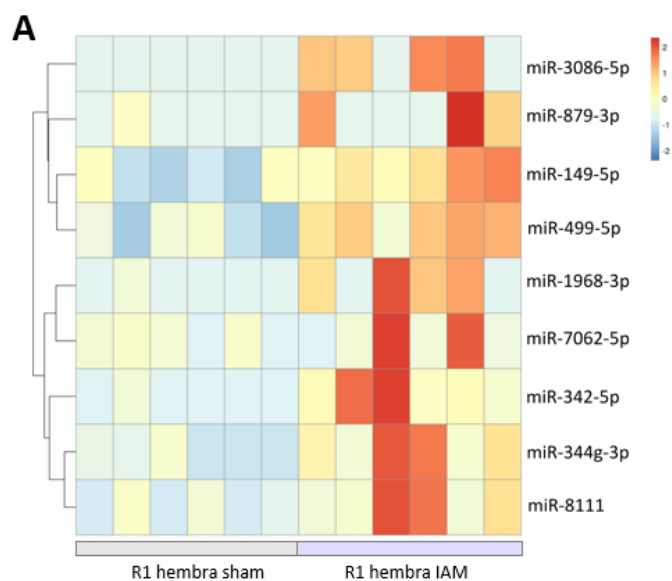


Figura 15. miRNAs diferencialmente expresados en las ratonas SAMR1 tras el análisis DESeq2, en la comparación de los grupos IAM vs sham. (A) *Heatmap* que muestra las lecturas normalizadas de los 9 miRNAs diferencialmente expresados en la comparación de los grupos IAM vs Sham, siendo el color rojo representativo de un mayor número de lecturas y el azul de un número menor. **(B)** Gráfico de barras según el *foldchange* de los 9 miRNAs sobre expresados en las ratonas SAMR1, en la comparación IAM vs sham, representado como el cambio de expresión del miRNA respecto al grupo sham.

El análisis funcional de los 9 miRNAs diferencialmente expresados en las ratonas SAMR1 hembras dio lugar a 2 rutas KEGG asociadas de manera significativa a los genes diana de estos miRNAs: la 'ruta de señalización de las MAPK', con 5 genes, y rutas relacionadas con el 'cáncer', con 9 genes. En cuanto a sus términos GO asociados se obtuvieron 42 resultados, de los cuales se muestran los 15 más significativos en la **Figura 16**. El resto de los términos GO aparecen en la **Tabla 17** del **Anexo 8.2**.. Entre los términos GO con un mayor número de genes implicados se encuentra la 'Regulación negativa de la transcripción', seguida de la 'Fosforilación de proteínas'. Mientras que aquellos con una ratio mayor de genes implicados respecto a los de la ruta son: el 'Proceso catabólico del colágeno', la 'Ruta de señalización apoptótica intrínseca en respuesta a estrés del retículo endoplásmico' y el 'Compromiso de destino celular'.

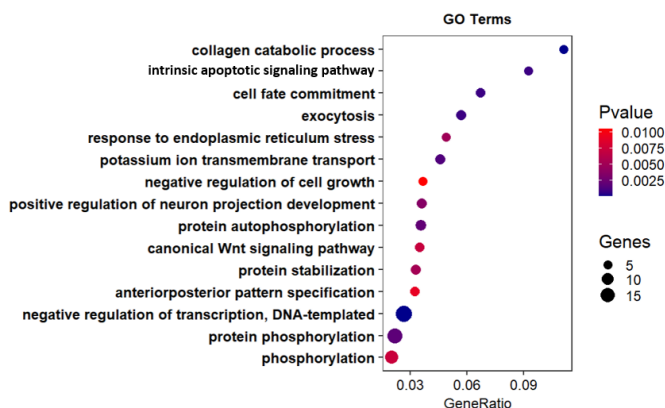


Figura 16. Resultados del análisis funcional mediante los términos GO de los 9 miRNAs diferencialmente expresados del método DESeq2 en las ratonas SAMR1, en los grupos IAM vs sham. Se representan los 15 términos GO más significativamente asociados a los 9 miRNAs diferencialmente expresados tras el análisis DESeq2 de las ratonas SAMR1, en la comparación IAM vs sham. El color de los puntos viene definido por su valor de asociación estadística (p-valor), el tamaño de los puntos indica el número de genes implicados en esa ruta y su posición en el eje X es la ratio de genes implicados en esa ruta que son diana de los miRNAs respecto al total de genes de esa ruta.

Para analizar las diferencias de sexo en la regulación de miRNAs en SAMR1 tras un IAM, se realizó un estudio de contraste complejo 2 vs. 2 de los ratones SAMR1 machos y hembras, comparando las tendencias de expresión de los miRNAs tras un IAM, esto permite estudiar la interacción de dos variables a la vez, el sexo y el infarto, y se obtuvieron 14 miRNAs diferencialmente expresados (**Figura 17**). Este resultado indica que la tendencia de expresión de los miRNAs tras un IAM es opuesta en los machos y las hembras SAMR1. Por ejemplo, el miR-3086-5p, disminuye su expresión tras un IAM en los ratones macho, mientras que en las hembras aumenta. Esta misma tendencia la siguen en total 9 miRNAs, mientras que 5 miRNAs aumentan su expresión en el grupo de machos con IAM y disminuyen en hembras tras el IAM.

En cuanto al resultado de su análisis funcional, las rutas con mayor ratio de genes implicados respecto a su total son la 'ruta de regulación de la longevidad' y la 'ruta de señalización FoxO'. Las rutas KEGG con mayor número de genes implicados están relacionadas con la 'Guía axonal', la 'Ruta de señalización del AMPc', y la 'ruta de señalización Ras', la 'ruta de señalización Rap1' y la 'ruta de señalización de MAPK' (**Figura 18A**). Los términos GO con mayor número de genes diana son la Regulación positiva de la transcripción, seguida de la

Angiogénesis y la Fosforilación de peptidil-serina. La Activación dependiente de calcio de la fusión de vesículas sinápticas es el término con un mayor ratio génico (**Figura 18B**).

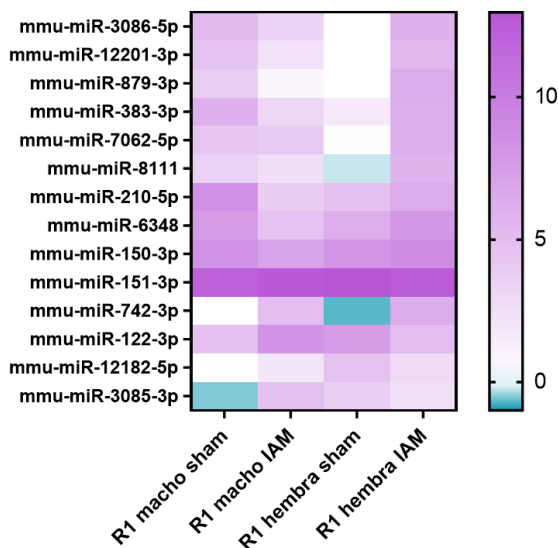


Figura 17. miRNAs diferencialmente expresados en los ratones SAMR1 machos y hembras tras una comparación 2vs2 mediante DESeq2 de los grupos IAM vs sham. Mediante un *heatmap* se visualizan los cambios de expresión de los 14 miRNAs con tendencias de expresión opuestas tras un IAM en machos y hembras de ratones SAMR1. El aumento en la expresión está indicado con el color morado y el color azul indica la disminución en la expresión. La expresión de 9 miRNAs disminuye tras un IAM en los ratones macho y aumenta en las hembras con IAM. Por otro lado, 5 miRNAs aumentan su expresión en los ratones macho con IAM y en hembras con IAM disminuye.

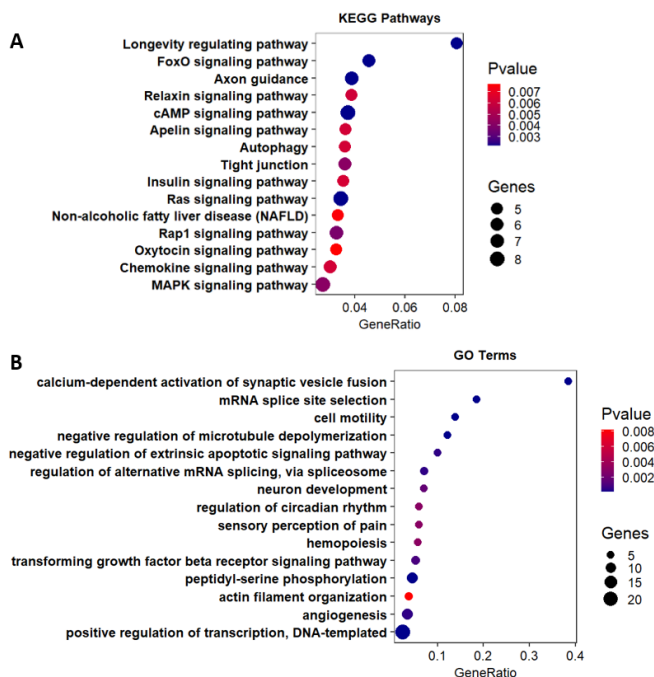


Figura 18. Resultados del análisis funcional mediante rutas KEGG y términos GO de los 14 miRNAs diferencialmente expresados en los ratones SAMR1 machos y hembras mediante un análisis 2vs2 mediante DESeq2 de los grupos IAM vs sham. Se representan las 15 rutas KEGG (A) y los 15 términos GO (B) más significativamente asociados a los 14 miRNAs diferencialmente expresados tras el análisis DESeq de los ratones SAMR1 machos y hembras, en la comparación de IAM vs sham. El color de los puntos viene definido por su valor de asociación estadística (p-valor), el tamaño de los puntos indica el número de genes implicados en esa ruta y su posición en el eje X es la ratio de genes implicados en esa ruta que son diana de los miRNAs respecto al total de genes de esa ruta.

En cuanto a los datos del grupo de ratones SAMP8, tras el análisis DESeq2 existe un número similar de miRNAs diferencialmente expresados en machos y hembras, 13 y 19, respectivamente (**Tabla 9**). En el caso de los 13 miRNAs diferencialmente expresados en los ratones SAMP8 se puede visualizar su número de lecturas normalizadas en la **Figura 19A**, mientras que los cambios relativos a su expresión en forma de *foldchange*, es decir, el número de veces que aumenta o disminuye su expresión respecto al grupo control se representa en la **Figura 19B**. De los 13 miRNAs cambiados, 10 están disminuidos, mientras que otros 3 miRNAs están aumentados en el grupo IAM. Entre los miRNAs más infraexpresados se encuentran el miR-99a-3p, el miR-12187-5p y el miR-6715-3p. Los más sobreexpresados son el miR-9768-5p, el miR-499-5p y el miR-30e-3p.

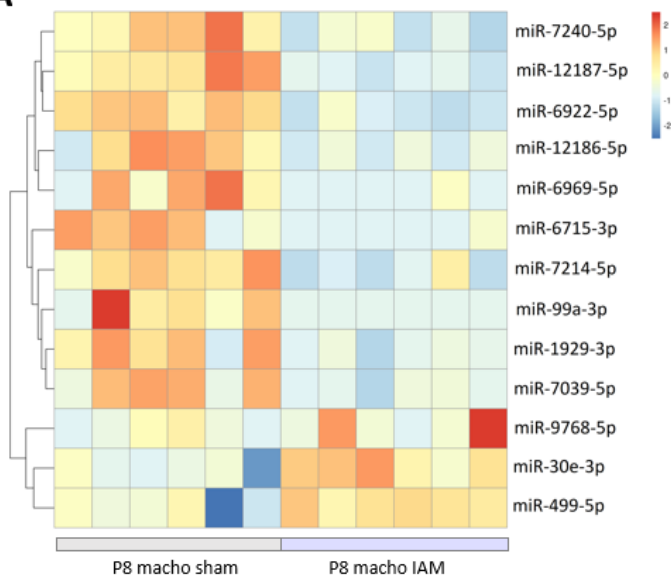
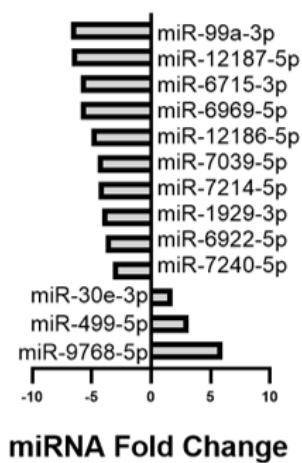
A**B**

Figura 19. miRNAs diferencialmente expresados en los ratones SAMP8 macho tras el análisis DESeq2, en la comparación de los grupos IAM vs sham. (A) *Heatmap* que muestra las lecturas normalizadas de los 13 miRNAs diferencialmente expresados en la comparación de los grupos IAM vs Sham, siendo el color rojo representativo de un mayor número de lecturas y el azul de un número menor. **(B)** Gráfico de barras según el *foldchange* de los 10 miRNAs infra expresados y los 3 miRNAs sobre expresados en el grupo IAM vs sham, representado como el cambio de expresión del miRNA respecto al grupo sham.

El análisis funcional de los 13 miRNAs diferencialmente expresados en el caso de los ratones SAMP8 macho fue infructuoso mediante el uso de la herramienta miRwalk para las rutas KEGG, mientras que los términos GO obtenidos dan como único resultado la Regulación de la transcripción ($p < 0.05$). Este escaso resultado puede deberse a los pocos miRNAs analizados con esta herramienta.

En el caso de las ratonas SAMP8, tras el análisis DESeq2 el resultado fue 19 miRNAs diferencialmente expresados, de los que 5 estaban infraexpresados y 14 sobreexpresados en el grupo IAM vs sham (**Figura 20**), en el apartado **(A)** se representan el número de lecturas normalizadas de cada miRNA, mientras que en el apartado **(B)**, se muestra su cambio de expresión en *foldchange* respecto a su grupo control.

El miR-134-3p destaca por ser el miRNA con la expresión más disminuida, seguido por dos miembros de la familia del miR-200 (miR-200c-3p y miR-200b-3p) y dos de la familia del let-7 (let-7c-5p y let-7b-5p). Los miRNA más incrementados son el miR-7660-3p, el miR-342-5p, el miR-7021-5p y el miR-9-3p.

Por otro lado, su análisis funcional (**Figura 21A**) dio lugar a la 'ruta de Regulación de la longevidad' y la 'ruta de Resistencia al inhibidor de la tirosina quinasa EGFR', las cuales tienen la mayor ratio de genes diana de la ruta respecto al número de genes totales de la ruta.

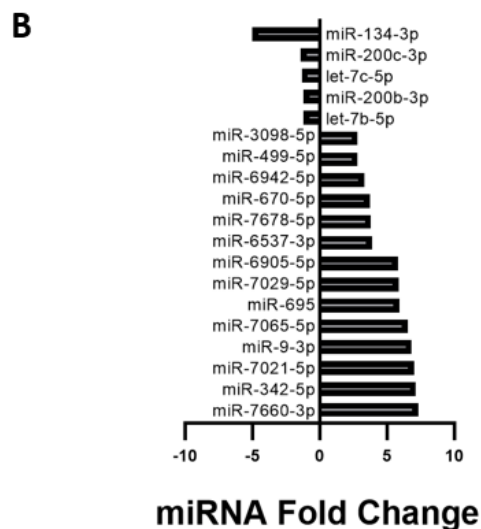
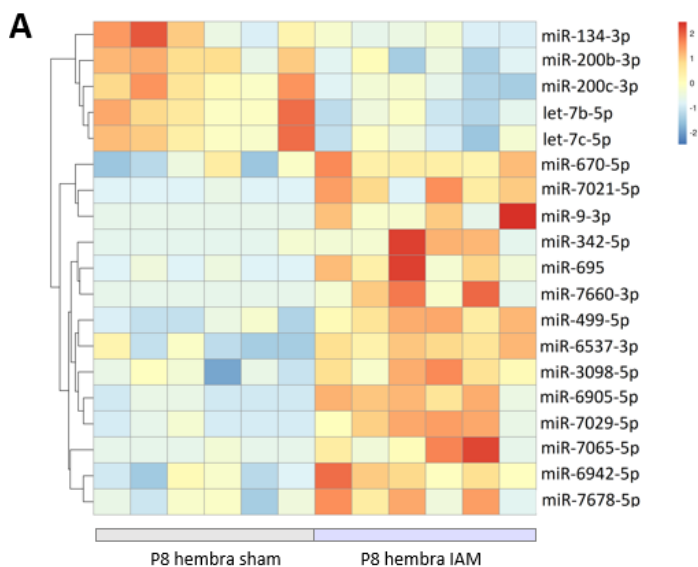


Figura 20. miRNAs diferencialmente expresados en las ratonas SAMP8 tras el análisis DESeq2, en la comparación de los grupos IAM vs sham. (A) *Heatmap* que muestra las lecturas normalizadas de los 19 miRNAs diferencialmente expresados en la comparación de los grupos IAM vs Sham, siendo el color rojo representativo de un mayor número de lecturas y el azul de un número menor. **(B)** Gráfico de barras según el *fold change* de los 14 miRNAs sobre expresados en el grupo IAM y de los 5 miRNAs infra expresados en la comparación IAM vs sham, representado como el cambio de expresión del miRNA respecto al grupo sham.

El análisis bioinformático también reveló rutas KEGG relacionadas con la ‘ruta de señalización MAPK’ con 24 genes asociados a los miRNAs que varían en el IAM, seguida por MicroRNAs en cáncer y la ‘Ruta de señalización PI3-Akt’. En cuanto a sus términos GO (**Figura 21B**), resultan interesantes los términos de ‘Regulación positiva y Regulación negativa de la transcripción’, y la ‘Regulación positiva de la expresión génica’ por tener un mayor número de genes diana implicados, 50 y 40, respectivamente, seguidos por el ‘Desarrollo del sistema nervioso’. El ‘Transporte de ceramidas’, la ‘Inserción exocítica de neurotransmisores’ y la ‘Ruta de señalización del receptor activina’ son las que mayor ratio de genes diana/genes totales tienen.

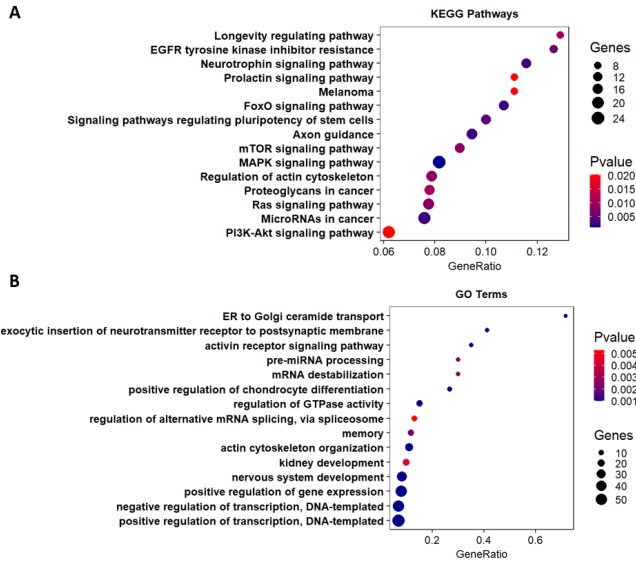


Figura 21. Resultados del análisis funcional mediante rutas KEGG y términos GO de los 19 miRNAs diferencialmente expresados en las ratonas SAMP8 de los grupos IAM vs sham. Se representan las 15 rutas KEGG (**A**) y los 15 términos GO (**B**) más significativamente asociados a los 19 miRNAs diferencialmente expresados tras el análisis DESeq2 de las ratonas SAMP8 en la comparación IAM vs sham. El color de los puntos viene definido por su valor de asociación estadística (p-valor), el tamaño de los puntos indica el número de genes implicados en esa ruta y su posición en el eje X es la ratio de genes implicados en esa ruta que son diana de los miRNAs respecto al total de genes de esa ruta.

Para analizar las diferencias de sexo en los resultados obtenidos en SAMP8, realizamos el estudio 2vs2 de los ratones macho y hembra, comparando las tendencias de expresión de los miRNAs tras un IAM. Se identificaron 30 miRNAs diferencialmente expresados (**Figura 22**). En total 6 miRNAs aumentan su expresión tras un IAM en los ratones macho mientras que en las hembras disminuye. En este grupo está incluido el miR-30e-3p que aumenta significativamente en la comparación de ratones SAMP8 macho IAM vs sham (**Figura 19**), pero no resulta alterado en las ratonas SAMP8. Por otro lado, 24 miRNAs disminuyen su expresión en el grupo de machos con IAM y en las hembras aumentan su expresión con el infarto.

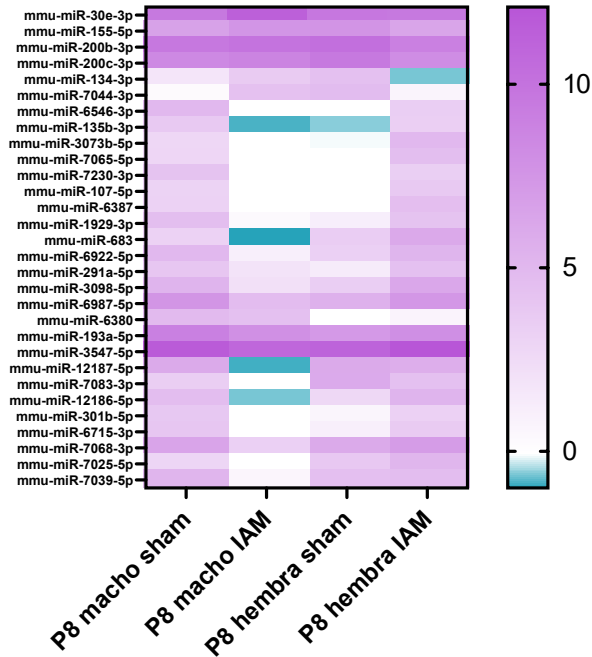


Figura 22. miRNAs diferencialmente expresados en los ratones SAMP8 machos y hembras tras una comparación 2vs2 mediante DESeq2 de los grupos IAM vs sham. Mediante un *heatmap* se visualizan los cambios de expresión de los 30 miRNAs con tendencias de expresión opuestas tras un IAM en machos y hembras de ratones SAMP8. El aumento en la expresión está indicado con el color morado y el color azul indica la disminución en la expresión. La expresión de 6 miRNAs aumenta tras un IAM en los ratones macho y disminuye en las hembras con IAM y 24 miRNAs disminuyen en los ratones macho con IAM y aumentan en hembras con IAM.

El resultado de su análisis funcional consiste en las siguientes rutas KEGG (**Figura 23A**), la 'ruta de Depresión a largo plazo', las 'Uniones tipo Gap' y la 'Regulación de la longevidad' son las rutas con mayor ratio de genes diana respecto al número total de genes de la ruta. Las rutas relevantes por contener el mayor número de genes diana están relacionadas con el 'Cáncer', con la 'Guía axonal' y con la 'Señalización de neurotrofinas'.

Sus términos GO (**Figura 23B**) con mayor número de genes diana implicados corresponden a la Regulación positiva y la Regulación negativa de la transcripción, seguida por la Regulación positiva de la expresión génica, la Regulación negativa de la proliferación celular y el Desarrollo del sistema nervioso (30 – 20 genes). La Desestabilización del RNA mensajero, la Localización del receptor de neurotransmisores y la Regulación del *splicing* de RNA mensajero son los términos con un mayor ratio de genes diana/genes totales.

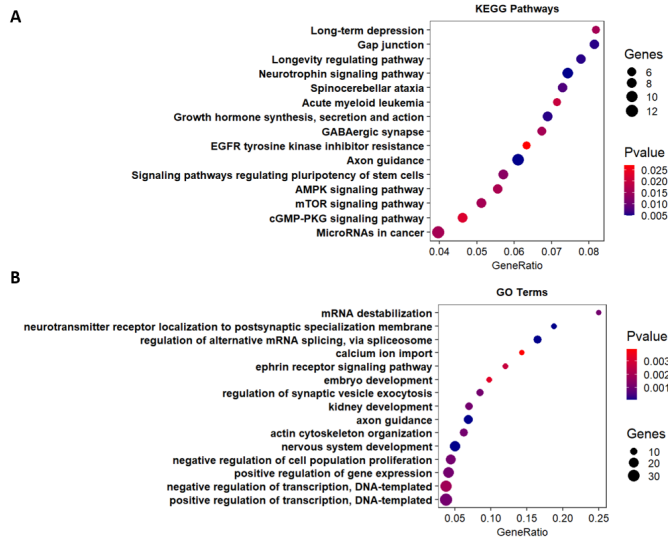


Figura 23. Resultados del análisis funcional mediante rutas KEGG y términos GO de los 30 miRNAs diferencialmente expresados en los ratones SAMP8 machos y hembras mediante un análisis 2vs2 mediante DESeq2 de los grupos IAM vs sham. Se representan las 15 rutas KEGG (**A**) y los 15 términos GO (**B**) más significativamente asociados a los 30 miRNAs diferencialmente expresados tras el análisis DESeq2 de los ratones SAMP8 machos y hembras, en la comparación de IAM vs sham. El color de los puntos viene definido por su valor de asociación estadística (p-valor), el tamaño de los puntos indica el número de genes implicados en esa ruta y su posición en el eje X es la ratio de genes implicados en esa ruta que son diana de los miRNAs respecto al total de genes de esa ruta.

4.3. IDENTIFICACIÓN DE LOS miRNAs CIRCULANTES RELACIONADOS CON EL IAM

Una vez determinado el perfil de expresión de los miRNAs en todos los grupos de estudio se procedió a la validación de aquellos miRNAs que podrían estar relacionados con el momento agudo del infarto en el modelo murino SAMR1/SAMP8. Para ello, seleccionamos un grupo de miRNAs cuya expresión se veía alterada de forma significativa en el grupo IAM respecto a su grupo control sham.

La elección de estos miRNAs se centró en aquellos que se repetían en la mayoría de los análisis (DESeq2, edgeR, limma y voom) identificando así 3 miRNAs sobre expresados (miR-30e-3p, miR-148a-3p y miR-149-5p) en el grupo IAM respecto al sham. Además, también elegimos un miRNA infra expresado (miR-423-5p) que resultó tener un cambio significativo sólo mediante el método de análisis edgeR, y así validar uno de los pocos miRNAs que cambiaban al aplicar este algoritmo.

Además, en los 4 miRNAs seleccionados (miR-30e-3p, miR-148a-3p, miR-149-5p y miR-423-5p) comprobamos la total conservación de secuencia entre las especies, de ratón y humano, por lo que además de analizar su expresión mediante qRT-PCR en el suero de ratones SAMR1/SAMP8, se pudo realizar el análisis de expresión en muestras de pacientes con IAM y en individuos control, tanto en su fracción de suero total como en su contenido en las VE. Para llevar a cabo este objetivo en primer lugar se caracterizó el correcto aislamiento de las pequeñas vesículas extracelulares mediante microscopía electrónica y mediante la detección de proteínas específicas de membrana.

Para facilitar la visualización de los resultados de los miRNAs en la secuenciación mediante el método DESeq2 y su comparación con los resultados de la qRT-PCR, se ha aplicado la fórmula de exponente al log2 (*foldchange*) o diferencia de expresión de los miRNAs diferencialmente expresados. Así los ratones sham de la secuenciación tienen un valor de 1, al igual que el valor normalizado de los ratones sham en la qRT-PCR tras el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

4.3.1. NIVELES DE EXPRESIÓN DE miRNAs EN UNA NUEVA COHORTE DE RATONES SAMR1/SAMP8

Mediante el análisis de los resultados del miR-30e-3p comparando el método de secuenciación y el de qRT-PCR (**Figura 24A** y **Figura 24B**, respectivamente), se observó una expresión similar en hembras SAMR1 mediante ambos métodos, aunque en ninguno de ellos su cambio es significativo. Sin embargo, la expresión de miR-30e-3p en el suero del grupo de ratones SAMR1 machos fue indetectable por secuenciación, mientras que mediante qRT-PCR no hubo cambios en este grupo de ratones. No obstante, si bien la secuenciación demostró un aumento significativo de expresión de 6 veces (*foldchange*) en ratones SAMP8 macho con IAM respecto a su grupo control sham ($p < 0.1$), estas diferencias no se reproducen en el análisis de qRT-PCR, donde no se detectaron cambios. Lo opuesto ocurrió en las ratonas SAMP8, donde no se observaron cambios en el análisis de secuenciación, pero se constató un incremento significativo ($p < 0.05$) del miR-30e-3p en el grupo con IAM por qRT-PCR.

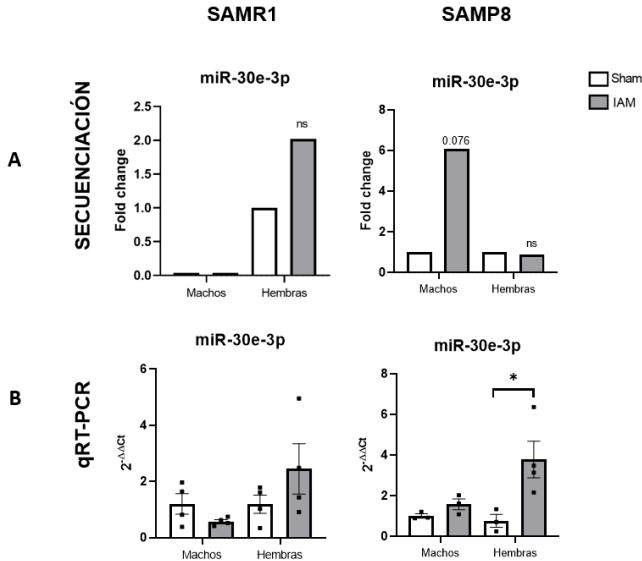


Figura 24. Análisis de expresión de miR-30e-3p en suero de ratones y ratonas SAMR1/SAMP8 en los grupos IAM vs sham, mediante (A) la técnica de análisis de secuenciación y (B) qRT-PCR. (A) Se muestran los resultados de la secuenciación con los cambios de expresión representados como *foldchange*, con los valores de los ratones sham normalizados a 1. **(B)** Resultados de la qRT-PCR, representando el valor de expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) calculada respecto al grupo control sham. La comparación de medias se realizó mediante la prueba t de Student (* $p < 0.05$). Secuenciación (n = 6), qRT-PCR (n = 3 - 4).

En cuanto al miR-148a-3p, los resultados obtenidos en la secuenciación (**Figura 25A**) indicaron un aumento significativo de su expresión en el grupo de los ratones SAMR1 macho con infarto ($p < 0.1$), mientras que no hubo cambios en las ratonas SAMR1. Sin embargo, el análisis por qRT-PCR reveló un resultado opuesto y significativo ($p < 0.05$) para los ratones SAMR1, y tampoco aparecieron cambios en las ratonas SAMR1 (**Figura 25B**). En los ratones SAMP8, machos y hembras, no se observaron cambios significativos en el resultado de secuenciación ni mediante qRT-PCR, aunque existe cierta tendencia al aumento de expresión del miR-148a-3p tras el infarto en ratonas SAMP8 mediante la PCR, aunque no es un cambio significativo ($p = 0.191$).

En los resultados de secuenciación del miR-149-5p (**Figura 26A**) se observó un incremento significativo ($p < 0.1$) en el grupo de ratones SAMR1 hembras, con una tendencia similar, pero sin cambios significativos en el resto de los grupos con infarto, SAMR1 macho y SAMP8 machos y hembras. Esta tendencia también se observó en algunos grupos en el análisis mediante qRT-PCR (**Figura 26B**) con un aumento de expresión no significativo en el caso de las ratonas SAMR1 ($p = 0.13$), y un incremento de expresión significativo ($p < 0.01$) en las ratonas SAMP8. Si bien la tendencia de la expresión

de miR-149-5p en el resto de los grupos fue similar en el análisis de secuenciación y en la qRT-PCR, no se registraron más cambios significativos. Estos resultados implican un posible papel del sexo y la senescencia en la expresión del miR-149-5p después de un infarto agudo de miocardio.

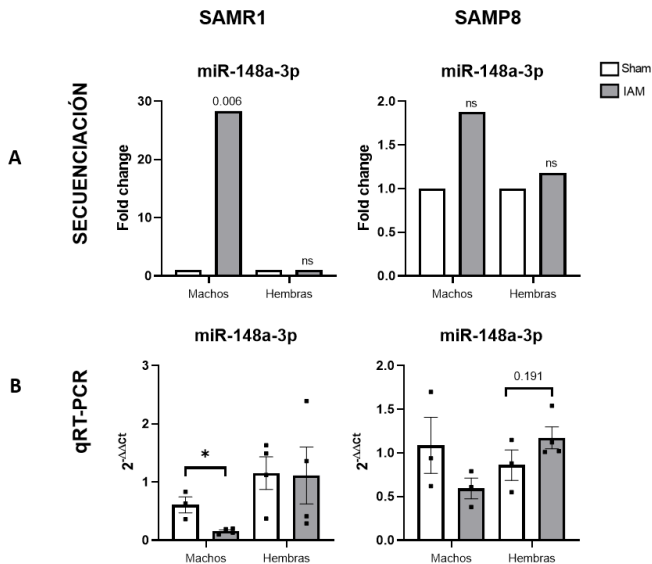


Figura 25. Análisis de expresión de miR-148a-3p en suero de ratones y ratonas SAMR1/SAMP8 en los grupos IAM vs sham, mediante (A) la técnica de análisis de secuenciación y (B) qRT-PCR. (A) Se muestran los resultados de la secuenciación con los cambios de expresión representados como *foldchange*, con los valores de los ratones sham normalizados a 1. **(B)** Resultados de la qRT-PCR, representando el valor de expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) calculada respecto al grupo

control sham. La comparación de medias se realizó mediante la prueba t de Student (* $p < 0.05$). Secuenciación (n = 6), qRT-PCR (n = 3 - 4).

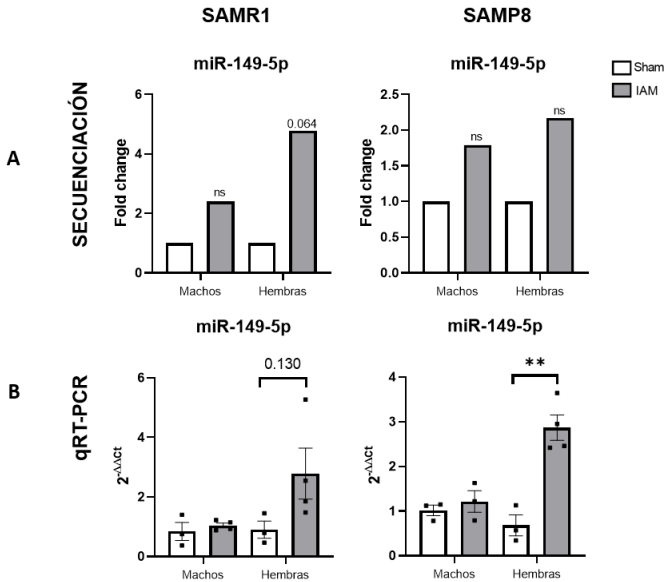


Figura 26. Análisis de expresión de miR-149-5p en suero de ratones y ratonas SAMR1/SAMP8 en los grupos IAM vs sham, mediante (A) la técnica de análisis de secuenciación y (B) qRT-PCR. (A) Se muestran los resultados de la secuenciación con los cambios de expresión representados como *foldchange*, con los valores de los ratones sham normalizados a 1. (B) Resultados de la qRT-PCR, representando el valor de expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) calculada respecto al grupo control sham. La comparación de medias se realizó mediante la prueba t de Student (** $p < 0.01$). Secuenciación (n = 6), qRT-PCR (n = 3 - 4).

Tras el estudio de los resultados de secuenciación del miR-423-5p se observa una disminución significativa ($p < 0.1$) de su expresión tras el infarto en los ratones SAMR1 macho mediante el análisis edgeR, estadística que desaparece en el análisis DESeq2 ($p = 0,129$) (**Figura 27A**). Sin embargo, mediante la técnica de qRT-PCR (**Figura 27B**), se observa una disminución en la expresión de miR-423-5p tras un infarto en los ratones SAMR1 macho ($p < 0.05$). No se registraron cambios en el resto de los grupos de ratones para la expresión circulante del miR-423-5p, por lo que podría tratarse de un miRNA cuya expresión está asociada al sexo del ratón no senescente.

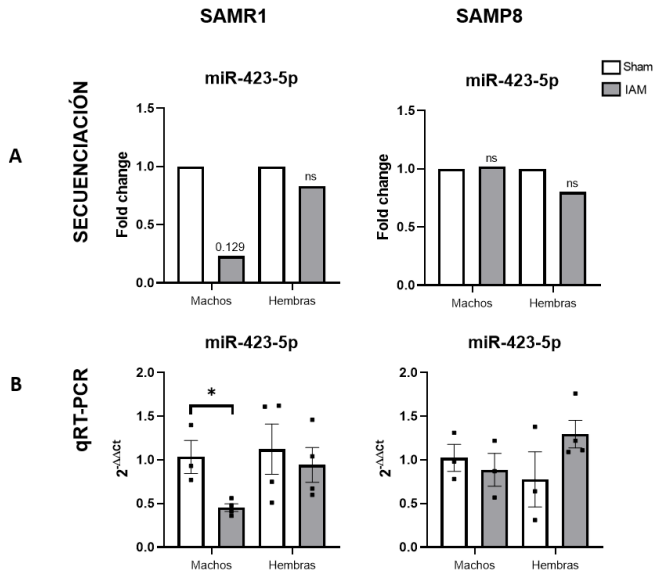


Figura 27. Análisis de expresión de miR-423-5p en suero de ratones y ratonas SAMR1/SAMP8 en los grupos IAM vs sham, mediante (A) la técnica de análisis de secuenciación y (B) qRT-PCR. (A) Se muestran los resultados de la secuenciación con los cambios de expresión representados como *foldchange*, con los valores de los ratones sham normalizados a 1. **(B)** Resultados de la qRT-PCR, representando el valor de expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) calculada respecto al grupo control sham. La comparación de medias se realizó mediante la prueba t de Student (* $p < 0.05$). Secuenciación (n = 6), qRT-PCR (n = 3 - 4).

4.3.2. ANÁLISIS DE LA CONSERVACIÓN DE SECUENCIA ENTRE ESPECIES DE LOS miRNAs

Con el objetivo de seguir estudiando los miRNAs mencionados en el apartado anterior de una manera traslacional, decidimos investigar la conservación de sus secuencias para determinar su homología con la especie humana (**Figura 28**). La información fue obtenida del repositorio online de miRNAs mirbase.org, la cual nos permitió confirmar una conservación total entre las secuencias maduras de los 4 miRNAs estudiados. La alta conservación de las secuencias de estos miRNAs nos permitió determinar su expresión en sueros de pacientes con IAM.

hsa-miR-30e-3p MIMAT0000693: CUUUCAGUCGGAUGUUUACAGC
 |||||
 mmu-miR-30e-3p MIMAT0000249: CUUUCAGUCGGAUGUUUACAGC

hsa-miR-148a-3p MIMAT0000243: UCAGUGCACUACAGAACUUUGU
 |||||
 mmu-miR-148a-3p MIMAT0000516: UCAGUGCACUACAGAACUUUGU

hsa-miR-149-5p MIMAT0000450: UCUGGCUCCGUGUCUUCACUCCC
 |||||
 mmu-miR-149-5p MIMAT0000159: UCUGGCUCCGUGUCUUCACUCCC

hsa-miR-423-5p MIMAT0004748: UGAGGGGCAGAGAGCGAGACUUU
 |||||
 mmu-miR-423-5p MIMAT0004825: UGAGGGGCAGAGAGCGAGACUUU

Figura 28. Secuencia madura de los miR-30e-3p, miR-148a-3p, miR-149-5p y miR-423-5p entre la especie *Mus musculus* y *Homo sapiens*. Las secuencias fueron obtenidas en el repositorio mirbase.org (consultada en febrero de 2023).

4.3.3. NIVELES DE EXPRESIÓN DE miRNAs EN PACIENTES CON IAM Y EN EL GRUPO CONTROL, EXPLORACIÓN DEL SUERO TOTAL Y LA FRACCIÓN EN VESÍCULAS EXTRACELULARES

En primer lugar, se llevó a cabo la medición de los miRNAs miR-30e-3p, miR-148a-3p, miR-149-5p y miR-423-5p en las muestras de los pacientes IAM y controles sanos, pero debido a que la mayoría fueron indetectables ($Ct > 35$) en el suero total se comprobó su expresión en el contenido de vesículas extracelulares (VE) aisladas del suero.

La población de estudio consta de 8 pacientes con IAM del Hospital Clínico Universitario de Valencia y 8 muestras de controles sanos obtenidas del Biobanco Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda (HUPHM)/Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro-Segovia de Arana (IDIPHISA).

En la **Tabla 10** pueden observarse las características basales de los pacientes con IAM y controles sanos. La media de edad del grupo control fue de 62.23 ± 0.83 , y la del grupo con infarto, 64.93 ± 3.32 años. En cuanto a la igualdad en el número de muestras de hombres y mujeres, en los dos grupos se cumple la equidad al 50%.

Ningún sujeto control padecía ningún factor de riesgo cardiovascular. En cuanto al grupo IAM, padecían los siguientes factores de riesgo cardiovascular: diabetes, hipertensión, hipercolesterolemia, tabaquismo y sobrepeso, considerado obesidad con un índice de masa muscular (IMC) > 30 ($n = 3$).

	Control (n = 8)	IAM (n = 8)
Edad , media $\pm$ SEM	62,23 $\pm$ 0,83	64,93 $\pm$ 3,32
Sexo , n (%)		
Hombres	50 (4)	50 (4)
Mujeres	50 (4)	50 (4)
IMC , media $\pm$ SEM	-	26,91 $\pm$ 1,18
Diabetes , n (%)	-	2 (25)
Hipertensión , n (%)	-	6 (75)
Hipercolesterolemia , n (%)	-	6 (75)
Tabaquismo , n (%)	-	4 (50)

Tabla 10. Características basales de los grupos de pacientes IAM y controles sanos a estudio. Los datos se muestran como número de individuos en cada grupo (n), porcentaje (%) o media $\pm$ error estándar de la media (SEM).

Tras el aislamiento de las VE del suero de los pacientes con IAM y de los controles sanos, se comprobó la presencia de las proteínas típicas de membrana de las pequeñas vesículas extracelulares mediante la inmunodetección de la flotilina, Tsg101 y Alix, y la ausencia de β -actina, la proteína de membrana típica de las grandes vesículas extracelulares (**Figura 29A**). La integridad y morfología de las vesículas se determinó mediante microscopía electrónica de transmisión (**Figura 29B, C, D**), donde se comprobó la presencia de estas vesículas y la preservación de su estructura.

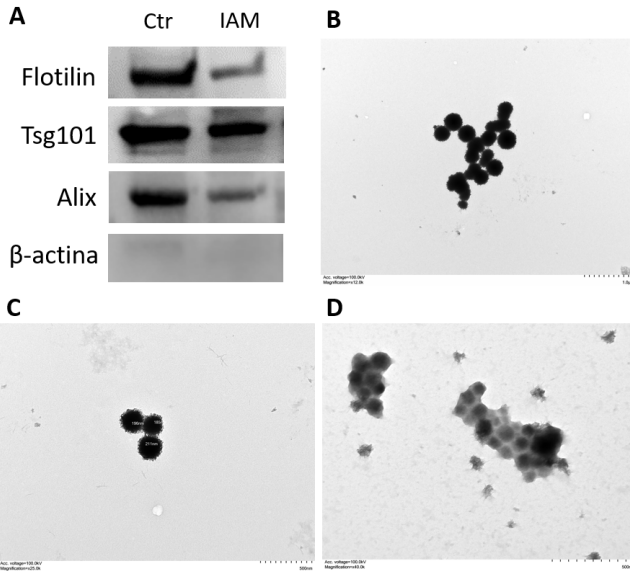


Figura 29. Caracterización de las pequeñas vesículas extracelulares. (A) Las VE aisladas de muestras de suero de individuos control y de pacientes con IAM fueron caracterizadas mediante Western Blot para determinar la presencia de las proteínas asociadas a las VE, Flotilin, Tsg101 y Alix, y la ausencia de la proteína β -actina, típica de las grandes vesículas extracelulares. (B), (C), (D) Imágenes representativas de vesículas obtenidas mediante microscopía electrónica a diferentes aumentos (x12.0k, x25.0k y x40.0k respectivamente), para el estudio de su morfología y preservación de su estructura.

Una vez caracterizadas y comprobada la morfología de las VE aisladas de suero de individuos control y pacientes con IAM, se analizó por qRT-PCR la expresión de los miR-30e-3p, miR-148a-3p, miR-149-5p y miR-423-5p. A diferencia del miR-423-5p el resto de miRNAs tuvo una expresión relativa prácticamente indetectable en suero total, ya que sus Ct en la qRT-PCR superaron los 35 ciclos. Por este motivo, en el caso del miR-30e-3p, miR-148a-3p y miR-423-5p, se presenta su expresión relativa en pacientes con IAM y controles sanos detectada solo en el contenido de las VE.

Mientras que el resultado del miR-30e-3p en la secuenciación y la obtenida por qRT-PCR en suero de ratones IAM evidenciaba un aumento en su expresión (**Figura 24**), en las VE de pacientes con IAM no se detectó ningún cambio ni en la población total (n =8, **Figura 30A**) ni en el análisis de su contenido en VE de hombres y mujeres por separado (**Figura 30B**).

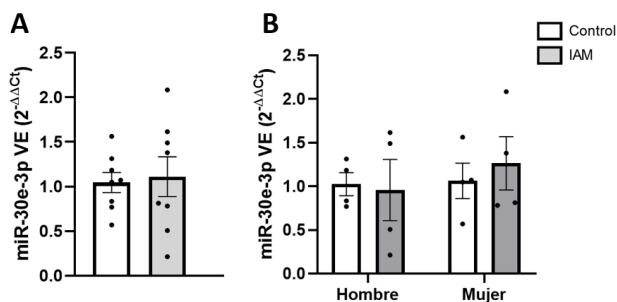


Figura 30. Expresión relativa del miR-30e-3p en vesículas extracelulares de muestras de suero de pacientes con IAM y controles sanos. Comparación de la expresión relativa del grupo de pacientes con infarto, respecto al grupo de controles sanos calculada mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (**A**) sin considerar el sexo ($n = 8$) y (**B**) separando los grupos en hombres y mujeres ($n = 4$). Los resultados se muestran como media $\pm$ SEM. La comparación de medias se realizó mediante la prueba t de Student.

En el caso del miR-148a-5p en ratones con IAM, el aumento significativo de su expresión observado en la secuenciación no se reprodujo por qRT-PCR de manera significativa (**Figura 25**). Sin embargo, en las muestras VE de pacientes con IAM se observó un aumento significativo de su expresión ($p < 0.01$) (**Figura 31A**), debido principalmente a la contribución del incremento del miR-148a-5p en las mujeres con IAM ($p < 0.01$) (**Figura 31B**).

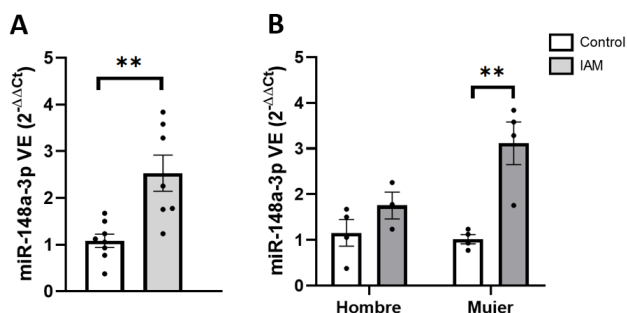


Figura 31. Expresión relativa del miR-148a-3p en vesículas extracelulares de muestras de suero de pacientes con IAM y controles sanos. Comparación de la expresión relativa del grupo de pacientes con infarto, respecto al grupo de controles sanos calculada mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (**A**) sin considerar el sexo ($n = 8$) y (**B**) separando los grupos en hombres y mujeres ($n = 4$). Los resultados se muestran como media $\pm$ SEM. La comparación de medias se realizó mediante la prueba t de Student. ** $p < 0.01$.

Mediante el análisis de secuenciación, se detectó una sobreexpresión del miR-149-5p en el suero de los ratones con IAM (**Figura 26**), la cual fue validada posteriormente por qRT-PCR. En las vesículas aisladas del suero de pacientes con IAM y controles sanos también se observó un aumento en los niveles de miR-149-5p circulantes, aunque no resultó ser significativo (**Figura 32A**). Cuando se estudia el efecto del infarto sobre los niveles de este miRNA separando los grupos por sexo (**Figura 32B**), se ve que es en el grupo de mujeres IAM donde existe esta tendencia a aumentar.

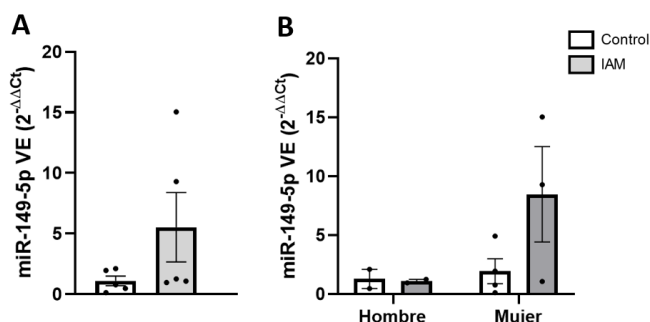


Figura 32. Expresión relativa del miR-149-5p en vesículas extracelulares de muestras de suero de pacientes con IAM y controles sanos. Comparación de la expresión relativa del grupo de pacientes con infarto, respecto al grupo de controles sanos calculada mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (**A**) sin considerar el sexo ($n = 8$) y (**B**) separando los grupos en hombres y mujeres ($n = 4$). Los resultados se muestran como media $\pm$ SEM. La comparación de medias se realizó mediante la prueba t de Student.

El comportamiento del miR-423 en el suero de los ratones con IAM se repite en el caso de la secuenciación y en su validación por qRT-PCR, confirmando una disminución significativa tras un IAM en ratones SAMR1 macho (**Figura 27**). En este caso, los resultados observados en los niveles séricos de miR-423-5p en humanos también indican una clara disminución después del IAM tanto en la fracción total del suero ($p < 0.001$) (**Figura 33A**) como en el contenido de las VE aisladas de estas mismas muestras ($p < 0.01$) (**Figura 33B**).

Separando las muestras según el sexo de los pacientes, observamos una disminución en los niveles del miR-423-5p después del infarto en todos los casos (**Figura 33C y Figura 33D**), si bien se hace significativo en la fracción libre en suero en las mujeres con IAM ($p < 0,01$) (**Figura 33C**).

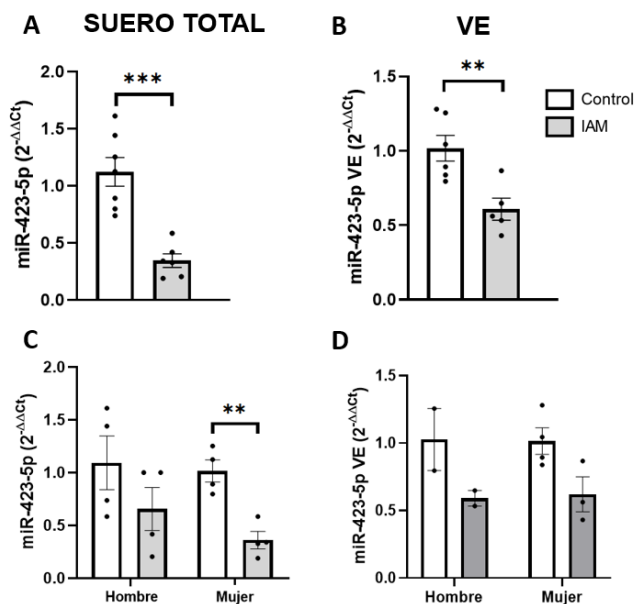


Figura 33. Expresión relativa del miR-423-5p en suero total y vesículas extracelulares de muestras de suero de pacientes con IAM y controles sanos. Comparación de la expresión relativa del grupo de pacientes con infarto, respecto al grupo de controles sanos calculada mediante el método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, sin considerar el sexo en **(A)** suero total (n = 6-7) y **(B)** en las VE (n = 5-6); separando los grupos de acuerdo a hombres y mujeres en **(C)** suero libre (n = 4), y **(D)** en las VE (n = 2-4). Los resultados se muestran como media $\pm$ SEM. La comparación de medias se realizó mediante la prueba t de Student. ** p < 0.01 y *** p < 0.001.

4.4. ENRIQUECIMIENTO FUNCIONAL DE LOS miRNAs CIRCULANTES RELACIONADOS CON EL IAM

Una vez estudiada la expresión del miR-30e-3p, miR-148a-3p, miR-149-5p y miR-423-5p en muestras de pacientes con IAM, se analizaron sus genes diana y rutas KEGG más relevantes mediante las herramientas de predicción de genes diana microT-CDS, TargetScan y miRDB. Se seleccionaron aquellos genes diana que se repetían en al menos 2 bases de datos y que estaban conservados tanto en humano como en ratón, mediante la plataforma en línea miRwalk, obteniéndose las rutas KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) de las que forman parte. Los resultados se han representado en diagramas de cuerdas, donde se pueden ver los genes diana de los miRNAs y su relación con las rutas de las que forman parte. La selección de rutas para su visualización gráfica se determinó por su valor estadístico, eligiendo las más significativas.

Los genes diana predichos del miR-30e-3p que se obtuvieron en al menos dos bases de datos fueron 429 en la búsqueda del hsa-miR-30e-3p, y 431 genes en el caso del mmu-miR-30e-3p. Comparando estos dos resultados, 89 genes diana coinciden entre las dos especies, de manera que esa selección de genes dio lugar al gráfico del miR-30e-3p (**Figura 34**), en el que se muestran las 4 rutas más significativamente asociadas a los genes diana del miR-30e-3p: la 'ruta de señalización FoxO', la 'ruta de señalización de esfingolípidos', la 'autofagia' y la 'ruta de señalización PI3k-Akt'. El resto de las rutas asociadas a estos genes y no mostradas en el gráfico están relacionadas con la patología del cáncer y la infección por el virus del papiloma humano.

Enriquecimiento funcional del miR-30e-3p

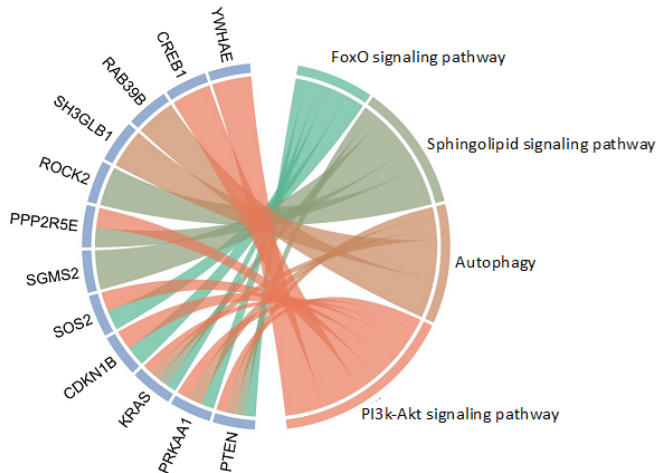


Figura 34. Diagrama de cuerdas del enriquecimiento funcional del miR-30e-3p, con sus genes diana y rutas KEGG asociadas obtenidos mediante miRwalk. El gráfico representa las conexiones entre los genes diana del miR-30e-3p y las rutas KEGG en las que están implicados. El nodo parte de la ruta, cada una con un color, y se divide en el número de genes diana del miRNA que están presentes en esa ruta. Plataforma online consultada en febrero de 2023 (mirwalk.umm.uni-heidelberg.de).

El enriquecimiento funcional del miR-148a-3p se realizó a partir de los 351 genes diana que coinciden entre los resultados de la búsqueda del miRNA en humano (685) y en ratón (519). En este caso se representan las 5 rutas más significativas (**Figura 35**), de un total de 61 rutas asociadas a los genes diana del miR-148a-3p. Se repiten las rutas KEGG de señalización FoxO y PI3k-Akt, y aparecen otras como la 'ruta de señalización ErbB' y la 'ruta de señalización TGF-beta', además de la 'ruta de regulación del citoesqueleto de actina'.

Enriquecimiento funcional del miR-148a-3p

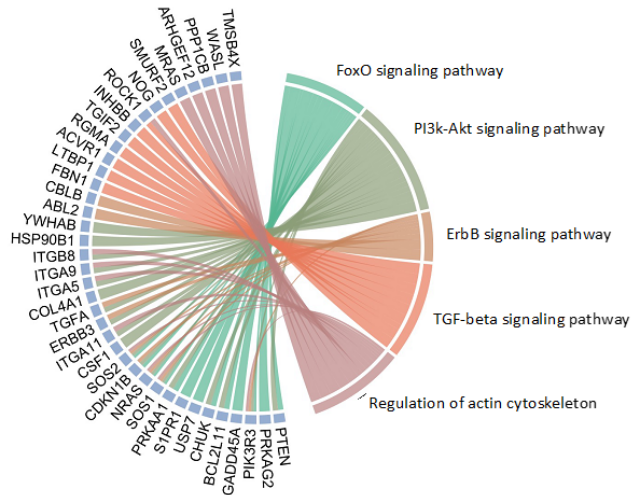


Figura 35. Diagrama de cuerdas del enriquecimiento funcional del miR-148a, con sus genes diana y rutas KEGG asociadas obtenidos mediante miRwalk.

Mediante un diagrama de cuerdas se presentan las conexiones entre los genes diana del miR-148a y las rutas KEGG en las que están implicados. El nodo parte de la ruta, cada uno tiene un color, y se va subdividiendo en cuanto al número de genes diana del miRNA que estén presentes en esa ruta. Plataforma online consultada en febrero de 2023 (mirwalk.umm.uni-heidelberg.de).

De igual manera que con los anteriores miRNAs, se estudiaron los genes diana del hsa-miR-149-5p (523) y del mmu-miR-149-5p (360) y aquellos genes presentes en las dos especies, 156 genes, se utilizaron para obtener las rutas. Se obtuvieron 10 rutas KEGG asociadas a estos genes diana del miR-149-5p, de las que se representan en el gráfico de cuerdas las 5 más significativas: la 'ruta de señalización del calcio', la 'ruta de señalización del cAMP', la 'adhesión focal', la 'ruta de señalización PI3k-Akt' y la 'ruta de señalización MAPK' (**Figura 36**). El resto de las rutas no representadas tienen relación con el cáncer, el 'síndrome de Cushing', la 'secreción pancreática', la 'ruta de señalización Rap1' y la 'regulación del citoesqueleto de actina'.

Y por último, del miR-423-5p se obtuvieron un total de 437 genes predichos para el hsa-miR-423-5p, mientras que para el caso del mmu-miR-423-5p fueron 253 genes, de los cuales coinciden entre ellos 89 genes. El resultado del análisis funcional de estos genes resultó en 3 rutas asociadas: la 'ruta de señalización RAS', la 'ruta de señalización MAPK', y la 'ruta de señalización PI3k-Akt' (**Figura 37**).

Enriquecimiento funcional del miR-149-5p

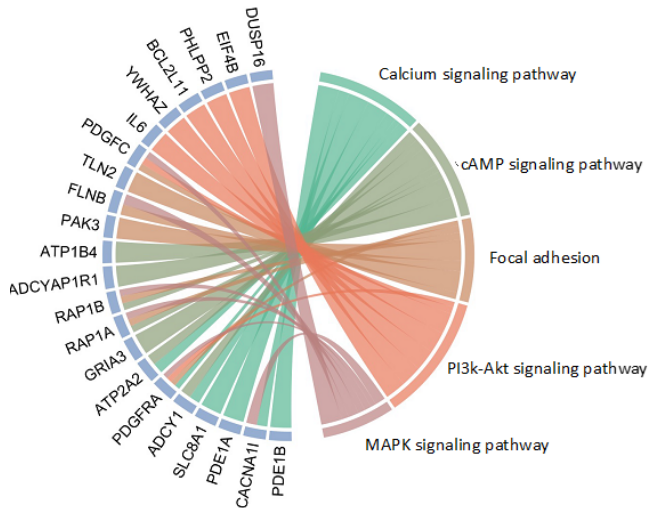


Figura 36. Diagrama de cuerdas del enriquecimiento funcional del miR-149, con sus genes diana y rutas KEGG asociadas obtenidos mediante miRwalk. Mediante un diagrama de cuerdas se presentan las conexiones entre los genes diana del miR-149 y las rutas KEGG en las que están implicados. El nodo parte de la ruta, cada uno tiene un color, y se va subdividiendo en cuanto al número de genes diana del miRNA que estén presentes en esa ruta. Plataforma online consultada en febrero de 2023 (mirwalk.umm.uni-heidelberg.de).

Enriquecimiento funcional del miR-423-5p

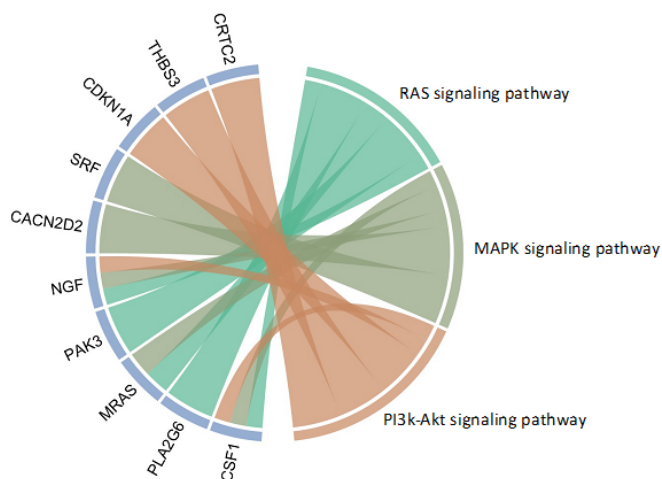


Figura 37. Diagrama de cuerdas del enriquecimiento funcional del miR-423, con sus genes diana y rutas KEGG asociadas obtenidos mediante miRwalk.

Mediante un diagrama de cuerdas se presentan las conexiones entre los genes diana del miR-423 y las rutas KEGG en las que están implicados. El nodo parte de la ruta, cada uno tiene un color, y se va subdividiendo en cuanto al número de genes diana del miRNA que estén presentes en esa ruta. Plataforma online consultada en febrero de 2023 (mirwalk.umm.uni-heidelberg.de).

5. DISCUSIÓN

5.1. SAMR1/SAMP8 COMO MODELO MURINO DE INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO

Las enfermedades cardiovasculares son uno de los problemas más graves de salud en todo el mundo, ocasionando casi 18 millones de muertes anuales a nivel global, de ellas, 4 de cada 5 son debidas a infartos (OMS, 2023). Con el objetivo de comprender los mecanismos moleculares implicados en las enfermedades cardiovasculares, el uso de modelos animales de experimentación es un paso obligatorio (Egido et al., 2011), los modelos animales permiten comprender la fisiopatología subyacente y la progresión de la enfermedad hasta el infarto agudo de miocardio (IAM), además, ayudan a plantear nuevas estrategias en el diagnóstico, prevención y tratamiento, y su posterior traslado a estudios clínicos (Liu et al., 2012).

Uno de los objetivos principales de este estudio fue el establecimiento de un modelo experimental de IAM con los ratones SAMR1/SAMP8, machos y hembras, en este sentido, uno de los principales obstáculos es la dificultad de contar con un modelo experimental representativo de la enfermedad. La creación de un modelo de IAM que represente las condiciones cardíacas humanas supone un desafío, debido principalmente a que esta patología se desarrolla en el paciente como

resultado de la interacción de muchas causas a lo largo del tiempo y a menudo se complica por comorbilidades y su tratamiento farmacológico previo (Pound & Ritskes-Hoitinga, 2018).

Se sabe que una amplia gama de condiciones de salud, como la epilepsia, el tabaquismo, el alcoholismo, el cáncer, la diabetes y la artritis reumatoide, afectan notablemente a la mortalidad por IAM (Quintana *et al*, 2018). También, que su incidencia está sesgada por la edad y el sexo, con tasas más altas en hombres que en mujeres y en personas mayores que en jóvenes (Savarese & Lund, 2017; Virani *et al*, 2021).

El papel del sexo y su influencia sobre las enfermedades cardiovasculares ha sido revisado por Beale *et al.*, caracterizando las diferencias de sexo en cuanto a la estructura cardíaca y su función, la circulación cardíaca y pulmonar, al igual que otros factores como las comorbilidades que explican las diferencias entre hombres y mujeres (Beale *et al*, 2018). Actualmente sigue siendo relevante el estudio de las diferencias de sexo en el IAM, por ello es necesario desarrollar estudios donde se investiguen por igual los dos sexos, teniendo en cuenta que las diferencias en cuanto al envejecimiento vascular, sistema inmune y

metabolismo cardíaco son considerables (Beale *et al*, 2018).

Los modelos animales utilizados actualmente en los entornos de laboratorio tienden a ser relativamente homogéneos, jóvenes y saludables, sin predisposición genética o condiciones médicas subyacentes (Bart van der Worp *et al*, 2010; Pound & Ritskes-Hoitinga, 2018), por lo que, en muchos casos, los estudios en animales no reflejan la heterogeneidad observada en los pacientes con IAM.

En cuanto a los animales grandes utilizados para este propósito se encuentran: el cerdo, la oveja y el conejo, los cuales se caracterizan por tener una anatomía y fisiología coronaria similares al humano. Los cerdos tienen una circulación colateral mínima y una vasculatura coronaria derecha similar a la de los humanos (Maxwell *et al*, 1987; Weaver *et al*, 1986), y la actividad metabólica del corazón es similar a la de los humanos, ya que utilizan ácidos grasos no esterificados para la producción de energía (Maxwell *et al*, 1987). Por lo que el modelo suino se utiliza ampliamente en la comprensión de las enfermedades genéticas y cardiovasculares humanas (Marchant-Forde & Herskin, 2018).

El miocardio de las ovejas comparte muchas similitudes con el humano, por ejemplo, la misma isoforma predominante de la cadena pesada de miosina, β -MHC lenta, (Milani-Nejad & Janssen, 2014). Se han desarrollado diversas patologías en el modelo ovino incluyendo el infarto de miocardio y la insuficiencia cardíaca gradual inducida por la constricción aórtica. Tanto el modelo suino como el ovino tienen como inconvenientes el precio en su producción, su mantenimiento y estabulación (Tang *et al*, 2018).

En los conejos, la anatomía del corazón, las ramas coronarias, el recorrido de la arteria coronaria y la circulación colateral coronaria son similares a las de los humanos (Lee *et al*, 2002). Sin embargo, las placas ateroscleróticas se forman principalmente en la aorta torácica y las lesiones coronarias principalmente en las arterias pequeñas, mientras que en los humanos se forman principalmente en las grandes ramas de las arterias coronarias (Lee *et al*, 2002).

Los modelos experimentales con roedores se utilizan ampliamente en estudios de infarto de miocardio debido a sus beneficios prácticos, como su pequeño tamaño corporal, fácil cuidado antes y después de la cirugía, fácil mantenimiento, bajo coste, menor tiempo de generación y genética bien definida (Pound & Ritskes-

Hoitinga, 2018). Sin embargo, los animales pequeños tienen algunas desventajas, entre ellas, su anatomía y cinética cardíaca son fundamentalmente diferentes a las de los humanos. Por ejemplo, la frecuencia cardíaca en reposo de los ratones es cinco veces mayor que en los humanos, también, tienen un pequeño tamaño corporal y eso puede dificultar el manejo de sus órganos (Milani-Nejad & Janssen, 2014).

En cuanto a los aspectos técnicos de la cirugía, el modelo de infarto de miocardio mediante la ligadura de la arteria coronaria descendente izquierda (ACDI) es el método quirúrgico más utilizado. Este método se introdujo por primera vez en 1954 por Johns y Olson et al. (Johns & Olson, 1954) y, con pocas modificaciones, se utiliza ahora ampliamente en animales grandes y pequeños. En el presente trabajo, hemos llevado a cabo esta técnica quirúrgica cuyo éxito fue comprobándose en diferentes momentos.

Nuestros resultados demuestran que el IAM en los ratones SAMR1/SAMP8 mediante la ligadura de la ACDI permite el establecimiento de un modelo murino de IAM, ya que se confirmó la oclusión mediante la observación inmediata de la palidez que aparece en la pared anterior del ventrículo izquierdo tras el cese de aporte sanguíneo por la ligadura, (Gao *et al*, 2000; Ahn

et al, 2004) y mediante la elevación del segmento ST en el electrocardiograma inmediatamente después de la cirugía, además de una vez sacrificados los ratones, mediante la tinción histológica con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio, se confirmó la necrosis miocárdica por su coloración blanquecina.

Las ventajas de este método consisten en una mayor tasa de supervivencia, un tamaño de infarto uniforme y un menor tiempo consumido durante la cirugía (Tang *et al*, 2018). Sin embargo, el principal inconveniente es la necesidad de contar con personal especializado en este tipo de cirugía.

Pero además de la especie utilizada y la técnica quirúrgica, es importante tener en cuenta otros factores que intervienen en la fisiopatología cardíaca, como el envejecimiento y las alteraciones estructurales y funcionales que conlleva, así como los factores de riesgo cardiovascular (Lakatta, 2015; Ferrari *et al*, 2003), entre ellos el sexo. Estudios previos sugieren que el envejecimiento induce alteraciones en la arquitectura y la función cardíacas (Pugh & Wei, 2001). Además, el envejecimiento se asocia con vías de inflamación, estrés oxidativo, estrés del retículo endoplásmico, señales de apoptosis y disfunción mitocondrial (Forman *et al*, 2011).

A pesar de la relevancia del envejecimiento en la incidencia del infarto de miocardio, existen pocos modelos que contemplen este aspecto como un rasgo primordial. Además, con el aumento de la esperanza de vida y el envejecimiento de la población (Forman *et al*, 2016), resulta fundamental investigar los efectos fisiológicos del envejecimiento con el objetivo de encontrar nuevas formas de tratar a esta población. Por lo tanto, se necesita un modelo que permita establecer el efecto del envejecimiento asociado al infarto de miocardio.

En lo que se refiere a las alteraciones cardiovasculares vinculadas al envejecimiento, el ratón también guarda semejanzas con los seres humanos (Vanhooren & Libert, 2013), pudiéndose equiparar el corazón de ratones envejecidos al de los humanos (Dai & Rabinovitch, 2009). Los estudios que existen actualmente que han investigado el papel del envejecimiento en el infarto de miocardio han utilizado roedores de pocos meses de edad en comparación con roedores envejecidos con más de dos años (Bujak *et al*, 2008), también siguieron el mismo procedimiento en un estudio sobre el envejecimiento cardiaco y el estrés oxidativo en las mitocondrias (Dai & Rabinovitch, 2009).

La desventaja del uso de ratones de más de dos años para el estudiar el efecto del envejecimiento radica principalmente en el elevado coste y espacio necesario que conlleva el mantenimiento de estos animales por un periodo tan prolongado de tiempo.

En esta línea, el modelo murino con senescencia acelerada (SAM, del inglés *Senescence Accelerated Mouse*) se ha empleado ampliamente para investigar enfermedades relacionadas con el envejecimiento, como el Alzheimer (Takeda, 2009). En lo que se refiere al ámbito vascular, la ausencia de anomalías a edades tempranas ha simplificado su uso en el análisis del envejecimiento (Butterfield & Poon, 2005). Asimismo, este modelo se ha empleado para analizar el papel del óxido nítrico en la respuesta vascular en la aorta de ratones (Lloréns *et al*, 2007) y de éste y otros mediadores endoteliales en ratonas (Novella *et al.*, 2013a; Novella *et al.*, 2013b; Novella *et al.*, 2010; Novensà *et al.*, 2011; Vidal-Gómez *et al.*, 2016). Los ratones SAMP8 envejecidos muestran un aumento en la activación del estrés oxidativo (Vidal-Gómez *et al*, 2016), la disfunción mitocondrial, el estrés del retículo endoplásmico, la expresión génica inflamatoria y las vías de señalización HMGB1-TLR2/TLR4, la disfunción vascular y la regulación negativa de la expresión de genes antioxidantes/antiinflamatorios (Karuppagounder *et al*,

2017). Estos efectos desencadenan apoptosis, fibrosis, factores proinflamatorios y producción de citoquinas, lo que provoca una remodelación cardíaca patológica (Karuppagounder *et al*, 2017; Giridharan *et al*, 2020).

En cuanto a su empleo en el estudio de enfermedades cardiovasculares, el ratón SAMP8 parece ser un excelente modelo para estudiar las relaciones entre el envejecimiento, las alteraciones de la homeostasis cardiovascular y la remodelación cardíaca adversa (Karuppagounder *et al*, 2017). El uso de este modelo implica una gran ventaja frente al tradicional ratón envejecido, ya que permite establecer una comparación entre ratón joven-envejecido a una edad de los ratones de 6 meses, tiempo en el cual se han establecido diferencias claras en cuanto a su vasculatura por efecto del envejecimiento (Novella *et al.*, 2013a). Los ratones SAMR1/SAMP8 permiten estudiar el efecto del envejecimiento en el IAM, pero, además también permiten investigar las diferencias de sexo asociadas a esta patología, incluyendo machos y hembras en el estudio.

Actualmente existen diversos precedentes de estudios de RNA no codificante en el modelo murino SAMR1/SAMP8, principalmente en la investigación del Alzheimer (Hong *et al*, 2020; Zhang *et al*, 2021b),

estudiando estas moléculas por su potencial como biomarcadores y posibles terapias.

Por ello, con los resultados aportados por estudios previos desarrollados en la cepa de ratones SAMR1 y SAMP8 y la puesta a punto de la técnica quirúrgica en este modelo experimental, nos planteamos comprobar si era adecuado para desarrollar estudios de transcriptómica, concretamente, del perfil de expresión de miRNAs circulantes después de un infarto agudo de miocardio.

5.2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE miRNAs BIOMARCADORES DE INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO EN EL MODELO SAMR1/SAMP8 MEDIANTE qRT-PCR

Uno de los objetivos principales de este trabajo es la utilización del modelo de infarto experimental murino para determinar la presencia de miRNAs como posibles biomarcadores del IAM. Aunque la troponina sérica se utiliza actualmente como marcador diagnóstico para el infarto de miocardio, su tiempo de liberación a menudo conlleva una baja sensibilidad, por lo que los miRNAs circulantes han sido objeto de estudio como potenciales biomarcadores para el diagnóstico del infarto debido a su estabilidad y especificidad (Sun *et al*, 2017; Viereck & Thum, 2017). Una gran cantidad de estudios ha explorado el hecho de que los miRNAs se filtran del corazón a la circulación después de una lesión miocárdica (Akat *et al*, 2014; De Rosa *et al*, 2011), durante este momento su expresión está elevada y es dinámica (Wang *et al*, 2010; Shi *et al*, 2010).

Por ello, en el modelo murino de IAM SAMR1/SAMP8 comprobamos la expresión de miRNAs establecidos previamente como biomarcadores de infarto en numerosos modelos murinos, a la vez que, en gran cantidad de ensayos con pacientes con IAM. Entre

estos miRNAs que, además, son abundantes en el corazón, se encuentran cuatro miRNAs circulantes, miR-1-3p, miR-133-3p, miR-208-3p y miR-499-5p, que aumentan en pacientes con IAM (Gidlöf *et al*, 2013; Adachi *et al*, 2010; Boštjančič *et al*, 2010). Son estos los miRNAs cuya expresión hemos estudiado en el suero de los ratones sometidos a un IAM para comprobar si su perfil era comparable al observado en humanos.

Después del IAM observamos de manera general un aumento de los cuatro miRNAs estudiados en el suero de los ratones SAMR1/SAMP8 comparado con sus grupos control, coincidiendo con lo previamente publicado en humanos y en otros modelos murinos. La expresión del miR-1-3p y del miR-133-3p aumentó en la mayoría de los grupos IAM aumentando entre 5 y 10 veces respecto al grupo control, pero en el caso del miR-208-3p y miR-499-5p este aumento fue considerablemente mayor, llegando a valores de expresión de hasta 40 veces superior al grupo control.

El aumento de estos cuatro miRNAs tras un IAM ha sido descrito en numerosas ocasiones, por ejemplo, Wang *et al*. midieron los niveles circulantes de miRNAs en pacientes con IAM, así como en sujetos sanos, observando una significativa regulación positiva de miR-1, miR-133 y miR-499 en la circulación de los pacientes

con IAM (Wang *et al*, 2010). Es interesante señalar que, el miR-208a es altamente detectable en el 91% de los pacientes con IAM, pero no en los controles sanos, además de que el miR-208a tiene ventajas como biomarcador sobre la troponina en la fase temprana del IAM. Otros estudios a pequeña escala también confirmaron que estos cuatro miRNAs están relacionados con el IAM en cardiomiocitos cultivados y en pacientes (Adachi *et al.*, 2010; Corsten *et al.*, 2010; Kuwabara *et al.*, 2011).

En otro estudio, Oerlemans *et al.* determinaron el valor potencial de los miRNAs circulantes miR-1, miR-21, miR-146a, miR-208a y miR-499 en una cohorte de 332 pacientes con IAM y encontraron que la combinación de miR-1, miR-21 y miR-499 podría tener un mayor valor diagnóstico que la troponina cardíaca T (cTnT) (Oerlemans *et al*, 2012). En un estudio con un total de 424 pacientes que presentaban IAM, miR-208b y miR-499 mostraron un nivel de expresión más alto en pacientes con infarto de miocardio en comparación con pacientes sin infarto, y se correlacionaron bien con troponinas cardíacas (Gidlöf *et al*, 2013).

Por este motivo se realizó la medida de estos miRNAs circulantes en el modelo murino de infarto SAMR1/SAMP8, con el objetivo de validar nuestro modelo en cuanto a la expresión aumentada de estos miRNAs tras un IAM. Además, debido a la novedad del estudio, se midieron a tres tiempos diferentes de infarto, 1, 4 y 24 horas tras la cirugía, para establecer un tiempo óptimo de sacrificio y toma de muestra en el que se detecten cambios en la expresión de los miRNAs, pero permaneciendo en la fase aguda del infarto.

En el presente estudio los niveles de estos miRNAs circulantes mostraron una expresión descendente en el grupo sham con el paso de las horas tras la cirugía, este resultado puede apreciarse claramente en los grupos de ratones SAMR1/SAMP8 en **Figura 10**, donde a las 24 horas hay una disminución drástica de su expresión comparada con el grupo de ratones sacrificados a 1 hora. Aunque es difícil establecer a qué es debido, nuestra hipótesis es que se produce una liberación aguda desde el miocardio infartado.

El análisis de los miRNAs miR-1-3p, miR-133-3p, miR-208-3p y miR-499-5p en el suero de los ratones SAMR1/SAMP8 tras la cirugía IAM, comparado con sus controles sham, reveló que en la mayoría de los grupos

existe un incremento en su expresión a las 4 horas, y siguiendo un incremento lineal en el caso del miR-208 y miR-499. Esto concuerda con el estudio realizado por Cheng *et al* en el plasma de ratones, donde midieron la expresión circulante de miR-1, miR-133, miR-208 y miR-499 observando su incremento a las 6 horas del IAM (Cheng *et al*, 2019). En otro estudio, los niveles de estos cuatro miRNAs se encontraron incrementados en el plasma de ratas en el rango de 3 a 6 horas tras sufrir un IAM (Wang *et al*, 2010). Estos resultados también coinciden con otros artículos publicados de investigación en pacientes con infarto, en el rango de toma de muestra tras el incidente de <12 horas (Kuwabara *et al*, 2011; Corsten *et al*, 2010a; Devaux *et al*, 2012).

Los estudios anteriormente comentados manifiestan el aumento de expresión de estos miRNAs específicos de miocardio y músculo esquelético en circulación tras un infarto, como resultado del daño y regeneración de tejido necrótico en el corazón (Chistiakov *et al*, 2016). Además, su secreción está relacionada con efectos antiapoptóticos, antifibróticos y antioxidantes, señales esenciales para la inducción de la reparación del tejido cardíaco dañado (Wang *et al*, 2014; He *et al*, 2011; Castoldi *et al*, 2012; Izarra *et al*, 2014). Dichas señales son características del momento agudo del infarto, disminuyendo con el paso del tiempo tras

producirse su pico entre las 4 y 6 horas (Cheng *et al*, 2019).

En resumen, el incremento de expresión en suero de los miRNAs biomarcadores típicos de infarto, y el éxito en la generación de un infarto de miocardio en los ratones SAMR1/SAMP8, aporta validez a este nuevo modelo de IAM y senescencia para el estudio de miRNAs.

5.3. ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE miRNAs EN EL MODELO SAMR1/SAMP8 MEDIANTE SECUENCIACIÓN

Uno de los objetivos de la presente Tesis fue analizar el perfil de expresión de miRNAs en el modelo murino de senescencia SAMR1/SAMP8 tras un infarto mediante un análisis inicial de secuenciación, con el fin de identificar nuevos miRNAs implicados en el momento agudo del infarto.

El uso de la tecnología de secuenciación de nueva generación para descubrir nuevos miRNAs implicados en alguna patología está muy extendido y es el preferido para el descubrimiento de nuevas secuencias de RNA. Su principal ventaja es la detección simultánea de isomiRs (miRNAs con variaciones respecto a la secuencia de referencia) y otras especies de pequeños RNA (Ouyang *et al*, 2019; Benesova *et al*, 2021; Wang *et al*, 2009).

Los microarrays también constituyen uno de los métodos más usados y, durante mucho tiempo, fue la tecnología más utilizada para la investigación de miRNAs (Calin & Croce, 2006). Sin embargo, esta técnica no permite la cuantificación absoluta, la identificación de nuevos miRNAs ni distingue entre miRNAs canónicos y sus isomiRs (Telonis *et al*, 2017,

2015; Koppers-Lalic *et al*, 2016). Además, requiere grandes cantidades de RNA, lo que es un factor limitante en muestras de suero de ratón (Ono *et al*, 2015).

Los resultados de secuenciación del presente estudio fueron diversos dependiendo del tipo de algoritmo utilizado para el análisis de expresión diferencial de miRNAs. Mientras que con DESeq2 se obtuvo el mayor número de miRNAs, con edgeR, limma y voom se detectaron un número inferior, aunque complementario al primer análisis.

Como se recogió en una revisión sistemática, el paso final en la mayoría de los estudios de secuenciación consiste en el análisis de expresión diferencial, es decir, detectar los genes o, en este caso, los miRNAs diferencialmente expresados entre dos o más condiciones (Corchete *et al*, 2020). Con este propósito, se han desarrollado numerosos algoritmos, entre ellos, destacan por ser los más usados, las herramientas de expresión diferencial DESeq2 y edgeR (Osabe *et al*, 2021), ambas emplean umbrales de corte para asegurar que los miRNAs tengan suficientes lecturas para considerarse en análisis posteriores, por lo que ambos métodos deberían producir resultados similares (Chung *et al*, 2021).

Los miRNAs resultantes del análisis de expresión diferencial confirmaron que las variables del sexo y senescencia afectan directamente a la regulación de miRNAs tras un IAM, ya que se detectaron diferentes cambios de sobreexpresión e infraexpresión en los miRNAs circulantes dependiendo del sexo de los ratones, y dependiendo de su envejecimiento, SAMR1 o SAMP8.

Tras el análisis de expresión diferencial realizado en todos los grupos de ratones SAMR1/SAMP8, machos y hembras, comparando sus grupos IAM con los controles, se llevó a cabo un análisis bioinformático de enriquecimiento funcional de estos miRNAs cambiados por el IAM. Con el objetivo de estudiar los procesos biológicos subyacentes y las vías fisiológicas afectadas, mediante la herramienta online miRwalk se obtuvieron las rutas KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) y los términos GO (*Gene Ontology*).

Curiosamente, en los tres grupos de ratones de los que se obtuvieron rutas KEGG, SAMR1 machos y hembras, y SAMP8 hembras, la 'Ruta de señalización MAPK' (cascadas de quinasas de proteínas activadas por mitógenos) resultó estar afectada de manera significativa por los miRNAs diferencialmente expresados. Se ha demostrado que las MAPK

desempeñan un papel fundamental en la conversión de estímulos extracelulares en una amplia gama de respuestas celulares, incluyendo la proliferación, migración y diferenciación celular, y la apoptosis (Yue & López, 2020). También están relacionadas con el remodelado cardíaco después de un IAM, concretamente la p38 MAPK induce la apoptosis y la producción de citoquinas inflamatorias (Muslin, 2008).

La ‘Ruta de señalización PI3-Akt’ (fosfatidilinositol 3-quinasa/proteína quinasa B) también aparece ligada directamente a los miRNAs diferencialmente expresados en los ratones SAMR1 machos, y las ratonas SAMP8 tras un IAM. Esta vía de señalización desempeña un papel clave en la regulación del crecimiento y supervivencia de los cardiomiocitos, disminuyendo los efectos negativos como la hipertrofia, necrosis, fibrosis e inflamación en el miocardio tras un IAM (Walkowski *et al*, 2022; Ghafouri-Fard *et al*, 2022). Además, se ha publicado una lista de miRNAs cuyo efecto sobre la ruta PI3-Akt está comprobado experimentalmente, además de en el remodelado cardíaco posterior al IAM (Walkowski *et al*, 2022), y entre ellos destacan el miR-122-3p, el miR-126a-3p y el miR-130a-3p, por aparecer diferencialmente expresados tras un IAM en los ratones SAMR1 machos, y ser, por tanto,

potenciales estrategias terapéuticas para la regeneración cardíaca.

Los miRNAs diferencialmente expresados en las ratonas SAMR1 y SAMP8 dieron lugar a rutas biológicas relacionadas con el cáncer. Existen evidencias claras de que el riesgo de desarrollar un IAM en pacientes con cáncer es alto, sobre todo en los primeros seis meses del diagnóstico de cáncer (Hirsch *et al*, 2022). Pero la principal conexión entre estas dos patologías viene dada por la similitud entre sus procesos celulares, ya que en ambos se produce una situación de hipoxia, liberación de citoquinas inflamatorias, y expresión de factores angiogénicos, los cuales en el cáncer promueven el desarrollo del tumor, mientras que en el IAM están implicados en la necrosis producida por la falta de aporte sanguíneo y la posterior regeneración celular del miocardio (Jiang *et al*, 2020).

La 'Ruta de resistencia al inhibidor de la tirosina quinasa EGFR' (receptor del factor de crecimiento epidérmico) aparece relacionada con los miRNAs diferencialmente expresados obtenidos en los ratones SAMR1 y en las ratonas SAMP8. Los inhibidores de la tirosina quinasa se utilizan ampliamente en el tratamiento del cáncer debido a su alta efectividad en la eliminación de células cancerosas, sin embargo, también

se ha informado sobre su cardiotoxicidad y su influencia en la calcificación cardiovascular (Masbuchin *et al*, 2022). También es sabido que, más del 80% de los cánceres de pulmón no microcítico presentan mutaciones del EGFR, aunque hay poca evidencia al respecto, en algunas investigaciones se ha comunicado su relación con la salud cardiovascular, como que el uso de los inhibidores aumentó la lesión miocárdica inducida por la infusión de isoproterenol (tratamiento del bloqueo, insuficiencia o paro cardíaco) (Chen *et al*, 2008).

En los ratones SAMR1 machos aparecieron dos rutas más directamente relacionadas con sus miRNAs diferencialmente expresados, la 'Ruta de señalización de la familia de proteínas ErbB' y la 'Ruta de señalización FoxO'. La relación de la ruta de señalización ErbB con el IAM está extensamente estudiada (Bersell *et al*, 2009; Shraim *et al*, 2021), en un estudio in vitro e in vivo con ratones demostraron la relación entre esta ruta y la regulación de la fibrosis tras un IAM, además de los procesos inflamatorios, y de apoptosis y senescencia de los fibroblastos cardíacos (Shiraishi *et al*, 2022). Con el uso de otro modelo de IAM, en este caso con ratas, vieron que el ejercicio activa la 'Ruta de señalización ErbB', promoviendo la reparación cardíaca a través de la regeneración endógena (Cai *et al*, 2016).

De igual manera ocurre con la 'Ruta de señalización FoxO', cuya relación ha sido explorada junto a las enfermedades cardiovasculares en numerosas revisiones (Xin *et al*, 2017; Ronnebaum & Patterson, 2010; Yu *et al*, 2020; Puthanveetil *et al*, 2013), y en artículos de investigación (Zhu *et al*, 2015; Sun *et al*, 2022). Por ejemplo, en un estudio in vitro establecieron que FoxO3a promovía la mitofagia (autofagia de las mitocondrias) y suprimía la hipertrofia cardíaca (Sun *et al*, 2022). Gracias a otra investigación determinaron que FoxO4 activa la transcripción de Arg1 (arginasa endotelial 1) en células endoteliales en respuesta al infarto de miocardio, lo que resulta en la disminución del óxido nítrico y el aumento de la infiltración de neutrófilos en el área del infarto (Zhu *et al*, 2015).

En las ratonas SAMP8 también destaca la ruta de regulación de la longevidad, esta ruta abarca varios genes y vías de señalización que pueden modular procesos como la autofagia, la síntesis de proteínas, la detección de nutrientes, la función mitocondrial y el estrés oxidativo (Mazucanti *et al*, 2015). Todos ellos son procesos que están directamente relacionados con el envejecimiento cardíaco y el desarrollo de cardiopatías (Packer, 2020). Que se vea afectada esta ruta por los miRNAs cambiados tras un IAM en estos ratones apoya

el efecto de la senescencia en el perfil de expresión de los miRNAs modificados.

En cuanto a los términos GO obtenidos en estas comparaciones, destacan los términos de regulación positiva y negativa de la transcripción, y regulación de la expresión génica, todos ellos por estar directamente implicados en el papel de los miRNAs como efectores de alteraciones transcripcionales.

En el análisis de enriquecimiento funcional de los miRNAs diferencialmente expresados en la secuenciación, también se estudiaron aquellos que cambiaban tras un IAM de manera opuesta en machos y hembras, esta comparación recibió el nombre de estudio de contraste complejo, haciendo alusión al hecho de comparar dos variables, el sexo y el infarto. El resultado de esta comparación en los ratones SAMR1 dio lugar a diferentes rutas KEGG y términos GO, entre ellas, la 'Ruta de regulación de la longevidad' y la 'Ruta de señalización FoxO', la 'Ruta de señalización MAPK', la 'Ruta de señalización del AMPc', la 'Ruta de señalización Ras' y la 'Ruta de señalización Rap1', además de la 'Guía axonal'. Algunos de los términos GO asociados a estos miRNAs fueron la regulación positiva de la transcripción, la angiogénesis, la fosforilación peptidil-

serina, y la activación dependiente de calcio de la fusión de vesículas sinápticas.

El efecto del sexo en la regulación de la longevidad es notable, pero ha sido comúnmente pasado por alto en anteriores estudios, aunque cada vez más estudios apoyan este hecho (Zeng *et al*, 2018). Que nuestros resultados determinen que tras un IAM el sexo determina una regulación inversa en la ruta de regulación de la longevidad confirma la necesidad de incluir el factor de las diferencias de sexo en los estudios de transcriptómica. De manera similar ocurre con la ruta de señalización FoxO, cuyas diferencias de sexo se ha estudiado en diversas patologías, como la diabetes (Penniman *et al*, 2019), pero queda por explorar su regulación dependiente de sexo tras un IAM.

Curiosamente, los miRNAs afectados de manera opuesta en machos y hembras SAMR1 tras un IAM están relacionados directamente con la 'Ruta de señalización de las MAPK', cuya relación con el IAM ya ha sido comentada anteriormente, pero también están relacionados con la 'Ruta de señalización del AMPc' (adenosinmonofosfato cíclico), la cual restablece la función barrera del endotelio vascular previniendo la liberación de citoquinas proinflamatorias, de hecho, en un estudio con un modelo porcino de lesión de la arteria carótida

observaron que el aumento de las concentraciones de AMPc inducen la reendotelización precoz de los segmentos lesionados, además de una menor proliferación fibromuscular (Fantidisa *et al*, 2001).

La relación entre la 'Ruta de señalización Ras' y el IAM, ha sido recientemente revisado por Zhang *et al*., explicando el papel de la proteína Ras homóloga de la familia A (RhoA) en la regulación de la regeneración cardíaca, la fibrosis e hipertrofia cardíaca, además de la proliferación y apoptosis celular, tras un IAM, y su potencial como nueva estrategia terapéutica (Zhang *et al*, 2022).

En un reciente artículo de investigación con corazones aislados de ratas postulan el papel de la 'Ruta de señalización Rap1' como posible regulador de la lesión tras una isquemia/reperfusión a través de Vitexin (un compuesto flavonoide), interviniendo en la disminución del tamaño del infarto, apoptosis de cardiomiocitos y producción de especies reactivas de oxígeno (Yang *et al*, 2021). Se obtuvieron resultados similares en otro estudio en ratas también con IAM, confirmando que la 'Ruta de señalización Rap1' está involucrada en la patogénesis de la isquemia/reperfusión tras un IAM (Wang *et al*, 2018).

La ‘Guía axonal’ está directamente relacionada con los miRNAs alterados de manera opuesta tras un IAM en los ratones SAMR1 y SAMP8, este proceso hace referencia al desarrollo de los axones por parte de las neuronas para establecer conexiones con otras células en el sistema nervioso, existen bastantes proteínas relacionadas con este proceso, pero por su papel cardioprotector tras un IAM destaca la Netrina-1, reguladora de la angiogénesis en respuesta a la isquemia (Salazar-Gonzalez *et al*, 2022).

El resultado del contraste complejo en los ratones SAMP8 también indicó que la ‘Depresión a largo plazo (LTD)’ estaba afectada, además de las ‘Uniones tipo GAP’, la ‘Guía axonal’, rutas relacionadas con el cáncer, y la ‘Señalización de neurotrofinas’. En cuanto a los términos GO, destacan los términos de regulación positiva y negativa de la transcripción, regulación positiva de la expresión génica, desestabilización y splicing del RNA mensajero, todos ellos ligados también al carácter regulador de la transcripción de los miRNAs.

La LTD es el fenómeno por el cual las sinapsis se vuelven menos eficientes en la transmisión de señales neuronales, se ha caracterizado en varios sistemas y áreas del cerebro, incluido el cerebelo, el hipocampo, la corteza cerebral y el cuerpo estriado

(Squire, 2009). Aunque la relación entre las diferencias de sexo y su efecto sobre la plasticidad sináptica ha sido estudiada a través de varios mecanismos, incluido el papel de las hormonas esteroideas como el estrógeno y la testosterona (Hyer *et al*, 2018), dicha relación tras un IAM es un resultado novedoso de la presente tesis que permite establecer un vínculo entre la senescencia, las diferencias de sexo y el IAM.

Las ‘Uniones GAP’ son agregados de canales intercelulares que permiten la transferencia directa de iones y moléculas pequeñas de célula a célula, estas uniones comunicantes se encuentran uniendo prácticamente todas las células en tejidos sólidos (Goodenough & Paul, 2009). Las ‘Uniones GAP’ y el IAM han sido estudiadas en conjunto debido a que la isquemia miocárdica conduce a alteraciones energéticas, morfológicas, metabólicas y funcionales, por lo que Lueck *et al.*, evaluó las diferencias en la tolerancia a la isquemia entre los corazones de cerdos recién nacidos y adultos, investigando el desacoplamiento de unión GAP y su correlación con la formación de edema intracelular miocárdico, siendo ambos importantes parámetros indicadores de daño cardíaco (Lueck *et al*, 2016).

Además, Luksha et al., establecieron una relación entre las diferencias de sexo en la vasculatura y las 'Uniones GAP', indicando que el receptor de estrógenos β contribuye a las diferencias de sexo observadas en el control del tono vasomotor dependiente del endotelio, al reducir la señalización del factor hiperpolarizante derivado del endotelio mediada por la unión GAP en un modelo murino (Luksha *et al*, 2006). Estas investigaciones aportan validez al resultado de la presente tesis en cuanto a las diferencias de sexo en la regulación de las uniones GAP.

Los estudios de contraste complejo revelan el importante papel de las diferencias de sexo en eventos cardiovasculares como el IAM, ya que los machos y hembras están sujetos a una regulación biológica distinta tras un IAM a través de los diferentes miRNAs desregulados y las diferentes rutas biológicas directamente implicadas, y que actualmente existe una dificultad considerable de relacionar nuestros resultados con artículos de investigación que tengan en cuenta las variables del sexo y el envejecimiento, en un modelo de IAM, lo que destaca la importancia de realizar nuevas investigaciones sobre las diferencias de sexo y envejecimiento en el contexto del IAM.

5.4. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL miR-30e, miR-148a, miR-149 Y miR-423 MEDIANTE qRT-PCR

Una vez analizado el perfil de expresión de los miRNAs mediante secuenciación se procedió al estudio mediante qRT-PCR de la expresión de cuatro miRNAs que podrían estar relacionados con el momento agudo del infarto en el modelo murino SAMR1/SAMP8, además de con el sexo y el envejecimiento. La elección de estos miRNAs se centró en aquellos que se repetían en la mayoría de los análisis (DESeq2, edgeR, limma y voom) identificando así 3 miRNAs sobreexpresados (miR-30e-3p, miR-148a-3p y miR-149-5p) en el grupo IAM respecto al sham. Además, también se eligió un miRNA infraexpresado (miR-423-5p) que resultó tener un cambio significativo mediante el método de análisis edgeR solamente.

El uso de la tecnología de secuenciación de nueva generación está muy extendido para el descubrimiento de nuevas secuencias, pero debido a la mayor sensibilidad de la técnica de qRT-PCR, es necesario comprobar de manera individual la expresión de los miRNAs diferencialmente expresados tras el análisis de secuenciación.

También se comprobó la homología de los miRNAs a estudio con la secuencia de estos en la especie humana, dicha confirmación permitió realizar la medida de los miRNAs en suero de pacientes de IAM y en el contenido en vesículas extracelulares pequeñas (VE), además de en la comparación entre su expresión mediante secuenciación y en una nueva cohorte de ratones mediante qRT-PCR.

Como se ha comentado anteriormente, los miRNAs son transportados asociados a proteínas o incluidos en el interior de VE, que pueden originarse en diferentes tipos celulares y a su vez, dirigirse a distintos tipos celulares a modo de señalización autocrina y paracrina. El mecanismo que determina un modo de transporte u otro fue expuesto por Villarroya-Beltri en 2013, demostrando la existencia de pequeñas secuencias de RNA presentes en determinados miRNAs que controlan su empaquetamiento selectivo en VE (Villarroya-Beltri *et al*, 2013).

Atendiendo a los resultados que hemos obtenido mediante secuenciación, el miR-30e-3p mostró un aumento significativo en el suero de ratones SAMP8, indicando una posible participación del sexo y la senescencia en su expresión. En el análisis de expresión por qRT-PCR observamos nuevamente la participación

del sexo y la senescencia, pero con un cambio de tendencia, registrándose el aumento de expresión en las ratonas SAMP8 (**Figura 24**).

Las diferencias entre los resultados de la secuenciación y la expresión individual de los miRNAs medidos mediante qRT-PCR ha sido sujeto de estudio de numerosas investigaciones, y recogidos en varias revisiones (Hughes, 2009; Coenye, 2021). La conclusión de una de estas investigaciones confirmó que el 15-20% de los genes obtenidos en un análisis son no concordantes, es decir, no coinciden entre ambos métodos (Everaert *et al*, 2017). También se incide en el hecho de que cuando la investigación se lleva a cabo en genes cuya expresión es baja, como es el caso de los miRNAs circulantes, es recomendable validar los resultados con el método de la qRT-PCR (Coenye, 2021). Además, la qRT-PCR posee una alta especificidad y sensibilidad, además de una gran reproducibilidad (Derveaux *et al*, 2010; Huggett *et al*, 2005; VanGuilder *et al*, 2008), lo que la convierte en la mejor técnica para el estudio de la expresión individual de un miRNA.

No obstante, en el caso de las muestras de pacientes con IAM, solo fue posible detectar el miR-30e-3p en la fracción transportada por VE donde no se apreciaron cambios, ya que en la fracción total del suero sus Cts superaron los 35 ciclos (**Figura 30**). En otros estudios se ha comprobado su transporte mediante VE, demostrando su valor como mediador de la comunicación intercelular (Salido-Guadarrama *et al*, 2014; Zhang *et al*, 2015a).

La relación entre el miR-30e-3p, las diferencias de sexo y el efecto del envejecimiento con el IAM no ha sido investigada hasta la fecha, sin embargo, en nuestro estudio sí que hemos encontrado una conexión con las dos variables, ya que el miR-30e-3p apareció sobreexpresado mediante qRT-PCR en el suero de las ratonas SAMP8 tras un IAM, mientras que en machos no aparece cambiado, de igual manera que en los ratones SAMR1 tampoco se detectaron cambios.

El miR-30e-3p pertenece a la familia de los miR-30, que incluye al miR-30a, miR-30b, miR-30c, miR-30d y miR-30e, están abundantemente expresados en el corazón e involucrados en la fisiopatología de diversas enfermedades cardiovasculares. Algunas de las investigaciones sobre la familia del miR-30 se han centrado en la hipertrofia miocárdica, el infarto de

miocardio, la insuficiencia cardíaca y la lesión por isquemia/reperfusión (Saddic & Muehlschlegel, 2016; Long *et al*, 2012; Duisters *et al*, 2009).

Pero la relación directa entre el miR-30e-3p y el infarto de miocardio ha sido poco estudiada, una investigación llevada a cabo en ratas macho detectó unos niveles disminuidos en el ventrículo izquierdo tras un IAM (Chen *et al*, 2021). De manera opuesta, en otro estudio llevado a cabo en ratones y ratas con IAM detectaron un incremento de la expresión de la familia del miR-30 en el miocardio tras el IAM (Shen *et al*, 2015).

Por otro lado, la investigación en humanos sí que estudió el papel circulante del miR-30e-5p tras un IAM, en un estudio en pacientes con IAM detectaron niveles elevados del miR-30e-5p en el momento de la admisión en aquellos pacientes que en los siguientes seis meses desarrollaron insuficiencia cardíaca y disfunción del ventrículo izquierdo (Maclejak *et al*, 2018). Nuestro estudio se centra en el miR-30e-3p, pero esta similitud en los resultados apoya la posibilidad de que el miR-30e juegue un papel importante tras el IAM relacionado con su sobreexpresión.

La familia miR-30 también juega un papel importante en la inhibición de la lesión isquémica cardíaca (Shen *et al*, 2015), y media la hipertrofia

miocárdica inducida por angiotensina II (Pan *et al*, 2013). Concretamente, el miR-30a transportado mediante VE, es capaz de aumentar la autofagia en cardiomiocitos expuestos a la hipoxia (Yang *et al*, 2016), mientras que la disminución de miR-30e podría inhibir la apoptosis para proteger el corazón del daño por isquemia/reperfusión miocárdica (Zheng *et al*, 2018). Por el contrario, otros estudios han demostrado que la sobreexpresión de miR-30a inhibe la autofagia para aliviar la lesión por hipoxia/reoxigenación en cardiomiocitos (Wang *et al*, 2020c). Además, también se ha demostrado que la sobreexpresión de miR-30e-5p disminuye la apoptosis inducida por hipoxia protegiendo a los cardiomiocitos (Mo *et al*, 2019), mientras que otro grupo demostró que la sobreexpresión de miR-30e-3p podría promover la autofagia e inhibir la apoptosis en cardiomiocitos expuestos a la hipoxia intermitente (Li *et al*, 2018).

Esto sugiere que el papel de los miembros de la familia miR-30 en la protección de los cardiomiocitos es diferente según las diversas condiciones fisiológicas. Además, se ha demostrado que el aumento de la autofagia protege a los cardiomiocitos durante la hipoxia, pero la activación excesiva de la autofagia provoca la muerte de los cardiomiocitos durante la lesión por isquemia/reperfusión miocárdica (Li *et al*, 2018). Estos

resultados apoyan nuestros resultados de enriquecimiento funcional del miR-30e-3p, ya que una de las rutas relacionada directamente con este miRNA es la 'Autofagia' a través de los genes diana RAB39B y SH3GLB1. El gen RAB39B pertenece a la familia oncogénica RAS y codifica una proteína de la familia Rab, las cuales son pequeñas GTPasas involucradas en el tráfico de vesículas. Está directamente relacionado con la autofagia (Chiu *et al*, 2023) y también se ha relacionado con la enfermedad de Parkinson entre otras (Lin *et al*, 2017; Ciammola *et al*, 2017; Shi *et al*, 2016). Por su parte, el gen SH3GLB1 codifica para la proteína endofilina-B1, perteneciente a la familia de proteínas Bin/Amphiphysin/Rvs167 y desempeña un papel fundamental en la fisión y fusión mitocondrial, así como en la autofagia y la apoptosis (Yan *et al*, 2021; Chien *et al*, 2022).

Otras rutas resultantes del análisis de enriquecimiento funcional del miR-30e-3p también incluyen a la 'Ruta de señalización FoxO', la 'Ruta de señalización de esfingolípidos' y la 'Ruta de señalización PI3-Akt', todas ellas importantes en la patología del IAM.

La relación del miR-30e-3p con la 'Ruta de señalización FoxO' ha sido establecida en el contexto del músculo esquelético en mujeres antes y después de una

única sesión submáxima de ejercicio de resistencia (Yan *et al*, 2023), a través de esta vía de transducción de señales FoxO mejora el cambio del metabolismo del músculo esquelético de glucosa a oxidación de ácidos grasos al mejorar la actividad de la piruvato deshidrogenasa 4 (Yan *et al*, 2023). Su relación en el ámbito del IAM queda actualmente pendiente de estudio.

En el músculo, la señalización de los esfingolípidos, a través de su forma soluble S1P, actúa de manera autocrina/paracrina para promover la proliferación de células satélite y la regeneración muscular (Rezza *et al*, 2014), por lo que, aunque su relación con el miR-30e-3p no ha sido estudiada en el contexto del IAM, puede ser un punto de partida prometedor como posible terapia tras el daño cardíaco.

La vía PI3K/AKT es una vía de señalización intracelular con un impacto considerable en el control del ciclo celular, esta vía está funcionalmente relacionada con la proliferación celular, la supervivencia celular, el metabolismo y la quiescencia, todos ellos procesos relevantes tras un IAM (Ghafouri-Fard *et al*, 2021). Actualmente, la ruta PI3-Akt está muy estudiada en el contexto del cáncer, de hecho, recientemente se detectó que el miR-30e-3p inhibe el desarrollo del cáncer gástrico al regular negativamente la señalización de la

vía PI3K/AKT/mTOR (Gu *et al*, 2022), afectando a la supresión tumoral del miR-30e-3p.

El aumento de la expresión del miR-148a-3p que observamos en el suero de machos SAMR1 tras un IAM, tampoco se reprodujo en el análisis por RT-qPCR (**Figura 25**). Nuevamente se obtiene poca concordancia entre los dos métodos de análisis, secuenciación y qRT-PCR, pero sin restarle valor a ninguno de los dos, refuerza la estrategia de encontrar nuevas secuencias mediante métodos de secuenciación masiva pero seguidos de una validación individual.

Sin embargo, en el suero de pacientes con IAM, se observó un aumento de expresión de miR-148a-3p, en el grupo de las mujeres, indicando un claro papel del sexo en su regulación (**Figura 31**). De igual manera que el anterior miRNA, solo se detectó su presencia en la fracción transportada mediante VE. En la literatura también se ha estudiado su transporte mediante pequeñas VE en varios artículos de investigación, en un modelo murino de fibrosis hepática, identificaron el miR-148a-3p contenido en VE liberadas por células madre mesenquimales como parte del tratamiento de la fibrosis, regulando el microambiente inflamatorio y reparando la herida (Tian *et al*, 2022). En otro estudio también detectaron el miR-148a-3p contenido en VE obtenidas

de macrófagos, además, también observaron que con estas vesículas se reduce el tamaño del infarto en un modelo in vivo con ratas de isquemia/reperfusión (Dai *et al*, 2020).

En otro modelo con ratas e isquemia/reperfusión también observaron una disminución de la expresión de miR-148a-3p en el miocardio tras la isquemia y reperfusión, además, de que su sobreexpresión en el miocardio dio lugar a varios efectos beneficiosos en rutas de proliferación y migración, la disminución de marcadores de lesión de miocardio, la disminución en la función antioxidante en el tejido de miocardio y el aumento en la producción de IL-10, una citoquina antiinflamatoria (Yin *et al*, 2021b).

Actualmente no se ha encontrado evidencia en la literatura sobre su papel como posible biomarcador circulante tras un IAM, ni en modelos murinos ni con muestras humanas, tampoco de su posible relación con las diferencias de sexo, ya que en nuestro estudio el miR-148a-3p aparece sobreexpresado principalmente en el suero de mujeres con IAM, lo que podría indicar su regulación dependiente del sexo.

Recientemente se ha estudiado la relación del miR-148a-3p con otras patologías cardiovasculares, como la aterosclerosis, principal causa del IAM. Se ha

relacionado la aterosclerosis con la sobreexpresión del miR-148a-3p, lo que supone una reducción de factores de inflamación (TNF, IL-1, IL-6) y un aumento de p-eNOS (NO sintasa de endotelio), por lo que la modulación de miR-148a-3p podría representar una posible diana para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para enfermedades cardiovasculares (Wang *et al*, 2021).

También se ha relacionado a otro miembro de la familia del miR-148a-3p con la aterosclerosis, en concreto al miR-148-5p, el cual reprime a la ITGB1 (integrina $\beta 1$), además de regular la proliferación y apoptosis de macrófagos junto con el lncRNA RAPIA (Sun *et al*, 2020). El miR-148a-3p también inhibe la apoptosis celular y los niveles de IL-6 y TNF- α en macrófagos THP-1 inducidos por oxLDL, estos resultados indican que el miR-148a-3p atenúa la apoptosis y la inflamación en macrófagos THP-1 inducidos por oxLDL (Wang *et al*, 2022).

En otro estudio similar se observó que en macrófagos estimulados con ox-LDL, SULT2B1b, una sulfatotransferasa, regula la expresión de varios microRNAs, incluyendo miR-148a-3p. El silenciamiento de esta sulfatotransferasa aumentó la expresión de miR-148a-3p, el cual también regula directamente la expresión de IKKB, lo que activa la ruta NF-KB en

macrófagos, lo que resulta en una respuesta inflamatoria y la expresión de citoquinas inflamatorias como IL-6 y TNF-alfa. Estos hallazgos sugieren que la inhibición de SULT2B1b o miR-148a-3p podrían ser potenciales estrategias terapéuticas para tratar la aterosclerosis y la inflamación relacionada con ella (Yin *et al*, 2021a).

En nuestro estudio de la implicación biológica del miR-148a-3p obtuvimos, entre otras, la 'Ruta de señalización FoxO', la 'Ruta de señalización PI3-Akt', la 'Ruta de señalización ErbB' y la 'Ruta de señalización TGF- β ' (factor de crecimiento transformante).

La relación entre la 'Ruta de señalización FoxO' y el miR-148a-3p se ha demostrado previamente en células endoteliales, afectando a su función proliferativa y migratoria a través de la supresión de FOXO3 y FOXO4 mediante la sobreexpresión de miR-148a-3p, y en última instancia, exacerbando la aterosclerosis (Shang *et al*, 2019). Además, la ruta de señalización FoxO está involucrada en multitud de procesos relevantes fisiológicamente, como procesos de proliferación celular, muerte celular, senescencia, angiogénesis y migración celular (Jiramongkol & Lam, 2020).

De igual manera ocurre con la relación entre el miR-148a-3p y la 'Ruta de señalización PI3-Akt', ya que se ha visto que la sobreexpresión del miRNA activa la vía

de señalización PI3-Akt, promoviendo la diferenciación e inhibiendo la apoptosis de células satélite del músculo esquelético, estableciendo su papel como posible promotor de la miogénesis (formación de células del tejido muscular) (Yin *et al*, 2020).

La 'Ruta de señalización ErbB' está compuesta por muchos tipos de receptores de superficie, uno de ellos es el inhibidor de retroalimentación del receptor ErbB 1 (ERRFI1), el cual es diana directa del miR-148a-3p, la sobreexpresión del miRNA promovió la proliferación de células endoteliales, este resultado confirma el papel del miR-148a-3p promoviendo la angiogénesis del tumor en gliomas (Wang *et al*, 2020a).

Otra ruta directamente relacionada con el miR-148a-3p en el estudio de enriquecimiento funcional es la 'Ruta de señalización TGF- β ', esta conexión ha sido explorada en la literatura sobre todo en el contexto del carcinoma hepatocelular, el tipo de cáncer de hígado más común. En especial, en un estudio in vitro y con muestras de pacientes se ha observado que el miR-148a-3p es un represor de la progresión del carcinoma a través de la disminución de la expresión de genes implicados en la ruta TGF- β , como la SMAD2 (Huang *et al*, 2020). En otro estudio con pacientes con carcinoma hepatocelular detectaron niveles inferiores en suero del

miR-148a-3p y superiores de TGF- β 1 comparado con los controles sanos, estos valores se relacionaron con metástasis y lesiones multinodulares, entre otros (Dawood *et al*, 2021).

Respecto al miR-149-5p, sus valores en los ratones SAMR1/SAMP8 tras un IAM aumentaron de manera significativa en el grupo de las ratonas SAMR1 mediante el análisis de secuenciación, mientras que mediante qRT-PCR se vio un aumento significativo en las ratonas SAMP8, y una tendencia de sobreexpresión en las ratonas SAMR1 (**Figura 26**). El miR-149-5p solo se detectó en el contenido de las VE (**Figura 32**) y se observó una tendencia al aumento en muestras de pacientes con IAM, que sólo se mantenía en mujeres.

En relación a la detección del miR-149-5p contenido en VE en el suero tras un IAM, hay pocos datos, aunque también se ha observado transportado en VE en la sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma de pulmón (Tian *et al*, 2021), cuyo estudio in vitro de sobreexpresión reveló el crecimiento de células tumorales e inhibió su apoptosis. También se identificó la presencia de este miRNA en VE derivadas de macrófagos de médula ósea tratados con ácido zoledrónico (usado para reducir el riesgo de fractura

osteoporótica), regulando funciones biológicas como la angiogénesis en células endoteliales (Shen *et al*, 2022).

La sobreexpresión de este miRNA tras un IAM no se ha explorado en la literatura específicamente, pero sí se ha desarrollado su relación con la lesión producida tras una isquemia/reperfusión, concretamente, en un estudio *in vitro* descubrieron que la sobreexpresión de miR-149-5p inhibió la viabilidad celular y promovió la piroptosis en células del miocardio expuestas a condiciones de hipoxia durante 2 horas (Lin *et al*, 2019). Gracias a otra investigación también en células del miocardio, concluyeron que el miR-149-5p reduce la apoptosis inducida por la isquemia/reperfusión inhibiendo la expresión de IL-6 (Pan *et al*, 2020).

En cuanto al efecto del envejecimiento en el presente estudio, se detectó un aumento en circulación del miR-149-5p en los ratones SAMP8 tras un IAM, lo que establece un vínculo entre la patología y el envejecimiento, esta conexión ha sido estudiada previamente, ya que ha sido propuesto como un biomarcador para el diagnóstico de la cardiopatía coronaria en personas de edad avanzada, donde se observó una disminución de su expresión en el plasma de pacientes con cardiopatía coronaria en comparación con los controles sanos (Ali Sheikh *et al*, 2015).

Se ha demostrado que miR-149-5p está involucrado en diversas enfermedades como la leucemia mieloide aguda (Tian & Yan, 2016), diabetes tipo 1 (Grieco *et al*, 2017), el carcinoma de células renales (Jin *et al*, 2016), y enfermedades metabólicas (Li *et al*, 2017). Además, diversos estudios han demostrado que miR-149-5p afecta a la proliferación celular y es importante tanto en el desarrollo del corazón y vasos sanguíneos como en la fisiopatología cardiovascular (Bennett *et al*, 2016; Fan *et al*, 2016). Su mecanismo de acción se relaciona con la regulación directa de la función celular, el control post-transcripcional de genes y la activación de vías clave de señalización intracelular (Tian & Yan, 2016).

Por ejemplo, se ha demostrado que la expresión de miR-149-5p está disminuida en astrocitomas (tumores en astrocitos), donde actúa como un supresor tumoral inhibiendo la proliferación y la migración celular (Schaefer *et al*, 2010). Sin embargo, en leucemia mieloide aguda, acelera la progresión de la enfermedad al promover la proliferación celular y detener el ciclo celular y la apoptosis (Fan *et al*, 2016). También se ha observado que su sobreexpresión inhibe la proliferación, la invasión y la migración de células musculares lisas (Zhang *et al*, 2019). Además, se ha observado una relación directa con el RNA no codificante circular

circDHCR24, cuya sobreexpresión puede aumentar la expresión de MMP9 al actuar como una esponja del miR-149-5p, afectando a la proliferación celular (Peng *et al*, 2020). También, relacionado con enfermedades cardiovasculares se ha observado el vínculo entre el miR-149-5p y el CD47, cuya interacción regula el desarrollo de placas ateroscleróticas necróticas (Ye *et al*, 2019).

El miR-149-5p también regula el desarrollo de la fibrosis hepática al dirigirse a TGF- β 2 *in vivo* e *in vitro* (Zhu *et al*, 2021b). miR-149-5p se identificó como antiinflamatorio y fibrótico, y su inhibición mejoró la expresión de COL22A1, indicando un efecto antiinflamatorio y fibrótico de miR-149-5p en la función cardíaca, la inflamación y la fibrosis (Li *et al*, 2022). El miR-149-5p también se ha descubierto como un supresor angiogénico mediante la acción directa de FOXO1, su gen diana (Zhang *et al*, 2021a).

El análisis funcional realizado para el miR-149-5p en el presente trabajo contiene rutas muy prometedoras relacionadas con las enfermedades cardiovasculares, como la 'Ruta de señalización del calcio', la 'Ruta de señalización del AMPc', la 'Adhesión focal', la 'Ruta de señalización PI3-Akt' y la 'Ruta de señalización MAPK'. Estos resultados coinciden en parte

con un estudio realizado en adipocitos bovinos, que tras su transfección con el miR-149-5p secuenciaron el RNA total para identificar aquellos genes alterados y estudiar las rutas KEGG directamente afectadas, con lo que presentaron entre otras, la 'Ruta de señalización del calcio', la 'Ruta de señalización del AMPc', la 'Ruta de señalización de PI3-Akt' y la 'Ruta de señalización de MAPK' (Guo *et al*, 2021). Todas ellas son rutas cuya relación directa con el miR-149-5p ha sido establecida, pero no en el contexto de la patología del IAM, aportando nuevas posibles vías de investigación para el descubrimiento del papel de este miRNA en dichas rutas de señalización. Ya que, se ha informado de la implicación de la vía de señalización del calcio como un novedoso mecanismo para el tratamiento del IAM tras el uso de la inyección Danhong, un método tradicional de medicina China (Guo *et al*, 2022).

En condiciones fisiológicas, la señalización de AMPc juega un papel clave en la regulación de la función cardíaca, su activación refleja la adaptación de los cardiomiocitos a diversos estímulos extracelulares, como el IAM, tras el cual se establece una activación crónica de la señalización del AMPc cardíaco para compensar la pérdida de cardiomiocitos (Colombe & Pidoux, 2021). Si bien esta adaptación es principalmente beneficiosa para la función contráctil, a la larga resulta perjudicial, por lo

que se confirma su papel como ruta de interés tras un IAM.

Las adhesiones focales son estructuras multiproteicas complejas que median la adhesión celular al conectar el citoesqueleto a la matriz extracelular, contribuyendo a la migración celular al traducir fuerzas externas en las fibras de estrés de actina (Carton *et al*, 2023). También se ha relacionado la adhesión focal con el IAM, por ejemplo, la inhibición dirigida de la quinasa de adhesión focal atenúa la fibrosis cardíaca y preserva la función cardíaca en la remodelación cardíaca adversa tras un IAM (Zhang *et al*, 2017).

Como se ha mencionado anteriormente, la vía de señalización PI3-Akt y la vía de señalización MAPK juegan un papel importante tras el IAM, sobre todo, en la regeneración del tejido tras el daño cardíaco producido por la isquemia miocárdica, ambas rutas se han descrito afectadas por la acción del miR-149-5p circulante en pacientes de Lupus sistémico, afectando directamente a procesos de apoptosis (FJ *et al*, 2019).

En la presente tesis también se estudió el miR-423-5p, el cual presentó una infraexpresión en los ratones SAMR1 machos mediante el análisis de secuenciación y que se confirmó mediante qRT-PCR (**Figura 27**). En el caso de las muestras de pacientes, se

pudo detectar su presencia en la fracción total del suero, además de contenido en las VE, donde en ambos casos se vio una disminución tras un infarto (**Figura 33**).

El transporte del miR-423-5p mediante VE ha sido descrito anteriormente por varias investigaciones, se encontró transportado en VE liberadas por células madre humanas del tejido adiposo, exhibiendo un papel importante en la regeneración del tejido, ya que es capaz de promover la angiogénesis (Xu *et al*, 2019). También se identificó transportado en VE de células cancerosas tras un tratamiento con sorafenib, un fármaco anticancerígeno (Stiuso *et al*, 2015).

Actualmente, la relación directa del miR-423-5p con el IAM como posible biomarcador circulante ha sido poco estudiada en la literatura, Nabialek et al., realizó un estudio con pacientes con IAM donde encontró una sobreexpresión inicial del miRNA en el plasma de los pacientes, y su posterior normalización al cabo de 6 horas (Nabialek *et al*, 2013). Este resultado parece indicar lo opuesto que nuestro estudio, poniendo de manifiesto la necesidad de más estudios sobre la expresión del miR-423-5p tras un IAM.

El miR-423-5p también se ha estudiado como posible biomarcador en insuficiencia cardíaca (Goren *et al*, 2012; Tijssen *et al*, 2010) y enfermedad arterial

coronaria (Nabialek *et al*, 2013; Rizzacasa *et al*, 2019), por lo que su implicación con la patología cardiovascular está bien documentada. También se ha especulado sobre su participación en la nefritis lúpica a través de la modulación del eje TNIP2-NF-kB (Wang *et al*, 2017).

El miR-423-5p también está disminuido en pacientes con insuficiencia cardiaca durante las primeras 48 horas tras un ingreso hospitalario, y esta disminución se ha asociado a un mayor riesgo de mortalidad en 180 días (Ovchinnikova *et al*, 2016). De manera similar, en pacientes con insuficiencia cardiaca los niveles más bajos de miR-423-5p predicen una mortalidad superior en 1 año (Seronde *et al*, 2015; Tijssen *et al*, 2012; Goren *et al*, 2012).

En un estudio realizado en la población china encontraron que la inclusión del miR-423-5p en los factores de riesgo tradicionales mejoró significativamente la capacidad de discriminación y reclasificación de los eventos de la enfermedad coronaria arterial, ya que un mayor nivel circulante de miR-423-5p estaba asociado con un menor riesgo de muerte (Wang *et al*, 2020b).

En ratones, miR-423-5p tiene un papel en la apoptosis de los cardiomiocitos a través de su regulación sobre el gen OGT, que es necesario para la división

celular y la embriogénesis mediante la adición de azúcar a las proteínas diana. La sobreexpresión de miR-423-5p en cardiomiocitos murinos resultó en la inhibición de la expresión de OGT y la fosforilación de AMPK, lo que llevó a un aumento en la tasa de apoptosis de los cardiomiocitos mediante la regulación de las proteínas proapoptóticas p53 y caspasa-3 (Shafi *et al*, 2000; Luo *et al*, 2015). Además, la supresión de OGT de los cardiomiocitos está involucrada en la inducción de insuficiencia cardíaca; de hecho, la OGT es una parte importante de la respuesta compensatoria endógena a la insuficiencia cardíaca inducida por infarto (Watson *et al*, 2010). Cabe destacar que la muerte apoptótica de los cardiomiocitos en la zona límite del área del infarto de miocardio agrava la disfunción cardíaca y causa insuficiencia cardíaca y mortalidad (Nabel & Braunwald, 2012).

El estudio de enriquecimiento funcional realizado en la presente Tesis con el miR-423-5p dio lugar a varias rutas KEGG involucradas con sus genes diana, la 'Ruta de señalización Ras', la 'Ruta de señalización MAPK' y la 'Ruta de señalización PI3-Akt'. Estos resultados coinciden con los obtenidos en una investigación previa sobre el miR-423-5p, y otros miRNAs, donde también realizaron un análisis funcional, obteniendo sus genes dianas, y posteriormente las rutas

de señalización afectadas de manera directa, indicando la existencia de una relación directa de estas rutas con la angiogenesis, y, por tanto, el valor proangiogénico del miR-423-5p (Xu *et al*, 2019).

Las proteínas RAS son reguladores clave de varias funciones, como el crecimiento, la supervivencia y la migración celular (Downward, 2003), dos de las principales vías celulares en las que operan la proteínas RAS son las vías de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la fosfoinositida-3 quinasa (PI3K), todas ellas cascadas de señalización muy estudiadas en el contexto de la carcinogenesis (Zenonos & Kyprianou, 2013). En resumen, el miR-423-5p participa en la regulación de rutas relevantes para el proceso de regeneración tras un IAM, siendo interesante su uso para posibles tratamientos terapéuticos.

6. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

1. El modelo murino SAMR1/SAMP8 presenta una desregulación de los miRNAs circulantes tras el IAM similar a la observada en humanos y en otros modelos experimentales, lo que le hace adecuado para llevar a cabo estudios transcriptómicos. El tiempo óptimo de toma de muestra tras el infarto para realizar estudios de expresión de miRNAs en este modelo es de 4 horas.
2. El sexo y la senescencia afectan al perfil de expresión de miRNAs circulantes tras un IAM en ratones SAMR1/SAMP8.
3. Las principales rutas biológicas afectadas determinadas bioinformáticamente tras un IAM en ratones SAMR1 son la 'Ruta de señalización ErbB' y la 'Ruta de la resistencia al inhibidor de la tirosina quinasa EGFR' en machos y la 'Ruta de señalización de las MAPK' en hembras. En SAMP8 hembras la 'Ruta de regulación de la longevidad' y la 'Ruta de la resistencia al inhibidor de la tirosina quinasa EGFR', en machos el análisis bioinformático no ofreció información de ninguna ruta alterada de manera significativa.

4. El estudio bioinformático también apunta hacia rutas biológicas que están reguladas por el infarto en machos y en hembras de manera inversa, tanto en la cepa SAMR1, como en la SAMP8. En SAMR1 destacan la 'Ruta de la longevidad' y la 'Ruta de señalización FoxO', y en SAMP8, las que afectan a la 'Depresión a largo plazo, LTD' y a las 'Uniones GAP'.
5. La tendencia de los miRNAs circulantes diferencialmente expresados en los algoritmos utilizados en la secuenciación, miR-30e-3p, miR-148a-3p, miR-149-5p y miR-423-5p, fue parcialmente validada por qRT-PCR en el grupo de ratones SAMR1/SAMP8 con IAM.
6. En pacientes con IAM, los miRNAs circulantes miR-148a-3p, miR-149-5p y miR-423-5p siguen la misma tendencia de expresión que en el modelo SAMR1/SAMP8. Sin embargo, en el suero de pacientes los miRNAs miR-30e-3p, miR-148a-3p y miR-149-5p solo se detectaron en vesículas extracelulares, mientras que el miR-423-5p se detectó también en el suero total.

7. En pacientes con IAM también se observan diferencias de sexo en la expresión del miR-148-3p circulante, por lo que el sexo es una variable a tener en cuenta en los estudios transcriptómicos.
8. La principal ruta de señalización afectada por el miRNAs circulante miR-148a-3p y, por tanto, susceptible de ser regulada diferencialmente por sexo en humanos es la 'Ruta de señalización FoxO', involucrada en procesos de proliferación celular, muerte celular, senescencia, angiogénesis y migración celular.

1. The SAMR1/SAMP8 murine model exhibits dysregulation of circulating miRNAs following AMI similar to that observed in humans and other experimental models, making it suitable for conducting transcriptomic studies. The optimal sampling time for miRNA expression studies in this model after myocardial infarction is 4 hours.
2. Sex and senescence affect the profile of circulating miRNA expression following AMI in SAMR1/SAMP8 mice.
3. The main biologically affected pathways determined bioinformatically following an MI in SAMR1 mice are the 'ErbB Signaling Pathway' and the 'EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor Resistance Pathway' in males, and the 'MAPK Signaling Pathway' in females. In SAMP8 females, the 'Longevity Regulation Pathway' and the 'EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor Resistance Pathway' are affected, while in males, the bioinformatic analysis did not provide significant information regarding any altered pathway.

4. The bioinformatics study also points to biological pathways that are inversely regulated by infarction in males and females, both in the SAMR1 strain and the SAMP8 strain. In SAMR1, the 'Longevity Pathway' and the 'FoxO Signaling Pathway' stand out, while in SAMP8, pathways related to 'Long-Term Depression, LTD' and 'Gap Junctions' are affected.
5. The trend of differentially expressed circulating miRNAs identified by sequencing algorithms, such as miR-30e-3p, miR-148a-3p, miR-149-5p, and miR-423-5p, was partially validated by qRT-PCR in the SAMR1/SAMP8 mouse group with AMI.
6. In patients with AMI, the circulating miRNAs miR-148a-3p, miR-149-5p, and miR-423-5p follow the same expression trend after AMI as observed in the SAMR1/SAMP8 model. However, in patient serum, miRNAs miR-30e-3p, miR-148a-3p, and miR-149-5p were only detected within extracellular vesicles, while miR-423-5p was also detected in total serum.

7. Sex differences in the expression of circulating miRNAs miR-148-3p are also observed in patients following AMI, indicating that sex is a variable to consider in transcriptomics studies.
8. The main signaling pathway affected by circulating miR-148a-3p miRNAs and, therefore, susceptible to be differentially regulated by sex in humans is the 'FoxO Signaling Pathway', involved in processes such as cell proliferation, cell death, senescence, angiogenesis and cell migration.

7. REFERENCIAS

- Adachi T, Nakanishi M, Otsuka Y, Nishimura K, Hirokawa G, Goto Y, Nonogi H & Iwai N (2010) Plasma microRNA 499 as a biomarker of acute myocardial infarction. *Clin Chem* 56: 1183–1185
- Ahn D, Cheng L, Moon C, Spurgeon H, Lakatta EG & Talan MI (2004) Induction of myocardial infarcts of a predictable size and location by branch pattern probability-assisted coronary ligation in C57BL/6 mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286 (3 55-3)
- Ai J, Zhang R, Li Y, Pu J, Lu Y, Jiao J, Li K, Yu B, Li Z, Wang R, *et al* (2010) Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 391: 73–77
- Akat KM, Moore-McGriff D, Morozov P, Brown M, Gogakos T, Da Rosa JC, Mihailovic A, Sauer M, Ji R, Ramaratnam A, *et al* (2014) Comparative RNA-sequencing analysis of myocardial and circulating small RNAs in human heart failure and their utility as biomarkers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 11151–11156
- Ali Sheikh MS, Xia K, Li F, Deng X, Salma U, Deng H, Wei Wei L, Yang TL & Peng J (2015) Circulating miR-765 and miR-149: Potential noninvasive diagnostic biomarkers for geriatric coronary artery disease patients. *Biomed Res Int* 2015
- Almaghrbi H, Giordo R, Pintus G & Zayed H (2023) Non-coding RNAs as biomarkers of myocardial infarction. *Clinica Chimica Acta* 540: 117222
- Alquézar Arbé A, Santaló Bel M & Sionis A (2015) Interpretación clínica de la determinación de

- troponina T de elevada sensibilidad. *Med Clin (Barc)* 145: 258–263
- Arora S, Stouffer GA, Kucharska-Newton AM, Qamar A, Vaduganathan M, Pandey A, Porterfield D, Blankstein R, Rosamond WD, Bhatt DL, *et al* (2019) Twenty Year Trends and Sex Differences in Young Adults Hospitalized With Acute Myocardial Infarction. *Circulation* 139: 1047–1056
- Bart van der Worp H, Howells DW, Sena ES, Porritt MJ, Rewell S, O'Collins V & Macleod MR (2010) Can animal models of disease reliably inform human studies? *PLoS Med* 7: 1–8
- Bartel DP (2018) Metazoan MicroRNAs. *Cell* 173: 20–51
- Beale AL, Meyer PMD, Marwick TH, Lam CSP & Kaye DM (2018) Sex Differences in Cardiovascular Pathophysiology. *Circulation* 138: 198–205
- Benesova S, Kubista M & Valihrach L (2021) Small RNA-Sequencing: Approaches and Considerations for miRNA Analysis. *Diagnostics* 11 (6)
- Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, Das SR, *et al* (2019) Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 139: e56–e528
- Bennett MR, Sinha S & Owens GK (2016) Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ Res* 118: 692–702
- Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R & Falk E (2014) Mechanisms of Plaque Formation and Rupture. *Circ Res* 114: 1852–1866

- Bersell K, Arab S, Haring B & Kühn B (2009) Neuregulin1/ErbB4 Signaling Induces Cardiomyocyte Proliferation and Repair of Heart Injury. *Cell* 138: 257–270
- Białek S, Górko D, Zajkowska A, Kołtowski Ł, Grabowski M, Stachurska A, Kochman J, Sygitowicz G, Małecki M, Opolski G, *et al* (2015) Release kinetics of circulating miRNA-208a in the early phase of myocardial infarction. *Kardiologia Polska (Polish Heart Journal)* 73: 613–619
- Boštjančič E, Zidar N, Štajer D & Glavač D (2010) MicroRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-208 are dysregulated in human myocardial infarction. *Cardiology* 115: 163–169
- Bujak M, Kweon HJ, Chatila K, Li N, Taffet G & Frangogiannis NG (2008) Aging-Related Defects Are Associated With Adverse Cardiac Remodeling in a Mouse Model of Reperfused Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* 51: 1384
- Butterfield DA & Poon HF (2005) The senescence-accelerated prone mouse (SAMP8): a model of age-related cognitive decline with relevance to alterations of the gene expression and protein abnormalities in Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* 40: 774–783
- Cai MX, Shi XC, Chen T, Tan ZN, Lin QQ, Du SJ & Tian ZJ (2016) Exercise training activates neuregulin 1/ErbB signaling and promotes cardiac repair in a rat myocardial infarction model. *Life Sci* 149: 1–9
- Calin GA & Croce CM (2006) MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 6: 857–866

- Camps C, Saini HK, Mole DR, Choudhry H, Reczko M, Guerra-Assunção JA, Tian YM, Buffa FM, Harris AL, Hatzigeorgiou AG, *et al* (2014) Integrated analysis of microRNA and mRNA expression and association with HIF binding reveals the complexity of microRNA expression regulation under hypoxia. *Mol Cancer* 13
- Carton F, Casarella S, Di Francesco D, Zanella E, D'urso A, Di Nunno L, Fusaro L, Cotella D, Prat M, Follenzi A, *et al* (2023) Cardiac Differentiation Promotes Focal Adhesions Assembly through Vinculin Recruitment. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol 24, Page 2444 24: 2444
- Castoldi G, di Gioia CRT, Bombardi C, Catalucci D, Corradi B, Gualazzi MG, Leopizzi M, Mancini M, Zerbini G, Condorelli G, *et al* (2012) MiR-133a regulates collagen 1A1: potential role of miR-133a in myocardial fibrosis in angiotensin II-dependent hypertension. *J Cell Physiol* 227: 850–856
- Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, Conlon FL & Wang DZ (2006) The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet* 38: 228–233
- Chen MH, Kerkelä R & Force T (2008) Mechanisms of Cardiac Dysfunction Associated With Tyrosine Kinase Inhibitor Cancer Therapeutics. *Circulation* 118: 84–95
- Chen Y, Yin Y & Jiang H (2021) miR-30e-5p Alleviates Inflammation and Cardiac Dysfunction After Myocardial Infarction Through Targeting PTEN. *Inflammation* 44: 769–779

- Cheng M, Yang J, Zhao X, Zhang E, Zeng Q, Yu Y, Yang L, Wu B, Yi G, Mao X, *et al* (2019) Circulating myocardial microRNAs from infarcted hearts are carried in exosomes and mobilise bone marrow progenitor cells. *Nature Communications* 2019 10:1 10: 1–9
- Cheng Y, Tan N, Yang J, Liu X, Cao X, He P, Dong X, Qin S & Zhang C (2010) A translational study of circulating cell-free microRNA-1 in acute myocardial infarction. *Clin Sci (Lond)* 119: 87–95
- Chien CH, Yang W Bin, Chuang JY, Lee JS, Liao WA, Huang CY, Chen PY, Wu AC, Yang ST, Lai CC, *et al* (2022) SH3GLB1-related autophagy mediates mitochondrial metabolism to acquire resistance against temozolomide in glioblastoma. *J Exp Clin Cancer Res* 41
- Chistiakov DA, Orekhov AN & Bobryshev Y V. (2016) Cardiac Extracellular Vesicles in Normal and Infarcted Heart. *Int J Mol Sci* 17: 1–18
- Chiu CC, Weng YH, Yeh TH, Lu JC, Chen WS, Li AHR, Chen YL, Wei KC & Wang HL (2023) Deficiency of RAB39B Activates ER Stress-Induced Pro-apoptotic Pathway and Causes Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Dopaminergic Neurons by Impairing Autophagy and Upregulating α -Synuclein. *Mol Neurobiol* 60
- Chung AK, Das SR, Leonard D, Peshock RM, Kazi F, Abdullah SM, Canham RM, Levine BD & Drazner MH (2006) Women Have Higher Left Ventricular Ejection Fractions Than Men Independent of Differences in Left Ventricular Volume. *Circulation* 113: 1597–1604

- Chung M, Bruno VM, Rasko DA, Cuomo CA, Muñoz JF, Livny J, Shetty AC, Mahurkar A & Dunning Hotopp JC (2021) Best practices on the differential expression analysis of multi-species RNA-seq. *Genome Biology* 2021 22:1 22: 1–23
- Ciammola A, Carrera P, Di Fonzo A, Sassone J, Villa R, Poletti B, Ferrari M, Girotti F, Monfrini E, Buongarzone G, *et al* (2017) X-linked Parkinsonism with Intellectual Disability caused by novel mutations and somatic mosaicism in RAB39B gene. *Parkinsonism Relat Disord* 44: 142–146
- Coenye T (2021) Do results obtained with RNA-sequencing require independent verification? *Biofilm* 3
- Cole JH, Miller JI, Sperling LS & Weintraub WS (2003) Long-term follow-up of coronary artery disease presenting in young adults. *J Am Coll Cardiol* 41: 521–528
- Colombe AS & Pidoux G (2021) Cardiac cAMP-PKA Signaling Compartmentalization in Myocardial Infarction. *Cells* 10
- Colpaert RMW & Calore M (2019) MicroRNAs in Cardiac Diseases. *Cells* 8
- Corchete LA, Rojas EA, Alonso-López D, De Las Rivas J, Gutiérrez NC & Burguillo FJ (2020) Systematic comparison and assessment of RNA-seq procedures for gene expression quantitative analysis. *Scientific Reports* 2020 10:1 10: 1–15
- Corsten MF, Dennert R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, Hofstra L, Wagner DR, Staessen JA, Heymans S & Schroen B (2010a) Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect

- myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet* 3: 499–506
- Corsten MF, Dennert R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, Hofstra L, Wagner DR, Staessen JA, Heymans S & Schroen B (2010b) Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet* 3: 499–506
- Curley D, Lavin Plaza B, Shah AM & Botnar RM (2018) Molecular imaging of cardiac remodelling after myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 113: 10
- Curtis AB, Karki R, Hattoum A & Sharma UC (2018a) Arrhythmias in Patients ≥80 Years of Age: Pathophysiology, Management, and Outcomes. *J Am Coll Cardiol* 71: 2041–2057
- Curtis AB, Karki R, Hattoum A & Sharma UC (2018b) Arrhythmias in Patients ≥80 Years of Age: Pathophysiology, Management, and Outcomes. *J Am Coll Cardiol* 71: 2041–2057
- Dai DF & Rabinovitch PS (2009) Cardiac aging in mice and humans: the role of mitochondrial oxidative stress. *Trends Cardiovasc Med* 19: 213–220
- Dai G, Kaazempur-Mofrad MR, Natarajan S, Zhang Y, Vaughn S, Blackman BR, Kamm RD, García-Cardeña G & Gimbrone MA (2004) Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and -resistant regions of human vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 14871–14876
- Dai Y, Wang S, Chang S, Ren D, Shali S, Li C, Yang H, Huang Z & Ge J (2020) M2 macrophage-derived

- exosomes carry microRNA-148a to alleviate myocardial ischemia/reperfusion injury via inhibiting TXNIP and the TLR4/NF- κ B/NLRP3 inflammasome signaling pathway. *J Mol Cell Cardiol* 142: 65–79
- Dawood AA, Saleh AA, Elbahr O, Gohar SF & Habieb MS (2021) Inverse relationship between the level of miRNA 148a-3p and both TGF- β 1 and FIB-4 in hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Rep* 27: 101082
- DeFilippis EM, Collins BL, Singh A, Biery DW, Fatima A, Qamar A, Berman AN, Gupta A, Cawley M, Wood MJ, *et al* (2020) Women who experience a myocardial infarction at a young age have worse outcomes compared with men: the Mass General Brigham YOUNG-MI registry. *Eur Heart J* 41: 4127–4137
- Instituto Nacional de Estadística (INE). Defunciones por Infarto Agudo de Miocardio (2022). <https://www.ine.es/jaxiT3/Datos.htm?t=7947#!tabs-grafico>
- Derveaux S, Vandesompele J & Hellemans J (2010) How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods* 50: 227–230
- Devaux Y, Vausort M, Goretti E, Nazarov P V., Azuaje F, Gilson G, Corsten MF, Schroen B, Lair ML, Heymans S, *et al* (2012) Use of circulating microRNAs to diagnose acute myocardial infarction. *Clin Chem* 58: 559–567
- Downward J (2003) Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 2003 3:13: 11–22

- Duisters RF, Tijssen AJ, Schroen B, Leenders JJ, Lentink V, Van Der Made I, Herias V, Van Leeuwen RE, Schellings MW, Barenbrug P, *et al* (2009) miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor: implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling. *Circ Res* 104: 170–178
- Egido J, Zaragoza C, Gomez-Guerrero C, Martin-Ventura JL, Blanco-Colio L, Lavin B, Mallavia B, Tarin C, Mas S & Ortiz A (2011) Animal models of cardiovascular diseases. *J Biomed Biotechnol* 2011
- Egred M, Viswanathan G & Davis GK (2005) Myocardial infarction in young adults. *Postgrad Med J* 81: 741–745
- Everaert C, Luypaert M, Maag JLV, Cheng QX, Dinger ME, Hellemans J & Mestdagh P (2017) Benchmarking of RNA-sequencing analysis workflows using whole-transcriptome RT-qPCR expression data. *Sci Rep* 7
- Fan S jin, Li H bo, Cui G, Kong X lin, Sun L li, Zhao Y qiu, Li Y hua & Zhou J (2016) miRNA-149* promotes cell proliferation and suppresses apoptosis by mediating JunB in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 41: 62–70
- Fantidisa P, Fernández-Ortiz A, Aragoncillo P, Pérez de Prada T, Sanmartín M, López J, Sabaté M, Escaned J, Alfonso F, Hernández R, *et al* (2001) Efecto del AMPc sobre la función de las células endoteliales y la proliferación fibromuscular tras la lesión de las arterias carótida y coronaria en un modelo porcino | Revista Española de Cardiología. *Rev Esp Cardiol* 54: 981–989

- Ferrari AU, Radaelli A & Centola M (2003) Invited review: aging and the cardiovascular system. *J Appl Physiol* (1985) 95: 2591–2597
- FJ G, AT S, N A & V H (2019) hsa-miR-149-5p Diminish MAPK and PI3K/Akt Signalling Pathways through Down-regulation of ERBB3 in SLE Patients. *Molecular Biology: Open Access* 8: 1–6
- Forman DE, Alexander K, Brindis RG, Curtis AB, Maurer M, Rich MW, Sperling L & Wenger NK (2016) Improved Cardiovascular Disease Outcomes in Older Adults. *F1000Res* 5
- Forman K, Vara E, García C, Kireev R, Cuesta S, Escames G & Tresguerres JAF (2011) Effect of a combined treatment with growth hormone and melatonin in the cardiological aging on male SAMP8 mice. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences* 66 A: 823–834
- Fritz J V., Heintz-Buschart A, Ghosal A, Wampach L, Etheridge A, Galas D & Wilmes P (2016) Sources and Functions of Extracellular Small RNAs in Human Circulation. *Annu Rev Nutr* 36: 301–336
- Gao XM, Dart AM, Dewar E, Jennings G & Du XJ (2000) Serial echocardiographic assessment of left ventricular dimensions and function after myocardial infarction in mice. *Cardiovasc Res* 45: 330–338
- Gerhardt T & Ley K (2015) Monocyte trafficking across the vessel wall. *Cardiovasc Res* 107: 321–330
- Ghafouri-Fard S, Abak A, Tondro Anamag F, Shoorei H, Majidpoor J & Taheri M (2021) The emerging role of non-coding RNAs in the regulation of PI3K/AKT

pathway in the carcinogenesis process. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 137: 111279

Ghafouri-Fard S, Khanbabapour Sasi A, Hussien BM, Shooarei H, Siddiq A, Taheri M & Ayatollahi SA (2022) Interplay between PI3K/AKT pathway and heart disorders. *Mol Biol Rep* 49: 9767–9781

Gidlöf O, Andersson P, Van Der Pals J, Götberg M & Erlinge D (2011) Cardiospecific microRNA plasma levels correlate with troponin and cardiac function in patients with ST elevation myocardial infarction, are selectively dependent on renal elimination, and can be detected in urine samples. *Cardiology* 118: 217–226

Gidlöf O, Smith JG, Miyazu K, Gilje P, Spencer A, Blomquist S & Erlinge D (2013) Circulating cardio-enriched microRNAs are associated with long-term prognosis following myocardial infarction. *BMC Cardiovasc Disord* 13

Giridharan V V., Karupppagounder V, Arumugam S, Nakamura Y, Guha A, Barichello T, Quevedo J, Watanabe K, Konishi T & Thandavarayan RA (2020) 3,4-Dihydroxybenzalacetone (DBL) Prevents Aging-Induced Myocardial Changes in Senescence-Accelerated Mouse-Prone 8 (SAMP8) Mice. *Cells* 9

Goodenough DA & Paul DL (2009) Gap Junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1

Goren Y, Kushnir M, Zafir B, Tabak S, Lewis BS & Amir O (2012) Serum levels of microRNAs in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail* 14: 147–154

Grabmaier U, Clauss S, Gross L, Klier I, Franz WM, Steinbeck G, Wakili R, Theiss HD & Brenner C

- (2017) Diagnostic and prognostic value of miR-1 and miR-29b on adverse ventricular remodeling after acute myocardial infarction - The SITAGRAMI-miR analysis. *Int J Cardiol* 244: 30–36
- Grieco FA, Sebastiani G, Juan-Mateu J, Villate O, Marroqui L, Ladrière L, Tugay K, Regazzi R, Bugliani M, Marchetti P, *et al* (2017) MicroRNAs miR-23a-3p, miR-23b-3p, and miR-149-5p Regulate the Expression of Proapoptotic BH3-Only Proteins DP5 and PUMA in Human Pancreatic β -Cells. *Diabetes* 66: 100–112
- Gu XJ, Li YJ, Wang F & Ye T (2022) MiR-30e-3p inhibits gastric cancer development by negatively regulating THO complex 2 and PI3K/AKT/mTOR signaling. *World J Gastrointest Oncol* 14: 2170
- Guo H, Khan R, Raza SHA, Suhail SM, Khan H, Khan SB, El-Aziz AHA & Zan L (2021) Rna-seq reveals function of bta-mir-149-5p in the regulation of bovine adipocyte differentiation. *Animals* 11: 1207
- Guo S, Tan Y, Huang Z, Li Y, Liu W, Fan X, Zhang J, Stalin A, Fu C, Wu Z, *et al* (2022) Revealing Calcium Signaling Pathway as Novel Mechanism of Danhong Injection for Treating Acute Myocardial Infarction by Systems Pharmacology and Experiment Validation. *Front Pharmacol* 13: 533
- He B, Xiao J, Ren AJ, Zhang YF, Zhang H, Chen M, Xie B, Gao XG & Wang YW (2011) Role of miR-1 and miR-133a in myocardial ischemic postconditioning. *J Biomed Sci* 18
- Hirsch E, Berrino L, Lange SA & Reinecke H (2022) Coronary Artery Disease and Cancer: Treatment

- and Prognosis Regarding Gender Differences. *Cancers* 2022, Vol 14, Page 434 14: 434
- Hong H, Mo Y, Li D, Xu Z, Liao Y, Yin P, Liu X, Xia Y, Fang J, Wang Q, *et al* (2020) Aberrant Expression Profiles of lncRNAs and Their Associated Nearby Coding Genes in the Hippocampus of the SAMP8 Mouse Model with AD. *Mol Ther Nucleic Acids* 20: 140–154
- Huang Z, Wen J, Yu J, Liao J, Liu S, Cai N, Liang H, Chen X, Ding Z & Zhang B (2020) MicroRNA-148a-3p inhibits progression of hepatocellular carcinoma by repressing SMAD2 expression in an Ago2 dependent manner. *J Exp Clin Cancer Res* 39
- Huggett J, Dheda K, Bustin S & Zumla A (2005) Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 6: 279–284
- Hughes TR (2009) ‘Validation’ in genome-scale research. *J Biol* 8
- Humphries KH, Norris CM & Pilote L (2022) Sex Differences in Acute Myocardial Infarction: Good News and Bad News. *Canadian Journal of Cardiology* 38: 1661–1663
- Hyer MM, Phillips LL & Neigh GN (2018) Sex Differences in Synaptic Plasticity: Hormones and Beyond. *Front Mol Neurosci* 11: 266
- Inclusion of Women and Minorities as Participants in Research Involving Human Subjects | grants.nih.gov. <https://grants.nih.gov/policy/inclusion/women-and-minorities.htm>
- Izarra A, Moscoso I, Levent E, Cañón S, Cerrada I, Díez-Juan A, Blanca V, Núñez-Gil IJ, Valiente I, Ruíz-

- Sauri A, *et al* (2014) miR-133a enhances the protective capacity of cardiac progenitors cells after myocardial infarction. *Stem Cell Reports* 3: 1029–1042
- Jia T, Wang C, Han Z, Wang X, Ding M & Wang Q (2020) Experimental Rodent Models of Cardiovascular Diseases. *Front Cardiovasc Med* 7: 310
- Jiang X, Wang J, Deng X, Xiong F, Zhang S, Gong Z, Li X, Cao K, Deng H, He Y, *et al* (2020) The role of microenvironment in tumor angiogenesis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2020 39:1 39: 1–19
- Jin L, Li Y, Liu J, Yang S, Gui Y, Mao X, Nie G & Lai Y (2016) Tumor suppressor miR-149-5p is associated with cellular migration, proliferation and apoptosis in renal cell carcinoma. *Mol Med Rep* 13: 5386–5392
- Jiramongkol Y & Lam EWF (2020) FOXO transcription factor family in cancer and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews* 2020 39:3 39: 681–709
- JOHNS TNP & OLSON BJ (1954) Experimental Myocardial Infarction: I. A Method of Coronary Occlusion in Small Animals. *Ann Surg* 140: 675
- Kajstura J, Gurusamy N, Ogórek B, Goichberg P, Clavo-Rondon C, Hosoda T, D'Amario D, Bardelli S, Beltrami AP, Cesselli D, *et al* (2010) Myocyte Turnover in the Aging Human Heart. *Circ Res* 107: 1374–1386
- Karuppagounder V, Arumugam S, Babu SS, Palaniyandi SS, Watanabe K, Cooke JP & Thandavarayan RA (2017) The senescence accelerated mouse prone

- 8 (SAMP8): A novel murine model for cardiac aging. *Ageing Res Rev* 35: 291–296
- Khera A, McGuire DK, Murphy SA, Stanek HG, Das SR, Vongpatanasin W, Wians FH, Grundy SM & De Lemos JA (2005) Race and Gender Differences in C-Reactive Protein Levels. *J Am Coll Cardiol* 46: 464–469
- Klein SL & Flanagan KL (2016) Sex differences in immune responses. *Nature Reviews Immunology* 2016 16:10 16: 626–638
- Kondkar AA & Abu-Amero KK (2015) Utility of circulating microRNAs as clinical biomarkers for cardiovascular diseases. *Biomed Res Int* 2015
- Koppers-Lalic D, Hackenberg M, De Menezes R, Misovic B, Wachalska M, Geldof A, Zini N, De Reijke T, Wurdinger T, Vis A, *et al* (2016) Non-invasive prostate cancer detection by measuring miRNA variants (isomiRs) in urine extracellular vesicles. *Oncotarget* 7: 22566–22578
- Kuwabara Y, Ono K, Horie T, Nishi H, Nagao K, Kinoshita M, Watanabe S, Baba O, Kojima Y, Shizuta S, *et al* (2011) Increased microRNA-1 and microRNA-133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage. *Circ Cardiovasc Genet* 4: 446–454
- Lakatta EG (2015) So! What's aging? Is cardiovascular aging a disease? *J Mol Cell Cardiol* 83: 1–13
- Lee BH, Kim WH, Choi MJ, Rho JR & Kim WG (2002) Chronic heart failure model in rabbits based on the concept of the bifurcation/trifurcation coronary artery branching pattern. *Artif Organs* 26: 360–365

- Li C, Ni J, Liu YX, Wang H, Liang ZQ & Wang X (2017) Response of MiRNA-22-3p and MiRNA-149-5p to Folate Deficiency and the Differential Regulation of MTHFR Expression in Normal and Cancerous Human Hepatocytes. *PLoS One* 12
- Li K, Xu W, Guo Q, Jiang Z, Wang P, Yue Y & Xiong S (2009) Differential macrophage polarization in male and female BALB/c mice infected with coxsackievirus B3 defines susceptibility to viral myocarditis. *Circ Res* 105: 353–364
- Li X, Hu X, Wang JiH, Xu W, Yi C, Ma R & Jiang H (2018) Inhibition of autophagy via activation of PI3K/Akt/mTOR pathway contributes to the protection of hesperidin against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Int J Mol Med* 42: 1917–1924
- Li X, Teng Y, Tian M, Qiu H, Zhao J, Gao Q, Zhang Y, Zhuang J & Chen J (2022) Enhancement of LncRNA-HFRL expression induces cardiomyocyte inflammation, proliferation, and fibrosis via the sequestering of miR-149-5p-mediated collagen 22A inhibition. *Ann Transl Med* 10: 523–523
- Li YQ, Zhang MF, Wen HY, Hu CL, Liu R, Wei HY, Ai CM, Wang G, Liao XX & Li X (2013) Comparing the diagnostic values of circulating microRNAs and cardiac troponin T in patients with acute myocardial infarction. *Clinics* 68: 75
- Libby P, Tabas I, Fredman G & Fisher EA (2014) Inflammation and its resolution as determinants of acute coronary syndromes. *Circ Res* 114: 1867
- Lin HH, Wu RM, Lin HI, Chen ML, Tai CH & Lin CH (2017) Lack of RAB39B mutations in early-onset and

- familial Parkinson's disease in a Taiwanese cohort. *Neurobiol Aging* 50: 169.e3-169.e4
- Lin J, Lin H, Ma C, Dong F, Hu Y & Li H (2019) MiR-149 Aggravates Pyroptosis in Myocardial Ischemia-Reperfusion Damage via Silencing FoxO3. *Med Sci Monit* 25: 8733
- Liu J, Li X, Liu J & Li X (2012) Novel Porcine Models of Myocardial Ischemia/Infarction – Technical Progress, Modified Electrocardiograms Validating, and Future Application. *Advances in Electrocardiograms - Clinical Applications*
- Liu X, Fan Z, Zhao T, Cao W, Zhang L, Li H, Xie Q, Tian Y & Wang B (2015a) Plasma miR-1, miR-208, miR-499 as potential predictive biomarkers for acute myocardial infarction: An independent study of Han population. *Exp Gerontol* 72: 230–238
- Liu X, Fan Z, Zhao T, Cao W, Zhang L, Li H, Xie Q, Tian Y & Wang B (2015b) Plasma miR-1, miR-208, miR-499 as potential predictive biomarkers for acute myocardial infarction: An independent study of Han population. *Exp Gerontol* 72: 230–238
- Lloréns S, De Mera RMMF, Pascual A, Prieto-Martín A, Mendizábal Y, De Cabo C, Nava E & Jordán J (2007) The senescence-accelerated mouse (SAM-P8) as a model for the study of vascular functional alterations during aging. *Biogerontology* 8: 663–672
- Long G, Wang F, Duan Q, Yang S, Chen F, Gong W, Yang X, Wang Y, Chen C, Wang DW, *et al* (2012) Circulating miR-30a, miR-195 and let-7b associated with acute myocardial infarction. *PLoS One* 7

- Lueck S, Delis A, Minor T, Preusse CJ & Schaefer M (2016) Age-related differences of intras ischemic gap junction uncoupling in hearts during ischemia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 152: 729–736
- Luksha L, Poston L, Gustafsson JÅ, Hultenby K & Kublickiene K (2006) The oestrogen receptor β contributes to sex related differences in endothelial function of murine small arteries via EDHF. *J Physiol* 577: 945
- Luo P, He T, Jiang R & Li G (2015) MicroRNA-423-5p targets O-GlcNAc transferase to induce apoptosis in cardiomyocytes. *Mol Med Rep* 12: 1163–1168
- Lv P, Zhou M, He J, Meng W, Ma X, Dong S, Meng X, Zhao X, Wang X & He F (2014) Circulating miR-208b and miR-34a Are Associated with Left Ventricular Remodeling after Acute Myocardial Infarction. *Int J Mol Sci* 15: 5774
- MacAskill MG, Stadulyte A, Williams L, Morgan TEF, Sloan NL, Alcaide-Corral CJ, Walton T, Wimberley C, McKenzie CA, Spath N, *et al* (2021) Quantification of Macrophage-Driven Inflammation During Myocardial Infarction with ¹⁸F-LW223, a Novel TSPO Radiotracer with Binding Independent of the rs6971 Human Polymorphism. *J Nucl Med* 62: 536–544
- Maclejak A, Kostarska-Srokosz E, Gierlak W, Dluzniewski M, Kuch M, Marchel M, Opolski G, Kiliszek M, Matlak K, Dobrzycki S, *et al* (2018) Circulating miR-30a-5p as a prognostic biomarker of left ventricular dysfunction after acute myocardial infarction. *Scientific Reports* 2018 8:1 8: 1–11

- Marchant-Forde JN & Herskin MS (2018) Pigs as laboratory animals. *Advances in Pig Welfare*: 445–475
- Martin TP, MacDonald EA, Elbassioni AAM, O'Toole D, Zaeri AAI, Nicklin SA, Gray GA & Loughrey CM (2022) Preclinical models of myocardial infarction: from mechanism to translation. *Br J Pharmacol* 179: 770–791
- Masbuchin AN, Widodo, Rohman MS & Liu PY (2022) The two facets of receptor tyrosine kinase in cardiovascular calcification—can tyrosine kinase inhibitors benefit cardiovascular system? *Front Cardiovasc Med* 9: 2654
- Massberg S & Polzin A (2018) [Update ESC-Guideline 2017: Dual Antiplatelet Therapy]. *Dtsch Med Wochenschr* 143: 1090–1093
- Maxwell MP, Hearse DJ & Yellon DM (1987) Species variation in the coronary collateral circulation during regional myocardial ischaemia: A critical determinant of the rate of evolution and extent of myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 21: 737–746
- Mazucanti C, Cabral-Costa J, Vasconcelos A, Andreotti D, Scavone C & Kawamoto E (2015) Longevity Pathways (mTOR, SIRT, Insulin/IGF-1) as Key Modulatory Targets on Aging and Neurodegeneration. *Curr Top Med Chem* 15: 2116–2138
- Mechanic OJ, Gavin M & Grossman SA (2022) Acute Myocardial Infarction. *StatPearls*
- Meschiari CA, Ero OK, Pan H, Finkel T & Lindsey ML (2017) The impact of aging on cardiac extracellular matrix. *Geroscience* 39: 7–18

- Milani-Nejad N & Janssen PML (2014a) Small and large animal models in cardiac contraction research: advantages and disadvantages. *Pharmacol Ther* 141: 235–249
- Milani-Nejad N & Janssen PML (2014b) Small and large animal models in cardiac contraction research: advantages and disadvantages. *Pharmacol Ther* 141: 235–249
- Millett ERC, Peters SAE & Woodward M (2018) Sex differences in risk factors for myocardial infarction: cohort study of UK Biobank participants. *BMJ* 363
- Mo B, Wu X, Wang X, Xie J, Ye Z & Li L (2019) miR-30e-5p Mitigates Hypoxia-Induced Apoptosis in Human Stem Cell-Derived Cardiomyocytes by Suppressing Bim. *Int J Biol Sci* 15: 1042–1051
- Muslin AJ (2008) MAPK Signaling in Cardiovascular Health and Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets. *Clin Sci (Lond)* 115: 203
- Nabel EG & Braunwald E (2012) A tale of coronary artery disease and myocardial infarction. *N Engl J Med* 366: 54–63
- Nabiałek E, Wańha W, Kula D, Jadczyk T, Krajewska M, Kowalówka A, Dworowy S, Hrycek E, Wtudarczyk W, Parma Z, *et al* (2013) Circulating microRNAs (miR-423-5p, miR-208a and miR-1) in acute myocardial infarction and stable coronary heart disease. *Minerva Cardioangiol* 61: 627–637
- Naeli P, Winter T, Hackett AP, Alboushi L & Jafarnejad SM (2023) The intricate balance between microRNA-induced mRNA decay and translational repression. *FEBS J* 290: 2508–2524

- Next-Generation Sequencing (NGS) | Explore the technology
- NIH Guide: NIH GUIDELINES ON THE INCLUSION OF WOMEN AND MINORITIES AS SUBJECTS IN CLINICAL RESEARCH
- North BJ & Sinclair DA (2012) The intersection between aging and cardiovascular disease. *Circ Res* 110: 1097–1108
- Novella S, Dantas AP, Segarra G, Novensà L, Bueno C, Heras M, Hermenegildo C & Medina P (2010) Gathering of aging and estrogen withdrawal in vascular dysfunction of senescent accelerated mice. *Exp Gerontol* 45: 868–874
- Novella S, Dantas AP, Segarra G, Novensa L, Heras M, Hermenegildo C & Medina P (2013a) Aging enhances contraction to thromboxane A2 in aorta from female senescence-accelerated mice. *Age (Dordr)* 35: 117–128
- Novella S, Dantas AP, Segarra G, Vidal-Gómez X, Mompeón A, Garabito M, Hermenegildo C & Medina P (2013b) Aging-related endothelial dysfunction in the aorta from female senescence-accelerated mice is associated with decreased nitric oxide synthase expression. *Exp Gerontol* 48: 1329–1337
- Novella S, Paes AB & Hermenegildo C (2021) Sex differences in epigenetics mechanisms of cardiovascular disease. *Epigenetics in Cardiovascular Disease*: 213–234
- Novensà L, Novella S, Medina P, Segarra G, Castillo N, Heras M, Hermenegildo C & Dantas AP (2011) Aging negatively affects estrogens-mediated

- effects on nitric oxide bioavailability by shifting ER α /ER β balance in female mice. *PLoS One* 6
- Oerlemans MIFJ, Mosterd A, Dekker MS, de Vrey EA, van Mil A, Pasterkamp G, Doevendans PA, Hoes AW & Sluijter JPG (2012) Early assessment of acute coronary syndromes in the emergency department: the potential diagnostic value of circulating microRNAs. *EMBO Mol Med* 4: 1176–1185
- Olena AF & Patton JG (2010) Genomic organization of microRNAs. *J Cell Physiol* 222: 540–545
- Ono S, Lam S, Nagahara M & Hoon DSB (2015) Circulating microRNA Biomarkers as Liquid Biopsy for Cancer Patients: Pros and Cons of Current Assays. *J Clin Med* 4: 1890–1907
- van Oosterhout REM, de Boer AR, Maas AHEM, Rutten FH, Bots ML & Peters SAE (2020) Sex differences in symptom presentation in acute coronary syndromes: A systematic review and meta-analysis. *J Am Heart Assoc* 9
- Organización Mundial de la Salud Enfermedades cardiovasculares.
- Osabe T, Shimizu K & Kadota K (2021) Differential expression analysis using a model-based gene clustering algorithm for RNA-seq data. *BMC Bioinformatics* 22: 1–20
- Ouyang T, Liu Z, Han Z & Ge Q (2019) MicroRNA Detection Specificity: Recent Advances and Future Perspective. *Anal Chem* 91: 3179–3186
- Ovchinnikova ES, Schmitter D, Vegter EL, Ter Maaten JM, Valente MAE, Liu LCY, Van Der Harst P, Pinto

- YM, De Boer RA, Meyer S, *et al* (2016) Signature of circulating microRNAs in patients with acute heart failure. *Eur J Heart Fail* 18: 414–423
- Packer M (2020) Longevity genes, cardiac ageing, and the pathogenesis of cardiomyopathy: implications for understanding the effects of current and future treatments for heart failure. *Eur Heart J* 41: 3856
- Pan Q, Su H, Hui D & Hu C (2020) MiR-149-5p can reduce myocardial apoptosis induced by myocardial ischaemia reperfusion by inhibiting the expression of IL-6. *Acta Medica Mediterranea* 36: 641–646
- Pan W, Zhong Y, Cheng C, Liu B, Wang L, Li A, Xiong L & Liu S (2013) MiR-30-regulated autophagy mediates angiotensin II-induced myocardial hypertrophy. *PLoS One* 8
- Parks RJ, Ray G, Bienvenu LA, Rose RA & Howlett SE (2014) Sex differences in SR Ca²⁺ release in murine ventricular myocytes are regulated by the cAMP/PKA pathway. *J Mol Cell Cardiol* 75: 162–173
- Paulus WJ & Tschöpe C (2013) A Novel Paradigm for Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: Comorbidities Drive Myocardial Dysfunction and Remodeling Through Coronary Microvascular Endothelial Inflammation. *J Am Coll Cardiol* 62: 263–271
- Peng W, Li T, Pi S, Huang L & Liu Y (2020) Suppression of circular RNA circDHCR24 alleviates aortic smooth muscle cell proliferation and migration by targeting miR-149-5p/MMP9 axis. *Biochem Biophys Res Commun* 529: 753–759

- Penniman CM, Suarez Beltran PA, Bhardwaj G, Junck TL, Jena J, Poro K, Hirshman MF, Goodyear LJ & O'Neill BT (2019) Loss of FoxOs in muscle reveals sex-based differences in insulin sensitivity but mitigates diet-induced obesity. *Mol Metab* 30: 203
- Perera M, Aggarwal L, Scott IA & Logan B (2018) Received care compared to ADP-guided care of patients admitted to hospital with chest pain of possible cardiac origin. *Int J Gen Med* 11: 345–351
- Peterson LR, Soto PF, Herrero P, Mohammed BS, Avidan MS, Schechtman KB, Dence C & Gropler RJ (2008) Impact of Gender on the Myocardial Metabolic Response to Obesity. *JACC Cardiovasc Imaging* 1: 424–433
- Pfeffer JM, Pfeffer MA & Braunwald E (1985a) Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat. *Circ Res* 57: 84–95
- Pfeffer MA, Pfeffer JM, Steinberg C & Finn P (1985b) Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril. *Circulation* 72: 406–412
- Poller W, Dimmeler S, Heymans S, Zeller T, Haas J, Karakas M, Leistner DM, Jakob P, Nakagawa S, Blankenberg S, *et al* (2018) Non-coding RNAs in cardiovascular diseases: diagnostic and therapeutic perspectives. *Eur Heart J* 39: 2704–2716
- Pound P & Ritskes-Hoitinga M (2018) Is it possible to overcome issues of external validity in preclinical animal research? Why most animal models are bound to fail. *J Transl Med* 16

- Pritchard CC, Cheng HH & Tewari M (2012) MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet* 13: 358
- Pugh KG & Wei JY (2001) Clinical implications of physiological changes in the aging heart. *Drugs Aging* 18: 263–276
- Puthanveetil P, Wan A & Rodrigues B (2013) FoxO1 is crucial for sustaining cardiomyocyte metabolism and cell survival. *Cardiovasc Res* 97: 393–403
- Quintana HK, Janszky I, Kanar A, Gigante B, Druid H, Ahlbom A, de Faire U, Hallqvist J & Leander K (2018) Comorbidities in relation to fatality of first myocardial infarction. *Cardiovasc Pathol* 32: 32–37
- Raposo G & Stoorvogel W (2013) Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 200: 373–383
- Redfield MM, Jacobsen SJ, Borlaug BA, Rodeheffer RJ & Kass DA (2005) Age- and Gender-Related Ventricular-Vascular Stiffening. *Circulation* 112: 2254–2262
- Redman CWG, Sacks GP & Sargent IL (1999) Preeclampsia: An excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 180: 499–506
- Regitz-Zagrosek V & Kararigas G (2017) Mechanistic pathways of sex differences in cardiovascular disease. *Physiol Rev* 97: 1–37
- Rezza A, Sennett R & Rendl M (2014) Adult Stem Cell Niches: Cellular and Molecular Components. *Curr Top Dev Biol* 107: 333–372

- Rizzacasa B, Morini E, Mango R, Vancheri C, Budassi S, Massaro G, Maletta S, Macrini M, D'Annibale S, Romeo F, *et al* (2019) MiR-423 is differentially expressed in patients with stable and unstable coronary artery disease: A pilot study. *PLoS One* 14
- Rodgers JL, Jones J, Bolleddu SI, Vanthenapalli S, Rodgers LE, Shah K, Karia K & Panguluri SK (2019) Cardiovascular Risks Associated with Gender and Aging. *J Cardiovasc Dev Dis* 6
- Romaine SPR, Tomaszewski M, Condorelli G & Samani NJ (2015) MicroRNAs in cardiovascular disease: an introduction for clinicians. *Heart* 101: 921–928
- Ronnebaum SM & Patterson C (2010) The FoxO Family in Cardiac Function and Dysfunction. *Annu Rev Physiol* 72: 81
- De Rosa S, Fichtlscherer S, Lehmann R, Assmus B, Dimmeler S & Zeiher AM (2011) Transcoronary concentration gradients of circulating microRNAs. *Circulation* 124: 1936–1944
- Saddic LA & Muehlschlegel JD (2016) Sarco"MiR" friend or foe: a perspective on the mechanisms of doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Ann Transl Med* 4
- Salazar-Gonzalez H, Gutierrez-Mercado YK, Munguia-Galaviz FJ & Echavarria R (2022) Signaling Pathways Involved in Myocardial Ischemia–Reperfusion Injury and Cardioprotection: A Systematic Review of Transcriptomic Studies in *Sus scrofa*. *J Cardiovasc Dev Dis* 9
- Salido-Guadarrama I, Romero-Cordoba S, Peralta-Zaragoza O, Hidalgo-Miranda A & Rodríguez-Dorantes M (2014) MicroRNAs transported by

exosomes in body fluids as mediators of intercellular communication in cancer. *Onco Targets Ther* 7: 1327

Savarese G & Lund LH (2017) Global Public Health Burden of Heart Failure. *Card Fail Rev* 3: 7

Sawano M, Lu Y, Caraballo C, Mahajan S, Dreyer R, Lichtman JH, D'Onofrio G, Spatz E, Khera R, Onuma O, *et al* (2023) Sex Difference in Outcomes of Acute Myocardial Infarction in Young Patients. *J Am Coll Cardiol* 81: 1797–1806

Schaefer A, Jung M, Mollenkopf HJ, Wagner I, Stephan C, Jentzmik F, Miller K, Lein M, Kristiansen G & Jung K (2010) Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. *Int J Cancer* 126: 1166–1176

Schwarz ER, Somoano Y, Hale SL & Kloner RA (2000) What is the required reperfusion period for assessment of myocardial infarct size using triphenyltetrazolium chloride staining in the rat? *J Thromb Thrombolysis* 10: 181–187

Seronde MF, Vausort M, Gayat E, Goretti E, Ng LL, Squire IB, Vodovar N, Sadoune M, Samuel JL, Thum T, *et al* (2015) Circulating microRNAs and Outcome in Patients with Acute Heart Failure. *PLoS One* 10

Shafi R, Iyer SPN, Ellies LG, O'Donnell N, Marek KW, Chui D, Hart GW & Marth JD (2000) The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5735–5739

- Shalaby SM, El-Shal AS, Shoukry A, Khedr MH & Abdelraheim N (2016) Serum miRNA-499 and miRNA-210: A potential role in early diagnosis of acute coronary syndrome. *IUBMB Life* 68: 673–682
- Shang L, Quan A, Sun H, Xu Y, Sun G & Cao P (2019) MicroRNA-148a-3p promotes survival and migration of endothelial cells isolated from Apoe deficient mice through restricting circular RNA 0003575. *Gene* 711
- Shen X, Zhu W, Zhang P, Fu Y, Cheng J, Liu L, Xu R & Jiang H (2022) Macrophage miR-149-5p induction is a key driver and therapeutic target for BRONJ. *JCI Insight* 7
- Shen Y, Shen Z, Miao L, Xin X, Lin S, Zhu Y, Guo W & Zhu YZ (2015) miRNA-30 family inhibition protects against cardiac ischemic injury by regulating cystathionine- γ -lyase expression. *Antioxid Redox Signal* 22: 224–240
- Shi B, Guo Y, Wang J & Gao W (2010) Altered expression of microRNAs in the myocardium of rats with acute myocardial infarction. *BMC Cardiovasc Disord* 10
- Shi CH, Zhang SY, Yang ZH, Yang J, Shang DD, Mao CY, Liu H, Hou HM, Shi MM, Wu J, *et al* (2016) A novel RAB39B gene mutation in X-linked juvenile parkinsonism with basal ganglia calcification. *Mov Disord* 31: 1905–1909
- Shiraishi M, Yamaguchi A & Suzuki K (2022) Nrg1/ErbB signaling-mediated regulation of fibrosis after myocardial infarction. *FASEB J* 36
- Shraim BA, Moursi MO, Benter IF, Habib AM & Akhtar S (2021) The Role of Epidermal Growth Factor

- Receptor Family of Receptor Tyrosine Kinases in Mediating Diabetes-Induced Cardiovascular Complications. *Front Pharmacol* 12: 1928
- Squire LR (2009) Encyclopedia of Neuroscience. *Encyclopedia of Neuroscience*
- Steenman M & Lande G (2017) Cardiac aging and heart disease in humans. *Biophys Rev* 9: 131–137
- Stiuso P, Potenza N, Lombardi A, Ferrandino I, Monaco A, Zappavigna S, Vanacore D, Mosca N, Castiello F, Porto S, *et al* (2015) MicroRNA-423-5p promotes autophagy in cancer cells and is increased in serum from hepatocarcinoma patients treated with sorafenib. *Mol Ther Nucleic Acids* 4: e233
- Stratmann B & Tschoepe D (2009) Atherogenesis and atherothrombosis - focus on diabetes mellitus. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 23: 291–303
- Sun C, Fu Y, Gu X, Xi X, Peng X, Wang C, Sun Q, Wang X, Qian F, Qin Z, *et al* (2020) Macrophage-Enriched lncRNA RAPIA: A Novel Therapeutic Target for Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 40: 1464–1478
- Sun T, Dong YH, Du W, Shi CY, Wang K, Tariq MA, Wang JX & Li PF (2017) The Role of MicroRNAs in Myocardial Infarction: From Molecular Mechanism to Clinical Application. *International Journal of Molecular Sciences* 2017, Vol 18, Page 745 18: 745
- Sun T, Han Y, Li JL, Jiao XY, Zuo L, Wang J, Wang HX, Yang JL, Cao JM & Wang JX (2022) FOXO3a-dependent PARKIN negatively regulates cardiac hypertrophy by restoring mitophagy. *Cell Biosci* 12: 1–19

- Takeda T (2009) Senescence-accelerated mouse (SAM) with special references to neurodegeneration models, SAMP8 and SAMP10 mice. *Neurochem Res* 34: 639–659
- Takeda T, Hosokawa M, Takeshita S, Irino M, Higuchi K, Matsushita T, Tomita Y, Yasuhira K, Hamamoto H, Shimizu K, *et al* (1981) A new murine model of accelerated senescence. *Mech Ageing Dev* 17: 183–194
- Tang Y ping, Liu Y, Fan Y jie, Zhao Y yang, Feng J qun & Liu Y (2018) To develop a novel animal model of myocardial infarction: A research imperative. *Animal Model Exp Med* 1: 36
- Telonis AG, Loher P, Jing Y, Londin E & Rigoutsos I (2015) Beyond the one-locus-one-miRNA paradigm: microRNA isoforms enable deeper insights into breast cancer heterogeneity. *Nucleic Acids Res* 43: 9158–9175
- Telonis AG, Magee R, Loher P, Chervoneva I, Londin E & Rigoutsos I (2017) Knowledge about the presence or absence of miRNA isoforms (isomiRs) can successfully discriminate amongst 32 TCGA cancer types. *Nucleic Acids Res* 45: 2973–2985
- Tian P & Yan L (2016) Inhibition of MicroRNA-149-5p Induces Apoptosis of Acute Myeloid Leukemia Cell Line THP-1 by Targeting Fas Ligand (FASLG). *Med Sci Monit* 22: 5116–5123
- Tian S, Zhou X, Zhang M, Cui L, Li B, Liu Y, Su R, Sun K, Hu Y, Yang F, *et al* (2022) Mesenchymal stem cell-derived exosomes protect against liver fibrosis via delivering miR-148a to target KLF6/STAT3

- pathway in macrophages. *Stem Cell Res Ther* 13: 1–20
- Tian W, Yang H & Zhou B (2021) Integrative analysis of exosomal microRNA-149-5p in lung adenocarcinoma. *Aging* 13: 7382–7396
- Tijssen AJ, Creemers EE, Moerland PD, De Windt LJ, Van Der Wal AC, Kok WE & Pinto YM (2010) MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure. *Circ Res* 106: 1035–1039
- Tijssen AJ, Pinto YM & Creemers EE (2012) Circulating microRNAs as diagnostic biomarkers for cardiovascular diseases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 303
- Tsui NBY, Ng EKO & Lo YMD (2002) Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin Chem* 48: 1647–1653
- VanGuilder HD, Vrana KE & Freeman WM (2008) Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques* 44: 619–626
- Vanhooren V & Libert C (2013) The mouse as a model organism in aging research: usefulness, pitfalls and possibilities. *Ageing Res Rev* 12: 8–21
- Vengatapathy KV, Ramesh R, Rajappa M, Kulkarni S & Hanifa M (2019) Role of serum microRNA-499 as a diagnostic marker in acute myocardial infarction. <http://e-coretvvasa.cz/doi/101016/j.crvasa201803008.html>
61: e272–e276
- Vidal-Gómez X, Novella S, Pérez-Monzó I, Garabito M, Dantas AP, Segarra G, Hermenegildo C & Medina P (2016) Decreased bioavailability of nitric oxide in

- aorta from ovariectomized senescent mice. Role of cyclooxygenase. *Exp Gerontol* 76: 1–8
- Viereck J & Thum T (2017) Circulating Noncoding RNAs as Biomarkers of Cardiovascular Disease and Injury. *Circ Res* 120: 381–399
- Villarroya-Beltri C, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Cabo F, Pérez-Hernández D, Vázquez J, Martín-Cofreces N, Martínez-Herrera DJ, Pascual-Montano A, Mittelbrunn M & Sánchez-Madrid F (2013) Sumoylated hnRNP A2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nature Communications* 2013 4:1 4: 1–10
- Virani SS, Alonso A, Aparicio HJ, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, Chamberlain AM, Cheng S, Delling FN, *et al* (2021) Heart disease and stroke statistics—2021 update: a report from the American Heart Association. *Am Heart Assoc* 143: 254–743
- Walkowski B, Kleibert M, Majka M & Wojciechowska M (2022) Insight into the Role of the PI3K/Akt Pathway in Ischemic Injury and Post-Infarct Left Ventricular Remodeling in Normal and Diabetic Heart. *Cells* 11
- Wang F, Ge J, Huang S, Zhou C, Sun Z, Song Y, Xu Y & Ji Y (2021) KLF5/LINC00346/miR-148a-3p axis regulates inflammation and endothelial cell injury in atherosclerosis. *Int J Mol Med* 48: 1–10
- Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, Li Q, Li Y, He J, Qin YW & Jing Q (2010) Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J* 31: 659–666

- Wang J, Jia Z, Zhang C, Sun M, Wang W, Chen P, Ma K, Zhang Y, Li X & Zhou C (2014) miR-499 protects cardiomyocytes from H₂O₂-induced apoptosis via its effects on Pdc4 and Pacs2. *RNA Biol* 11: 339–350
- Wang K, Huang X-T, Miao Y-P, Bai X-L & Jin F (2022) MiR-148a-3p attenuates apoptosis and inflammation by targeting CNTN4 in atherosclerosis. *Ann Transl Med* 10: 1201–1201
- Wang M, Zhao Y, Yu ZY, Zhang R De, Li SA, Zhang P, Shan TK, Liu XY, Wang ZM, Zhao PC, *et al* (2020a) Glioma exosomal microRNA-148a-3p promotes tumor angiogenesis through activating the EGFR/MAPK signaling pathway via inhibiting ERRF1. *Cancer Cell Int* 20: 1–16
- Wang R, Li N, Zhang Y, Ran Y & Pu J (2011) Circulating microRNAs are promising novel biomarkers of acute myocardial infarction. *Intern Med* 50: 1789–1795
- Wang W, Gao J & Wang F (2017) MiR-663a/MiR-423-5p are involved in the pathogenesis of lupus nephritis via modulating the activation of NF- κ B by targeting TNIP2. *Am J Transl Res*
- Wang X, Che X, Jiang Q, Zhang G-L & Dong L-Y (2018) Epac1/Rap1 signaling pathway is involved in the pathogenesis of myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. *Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*: 309–310
- Wang X, Dong Y, Fang T, Wang X, Chen L, Zheng C, Kang Y, Jiang L, You X, Gai S, *et al* (2020b) Circulating MicroRNA-423-3p Improves the Prediction of Coronary Artery Disease in a General

- Population — Six-Year Follow-up Results From the China-Cardiovascular Disease Study —. *Circulation Journal* 84: 1155–1162
- Wang YH, Hao YJ, Zhang H, Xu LB, Ding N, Wang R, Zhu GR, Ma SC, Yang AN, Yang Y, *et al* (2020c) DNA Hypomethylation of miR-30a Mediated the Protection of Hypoxia Postconditioning Against Aged Cardiomyocytes Hypoxia/Reoxygenation Injury Through Inhibiting Autophagy. *Circ J* 84: 616–625
- Wang Z, Gerstein M & Snyder M (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 10: 57–63
- Watson LJ, Facundo HT, Ngoh GA, Ameen M, Brainard RE, Lemma KM, Long BW, Prabhu SD, Xuan YT & Jones SP (2010) O-linked β -N-acetylglucosamine transferase is indispensable in the failing heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 17797–17802
- Weaver ME, Pantely GA, Bristow JD & Ladley HD (1986) A quantitative study of the anatomy and distribution of coronary arteries in swine in comparison with other animals and man. *Cardiovasc Res* 20: 907–917
- Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ & Wang K (2010) The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. *Clin Chem* 56: 1733–1741
- Wenger NK (2020) Why Does Myocardial Infarction Preferentially Disadvantage Women?*. *J Am Coll Cardiol* 76: 1761–1762
- Widera C, Gupta SK, Lorenzen JM, Bang C, Bauersachs J, Bethmann K, Kempf T, Wollert KC & Thum T

- (2011) Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary syndrome. *J Mol Cell Cardiol* 51: 872–875
- Xie W, Santulli G, Reiken SR, Yuan Q, Osborne BW, Chen BX & Marks AR (2015) Mitochondrial oxidative stress promotes atrial fibrillation. *Sci Rep* 5
- Xin Z, Ma Z, Jiang S, Wang D, Fan C, Di S, Hu W, Li T, She J & Yang Y (2017) FOXOs in the impaired heart: New therapeutic targets for cardiac diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1863: 486–498
- Xu F, Xiang Q, Huang J, Chen Q, Yu N, Long X & Zhou Z (2019) Exosomal miR-423-5p mediates the proangiogenic activity of human adipose-derived stem cells by targeting Sufu. *Stem Cell Res Ther* 10: 1–14
- Yan J, Cao J & Chen Z (2021) Mining prognostic markers of Asian hepatocellular carcinoma patients based on the apoptosis-related genes. *BMC Cancer* 21
- Yan Z, Grieb A, Schmitt A, Fragasso A, Widmann M, Maturana FM, Burgstahler C, Erz G, Schellhorn P, Nieß AM, *et al* (2023) Skeletal Muscle MicroRNA Patterns in Response to a Single Bout of Exercise in Females: Biomarkers for Subsequent Training Adaptation? *Biomolecules* 2023, Vol 13, Page 884 13: 884
- Yang H, Xue W, Ding C, Wang C, Xu B, Chen S, Zha B, Sun Y, Zhu H, Zhang J, *et al* (2021) Vitexin Mitigates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Rats by Regulating Mitochondrial Dysfunction via Epac1-Rap1 Signaling. *Oxid Med Cell Longev* 2021

- Yang Y, Li Y, Chen X, Cheng X, Liao Y & Yu X (2016) Exosomal transfer of miR-30a between cardiomyocytes regulates autophagy after hypoxia. *J Mol Med (Berl)* 94: 711–724
- Yao Y, Du J, Cao X, Wang Y, Huang Y, Hu S & Zheng Z (2014) Plasma Levels of MicroRNA-499 Provide an Early Indication of Perioperative Myocardial Infarction in Coronary Artery Bypass Graft Patients. *PLoS One* 9: e104618
- Ye Z ming, Yang S, Xia Y peng, Hu R ting, Chen S, Li B wei, Chen S li, Luo X ying, Mao L, Li Y, *et al* (2019) LncRNA MIAT sponges miR-149-5p to inhibit efferocytosis in advanced atherosclerosis through CD47 upregulation. *Cell Death Dis* 10
- Yin H, He H, Cao X, Shen X, Han S, Cui C, Zhao J, Wei Y, Chen Y, Xia L, *et al* (2020) MiR-148a-3p Regulates Skeletal Muscle Satellite Cell Differentiation and Apoptosis via the PI3K/AKT Signaling Pathway by Targeting Meox2. *Front Genet* 11: 512
- Yin M, Lu J, Guo Z, Zhang Y, Liu J, Wu T, Guo K, Luo T & Guo Z (2021a) Reduced SULT2B1b expression alleviates ox-LDL-induced inflammation by upregulating miR-148-3P via inhibiting the IKK β /NF- κ B pathway in macrophages. *Aging (Albany NY)* 13: 3428
- Yin Q, Wang P & Wu X (2021b) MicroRNA -148 alleviates cardiac dysfunction, immune disorders and myocardial apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion (MI/R) injury by targeting pyruvate dehydrogenase kinase (PDK4): Myocardial protection of miR-148/PDK4 in immature rats. *Bioengineered* 12: 5552

- Yu W, Chen C & Cheng J (2020) The role and molecular mechanism of FoxO1 in mediating cardiac hypertrophy. *ESC Heart Fail* 7: 3497
- Yue J & López JM (2020) Understanding MAPK Signaling Pathways in Apoptosis. *Int J Mol Sci* 21
- Zeng Y, Nie C, Min J, Chen H, Liu X, Ye R, Chen Z, Bai C, Xie E, Yin Z, *et al* (2018) Sex Differences in Genetic Associations With Longevity. *JAMA Netw Open* 1: 181670
- Zenonos K & Kyprianou K (2013) RAS signaling pathways, mutations and their role in colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol* 5: 97
- Zhang B, Dong Y, Liu M, Yang L & Zhao Z (2019) miR-149-5p Inhibits Vascular Smooth Muscle Cells Proliferation, Invasion, and Migration by Targeting Histone Deacetylase 4 (HDAC4). *Med Sci Monit* 25: 7581
- Zhang J, Fan G, Zhao H, Wang Z, Li F, Zhang P, Zhang J, Wang X & Wang W (2017) Targeted inhibition of Focal Adhesion Kinase Attenuates Cardiac Fibrosis and Preserves Heart Function in Adverse Cardiac Remodeling. *Scientific Reports* 2017 7:1 7: 1–12
- Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J & Mi S (2015a) Exosome and Exosomal MicroRNA: Trafficking, Sorting, and Function. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 13: 17–24
- Zhang J, Ma Y, Zhang Y, Niu S, Chu M & Zhang Z (2021a) Angiogenesis is Inhibited by Arsenic Trioxide Through Downregulation of the CircHIPK3/miR-149-5p/FOXO1/VEGF Functional Module in Rheumatoid Arthritis. *Front Pharmacol* 12

- Zhang L, Chen X, Su T, Li H, Huang Q, Wu D, Yang C & Han Z (2015b) Circulating miR-499 are novel and sensitive biomarker of acute myocardial infarction. *J Thorac Dis* 7: 303
- Zhang L, Ding H, Zhang Y, Wang Y, Zhu W & Li P (2020) Circulating MicroRNAs: Biogenesis and Clinical Significance in Acute Myocardial Infarction. *Front Physiol* 11: 1088
- Zhang L, Zhang Y, Zhao Y, Wang Y, Ding H, Xue S & Li P (2018) Circulating miRNAs as biomarkers for early diagnosis of coronary artery disease. *Expert Opin Ther Pat* 28: 591–601
- Zhang Q, Wang L, Wang S, Cheng H, Xu L, Pei G, Wang Y, Fu C, Jiang Y, He C, *et al* (2022) Signaling pathways and targeted therapy for myocardial infarction. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2022 7:1 7: 1–38
- Zhang S, Duan J, Du Y, Xie J, Zhang H, Li C & Zhang W (2021b) Long Non-coding RNA Signatures Associated With Liver Aging in Senescence-Accelerated Mouse Prone 8 Model. *Front Cell Dev Biol* 9
- Zhao J, Yu H, Yan P, Zhou X, Wang Y & Yao Y (2019) Circulating MicroRNA-499 as a diagnostic biomarker for acute myocardial infarction: A meta-analysis. *Dis Markers* 2019
- Zheng J, Li J, Kou B, Yi Q & Shi T (2018) MicroRNA-30e protects the heart against ischemia and reperfusion injury through autophagy and the Notch1/Hes1/Akt signaling pathway. *Int J Mol Med* 41: 3221–3230

- Zhu L, Li N, Sun L, Zheng D & Shao G (2021a) Non-coding RNAs: The key detectors and regulators in cardiovascular disease. *Genomics* 113: 1233–1246
- Zhu M, Goetsch SC, Wang Z, Luo R, Hill JA, Schneider J, Morris SM & Liu ZP (2015) FoxO4 Promotes Early Inflammatory Response Upon Myocardial Infarction via Endothelial Arg1. *Circ Res* 117: 967–977
- Zhu S, Chen X, Wang JN, Xu JJ, Wang A, Li JJ, Wu S, Wu YY, Li XF, Huang C, *et al* (2021b) Circular RNA circUbe2k promotes hepatic fibrosis via sponging miR-149-5p/TGF- β 2 axis. *FASEB J* 35

8. ANEXOS

8.1. miRNAs DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN EL ESTUDIO DE SECUENCIACIÓN

miRNAs diferencialmente expresados mediante el análisis DESeq2		
miRNAs R1 machos	Log2(Fold change)	P-VALOR
mmu-miR-6383	8.18	0.0017
mmu-miR-6965-3p	8.10	0.0004
mmu-miR-742-3p	7.79	0.0013
mmu-miR-449a-3p	7.05	0.0063
mmu-miR-6954-3p	6.32	0.0957
mmu-miR-362-3p	5.94	0.0074
mmu-miR-499-5p	5.57	< 0.0001
mmu-miR-3085-3p	5.57	0.0057
mmu-miR-6540-5p	5.50	0.0313
mmu-miR-8120	5.35	0.0597
mmu-miR-29c-5p	5.34	0.0355
mmu-miR-12184-5p	5.10	0.0505
mmu-miR-214-5p	4.86	0.0336
mmu-miR-450b-3p	4.73	0.0553
mmu-miR-122-3p	3.69	0.0754
mmu-miR-7022-5p	3.68	0.0957
mmu-miR-199a-5p	3.62	0.0888
mmu-miR-148a-3p	3.34	0.0055
mmu-miR-5099	3.18	0.0908
mmu-miR-203b-3p	3.18	0.0957
mmu-miR-30b-5p	2.83	0.0101
mmu-miR-192-3p	2.81	0.0694
mmu-miR-125b-2-3p	2.67	0.0817

mmu-miR-1839-5p	2.52	0.0181
mmu-miR-451a	2.49	0.0477
mmu-let-7f-5p	2.43	0.0543
mmu-miR-30e-5p	2.42	0.0262
mmu-miR-146b-5p	2.36	0.0935
mmu-miR-24-2-5p	2.33	0.0100
mmu-miR-186-5p	2.32	0.0674
mmu-miR-148b-3p	2.30	0.0662
mmu-miR-378c	2.27	0.0115
mmu-miR-130a-3p	2.24	0.0477
mmu-miR-6964-5p	2.22	0.0477
mmu-miR-378b	2.22	0.0694
mmu-miR-133b-3p	2.22	0.0699
mmu-miR-126a-3p	2.16	0.0543
mmu-miR-30a-5p	2.13	0.0543
mmu-miR-133a-5p	2.13	0.0935
mmu-miR-378a-3p	2.11	0.0240
mmu-miR-27b-3p	2.08	0.0181
mmu-miR-29c-3p	2.05	0.0543
mmu-let-7i-5p	2.02	0.0372
mmu-miR-140-3p	2.01	0.0662
mmu-miR-29a-3p	2.00	0.0240
mmu-miR-16-5p	1.92	0.0754
mmu-miR-3620-3p	1.89	0.0477
mmu-miR-22-3p	1.80	0.0662
mmu-miR-181b-5p	1.78	0.0940
mmu-miR-24-3p	1.74	0.0361
mmu-miR-185-5p	1.70	0.0896
mmu-miR-181a-5p	1.61	0.0973
mmu-miR-27a-3p	1.59	0.0935

mmu-miR-12188-5p	1.58	0.0957
mmu-miR-5128	-1.47	0.0240
mmu-miR-5113	-1.64	0.0973
mmu-miR-1247-5p	-1.69	0.0262
mmu-miR-139-3p	-1.70	0.0691
mmu-miR-6404	-1.79	0.0940
mmu-miR-3091-5p	-1.94	0.0694
mmu-miR-6368	-2.02	0.0261
mmu-miR-6954-5p	-2.09	0.0817
mmu-miR-5112	-2.35	0.0261
mmu-miR-7666-3p	-2.51	0.0477
mmu-miR-873a-3p	-2.69	0.0888
mmu-miR-7062-3p	-2.75	0.0754
mmu-miR-5622-3p	-2.79	0.0233
mmu-miR-6348	-2.80	0.0662
mmu-miR-7086-5p	-2.96	0.0063
mmu-miR-7238-5p	-3.03	0.0058
mmu-miR-5129-5p	-3.08	0.0261
mmu-miR-6241	-3.14	0.0063
mmu-miR-188-5p	-3.40	0.0174
mmu-miR-7001-5p	-3.52	0.0817
mmu-miR-1897-3p	-3.57	0.0543
mmu-miR-7066-5p	-3.60	0.0292
mmu-miR-12203-5p	-3.69	0.0007
mmu-miR-7221-5p	-3.79	0.0240
mmu-miR-7660-3p	-3.89	0.0991
mmu-miR-12181-5p	-3.99	0.0477
mmu-miR-302a-5p	-4.30	0.0100
mmu-miR-380-3p	-4.41	0.0343
mmu-miR-6906-3p	-4.43	0.0736

mmu-miR-210-5p	-4.53	0.0013
mmu-miR-465b-5p	-4.92	0.0597
mmu-miR-7211-3p	-5.08	0.0060
mmu-miR-8115	-5.33	0.0935
mmu-miR-7116-5p	-5.64	0.0100
mmu-miR-3080-3p	-5.82	0.0132
mmu-miR-592-3p	-5.86	0.0418
mmu-miR-6962-3p	-6.00	0.0662
mmu-miR-1929-5p	-6.02	0.0691
mmu-miR-6939-3p	-6.67	0.0372
miRNAs R1 hembras	Log2(Fold change)	P-VALOR
mmu-miR-3086-5p	8.55	0.0168
mmu-miR-879-3p	8.09	0.0644
mmu-miR-1968-3p	7.31	0.068
mmu-miR-342-5p	7.23	0.017
mmu-miR-344g-3p	6.03	0.0168
mmu-miR-7062-5p	5.98	0.0644
mmu-miR-8111	5.89	0.0306
mmu-miR-499-5p	3.45	< 0.0001
mmu-miR-149-5p	1.56	0.0644
miRNAs P8 machos	Log2(Fold change)	P-VALOR
miR-9768-5p	6.04	0.0558
miR-499-5p	3.19	0.0764
miR-30e-3p	1.80	0.0764
miR-7240-5p	-3.20	0.0129
miR-6922-5p	-3.83	0.0037

miR-1929-3p	-4.09	0.0594
miR-7214-5p	-4.43	0.0764
miR-7039-5p	-4.48	0.0129
miR-12186-5p	-5.04	0.0764
miR-6969-5p	-5.89	0.0988
miR-6715-3p	-5.89	0.0988
miR-12187-5p	-6.63	< 0.0001
miR-99a-3p	-6.73	0.0764
miRNAs P8 hembras	Log2(Fold change)	P-VALOR
miR-7660-3p	7.30	0.0375
miR-342-5p	7.14	0.0310
miR-7021-5p	7.01	0.0109
miR-9-3p	6.83	0.0945
miR-7065-5p	6.53	0.0708
miR-695	5.91	0.0410
miR-7029-5p	5.87	0.0132
miR-6905-5p	5.80	0.0172
miR-6537-3p	3.88	0.0375
miR-7678-5p	3.80	0.0547
miR-670-5p	3.72	0.0703
miR-6942-5p	3.30	0.0439
miR-499-5p	2.82	< 0.0001
miR-3098-5p	2.81	0.0410
let-7b-5p	-1.20	0.0310
miR-200b-3p	-1.21	0.0313
let-7c-5p	-1.34	0.0410
miR-200c-3p	-1.41	0.0206
miR-134-3p	-5.01	0.0945

Tabla 11. miRNAs diferencialmente expresados obtenidos mediante el análisis DESeq2, en ratones SAMR1/SAMP8, machos y hembras, comparando sus grupos IAM vs sham. Se enumeran los miRNAs diferencialmente expresados tras el análisis con DESeq2 en los grupos SAMR1, machos (n = 93) y hembras (n = 9), y SAMP8, machos (n = 13) y hembras (n = 19) ordenados según su diferencia de expresión (Log2(Fold change)) (p-valor < 0.1).

miRNAs diferencialmente expresados mediante el análisis edgeR		
miRNAs R1 machos	Log2(Fold change)	P- VALOR
mmu-miR-208a-3p	9.94	0.0003
mmu-miR-499-5p	4.68	< 0.0001
mmu-miR-1247-5p	2.16	0.0628
mmu-miR-30f	2.08	0.0348
mmu-miR-30e-3p	2.08	0.0348
mmu-miR-148a-3p	1.78	0.0461
mmu-miR-143-3p	1.65	0.0542
mmu-miR-423-5p	-1.86	0.0461
miRNAs R1 hembras	Log2(Fold change)	P- VALOR
mmu-miR-9-3p	9.92	0.0001
mmu-miR-9b-5p	9.92	0.0001
mmu-miR-219a-2-3p	8.87	0.0088
mmu-miR-219b-5p	8.87	0.0088

mmu-miR-9-5p	6.59	0.0904
mmu-miR-9b-3p	6.59	0.0904
mmu-miR-208a-3p	5.15	0.0007
mmu-miR-499-5p	3.58	< 0.0001
mmu-miR-149-5p	1.79	0.0006
miRNAs P8 machos	Log2(Fold change)	P- VALOR
mmu-miR-499-5p	2.83	0.0657
miRNAs P8 hembras	Log2(Fold change)	P- VALOR
mmu-miR-9-3p	8.77	0.0029
mmu-miR-9b-5p	8.77	0.0029
mmu-miR-208a-5p	4.58	0.0349
mmu-miR-499-5p	3.28	< 0.0001
mmu-let-7c-5p	-1.13	0.0849

Tabla 12. miRNAs diferencialmente expresados obtenidos mediante el análisis edgeR, en ratones SAMR1/SAMP8, machos y hembras, comparando sus grupos IAM vs sham.

Se enumeran los miRNAs diferencialmente expresados tras el análisis con edgeR en los grupos SAMR1, machos (n = 6) y hembras (n = 6), y en el grupo SAMP8, machos (n = 1) y hembras (n = 5), ordenados según su diferencia de expresión (Log2(Fold change)) (p-valor < 0.1).

miRNAs diferencialmente expresados mediante el análisis limma		
miRNAs R1 machos	Log2(Fold change)	P- VALOR
mmu-miR-499-5p	4.99	0.0685
miRNAs R1 hembras	Log2(Fold change)	P- VALOR
mmu-miR-208a-3p	5.11	0.0524
mmu-miR-499-5p	3.50	0.0524
miRNAs P8 hembras	Log2(Fold change)	P- VALOR
mmu-miR-208a-5p	4.08	0.0278
mmu-miR-499-5p	3.15	0.0045

Tabla 13. miRNAs diferencialmente expresados mediante el análisis limma, en ratones SAMR1/SAMP8, comparando sus grupos IAM vs sham. Se enumeran los miRNAs diferencialmente expresados tras el análisis con limma en los grupos SAMR1, machos (n = 1) y hembras (n = 2), y en el grupo SAMP8 hembras (n = 2), ordenados según su diferencia de expresión (Log2(Fold change)) (p-valor < 0.1).

miRNAs diferencialmente expresados mediante el análisis voom		
miRNAs R1 machos	Log2(Fold change)	P- VALOR
mmu-miR-208a-3p	6.37	0.0112
mmu-miR-499-5p	4.98	0.0239
mmu-miR-582-3p	4.73	0.0802
mmu-miR-143-3p	1.55	0.0765
mmu-miR-485-3p	-2.11	0.0765
mmu-miR-423-5p	-2.46	0.0765
mmu-miR-139-3p	-2.53	0.0765
mmu-miR-1249-3p	-2.65	0.0765
mmu-miR-1247-5p	-3.13	0.0765
mmu-miR-193b-5p	-3.24	0.0935
mmu-miR-702-3p	-3.56	0.0773
mmu-miR-3103-3p	-4.39	0.0765
miRNAs R1 hembras	Log2(Fold change)	P- VALOR
mmu-miR-208a-3p	7.18	0.0111
mmu-miR-499-5p	3.68	0.0862
miRNAs P8 machos	Log2(Fold change)	P- VALOR
mmu-miR-1941-3p	-5.35	0.0081
mmu-miR-3963	-5.49	0.0081

miRNAs P8 hembras	Log2(Fold change)	P- VALOR
mmu-miR-208a-3p	5.46	0.0274
mmu-miR-208a-5p	5.20	0.0109
mmu-miR-499-5p	3.17	0.0109

Tabla 14. miRNAs diferencialmente expresados mediante el análisis voom, en ratones SAMR1/SAMP8, comparando sus grupos IAM vs sham. Se enumeran los miRNAs diferencialmente expresados tras el análisis con voom en los grupos SAMR1, machos (n = 12) y hembras (n = 2), y en el grupo SAMP8, machos (n = 2) y hembras (n = 3), ordenados según su diferencia de expresión (Log2(Fold change)) (p-valor < 0.1).

8.2. ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO FUNCIONAL DEL RESULTADO DE LA SECUENCIACIÓN

RUTAS KEGG DE LOS miRNAs diferencialmente expresados de los RATONES SAMR1 machos IAM vs sham			
Ruta	Genes		P valor
	Diana	Ruta	
EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	29	79	0
Endocrine resistance	25	93	0
MAPK signaling pathway	75	294	0
ErbB signaling pathway	34	84	0
Ras signaling pathway	56	232	0
Rap1 signaling pathway	43	214	0
cAMP signaling pathway	44	215	0
FoxO signaling pathway	40	131	0
mTOR signaling pathway	43	156	0
PI3K-Akt signaling pathway	65	355	0
Adrenergic signaling in cardiomyocytes	35	152	0
Wnt signaling pathway	38	162	0
TGF-beta signaling pathway	27	95	0
Axon guidance	43	180	0
Focal adhesion	51	199	0
Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	43	140	0
T cell receptor signaling pathway	27	103	0
Long-term potentiation	23	67	0
Neurotrophin signaling pathway	36	121	0
Dopaminergic synapse	33	135	0
Insulin signaling pathway	35	141	0
GnRH signaling pathway	28	90	0
Melanogenesis	26	100	0
Prolactin signaling pathway	22	72	0
Relaxin signaling pathway	34	129	0
AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	29	101	0
Cushing syndrome	35	160	0
Growth hormone synthesis, secretion and action	32	116	0

Spinocerebellar ataxia	36	96	0
Pathways in cancer	95	539	0
Proteoglycans in cancer	47	205	0
Renal cell carcinoma	24	68	0
Glioma	24	74	0
Choline metabolism in cancer	28	98	0
Calcium signaling pathway	39	192	0.0005
Circadian entrainment	24	98	0.0005
Regulation of actin cytoskeleton	42	216	0.0005
Hepatitis B	35	162	0.0005
Colorectal cancer	23	88	0.0005
Prostate cancer	25	99	0.0005
Hepatocellular carcinoma	35	172	0.0005
Gastric cancer	32	150	0.0005
Transcriptional misregulation in cancer	36	184	0.001
Chronic myeloid leukemia	20	76	0.001
Breast cancer	31	147	0.001
cGMP-PKG signaling pathway	34	173	0.0013
Autophagy	29	138	0.0013
Adherens junction	19	71	0.0013
Insulin resistance	25	110	0.0013
Morphine addiction	22	91	0.0013
Oocyte meiosis	26	119	0.0017
Fc epsilon RI signaling pathway	18	67	0.0017
Cholinergic synapse	25	112	0.0017
Hippo signaling pathway	31	157	0.002
Longevity regulating pathway	21	90	0.0023
Apelin signaling pathway	28	137	0.0023
Circadian rhythm	11	30	0.0023
Progesterone-mediated oocyte maturation	21	90	0.0023
Thyroid hormone signaling pathway	25	118	0.0025
Salivary secretion	19	78	0.0025
Melanoma	18	72	0.0025
Aldosterone-regulated sodium reabsorption	12	38	0.0035
Regulation of lipolysis in adipocytes	15	56	0.0038
Sphingolipid signaling pathway	25	124	0.004
Renin secretion	18	76	0.004
Pancreatic cancer	18	76	0.004

Oxytocin signaling pathway	29	153	0.0042
Phospholipase D signaling pathway	28	148	0.0048
Estrogen signaling pathway	26	134	0.005
MicroRNAs in cancer	48	303	0.005
TNF signaling pathway	23	113	0.0052
Glutamatergic synapse	23	113	0.0052
Hedgehog signaling pathway	13	47	0.0053
Gap junction	19	86	0.0053
Non-small cell lung cancer	16	66	0.0053
Type II diabetes mellitus	13	48	0.0061
Longevity regulating pathway	15	62	0.007
Gastric acid secretion	17	75	0.007
Amphetamine addiction	16	69	0.0075
AMPK signaling pathway	24	126	0.0077
Retrograde endocannabinoid signaling	27	148	0.0077
Glucagon signaling pathway	21	104	0.0077
Acute myeloid leukemia	16	70	0.0079
VEGF signaling pathway	14	58	0.0089
Osteoclast differentiation	24	128	0.0089
Adipocytokine signaling pathway	16	71	0.0089
Endocytosis	42	269	0.009
Yersinia infection	23	121	0.009
Aldosterone synthesis and secretion	20	100	0.0095
Human papillomavirus infection	53	361	0.0095
Bacterial invasion of epithelial cells	16	73	0.0103
Endocrine and other factor-regulated calcium reabsorption	14	60	0.0107
Long-term depression	14	61	0.012
GABAergic synapse	18	89	0.0123
Mitophagy	14	63	0.0148
GnRH secretion	14	63	0.0148
Small cell lung cancer	18	92	0.016
Parathyroid hormone synthesis, secretion and action	20	107	0.0163
p53 signaling pathway	15	71	0.0164
Cellular senescence	30	185	0.0169
Cell cycle	22	123	0.0171
Insulin secretion	17	86	0.0172
Endometrial cancer	13	58	0.0172
Platelet activation	22	125	0.0192

Thyroid hormone synthesis	15	73	0 .0192
Carbohydrate digestion and absorption	11	46	0 .0196
PD-L1 expression and PD-1 checkpoint pathway in cancer	17	88	0 .0196
Nicotine addiction	10	40	0 .0209
Tight junction	27	166	0 .0211
HIF-1 signaling pathway	20	112	0 .0215
C-type lectin receptor signaling pathway	20	112	0 .0215
Inflammatory mediator regulation of TRP channels	22	127	0 .0215
Lysine degradation	13	61	0 .0221
Glycerophospholipid metabolism	18	98	0 .0232
Human cytomegalovirus infection	37	255	0 .0291
Protein digestion and absorption	17	94	0 .0305
Dilated cardiomyopathy (DCM)	17	94	0 .0305
Fluid shear stress and atherosclerosis	23	144	0 .0373
Fc gamma R-mediated phagocytosis	16	90	0 .0403
Phosphatidylinositol signaling system	17	98	0 .0409
Ubiquitin mediated proteolysis	22	138	0 .0413
Human immunodeficiency virus 1 infection	34	238	0 .0413
Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	16	91	0 .0422
Serotonergic synapse	21	131	0 .0434
Protein processing in endoplasmic reticulum	25	164	0 .0438
Sphingolipid metabolism	10	48	0 .0476
Cortisol synthesis and secretion	13	70	0 .0476

Tabla 15. Rutas KEGG asociadas a los genes diana de los 93 miRNAs diferencialmente expresados de los ratones SAMR1 machos, en la comparación de sus grupos IAM vs sham mediante el análisis DESeq2. En la tabla aparece descrita la ruta en la primera columna, seguida del número de genes diana implicados en la misma, y el número total de genes de la ruta, en la cuarta columna está el Pvalor, es decir, la significancia estadística de la relación entre los genes diana y su ruta.

TÉRMINOS GO DE LOS miRNAs diferencialmente expresados de los RATONES SAMR1 machos IAM vs sham			
Términos GO	Genes		Pvalor
	Diana	Ruta	
Chromatin organization	64	314	0
Regulation of translation	42	139	0
Protein phosphorylation	170	734	0
Protein O-linked glycosylation	18	44	0
Sphingomyelin biosynthetic process	12	18	0
Transforming growth factor beta receptor signaling pathway	36	132	0
JNK cascade	17	39	0
Activation of JUN kinase activity	20	49	0
Nervous system development	91	440	0
Axon guidance	54	248	0
Memory	34	119	0
Negative regulation of cell population proliferation	86	475	0
Regulation of gene expression	91	481	0
Positive regulation of gene expression	114	630	0
Phosphorylation	124	591	0
Negative regulation of translation	30	109	0
Peptidyl-serine phosphorylation	72	241	0
Peptidyl-threonine phosphorylation	29	89	0
Intracellular signal transduction	91	479	0
Regulation of circadian rhythm	29	83	0
Regulation of mrna stability	17	43	0
Positive regulation of translation	26	87	0
Negative regulation of transcription. DNA-templated	139	716	0
Positive regulation of transcription. DNA-templated	184	849	0
Protein autophosphorylation	51	223	0
Rhythmic process	50	153	0
Blood vessel morphogenesis	21	44	0
Dendrite morphogenesis	24	58	0
Positive regulation of nuclear-transcribed mrna poly(A) tail shortening	12	18	0
Presynaptic membrane assembly	12	17	0
Positive regulation of cold-induced thermogenesis	28	99	0
Response to hypoxia	34	145	0.0026

Norepinephrine-epinephrine-mediated vasodilation involved in regulation of systemic arterial blood pressure	8	8	0.0026
Cytoskeleton organization	32	129	0.0026
Visual learning	23	77	0.0026
BMP signaling pathway	34	146	0.0026
Gene silencing by RNA	19	57	0.0026
Neuron projection development	43	194	0.0026
Circadian regulation of gene expression	27	98	0.0026
Sodium ion export across plasma membrane	11	21	0.0026
Potassium ion transmembrane transport	36	152	0.0026
Regulation of neurotransmitter receptor localization to postsynaptic specialization membrane	12	22	0.0026
Dendritic transport of messenger ribonucleoprotein complex	9	12	0.0026
Protein polyubiquitination	44	213	0.0046
In utero embryonic development	63	345	0.0046
Positive regulation of phosphorylation	15	40	0.0046
Positive regulation of apoptotic process	74	419	0.0046
Protein homooligomerization	28	111	0.0046
Excitatory postsynaptic potential	17	49	0.0046
Membrane protein ectodomain proteolysis	14	38	0.0063
Wnt signaling pathway	46	230	0.0063
Neuron differentiation	42	204	0.0063
IRE1-mediated unfolded protein response	7	8	0.0063
Acylglycerol catabolic process	8	12	0.0063
Animal organ morphogenesis	36	169	0.0078
Pre-mirna processing	10	20	0.0078
Activin receptor signaling pathway	10	20	0.0078
Negative regulation of canonical Wnt signaling pathway	39	188	0.0078
G1S transition of mitotic cell cycle	20	72	0.0087
Lymphangiogenesis	10	21	0.0087
Positive regulation of cell population proliferation	110	709	0.0087
Artery morphogenesis	12	30	0.0087
Semaphorin-plexin signaling pathway	17	55	0.0087
Calcium-dependent activation of synaptic vesicle fusion	8	13	0.0087
Positive regulation of nuclear-transcribed mrna catabolic process. deadenylation-dependent decay	9	17	0.0087
Negative regulation of cell migration	31	140	0.0101
DNA demethylation	11	26	0.0101
Mrna splice site selection	11	27	0.0112
Learning	20	74	0.0112

Insulin receptor signaling pathway	21	80	0.0112
Endoplasmic reticulum tubular network organization	8	14	0.0112
Regulation of postsynaptic neurotransmitter receptor activity	12	32	0.0124
Negative regulation of synaptic vesicle exocytosis	6	7	0.0124
Stress granule assembly	10	23	0.0138
Sphingolipid biosynthetic process	12	33	0.0147
Vascular endothelial growth factor signaling pathway	8	15	0.0147
Negative regulation of axon extension involved in axon guidance	12	33	0.0147
Negative regulation of BMP signaling pathway	20	78	0.0157
Production of mirnas involved in gene silencing by mirna	10	24	0.0157
Response to cold	12	34	0.0166
Negative regulation of ossification	11	29	0.0166
Protein K48-linked deubiquitination	11	29	0.0166
Regulation of alternative mrna splicing, via spliceosome	21	85	0.0175
Muscle cell differentiation	9	20	0.0175
Angiogenesis	54	311	0.0193
Negative regulation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process	19	74	0.0193
Canonical Wnt signaling pathway	34	170	0.0193
Regulation of dendritic spine development	7	12	0.0193
Cellular response to glucose stimulus	16	57	0.0203
Histone H4-K16 acetylation	9	21	0.0211
Positive regulation of protein kinase B signaling	28	132	0.0211
Chemical synaptic transmission	41	221	0.0221
Calcium ion transport	35	180	0.0224
P-body assembly	8	17	0.0224
Ionotropic glutamate receptor signaling pathway	8	17	0.0224
Insulin-like growth factor receptor signaling pathway	8	17	0.0224
Peptidyl-tyrosine phosphorylation	22	95	0.0226
Positive regulation of blood vessel endothelial cell migration	13	42	0.0226
Positive regulation of axon extension involved in axon guidance	6	9	0.0226
Positive regulation of cellular component movement	7	13	0.0226
MAPK cascade	19	77	0.023
Protein dephosphorylation	38	202	0.023
Heart development	52	302	0.023
Protein deubiquitination	27	128	0.023
Actin cytoskeleton organization	39	209	0.023
Response to endoplasmic reticulum stress	23	102	0.023

Hippo signaling	12	37	0.023
Neurotransmitter receptor localization to postsynaptic specialization membrane	11	32	0.023
Regulated exocytosis	10	27	0.0234
Positive regulation of protein catabolic process	21	90	0.0234
3'-UTR-mediated mrna destabilization	10	27	0.0234
Learning or memory	19	78	0.024
Sensory perception of pain	20	84	0.024
Multicellular organism growth	28	136	0.0248
Negative regulation of protein-containing complex assembly	12	38	0.0256
Transmembrane receptor protein serinethreonine kinase signaling pathway	9	23	0.0264
Central nervous system neuron development	9	23	0.0264
Negative regulation of Wnt signaling pathway	18	73	0.0264
Collagen fibril organization	17	67	0.0264
Negative regulation of axon regeneration	7	14	0.0264
Neuron-neuron synaptic transmission	6	10	0.0267
Regulation of synaptic membrane adhesion	6	10	0.0267
Positive regulation of Wnt signaling pathway. planar cell polarity pathway	6	10	0.0267
Neuron migration	33	172	0.0269
Positive regulation of neuron projection development	36	193	0.0269
Cellular response to calcium ion	20	86	0.0269
Protein K63-linked deubiquitination	12	39	0.0272
Negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway via death domain receptors	12	39	0.0272
Cellular response to amyloid-beta	12	39	0.0272
Skeletal muscle tissue development	18	74	0.0276
Regulation of protein stability	21	93	0.0276
Inner ear morphogenesis	20	87	0.0289
Positive regulation of Ras protein signal transduction	10	29	0.0289
Cellular response to transforming growth factor beta stimulus	15	57	0.0304
Lymphocyte homeostasis	7	15	0.0311
Rap protein signal transduction	7	15	0.0311
Mirna loading onto RISC involved in gene silencing by mirna	5	7	0.0311
Long-chain fatty-acyl-coa biosynthetic process	5	7	0.0311
Brain development	38	211	0.0317
Endocytosis	38	212	0.032
Regulation of cell size	9	25	0.032
Positive regulation of chondrocyte differentiation	10	30	0.032

Protein localization to endosome	6	11	0.032
Diacylglycerol metabolic process	10	30	0.032
Regulation of bone remodeling	6	11	0.032
Regulation of axon regeneration	6	11	0.032
Modulation of chemical synaptic transmission	25	122	0.032
Cartilage development	21	95	0.032
Histone H3-K27 demethylation	6	11	0.032
Regulation of potassium ion transmembrane transport	9	25	0.032
Negative regulation of cytoplasmic translation	6	11	0.032
Regulation of neuron migration	9	25	0.032
Negative regulation of cell growth	27	136	0.0333
Cellular response to insulin stimulus	24	116	0.0336
Ventricular septum morphogenesis	13	47	0.0336
Transcription, DNA-templated	21	98	0.0361
Negative regulation of gene expression	64	410	0.0361
Positive regulation of cell death	15	60	0.0361
Histone acetylation	12	42	0.0361
Hippocampus development	16	66	0.0361
Cellular potassium ion homeostasis	8	21	0.0361
Protein K11-linked deubiquitination	7	16	0.0361
Peptidyl-tyrosine autophosphorylation	9	26	0.0361
Regulation of neuron differentiation	12	42	0.0361
Positive regulation of angiogenesis	33	180	0.0361
Lung alveolus development	15	60	0.0361
Histone H3-K4 trimethylation	9	26	0.0361
Positive regulation of canonical Wnt signaling pathway	27	138	0.0361
Negative regulation of cytokine production involved in inflammatory response	8	21	0.0361
Heart morphogenesis	18	79	0.037
Postsynaptic membrane assembly	6	12	0.037
Cellular calcium ion homeostasis	28	146	0.0373
RNA secondary structure unwinding	5	8	0.0373
P38mapk cascade	5	8	0.0373
Axonogenesis involved in innervation	5	8	0.0373
Postsynaptic specialization assembly	5	8	0.0373
Cerebellum development	12	43	0.0375
Positive regulation of dendritic spine development	12	43	0.0375
Cerebral cortex development	16	67	0.0377
Positive regulation of Wnt signaling pathway	13	49	0.0377

Somatic stem cell population maintenance	13	49	0.0377
Positive regulation of glucose import	13	49	0.0377
Embryonic organ development	13	49	0.0377
Male gonad development	24	120	0.0393
Negative regulation of angiogenesis	24	120	0.0393
Positive regulation of embryonic development	7	17	0.0393
Positive regulation of gene silencing by mirna	7	17	0.0393
Positive regulation of cardiac muscle cell apoptotic process	8	22	0.0397
Cell morphogenesis	22	107	0.0407
Negative regulation of signal transduction	14	56	0.0417
Axonogenesis	25	128	0.0426
Nuclear-transcribed mrna catabolic process. deadenylation-dependent decay	6	13	0.0435
Keratinocyte development	6	13	0.0435
Lipid biosynthetic process	8	23	0.0435
Negative regulation of transcription by competitive promoter binding	5	9	0.0435
Positive regulation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling	19	89	0.0435
Fatty acid elongation, saturated fatty acid	6	13	0.0435
Cerebral cortex neuron differentiation	8	23	0.0435
Central nervous system neuron differentiation	6	13	0.0435
Lung development	26	136	0.0435
Activation of protein kinase activity	13	51	0.0435
Aorta development	9	28	0.0435
Reelin-mediated signaling pathway	5	9	0.0435
Positive regulation of glycolytic process	8	23	0.0435
Lipid phosphorylation	8	23	0.0435
Stress-activated MAPK cascade	6	13	0.0435
Regulation of calcium ion transport	11	39	0.0435
Regulation of gene silencing by mirna	5	9	0.0435
Dendritic spine development	8	23	0.0435
Positive regulation of branching involved in ureteric bud morphogenesis	9	28	0.0435
Dendritic spine maintenance	6	13	0.0435
Negative regulation of endoplasmic reticulum stress-induced eif2 alpha phosphorylation	5	9	0.0435
Negative regulation of sodium ion transmembrane transporter activity	5	9	0.0435
Circadian rhythm	20	96	0.0447
Positive regulation of DNA-binding transcription factor activity	26	137	0.0447
Regulation of Rho protein signal transduction	18	83	0.0448

Positive regulation of osteoclast differentiation	10	34	0.0448
Negative regulation of neuron projection development	21	103	0.0451
Response to ischemia	11	40	0.0459
Positive regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway	11	40	0.0459
Positive regulation of protein binding	19	90	0.0459
Positive regulation of filopodium assembly	11	40	0.0459
Branching involved in blood vessel morphogenesis	12	46	0.0462
Negative regulation of Notch signaling pathway	13	52	0.0462
Platelet-derived growth factor receptor signaling pathway	12	46	0.0462
Positive regulation of cell migration	45	277	0.0468
Regulation of MAPK cascade	9	29	0.0468
Neuron development	16	71	0.0471
Proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process	37	218	0.0484
Axonal fasciculation	8	24	0.0485
Mirna mediated inhibition of translation	8	24	0.0485
Phospholipid dephosphorylation	8	24	0.0485
Regulation of dendrite development	8	24	0.0485
Mrna stabilization	10	35	0.0486
Calcium ion import	10	35	0.0486
Response to dietary excess	7	19	0.0487
Cellular response to UV	14	59	0.0487
Collagen-activated tyrosine kinase receptor signaling pathway	7	19	0.0487
Negative regulation of cardiac muscle cell proliferation	7	19	0.0487
Negative regulation of microtubule depolymerization	11	41	0.049
Regulation of heart rate by cardiac conduction	12	47	0.0493

Tabla 16. Términos GO asociados a los genes diana de los 93 miRNAs diferencialmente expresados de los ratones SAMR1 machos, en la comparación de sus grupos IAM vs sham mediante el análisis DESeq2. En la tabla aparece descrita la ruta en la primera columna, seguida del número de genes diana implicados en la misma, y el número total de genes de la ruta, en la cuarta columna está el Pvalor, es decir, la significancia estadística de la relación entre los genes diana y su ruta.

**TÉRMINOS GO DE LOS miRNAs diferencialmente
expresados de los RATONES SAMR1 hembras IAM vs sham**

Ruta	Genes		Pvalor
	Diana	Ruta	
Collagen catabolic process	5	45	0.00001
Negative regulation of transcription. DNA-templated	19	716	0.00001
Exocytosis	7	123	0.0008
Cell fate commitment	6	89	0.0008
Intrinsic apoptotic signaling pathway in response to endoplasmic reticulum stress	5	54	0.0008
Potassium ion transmembrane transport	7	152	0.0014
Protein phosphorylation	16	734	0.0018
Protein autophosphorylation	8	223	0.002
Positive regulation of neuron projection development	7	193	0.0036
Response to endoplasmic reticulum stress	5	102	0.0049
Protein stabilization	7	212	0.0052
Canonical Wnt signaling pathway	6	170	0.0072
Phosphorylation	12	591	0.0073
Anteriorposterior pattern specification	6	184	0.0091
Negative regulation of cell growth	5	136	0.0105
Lung development	5	136	0.0105
Brain development	6	211	0.014
Axon guidance	6	248	0.0265
Positive regulation of angiogenesis	5	180	0.0265
Positive regulation of transcription. DNA-templated	13	849	0.0289
Apoptotic process	10	605	0.0349
Neuron differentiation	5	204	0.0365
Extracellular matrix organization	5	206	0.0365
Cell migration	6	302	0.047
Negative regulation of gene expression	7	410	0.0597
Positive regulation of cell population proliferation	10	709	0.0686
Nervous system development	7	440	0.0749
Negative regulation of cell population proliferation	7	475	0.0988
Protein ubiquitination	6	388	0.1022
Angiogenesis	5	311	0.1151
Chromatin organization	5	314	0.1151
Positive regulation of apoptotic process	6	419	0.1216
Protein transport	8	630	0.1259
Inflammatory response	5	415	0.235
Cellular response to DNA damage stimulus	6	542	0.2486
Negative regulation of apoptotic process	7	660	0.2486
Ion transport	6	596	0.3036
Regulation of gene expression	5	481	0.3036
Innate immune response	6	641	0.3497
Cell adhesion	5	607	0.468
Cell cycle	5	621	0.4756

Tabla 17. Términos GO asociados a los genes diana de los 9 miRNAs diferencialmente expresados de los ratones SAMR1 hembras, en la comparación de sus grupos IAM vs sham mediante el análisis DESeq2. En la tabla aparece descrita la ruta en la primera columna, seguida del número de genes diana implicados en la misma, y el número total de genes de la ruta, en la cuarta columna está el Pvalor, es decir, la significancia estadística de la relación entre los genes diana y su ruta.

RUTAS KEGG DE LOS miRNAs diferencialmente expresados en el COMPLEX CONTRAST de los RATONES SAMR1 IAM vs sham			
Ruta	Genes		Pvalor
	Diana	Ruta	
Ras signaling pathway	8	232	0.0022
cAMP signaling pathway	8	215	0.0022
FoxO signaling pathway	6	131	0.0022
Longevity regulating pathway	5	62	0.0022
Axon guidance	7	180	0.0022
Rap1 signaling pathway	7	214	0.0038
MAPK signaling pathway	8	294	0.0042
Tight junction	6	166	0.0042
Relaxin signaling pathway	5	129	0.0062
Chemokine signaling pathway	6	198	0.0063
Autophagy	5	138	0.0063
Apelin signaling pathway	5	137	0.0063
Insulin signaling pathway	5	141	0.0064
Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)	5	150	0.0076
Oxytocin signaling pathway	5	153	0.0077
Cushing syndrome	5	160	0.0087
Human T-cell leukemia virus 1 infection	5	246	0.0413
Ras signaling pathway	8	232	0.0022
cAMP signaling pathway	8	215	0.0022
FoxO signaling pathway	6	131	0.0022
Longevity regulating pathway	5	62	0.0022
Axon guidance	7	180	0.0022
Rap1 signaling pathway	7	214	0.0038
MAPK signaling pathway	8	294	0.0042
Tight junction	6	166	0.0042
Relaxin signaling pathway	5	129	0.0062
Chemokine signaling pathway	6	198	0.0063
Autophagy	5	138	0.0063
Apelin signaling pathway	5	137	0.0063
Insulin signaling pathway	5	141	0.0064
Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)	5	150	0.0076

Tabla 18. Términos KEGG asociados a los genes diana de los 14 miRNAs diferencialmente expresados en el contraste complejo de los ratones SAMR1 machos y hembras, en la comparación de sus grupos IAM vs sham mediante el análisis DESeq2. En la tabla aparece descrita la ruta en la primera columna, seguida del número de genes diana implicados en la misma, y el número total de genes de la ruta, en la cuarta columna está el Pvalor, es decir, la significancia estadística de la relación entre los genes diana y su ruta.

TÉRMINOS GO DE LOS miRNAs diferencialmente expresados en el COMPLEX CONTRAST de los RATONES SAMR1 IAM vs sham			
Ruta	Genes		Pvalor
	Diana	Ruta	
mRNA splice site selection	5	27	0.0001
Negative regulation of microtubule depolymerization	5	41	0.0001
Peptidyl-serine phosphorylation	11	241	0.0001
Positive regulation of transcription. DNA-templated	21	849	0.0001
Cell motility	5	36	0.0001
Calcium-dependent activation of synaptic vesicle fusion	5	13	0.0001
Regulation of alternative mrna splicing. via spliceosome	6	85	0.0005
Angiogenesis	11	311	0.0005
Negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway	5	50	0.0005
Transforming growth factor beta receptor signaling pathway	7	132	0.001
Neuron development	5	71	0.0017
Sensory perception of pain	5	84	0.003
Regulation of circadian rhythm	5	83	0.003
Hemopoiesis	5	87	0.0031
Actin filament organization	6	162	0.0082
Glucose homeostasis	6	165	0.0082
Protein autophosphorylation	7	223	0.0082
Protein phosphorylation	14	734	0.0109
Positive regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation	5	132	0.0134
Negative regulation of inflammatory response	5	137	0.0146
Fatty acid metabolic process	6	200	0.016
Positive regulation of cell population proliferation	13	709	0.0161
Rhythmic process	5	153	0.0198
Calcium ion transport	5	180	0.0342
Negative regulation of transcription. DNA-templated	12	716	0.0342
Intracellular signal transduction	9	479	0.036
Phosphorylation	10	591	0.0475

Tabla 19. Términos GO asociados a los genes diana de los 14 miRNAs diferencialmente expresados en el contraste complejo de los ratones SAMR1 machos y hembras, en la comparación de sus grupos IAM vs sham mediante el análisis DESeq2. En la tabla aparece descrita la ruta en la

primera columna, seguida del número de genes diana implicados en la misma, y el número total de genes de la ruta, en la cuarta columna está el Pvalor, es decir, la significancia estadística de la relación entre los genes diana y su ruta.

RUTAS KEGG DE LOS miRNAs diferencialmente expresados en los RATONES SAMP8 hembras IAM vs sham			
Ruta	Genes		Pvalor
	Diana	Ruta	
MAPK signaling pathway	24	294	0.001
FoxO signaling pathway	14	131	0.0025
Axon guidance	17	180	0.0025
Neurotrophin signaling pathway	14	121	0.0025
MicroRNAs in cancer	23	303	0.0025
Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	14	140	0.0042
EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	10	79	0.0054
Ras signaling pathway	18	232	0.0079
mTOR signaling pathway	14	156	0.0084
Regulation of actin cytoskeleton	17	216	0.0088
Longevity regulating pathway	8	62	0.0105
Proteoglycans in cancer	16	205	0.0105
PI3K-Akt signaling pathway	22	355	0.0202
Prolactin signaling pathway	8	72	0.0202
Melanoma	8	72	0.0202
Longevity regulating pathway	9	90	0.0205
Rap1 signaling pathway	15	214	0.0259
cGMP-PKG signaling pathway	13	173	0.0259
Growth hormone synthesis, secretion, and action	10	116	0.0279
SNARE interactions in vesicular transport	5	33	0.0281
Autophagy	11	138	0.0281
Type II diabetes mellitus	6	48	0.0281
ErbB signaling pathway	8	84	0.0312
Renal cell carcinoma	7	68	0.0341
Breast cancer	11	147	0.0359
PD-L1 expression and PD-1 checkpoint pathway in cancer	8	88	0.0359

Fc gamma R-mediated phagocytosis	8	90	0.0374
Aldosterone-regulated sodium reabsorption	5	38	0.0374
Hepatocellular carcinoma	12	172	0.0378
Regulation of lipolysis in adipocytes	6	56	0.0394
Glioma	7	74	0.0394
TGF-beta signaling pathway	8	95	0.0421
Spinocerebellar ataxia	8	96	0.0421
Pathways in cancer	27	539	0.0421
Pancreatic cancer	7	76	0.0421
Insulin signaling pathway	10	141	0.0494

Tabla 20. Rutas KEGG asociadas a los genes diana de los 19 miRNAs diferencialmente expresados de los ratones SAMP8 hembras, en la comparación de sus grupos IAM vs sham mediante el análisis DESeq2. En la tabla aparece descrita la ruta en la primera columna, seguida del número de genes diana implicados en la misma, y el número total de genes de la ruta, en la cuarta columna está el Pvalor, es decir, la significancia estadística de la relación entre los genes diana y su ruta.

TÉRMINOS GO DE LOS miRNAs diferencialmente expresados en los RATONES SAMP8 hembras IAM vs sham			
Ruta	Genes		Pvalor
	Diana	Ruta	
Nervous system development	36	440	0.001
Positive regulation of gene expression	50	630	0.001
Actin cytoskeleton organization	23	209	0.001
Positive regulation of chondrocyte differentiation	8	30	0.001
Activin receptor signaling pathway	7	20	0.001
ER to Golgi ceramide transport	5	7	0.001
Regulation of gtpase activity	14	93	0.001
Negative regulation of transcription, DNA-templated	49	716	0.001
Positive regulation of transcription, DNA-templated	58	849	0.001
Exocytic insertion of neurotransmitter receptor to postsynaptic membrane	7	17	0.001
Memory	14	119	0.0023
Pre-mirna processing	6	20	0.0023
Mrna destabilization	6	20	0.0023
Kidney development	17	173	0.0043
Regulation of alternative mrna splicing, via spliceosome	11	85	0.0053
Cartilage condensation	6	23	0.0053
Glycine transport	5	15	0.0053
Vesicle fusion	8	48	0.0067
Regulation of actin cytoskeleton organization	11	92	0.0079
Protein phosphorylation	43	734	0.009
Bicarbonate transport	6	28	0.0095
Negative regulation of type I interferon-mediated signaling pathway	5	18	0.0095
Protein dephosphorylation	17	202	0.01
Establishment of endothelial barrier	5	19	0.01
Muscle cell differentiation	5	20	0.0115
Positive regulation of neuron apoptotic process	10	86	0.0115
Histone H3-K9 demethylation	5	21	0.012
Positive regulation of translation	10	87	0.012
Dendrite morphogenesis	8	58	0.012
Vesicle-mediated transport in synapse	6	32	0.012
Cell fate commitment	10	89	0.0122
Neuron apoptotic process	8	59	0.0122

Learning	9	74	0.0124
Embryonic limb morphogenesis	9	74	0.0124
G protein-coupled glutamate receptor signaling pathway	5	24	0.0147
Learning or memory	9	78	0.0147
Motor neuron axon guidance	6	36	0.0147
Neurogenesis	9	78	0.0147
Production of mirnas involved in gene silencing by mirna	5	24	0.0147
Golgi to plasma membrane protein transport	6	36	0.0147
Skin development	8	64	0.0147
Excitatory postsynaptic potential	7	49	0.0147
Positive regulation of pri-mirna transcription by RNA polymerase II	7	49	0.0147
Ephrin receptor signaling pathway	7	50	0.015
Phosphorylation	34	591	0.0163
Intracellular signal transduction	29	479	0.0163
Vesicle-mediated transport	19	268	0.0166
Regulation of heart rate	6	39	0.018
Positive regulation of mesenchymal cell proliferation	6	39	0.018
Negative regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway	9	84	0.018
Mrna splice site selection	5	27	0.0188
Regulation of translation	12	139	0.0198
Negative regulation of neuron projection development	10	103	0.0198
Adrenal gland development	5	28	0.0198
Positive regulation of cyclin-dependent protein serinethreonine kinase activity	5	28	0.0198
Regulation of neurotransmitter secretion	5	28	0.0198
Regulation of membrane potential	13	160	0.0211
Mrna catabolic process	6	42	0.0212
Positive regulation of erythrocyte differentiation	5	29	0.0219
Positive regulation of cell population proliferation	38	709	0.0221
Sodium ion transmembrane transport	9	90	0.0221
Positive regulation of dendritic spine development	6	43	0.0223
Positive regulation of protein phosphorylation	18	266	0.0236
Hair follicle development	7	60	0.0236
Protein O-linked glycosylation	6	44	0.0236
Peripheral nervous system development	5	31	0.0236
Regulation of protein stability	9	93	0.0236
Retrograde transport, endosome to Golgi	9	92	0.0236
Positive regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity	5	31	0.0236

Synaptic membrane adhesion	7	59	0.0236
Endoplasmic reticulum to Golgi vesicle-mediated transport	11	129	0.0237
Axon guidance	17	248	0.0238
Negative regulation of neuron apoptotic process	15	209	0.0255
Cartilage development	9	95	0.0255
Intra-Golgi vesicle-mediated transport	5	33	0.0276
Neural tube closure	10	115	0.028
Cellular response to insulin stimulus	10	116	0.0288
Phosphatidylinositol dephosphorylation	6	48	0.0288
Neurotransmitter transport	6	49	0.0296
Activation of JUN kinase activity	6	49	0.0296
Positive regulation of cold-induced thermogenesis	9	99	0.0296
In utero embryonic development	21	345	0.03
Ras protein signal transduction	7	66	0.0311
Regulation of Rho protein signal transduction	8	83	0.0311
Calcium ion import	5	35	0.0311
Endoplasmic reticulum organization	6	51	0.0331
Exocytosis	10	123	0.0369
Branching morphogenesis of an epithelial tube	5	38	0.0395
Cell morphogenesis	9	107	0.0404
Water transport	5	39	0.0404
Cellular calcium ion homeostasis	11	146	0.0404
Peptidyl-threonine phosphorylation	8	89	0.0404
Negative regulation of smoothened signaling pathway	5	39	0.0404
Regulation of cell cycle	11	145	0.0404
Positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade	17	272	0.0404
Embryo development	7	72	0.0408
Semaphorin-plexin signaling pathway	6	55	0.0408
Neuron projection morphogenesis	8	90	0.041
Negative regulation of translation	9	109	0.0415
Regulation of gene expression	26	481	0.0425
Positive regulation of neuron differentiation	10	129	0.0425
Skeletal muscle tissue development	7	74	0.0437
Positive regulation of cell migration	17	277	0.0437
Gene silencing by RNA	6	57	0.0437
Dopaminergic neuron differentiation	5	41	0.0437
Neuron migration	12	172	0.0451
Heart development	18	302	0.0451

Protein glycosylation	8	94	0.0455
Embryonic hindlimb morphogenesis	5	42	0.0455
Regulation of neuron differentiation	5	42	0.0455
Fibroblast growth factor receptor signaling pathway	7	76	0.0459
Peptidyl-tyrosine phosphorylation	8	95	0.0471
Ventricular septum development	5	43	0.0472
Neuronal action potential	5	43	0.0472
Regulation of mrna stability	5	43	0.0472
Positive regulation of cell death	6	60	0.0477
Phosphatidylinositol 3-kinase signaling	5	44	0.0477
Positive regulation of smooth muscle cell migration	5	44	0.0477
Peptidyl-serine phosphorylation	15	241	0.0477
Lung development	10	136	0.0477
Negative regulation of BMP signaling pathway	7	78	0.0477
Lung alveolus development	6	60	0.0477
Embryonic cranial skeleton morphogenesis	5	44	0.0477
Embryonic skeletal system morphogenesis	7	78	0.0477
Chemical synaptic transmission	14	221	0.0482

Tabla 21. Términos GO asociados a los genes diana de los 19 miRNAs diferencialmente expresados de los ratones SAMP8 hembras, en la comparación de sus grupos IAM vs sham mediante análisis DESeq2. En la tabla aparece descrita la ruta en la primera columna, seguida del número de genes diana implicados en la misma, y el número total de genes de la ruta, en la cuarta columna está el Pvalor, es decir, la significancia estadística de la relación entre los genes diana y su ruta.

RUTAS KEGG DE LOS miRNAs diferencialmente expresados en el COMPLEX CONTRAST de los RATONES SAMP8 IAM vs sham			
Ruta	Genes		Pvalor
	Diana	Ruta	
Axon guidance	11	180	0.0049
Neurotrophin signaling pathway	9	121	0.0049
Longevity regulating pathway	7	90	0.0057
Gap junction	7	86	0.0057
Growth hormone synthesis, secretion and action	8	116	0.0057
Spinocerebellar ataxia	7	96	0.0077
Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	8	140	0.0129
mTOR signaling pathway	8	156	0.0159
GABAergic synapse	6	89	0.0159
Long-term depression	5	61	0.0159
MicroRNAs in cancer	12	303	0.0159
AMPK signaling pathway	7	126	0.0166
Acute myeloid leukemia	5	70	0.02
cGMP-PKG signaling pathway	8	173	0.0225
EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	5	79	0.027
Glutamatergic synapse	6	113	0.027
Transcriptional misregulation in cancer	8	184	0.027
ErbB signaling pathway	5	84	0.0297
Fc gamma R-mediated phagocytosis	5	90	0.0368
MAPK signaling pathway	10	294	0.0432
FoxO signaling pathway	6	131	0.0432
Regulation of actin cytoskeleton	8	216	0.0473

Tabla 22. Rutas KEGG asociadas a los genes diana de los 14 miRNAs diferencialmente expresados en el contraste complejo de los ratones SAMP8 machos y hembras, en la comparación de sus grupos IAM vs sham mediante el análisis DESeq2. En la tabla aparece descrita la ruta en la primera columna, seguida del número de genes diana implicados en la misma, y el número total de genes de la ruta, en la cuarta columna está el Pvalor, es decir, la significancia estadística de la relación entre los genes diana y su ruta.

TÉRMINOS GO DE LOS miRNAs diferencialmente expresados en el COMPLEX CONTRAST de los RATONES SAMP8 IAM vs sham			
Ruta	Genes		Pvalor
	Diana	Ruta	
Regulation of alternative mrna splicing, via spliceosome	14	85	0.0001
Nervous system development	22	440	0.0001
Axon guidance	17	248	0.0001
Neurotransmitter receptor localization to postsynaptic specialization membrane	6	32	0.0001
Kidney development	12	173	0.0011
Negative regulation of cell population proliferation	21	475	0.0011
Positive regulation of gene expression	26	630	0.0011
Actin cytoskeleton organization	13	209	0.0011
Positive regulation of transcription, DNA-templated	32	849	0.0011
Mrna destabilization	5	20	0.0011
Regulation of synaptic vesicle exocytosis	10	118	0.0011
Negative regulation of transcription, DNA-templated	27	716	0.0019
Ephrin receptor signaling pathway	6	50	0.0027
Embryo development	7	72	0.0033
Calcium ion import	5	35	0.0039
Mrna catabolic process	5	42	0.0072
Positive regulation of smooth muscle cell migration	5	44	0.0072
Embryonic hindlimb morphogenesis	5	42	0.0072
Regulation of mrna stability	5	43	0.0072
Anatomical structure development	6	66	0.0072
Positive regulation of dendritic spine development	5	43	0.0072
Regulation of actin cytoskeleton organization	7	92	0.0074
Forebrain development	7	94	0.0076
Receptor clustering	5	46	0.0077
Learning	6	74	0.0102
Ureteric bud development	5	52	0.0112
Protein processing	7	105	0.0116
Neurogenesis	6	78	0.0116
Neuron migration	9	172	0.014
Cellular response to insulin stimulus	7	116	0.0172
Positive regulation of translation	6	87	0.0172
Rhythmic process	8	153	0.021
Negative regulation of canonical Wnt signaling pathway	9	188	0.0214
Cartilage development	6	95	0.0235
In utero embryonic development	13	345	0.0259
Transforming growth factor beta receptor signaling pathway	7	132	0.0276
Positive regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation	7	132	0.0276
Synaptic vesicle endocytosis	5	72	0.0281
Fat cell differentiation	6	103	0.0284
Positive regulation of protein kinase activity	5	73	0.0284
Regulation of cell shape	8	174	0.032
Negative regulation of neuron apoptotic process	9	209	0.032

Sodium ion transport	7	144	0.0361
Sensory perception of pain	5	84	0.043
Heart development	11	302	0.0433
Protein phosphorylation	21	734	0.0439
Positive regulation of neuron apoptotic process	5	86	0.0439
Wnt signaling pathway	9	230	0.0459
Positive regulation of osteoblast differentiation	5	88	0.0459
Angiogenesis	11	311	0.046
Positive regulation of cytosolic calcium ion concentration	8	195	0.046
Regulation of gene expression	15	481	0.046
Sodium ion transmembrane transport	5	90	0.046
Regulation of membrane potential	7	160	0.0473
Retrograde transport, endosome to Golgi	5	92	0.0479
Positive regulation of NF-kappaB transcription factor activity	8	199	0.0479
Regulation of gtpase activity	5	93	0.0482
Peptidyl-serine phosphorylation	9	241	0.0497
Glucose homeostasis	7	165	0.0497

Tabla 23. Términos GO asociados a los genes diana de los 14 miRNAs diferencialmente expresados en el contraste complejo de los ratones SAMP8 machos y hembras, en la comparación de sus grupos IAM vs sham mediante DESeq2. En la tabla aparece descrita la ruta en la primera columna, seguida del número de genes diana implicados en la misma, y el número total de genes de la ruta, en la cuarta columna está el Pvalor, es decir, la significancia estadística de la relación entre los genes diana y su ruta.

8.3. ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO FUNCIONAL DEL miR-30e-3p, miR-148a-3p, miR-149-5p y miR-423-5p

RUTAS KEGG DEL miR-30e-3p OBTENIDAS DEL miRWalk			
Ruta	Genes		Pvalor
	Diana	Ruta	
hsa04068_FoxO_signaling_pathway	5	131	0.004
hsa04071_Sphingolipid_signaling_pathway	5	119	0.004
hsa04140_Autophagy	5	137	0.004
hsa04151_Pi3K-Akt_signaling_pathway	8	354	0.004
hsa05215_Prostate_cancer	5	97	0.004
hsa05165_HumanPapillomavirus_infection	7	330	0.0082
hsa05200_Pathways_in_cancer	9	531	0.0096
hsa05203_Viral_carcinogenesis	5	201	0.0106
hsa05206_MicroRNAs_in_cancer	6	310	0.0144

Tabla 24. Rutas KEGG asociadas a los genes diana del miR-30e-3p obtenidas mediante la herramienta online miRwalk. En la tabla aparece descrita la ruta en la primera columna, seguida del número de genes diana implicados en la misma, y el número total de genes de la ruta, en la cuarta columna está el Pvalor, es decir, la significancia estadística de la relación entre los genes diana y su ruta.

RUTAS KEGG DEL miR-148a-3p OBTENIDAS DEL miRWalk

Ruta	Genes		Pvalor
	Diana	Ruta	
hsa04068_FoxO_signaling_pathway	13	131	0
hsa04151_PI3K-Akt_signaling_pathway	20	354	0
hsa05215_Prostate_cancer	10	97	0
hsa04012_ErbB_signaling_pathway	9	85	0.0015
hsa04350_TGF-beta_signaling_pathway	9	94	0.0015
hsa04810_Regulation_of_actin_cytoskeleton	14	213	0.0015
hsa01521_EGFR_tyrosine_kinase_inhibitor_resistance	8	79	0.0018
hsa05200_Pathways_in_cancer	24	531	0.0018
hsa05214_Glioma	8	75	0.0018
hsa05220_Chronic_myeloid_leukemia	8	76	0.0018
hsa05206_MicroRNAs_in_cancer	16	310	0.0032
hsa05211_Renal_cell_carcinoma	7	69	0.0032
hsa05223_Non-small_cell_lung_cancer	7	66	0.0032
hsa05410_Hypertrophic_cardiomyopathy_(HCM)	8	90	0.0032
hsa04510_Focal_adhesion	12	199	0.0042
hsa04150_mTOR_signaling_pathway	10	155	0.0063
hsa05213_Endometrial_cancer	6	58	0.0064
hsa04141_Protein_processing_in_endoplasmic_reticulum	10	166	0.0086
hsa04910_Insulin_signaling_pathway	9	139	0.0086
hsa05210_Colorectal_cancer	7	86	0.0086
hsa05165_Human_papillomavirus_infection	15	330	0.0098
hsa05205_Proteoglycans_in_cancer	11	204	0.0098
hsa05221_Acute_myeloid_leukemia	6	67	0.0098
hsa05222_Small_cell_lung_cancer	7	92	0.0098
hsa05224_Breast_cancer	9	147	0.0098
hsa05414_Dilated_cardiomyopathy_(DCM)	7	96	0.0108
hsa05218_Melanoma	6	72	0.0111
hsa01522_Endocrine_resistance	7	98	0.0114
hsa05212_Pancreatic_cancer	6	76	0.0132
hsa05412_Arrhythmogenic_right_ventricular_cardiomyopathy_(ARVC)	6	77	0.0133
hsa04218_Cellular_senescence	9	160	0.0135
hsa04931_Insulin_resistance	7	108	0.0162
hsa04915_Estrogen_signaling_pathway	8	138	0.0163
hsa05225_Hepatocellular_carcinoma	9	168	0.0163
hsa04550_Signaling_pathways_regulating_pluripotency_of_stem_cells	8	142	0.0185
hsa04213_Longevity_regulating_pathway	5	62	0.0199
hsa04512_ECM-receptor_interaction	6	88	0.0199
hsa04211_Longevity_regulating_pathway	6	89	0.0204
hsa05226_Gastric_cancer	8	149	0.0215
hsa04360_Axon_guidance	9	181	0.0216
hsa04920_Adipocytokine_signaling_pathway	5	69	0.0264

hsa05017_Spinocerebellar_ataxia	6	98	0.0277
hsa05163_Human_cytomegalovirus_infection	10	225	0.0277
hsa04014_Ras_signaling_pathway	10	232	0.0325
hsa04625_C-type_lectin_receptor_signaling_pathway	6	104	0.0326
hsa04660_T_cell_receptor_signaling_pathway	6	104	0.0326
hsa04120_Ubiquitin_mediated_proteolysis	7	136	0.0328
hsa04140_Autophagy	7	137	0.0328
hsa04371_Apelin_signaling_pathway	7	137	0.0328
hsa04922_Glucagon_signaling_pathway	6	106	0.0328
hsa04662_B_cell_receptor_signaling_pathway	5	82	0.0401
hsa04072_Phospholipase_D_signaling_pathway	7	148	0.0448
hsa05166_Human_T-cell_leukemia_virus_1_infection	9	219	0.0465
hsa04010_MAPK_signaling_pathway	11	295	0.0466
hsa04071_Sphingolipid_signaling_pathway	6	119	0.0466
hsa04152_AMPK_signaling_pathway	6	120	0.0466
hsa04919_Thyroid_hormone_signaling_pathway	6	119	0.0466
hsa05135_Yersinia_infection	6	120	0.0466
hsa04062_Chemokine_signaling_pathway	8	189	0.0476
hsa05160_Hepatitis_C	7	155	0.0476

Tabla 25. Rutas KEGG asociadas a los genes diana del miR-148a-3p obtenidas mediante la herramienta online miRwalk. En la tabla aparece descrita la ruta en la primera columna, seguida del número de genes diana implicados en la misma, y el número total de genes de la ruta, en la cuarta columna está el Pvalor, es decir, la significancia estadística de la relación entre los genes diana y su ruta.

RUTAS KEGG DEL miR-149-5p OBTENIDAS DEL miRWalk			
Ruta	Genes		Pvalor
	Diana	Ruta	
hsa04020_Calcium_signaling_pathway	7	193	0.0108
hsa04024_cAMP_signaling_pathway	7	216	0.0108
hsa04510_Focal_adhesion	7	199	0.0108
hsa04934_Cushing_syndrome	6	155	0.0108
hsa04972_Pancreatic_secretion	5	102	0.0108
hsa04015_Rap1_signaling_pathway	6	210	0.0264
hsa04810_Regulation_of_actin_cytoskeleton	6	213	0.0264
hsa04151_P13K-Akt_signaling_pathway	8	354	0.0272
hsa04010_MAPK_signaling_pathway	7	295	0.028
hsa05202_Transcriptional_misregulation_in_cancer	5	186	0.0375

Tabla 26. Rutas KEGG asociadas a los genes diana del miR-149-5p obtenidas mediante la herramienta online miRwalk. En la tabla aparece descrita la ruta en la primera columna, seguida del número de genes diana implicados en la misma, y el número total de genes de la ruta, en la cuarta columna está el Pvalor, es decir, la significancia estadística de la relación entre los genes diana y su ruta.

RUTAS KEGG DEL miR-423-5p OBTENIDAS DEL miRWalk			
Ruta	Genes		Pvalor
	Diana	Ruta	
hsa04014_Ras_signaling_pathway	5	232	0.0192
hsa04010_MAPK_signaling_pathway	5	295	0.0244
hsa04151_P13K-Akt_signaling_pathway	5	354	0.0321

Tabla 27. Rutas KEGG asociadas a los genes diana del miR-423-5p obtenidas mediante la herramienta online miRwalk. En la tabla aparece descrita la ruta en la primera columna, seguida del número de genes diana implicados en la misma, y el número total de genes de la ruta, en la cuarta columna está el Pvalor, es decir, la significancia estadística de la relación entre los genes diana y su ruta.

8.4. SUMMARY

8.4.1. Introduction

Cardiovascular diseases remain one of the leading causes of mortality in Spain. According to the National Institute of Statistics (INE), in 2021, 13,463 people died from acute myocardial infarction (AMI), with 8,209 being men and 5,254 women. These gender disparities in disease incidence have been observed in previous years as well, even before the COVID pandemic.

The differences in AMI mortality incidence between men and women can be attributed to cardiovascular disparities between the sexes. These differences encompass cardiac structure and function, cellular and molecular mechanisms, as well as inflammatory processes and the immune system.

Regarding cardiac structure and function, healthy women and men have distinct dimensions and functions of the left ventricle (LV). Even after adjusting for body size, women have smaller LV chambers and, consequently, lower ejection volumes, although their resting heart rate is higher, maintaining a similar cardiac output to men. While the LV ejection fraction increases with age in both sexes, it is more pronounced in women.

At the cellular level, the number of cardiomyocytes is similar between the sexes at birth, but older women experience a relatively attenuated decrease in cardiomyocyte number and mass, with less tendency towards hypertrophy and eccentric remodelling of the LV compared to men.

Although little is known about the underlying molecular mechanisms predisposing women to cardiovascular pathologies, differences in some mechanisms have been studied. Among them is the renin-angiotensin-aldosterone system activated in response to low estrogen levels, which increases the production of reactive oxygen species and combined with a decrease in nitric oxide during menopause, leads to collagen synthesis and diastolic dysfunction.

Calcium regulation may also contribute to sex differences, as women have smaller calcium currents and a lower gain of excitation-contraction coupling compared to men. Lastly, sex differences in myocardial substrate metabolism are also relevant, as women have lower glucose uptake and utilization, higher fatty acid uptake, and metabolic inefficiency compared to men.

Inflammation and the immune system also play a significant role in the differential development of cardiovascular diseases based on sex. Additionally,

there are gender differences in the biology of the immune system. Women have stronger immune responses than men, resulting in faster recovery from infectious diseases, higher vaccine efficacy, and better cancer survival. However, the downside of a stronger immunity is that women have higher expression of pro-inflammatory genes, elevated levels of inflammatory cytokines, increased activation of CD4 and CD8 T cells, and generally higher systemic inflammation. Women also have higher levels of C-reactive protein than men.

Inflammation is also driven by a range of non-cardiac comorbidities, particularly prevalent in women, including hypertension, diabetes mellitus, chronic kidney disease, obesity, iron deficiency, and preeclampsia, which could have an impact on the myocardium.

Thus, the pathogenic mechanisms of cardiac inflammation differ between men and women. For example, macrophage polarization in myocarditis, i.e., differentiation into M1 or M2 phenotype, is sex-specific, with higher expression of M1-activated macrophages in males and M2 phenotype macrophages in female mice.

AMI is a cardiovascular disease characterized by the death of myocardial cells due to an acute decrease in coronary blood flow, typically caused by the obstruction of a coronary artery. The interruption of blood supply to

the myocardium leads to an ischemic process, where myocardial cells do not receive sufficient oxygen and nutrients, resulting in irreversible damage.

AMI is diagnosed by the presence of an increase in biomarkers of myocardial damage, such as troponin, along with ischemic changes in the electrocardiogram (ECG). The decrease in coronary blood flow is a multifactorial process. The most common underlying disease behind AMI is atherosclerosis, but there are other causes such as coronary artery embolism, cocaine-induced ischemia, coronary dissection, and coronary vasospasm.

Atherosclerosis is an inflammatory process that affects medium and large-sized arteries throughout the cardiovascular system. It begins with the accumulation of low-density lipoproteins (LDL) in the subendothelial space, which can be modified through oxidation and aggregation, leading to an imbalance in the availability of active substances and causing endothelial dysfunction.

Modified LDL acts as chronic stimulators of the immune response, temporarily activating the endothelium through pro-inflammatory cytokines and the expression of adhesion molecules that promote monocyte adhesion and differentiation into macrophages, which in turn promote lipid accumulation.

Smooth muscle cells also migrate to the inflamed intimal layer, forming a fibromuscular layer. Rupture of the atherosclerotic plaque is the most common cause of thrombosis, leading to coronary artery occlusion and myocardial ischemia.

One of the main sex differences in AMI is its higher incidence in men, as previously mentioned. However, there are other relevant aspects for the research of the disease, such as differences in symptom presentation, disease outcome, comorbidities, and risk factors. In a recent meta-analysis by Van Oosterhout, the existing sex differences in the presentation of AMI symptoms were further explored, confirming that women are more likely to experience pain between the shoulder blades, nausea or vomiting, and shortness of breath, while they are less likely to experience chest pain or diaphoresis (profuse sweating). It is also emphasized that these differences have been established in the literature for over a decade.

Regarding sex differences in disease outcome, it has been shown that young women with AMI experience more adverse outcomes than men in the year following discharge. In addition to a higher incidence of readmission in women due to adverse events, the high prevalence of comorbidities in women after AMI

compared to men is also relevant, including diabetes, hypertension, chronic obstructive pulmonary disease, and renal failure. A study in middle-aged women and men found that certain risk factors for AMI were more strongly associated with a higher risk in women than in men, including smoking, hypertension, and type 2 diabetes.

Over the decades, women have been underrepresented in clinical and therapeutic trials, resulting in a lack of knowledge about the disease in women. Even in basic research, the origin of cells, fluids, and tissues used was often unknown. Fortunately, since 1994, with the guidance from the National Institutes of Health (NIH) for the inclusion of women as subjects in research, legislation in this regard has been updated with the aim of achieving equal inclusion of male and female samples in basic research. Moreover, clinical trials should determine the safety and efficacy of new drugs in both sexes.

As previously mentioned, the incidence of AMI depends on sex, but age also plays a significant role. Framingham study demonstrated that the incidence of AMI is 2.5 times higher in men than in women before the age of 45, but this difference disappears after the age of 55. However, in ages above 60, women have twice the probability of AMI compared to men. Additionally, the

prognosis of AMI is usually worse in younger patients due to the absence of chronic ischemia history and secondary collateral development. Early AMI is often associated with multiple risk factors such as diabetes, smoking, metabolic syndrome, and recreational drug use.

Regarding the role of aging in AMI's pathophysiology, age plays a vital role in the deterioration of cardiovascular functionality, leading to a higher risk of AMI in older adults. Aging causes functional and electrical changes in the heart, which are influenced by factors like increased oxidative stress production, inflammation, and myocardial degeneration. Increased reactive oxygen species production and proinflammatory markers are linked to aging, contributing to collagen deposition, hypertrophy, and cardiac fibrosis development. Oxidative stress also leads to mitochondrial dysfunction, affecting cardiac aerobic metabolism dependent on ATP produced by mitochondria. Calcium signaling pathways are also affected, and lipid oxidation increases, promoting atherosclerosis development. Collectively, oxidative stress related to aging results in significant cellular and structural changes that eventually lead to impaired cardiac function and the potential development of AMI. Given that the number of elderly patients continues to rise, further research is crucial to understand the impact

of aging and sex differences in clinical and investigational studies to improve outcomes in the elderly population.

MicroRNAs (miRNAs) are a type of non-coding RNA (ncRNA) that are approximately 17-22 nucleotides in length. They function by reducing gene expression through the inhibition of translation or the degradation of messenger RNA (mRNA) molecules. The human genome encodes approximately 2000 miRNAs, each of which can regulate the expression of hundreds of protein-coding mRNAs, thereby participating in numerous physiological and pathological processes such as cardiovascular development, inflammation, hypertrophy, and vascular function.

MiRNAs have also been discovered in the circulatory system, opening new possibilities for their use as potential biomarkers for the diagnosis of cardiovascular diseases. In comparison to current diagnostic strategies for AMI, such as electrocardiography or coronary angiography, miRNAs hold promise as non-invasive, harmless biochemical markers, paving the way for their study as biomarkers for AMI.

The biogenesis of miRNAs involves multiple steps. Most miRNAs are derived from the introns of functional genes, although they can also be located in

intergenic and exonic regions of the host gene. The mature and functional miRNAs are produced and processed through several stages. It starts with the transcription of the primary miRNA (pri-miRNA) by RNA polymerase II. The enzyme RNase III Drosha and the DiGeorge critical region 8 (DGCR8) protein process and cleave the pri-miRNAs to generate precursor miRNAs (pre-miRNAs). The pre-miRNAs are then exported to the cytoplasm by exportin-5, where the Dicer enzyme, a ribonuclease III complex, cleaves them to produce mature miRNAs of approximately 22 nucleotides. The selection of the strand and the assembly of the mature miRNA with the RNA-induced silencing complex (RISC) are mediated by the Dicer complex, Argonaute 2 (Ago2), and the TAR RNA-binding protein (TRBP). The thermodynamic stability of the duplex ends allows for the selection of the strand with the less stable 5' end.

Overall, miRNAs have emerged as important regulators of gene expression with potential applications as diagnostic biomarkers for various diseases, including cardiovascular disorders like AMI. Further research in this field holds promise for improving diagnosis and treatment strategies.

Circulating miRNAs are primarily secreted into the bloodstream in two main forms: encapsulated within

lipid vesicles (small and large extracellular vesicles and apoptotic bodies) and associated with RNA-binding proteins such as nucleophosmin 1 (NPM1) and Ago2 or lipoprotein complexes. Lipid vesicles vary in size, origin, and mode of release. Small vesicles (30 to 100 nm) originate from endosomes and are secreted into the circulation when multivesicular bodies fuse with the plasma membrane. Large vesicles (0.1–1 μm) are released through budding. Apoptotic bodies (0.5–2 μm) are secreted during apoptosis.

The past two decades have witnessed remarkable progress in understanding the various aspects of the miRNA-induced silencing machinery, including the multitude of proteins and complexes involved in this process. Specifically, numerous miRNAs are directly related to AMI pathology. For example, miR-21 and miR-92a promote endothelial damage and dysfunction, miR-223, miR-155, miR-205, and miR-147 participate in endothelial cell inflammation, while miR-122 and miR-370 facilitate triglyceride accumulation. Additionally, miR-221 and miR-222 stimulate vascular smooth muscle cell proliferation and migration, and miR-33 increases atherosclerotic plaque size and lipid content. All these miRNAs are involved in atherosclerotic plaque formation and, consequently, in the development of AMI. On the other hand, several miRNAs have an

opposite effect, preventing the atherosclerosis process. For instance, miR-30c and miR-146a reduce lipid accumulation, and miR-145/143 decreases atherosclerotic plaque size. Overall, miRNAs play a role in all stages of atherosclerosis development, highlighting their significant involvement in AMI.

In order for a molecule to be considered an ideal diagnostic biomarker for AMI, it must fulfil several criteria, including non-invasive accessibility of the sample source, high sensitivity and specificity for the disease, rapid and accurate detection in the early stage of the disease, and a long half-life. Circulating miRNAs have several advantages as they meet many of these criteria. They can be obtained through a simple and harmless method, they are extremely stable in circulation, exhibiting remarkable resistance to degradation by endogenous RNase activity, and they can be detected in real-time using PCR. Therefore, circulating miRNAs have great potential as diagnostic biomarkers for AMI.

Numerous studies have investigated the role of miRNAs in the classification of patients with AMI, identifying some promising candidates as biomarkers. Among them, miR-1, miR-133a/b, miR-208a/b, and miR-499 stand out. All of these miRNAs are specific to the myocardium, highly expressed in skeletal muscle, and

have been found to be elevated in circulation in experimental models and patients with AMI, as summarized in various articles.

Increased levels of miR-1 after AMI have also been positively associated with the size of the myocardial infarction. In patients who had suffered an AMI, miR-1 showed a significant correlation with the absolute change in infarct size, exhibited a trend towards a positive correlation with the left ventricular ejection fraction, and was associated with higher mortality from AMI. Furthermore, a higher level of miR-1 was also detected in AMI patients, negatively associated with arrhythmia.

Similar to miR-1, miR-133 is a crucial regulator of cardiac and skeletal muscle development and is involved in the biology of vascular smooth muscle cells. Patients with AMI have been found to have significantly higher plasma levels of miR-133-3p compared to control subjects, which returned to baseline levels after 7 days. Additionally, miR-133-3p has shown a significant correlation with mortality.

In patients with acute myocardial infarction, a higher level of miR-208a-3p was observed, peaking at 3 hours after reperfusion, compared to patients with unstable angina. Moreover, the increased miR-208a was significantly associated with a higher risk of mortality or

heart failure within 6 months post-infarction and circulating levels of miR-208a-3p correlated with cTnI (cardiac troponin I) and CK-MB (creatin kinase MB) released from the area. Wang et al. reported significantly higher levels of miR-1, miR-133a, miR-208a, and miR-499 in plasma in rats with AMI, with miR-208a showing the best sensitivity and specificity of detection. Liu et al. revealed that miR-208, along with miR-499, had a safer value than miR-1 in the diagnosis of AMI.

The role of miR-499-5p as a diagnostic biomarker for AMI has been compiled in several articles. Specifically, elevated levels of miR-499-5p associated with human cardiac myocytes have been detected in plasma and correlated with cTnI in patients with acute myocardial infarction, suggesting its release from injured cardiomyocytes. In another study, miR-499-5p exhibited a more accurate predictive value that was significantly higher than most reliable biomarkers of AMI, such as cTnI and CK-MB. Changes in circulating miR-499 levels have been associated with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction in patients presenting within 3 hours of symptom onset. Li et al. illustrated that miR-499 was more accurate than cTnT (cardiac troponin T) for the diagnosis of AMI in elderly patients. Other clinical studies have described elevated levels of circulating miR-499 in patients with AMI.

While currently there is limited evidence that miRNAs can surpass traditional biomarkers, such as cardiac troponin, in the diagnosis of AMI, there is potential for miRNAs to complement existing risk prediction models and act as valuable markers in the acute phase of the disease.

As previously mentioned, the role of miRNAs in different pathologies and their potential as biomarkers or therapeutic tools is continuously being studied. However, conducting prior studies in experimental models is essential for all these advancements to take place.

Preclinical studies using animal models of myocardial infarction are vital in the discovery process of relevant molecules involved in the physiological process of the disease. For instance, angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEIs) have demonstrated benefits in a rat model of myocardial infarction induced by coronary artery ligation, transforming the prospects for heart failure patients. Nonetheless, results from experimental models do not always translate well into clinical settings, particularly in interventions designed to protect the heart from acute ischemia. While non-invasive imaging innovations have provided new insights into human myocardial disease, including myocardial infarction, preclinical models remain crucial for a deeper molecular

understanding and for testing the validity of new therapeutic agents.

Large animal models such as canine and primate models have long been used in cardiovascular disease research. Although they are effective in simulating pathological characteristics observed in human patients, they come with inevitable limitations such as high feeding costs, difficulties in genetic modification, extensive space requirements for manipulation, and ethical concerns regarding their use. On the other hand, rodent models are the most commonly employed in cardiovascular disease research and serve as indispensable tools for studying pathological characteristics, clinical symptoms, and drug development for human diseases.

Despite their imperfections, rodent models offer advantages such as extensive knowledge of their genome, a wide variety of genetically modified strains, short gestation periods, and relatively low breeding and maintenance costs, providing greater convenience for scientific research. Rodent models have been developed and utilized to simulate various characteristics and indicators of common cardiovascular diseases, greatly contributing to scientific research.

A commonly used method to simulate myocardial infarction in experimental models involves

permanent surgical occlusion of the left anterior descending coronary artery. Permanent ligation prevents distal perfusion, resulting in irreversible hypoxia in a significant portion of the left ventricle, leading to cardiomyocyte cell death, apoptosis, and scar formation. This model allows investigation into the cellular and molecular mechanisms underlying tissue injury and wound healing. However, this technique presents considerable challenges in mice due to their small heart size, requiring highly trained personnel to perform the artery ligation.

In general, the use of animal models to study myocardial infarction is highly valued in three broad areas of cardiovascular research: (i) molecular studies (involving, for example, infarct repair, adverse cardiac remodeling, cell death, and arrhythmias); (ii) translation studies (e.g., evaluating pharmacological interventions in the context of the disease to improve outcomes); and (iii) advanced therapies to enhance cardiac function, tissue remodeling, and regeneration (e.g., gene therapy, cell therapy, and tissue engineering).

In the case of the present thesis, our experimental model of myocardial infarction allows the study of the molecular aspect in the acute phase of the infarction in the SAMR1/SAMP8 murine model, enabling the discovery of new molecules involved in the acute phase of the pathology.

8.4.2. Hypothesis and Objectives

It has been observed that acute myocardial infarction (AMI) alters the levels of circulating miRNAs capable of regulating various biological processes. Understanding this change in the miRNA expression profile in circulation could potentially enable the identification of new diagnostic and prognostic biomarkers for the disease, as well as provide a starting point for studying and intervening in the affected cellular signaling pathways.

AMI is generally associated with aging processes, where advanced age is the main determinant of AMI prognosis, and there are also sex differences in its incidence in the population.

The hypothesis of this study is that senescence and sex differentially regulate the expression profile of miRNAs in an experimental myocardial infarction model using SAMR1/SAMP8 mouse strains, which would have implications in the regulation of the cellular signaling pathways involved in AMI.

Therefore, the main objective of this study was to determine the miRNA expression profile in the experimental myocardial infarction mouse model using SAMR1/SAMP8 strains and to study the influence of sex and senescence.

To achieve this, the following specific objectives were proposed:

1. Establish the experimental model of acute myocardial infarction (AMI) and senescence using SAMR1/SAMP8 mice and determine the optimal time that should elapse after inducing the infarction for sample collection.
2. Analyze the influence of sex and senescence on the miRNA expression profile in the serum of SAMR1/SAMP8 mice and determine the affected biological pathways using bioinformatics.
3. Validate the expression of dysregulated circulating miRNAs related to aging and sex in a new cohort of SAMR1/SAMP8 mice, as well as in samples from male and female patients with AMI.
4. Investigate the functional implication of differentially expressed miRNAs related to aging and sex in AMI using bioinformatics tools.

8.4.3. Materials and Methods

For the establishment of the murine model of acute myocardial infarction (AMI), Senescence Accelerated Mouse (SAM) model was utilized. SAM mice were obtained through phenotypic selection from an AKR/J mouse colony. This model was described by Takeda et al. in 1981. SAM mice encompass various subtypes characterized by phenotypic changes associated with accelerated aging. In this study, SAMR1 mice, representing normal biological aging, and SAMP8 mice, displaying accelerated senescence and age-related alterations such as cataracts, osteoporosis, senile amyloidosis, and memory loss, were used. The mice were bred and maintained at the Central Unit for Medical Research of the University of Valencia (UCIM), under controlled conditions of constant temperature (22°C), 12-hour light/dark cycles, 60% humidity, and ad libitum access to food and water.

The study aimed to determine the optimal sacrifice time in the murine model of acute myocardial infarction and involved SAMR1 mice (n = 36) and SAMP8 mice (n = 36). For the transcriptomic profiling study using microRNA sequencing (microRNAseq), SAMR1 mice (n = 24) and SAMP8 mice (n = 24) were used. The mice in

both studies were divided into the following experimental groups:

- Surgery controls (sham): Control group subjected to the same surgical procedure as the others, but without coronary artery ligation.
- Acute myocardial infarction (AMI): Experimental group undergoing coronary artery occlusion.

Before the surgical procedure, intraperitoneal analgesics, meloxicam (0.3 mg/kg), and buprenorphine (0.1 mg/kg) were administered for pain management. Subsequently, mice were anesthetized by inhaling 5% isoflurane (Abbot Laboratories, Chicago, IL, USA) at the minimum alveolar concentration (MAC) in a medical-grade air and 100% oxygen mixture within an anaesthesia chamber.

For the surgery, a less invasive method of endotracheal intubation was used, employing overhead illumination of the oropharynx without incisions, ensuring a safer and less traumatic experience for the animals. Mice were placed on a surgical table and connected to a rodent ventilator (Minivent type 845, Panlab Harvard Apparatus, Barcelona, Spain) adjusted to a tidal volume of 200 μ L and a frequency of 110 breaths per minute, supplemented with 100% oxygen and 2% isoflurane (MAC for maintenance) at a flow rate of 0.2 L/min.

After confirming the depth of anesthesia by the loss of paw reflexes, AMI was induced by accessing the heart through a left thoracotomy between the fourth and fifth intercostal spaces. Following the pericardium incision, a permanent ligature of the left anterior descending coronary artery (LAD) was performed using microsurgical forceps and non-absorbable monofilament suture (Monosyn 6/0 Braun). The occlusion point was approximately 1-2 mm from the apex of the left atrium in its normal position. In the sham surgery control group, the needle was passed around the artery without ligation.

After ligation, the mouse's chest was closed in layers using absorbable monofilament sutures (Monosyn 5/0 Braun), closing the intercostal space, subcutaneous tissue, and skin. The mice were placed in a clean recovery cage under a heat lamp to regain consciousness. AMI was visually confirmed by immediate discoloration of the left ventricle due to blood flow interruption and ST segment elevation on the electrocardiogram (ECG) recorded with a BIOPAC MP36 (BIOPAC Systems Inc, Santa Barbara, USA).

The mice were sacrificed at the designated time after surgery according to the study, using 5% vaporized isoflurane, and blood samples were collected. Blood samples were obtained from the vena cava using a 1 ml

syringe and a 25 G needle in a sterile 1.5 ml Eppendorf tube. After resting at room temperature for 30 minutes, the samples were centrifuged at 1500 g for 15 minutes at 4°C to obtain serum, which was transferred to RNase/DNase-free tubes.

To exclude hemolyzed blood samples unsuitable for nucleic acid studies, a hemolysis control was performed using spectrophotometry. The absorbance of 1 µl of serum at a wavelength of 414 nm was measured using the NanoDrop One (ThermoScientific, Rockford, IL, USA), and a threshold of 0.5 absorbance units (UA) was established, above which the sample was discarded for further use. Non-hemolyzed samples were stored at -80°C until use.

The hearts were isolated in a Petri dish containing physiological saline solution (0.9% NaCl) at 4°C. They were carefully cleaned of fat and adhesions using microdissection scissors under a cold light stereomicroscope, LEICA S9E (Leica Microsystems). Hearts intended for histological staining with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) to evaluate tissue viability and infarct size were cut into 1 mm sections using a scalpel blade. Each section was incubated in 1% TTC-PBS solution at pH 7.4 at room temperature for 20

minutes and then fixed in 10% buffered formalin for 18 hours at 2-8°C.

Total RNA was isolated from serum using the miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Two hundred microliters of serum were mixed with 700 µl of lysis reagent, followed by the addition of chloroform, ethanol, and wash buffer. The RNA bound to the spin column membrane was eluted with RNase-free water. The total RNA quantity and purity were measured using the NanoDrop One (ThermoScientific, Rockford, IL, USA). RNA samples were stored at -80°C until further use in subsequent assays.

The individual expression of miRNAs was determined by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) using the TaqMan miRNA Assay system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), which amplifies, detects, and quantifies specific sequences through fluorescence released after quencher hydrolysis, allowing quantification of the luminescent signal.

Before PCR, reverse transcription (RT) of RNA to complementary DNA (cDNA) was performed using the TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) following the manufacturer's instructions. RT was carried out using

200 ng of RNA in a 20 μ L reaction volume and performed in a thermocycler (MasterCycler 5891T13, Eppendorf) programmed with optimal temperature conditions. Samples were stored at 4°C until use.

Real-time PCR was performed using the ABI Prism 7900 HT system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with a 384-well plate support (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) connected to a computer with QuantStudio 5 software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Taqman Gene Assay probes (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) were used for each of the miRNAs of interest. The U6 snRNA was used as an endogenous control to normalize differences in RNA quantity, RNA quality, and reverse transcription efficiency in mouse samples, while miR-484 was used in patient samples.

In PCR, the threshold cycle (Ct) is the cycle at which the amplification curve exceeds the fluorescence signal threshold, serving as a relative measure of the initial concentration of miRNA in the sample. Each sample was analyzed in duplicate, and relative expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

The miRNA expression profile was determined using the NextSeq550 next-generation sequencing (NGS) platform (Illumina, San Diego, CA, USA) at the Genomics and Epigenomics Service of UCIM, where sample

processing, library preparation, and sequencing were performed. NGS technology allows the analysis of a large number of samples with high sensitivity, greater read depth than microarray hybridization technology, and the detection of novel unknown sequences.

Libraries were prepared by selecting microRNA molecules from the initial total RNA material and adding adapters with binding sites for flow cell and sequencing primers using the NEXTFLEX® Small RNA-Seq v3 Kit for Illumina Platforms (Bioo Scientific® Corporation, Texas, USA). The small RNA molecules were first ligated to adenylated 3'-4N adapters with random bases using the NEXTFLEX small RNA sequencing kit. This kit reduces ligase bias by utilizing the phosphate group of its terminal end, allowing exclusive selection of these molecules.

While YRNA fragments (88-112 nt) and tRNA may have unexplored functions as diagnostic markers, in this study, they can act as contaminants, reducing the relative number of mapping reads. Including blockers against YRNA and tRNA in the library preparation process can increase miRNA sequencing reads. Next, 5'-4N adapters were ligated, followed by reverse transcription of the molecule to cDNA. The generated cDNA fragments were amplified and indexed by PCR using barcoded primers for each sample. Library quality control and concentration

were verified using the Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer with high-sensitivity DNA chips. Subsequently, an equimolar pool of each library was prepared for sequencing.

Finally, the library pool was purified using the automated Sage Pippin Prep system to select the library size. The protocol aimed to recover final products of approximately 150 bp, representing miRNAs and siRNAs. The obtained libraries were loaded into a flow cell and placed in the sequencer. DNA fragments were amplified by binding to complementary oligos in the flow cell, a process called clustering, resulting in millions of copies of single-stranded DNA.

Illumina's sequencing-by-synthesis (SBS) technology utilized a patented reversible terminator method that detects individual bases as they are incorporated into the single-stranded DNA template. The fluorescent signal indicates the added nucleotide, and the terminator is cleaved for the next base to join. The result is highly accurate single-read sequencing of 50 cycles (1 x 50 bp), virtually eliminating context-specific errors, even within repetitive sequences and homopolymers.

The sequencing data obtained contains millions of small reads stored in FASTQ format text files. Each read

has four lines: the first starting with the "@" symbol followed by a unique identifier code, the second line containing the read nucleotide sequence, the third line repeating the read identifier with the "+" symbol, and the fourth line consisting of a series of quality index specifying the probability of each nucleotide read being incorrect. The FASTQ files were processed and subjected to bioinformatic analysis by EpiDisease S.L. (Paterna, Valencia).

Several software programs were implemented for preprocessing and quality control, including FastQC (analysis of multiple FASTQ files simultaneously), Cutadapt (removal of sequencing adapters), Subread (sequence alignment), and Multiqc (modular tool for aggregating bioinformatics analysis results across multiple samples into a single report). The miRNAs present in the samples were annotated using miRBase with the mouse genome version 38 (mm10). Normalization of the read counts per sample for each miRNA was performed using TMM6 (Trimmed Mean M-values).

For the study of differentially expressed miRNAs between experimental groups, four bioinformatics algorithms with different tests were applied: edgeR, limma, limma-voom, and DESeq2. The edgeR and

DESeq2 algorithms are commonly used for differential expression analysis after sequencing. Although there is some conceptual similarity between these methods, there are differences in data normalization that have a significant impact on the results. As different analysis methods utilizing complex statistical functions, it is expected that the obtained results will be different yet complementary.

Differential expression analysis was performed for all study groups using 1 vs. 1 comparisons. Taking into account the three variables (MI, aging, and sex), a total of 12 comparisons were analyzed. Additionally, a complex 2 vs. 2 contrast analysis was conducted, providing the opportunity to identify groups of miRNAs with opposing expression trends between the comparison groups.

After obtaining the differentially expressed miRNAs in the 1 vs. 1 and 2 vs. 2 comparisons, different graphical representation methods were used, such as principal component analysis (PCA), which describes the samples of each group based on new uncorrelated variables.

The data were also represented using Volcano Plots, scatter plots showing statistical significance (p-value) vs. magnitude of expression change (fold change). PCA were generated using R Studio and the ggplot2 package,

while Heatmaps, two-dimensional representations where the colour scale encodes the information for each miRNA, were generated using GraphPad Prism 8.0 software.

Human serum samples were obtained from patients with AMI at the Clinical Hospital of Valencia. The samples, collected between April 2014 and October 2016, were stored at -80°C. Serum samples from a group of 23 healthy subjects provided by the Biobank of Puerta de Hierro Majadahonda University Hospital (HUPHM)/Puerta de Hierro-Segovia de Arana Health Research Institute (IDIPHISA) were included as controls. Peripheral venous blood samples (10 ml) were collected from patients before percutaneous coronary intervention (PCI) and processed using BD Vacutainer SST tubes with clot activator and serum separator gel.

The serum samples were centrifuged, and the supernatant was transferred to sterile tubes. The serum was aliquoted into RNase-free Eppendorf DNA/RNA Lobind tubes and immediately frozen at -80°C.

Small extracellular vesicles (sEVs) were isolated from serum using the exoEasy kit from Qiagen. The isolation procedure involved a quick centrifugation step, and the purified sEVs were stored at 4°C until further use. The sEVs were characterized using Western blot

analysis for the identification of characteristic membrane proteins. The morphology of the sEVs was examined using a HITACHI HT7800 transmission electron microscope.

To perform functional analysis of the target genes of differentially expressed miRNAs, over-representation analysis (ORA) was conducted. ORA examines the statistical over-representation of a list of genes of interest in a reference list obtained from public databases. Gene Ontology (GO) terms and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways were analyzed. The functional enrichment analysis of differentially expressed miRNAs was carried out using the online tool miRwalk and the TargetScan database. The predicted target genes were represented using Dotblot graphs generated with R Studio and the ggplot2 package.

For individual target prediction of selected differentially expressed miRNAs, gene prediction tools including microT-CDS, TargetScan, and miRDB were used. Genes appearing in at least two databases were selected to increase prediction confidence. The conserved genes between human and mouse were used to obtain KEGG pathways using the miRwalk tool. The results were represented using ChordPlot graphs generated with R Studio and the ggplot2 package.

8.4.4. Results

The murine models of acute myocardial infarction (AMI) and aging were established in male and female SAMR1 (n = 36) and SAMP8 (n = 36) mice. The AMI group underwent left anterior descending coronary artery (LAD) ligation, while the surgery controls (Sham) underwent the same surgical procedure without artery ligation. Mice were sacrificed at different time points after surgery: 1, 4, and 24 hours. Three different sacrifice times were established to determine the optimal time after infarction to observe quantifiable differences in miRNA expression. Two time points close to the operation, 1 and 4 hours, were chosen to study acute myocardial infarction, and another time point, 24 hours, was chosen to study miRNA expression trends.

In all mice in the AMI group, myocardial ischemia was confirmed in the electrocardiogram (ECG) by observing ST segment elevation in lead II, which appeared within the first 5 minutes after coronary artery ligation. The staining with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) differentiated necrotic myocardial tissue (whitish area) from viable tissue, confirming the infarcted area (red zone). Another clear indication of occlusion was the instant paleness of the myocardium due to the cessation of blood flow in the affected area. The murine

model of AMI was generated by occlusion of the coronary artery, and the survival rate exceeded 80%. All deaths occurred during the surgical procedure and were not considered in the subsequent analyses. There were no differences in mortality rates between SAMR1 and SAMP8. Prior to surgery, the weights of mice from different groups, male and female SAMR1 and SAMP8, were recorded. In both groups of mice, SAMR1/SAMP8, there was a significant decrease ($p < 0.01$) in female mice compared to males. A significant decrease ($p < 0.05$) was also observed in male and female SAMP8 mice compared to SAMR1 mice.

One of the main challenges in the analysis of circulating miRNAs is their interference with miRNAs released by blood cells during hemolysis. The lysis of blood cells during phlebotomy or sample manipulation can result in high levels of miRNAs that do not correspond to the actual levels present in the serum. We analyzed sample hemolysis by measuring free hemoglobin at an absorbance of 414 nm (A414) using NanoDrop One. Samples were classified as hemolyzed if the A414 reading exceeded the value of 0.5 arbitrary units (A.U.). All mouse samples that exceeded this absorbance threshold were discarded for further miRNA analysis. Figure 9 shows the absorbance values of the sera from the mice used in the microRNAseq study. It is

particularly striking that all samples exceeding the established threshold were from female mice.

To assess the effect of AMI on the expression of circulating miRNAs in our murine model, we selected four miRNAs that had previously been defined as potential biomarkers of AMI in experimental rodent models or patients with acute coronary syndrome. The selection of these miRNAs was based on a review of different experimental publications, and they were miR-1-3p, miR-133-3p, miR-208-3p, and miR-499-5p. Three different sacrifice times were established (1, 4, and 24 hours) to determine the optimal time after surgery when the miRNAs showed sufficiently distinguishable expression compared to their control groups. To determine if the surgical procedure itself had an effect on miRNA expression, a preliminary study of the temporal evolution of miRNA expression in serum samples from the surgery control group (sham) in SAMR1 and SAMP8 mice was conducted at the three time points.

The expression of miR-1-3p, miR-133-3p, and miR-499-5p in SAMR1 and SAMP8 mice significantly decreased at 24 hours after sham surgery ($p < 0.05$). In the case of miR-1-3p and miR-133-3p in SAMR1 mice, their expression also significantly decreased at 4 hours ($p < 0.001$). However, the expression of miR-208-3p

showed a decreasing trend, but the changes were not significant. These results indicate that prior to the development of myocardial ischemia, the surgical procedure itself induces a change in the serum profile of some miRNAs previously described as biomarkers of AMI.

Due to the observed effect of the sham surgical procedure, the expression of miRNAs in the infarcted mouse group was compared at the three sacrifice times to analyze the effect of the infarction on miRNA expression. The respective sham groups sacrificed at the same time were normalized to 1 and represented as a dashed line. The differences in miRNA expression in the AMI mice at different sacrifice times are shown in Table 7.

In SAMR1 mice, the expression of miR-1-3p did not vary at the three analyzed times after infarction and remained consistently higher than the Sham group. In senescent SAMP8 mice, there were no differences in miR-1-3p expression compared to the Sham group at 1 hour after infarction, but it increased at 4 hours and to a lesser extent at 24 hours. The increase in expression at 4 hours compared to 1 hour was significant ($p < 0.01$), and the decrease between 4 and 24 hours was also significant ($p < 0.05$).

Regarding miR-133-3p expression in SAMR1 mice, differences were observed in the infarcted group at 24 hours compared to the Sham group, while significant changes were observed between the 1 and 4-hour groups with the 24-hour group ($p < 0.01$). In SAMP8 mice, it was observed that miR-133-3p expression started to increase at 4 hours after infarction compared to the Sham groups, with no significant changes in its temporal evolution.

Similar to miR-133-3p expression, the increase in miR-208-3p compared to the Sham groups was detected starting at 4 hours after infarction in SAMR1 mice, while the 24-hour infarcted group showed a significant increase compared to the 1-hour group ($p < 0.05$). In the case of SAMP8 mice, there was also an increase in expression after infarction compared to the Sham mice at the 4 and 24-hour groups, both showing significant changes compared to the 1-hour group ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively).

The expression of miR-499-5p predominantly increased starting at 4 hours in all groups after AMI surgery compared to the Sham groups. In SAMR1 mice, the maximum increase occurred at 24 hours after infarction, showing a significant change compared to the 1-hour group ($p < 0.05$). In SAMP8 mice, the maximum

increase also occurred at 24 hours, and this increase was significant compared to the 1-hour ($p < 0.001$) and 4-hour groups ($p < 0.01$).

Based on these results, a sacrifice time of 4 hours was established as the optimal time for sample collection and miRNA analysis, as it is the closest time to the acute phase of the infarction and when the most noticeable differences start to appear compared to the control groups, particularly in SAMP8 mice. The sacrifice time of 1 hour after surgery was discarded due to minimal changes in miRNA expression, and the 24-hour time point was excluded due to a lower quantity of circulating miRNAs.

Once the optimal time after infarction was established to study miRNA expression, we analyzed the differential expression profile of circulating miRNAs following AMI in the SAMR1/SAMP8 murine model, both males and females, 4 hours after surgery. The Illumina NextSeq550 (NGS) microRNA sequencing technology was used, as previously described in the Materials and Methods section.

Depending on the algorithm used for the analysis of differentially expressed miRNAs after sequencing (edgeR, limma, voom, or DESeq2), we obtained different results in the number of modified miRNAs in the miRNA

expression profile following AMI, with a cutoff p-value of 0.1. After analyzing the results of each algorithm, which provide complementary information without being mutually exclusive, we proceeded with DESeq2 for the sequencing analysis. This algorithm yielded the highest number of differentially expressed miRNAs per comparison, followed by edgeR.

The differential expression analysis using DESeq2 allows for a more comprehensive functional study, as it provides 93 differentially expressed miRNAs in male SAMR1 mice and 9 miRNAs in female SAMR1 mice. In SAMP8 mice, there are 13 miRNAs in males and 19 miRNAs in females. The tables of differentially expressed miRNAs obtained through the DESeq2 analysis can be found in the Appendix, along with those from the edgeR, limma, and voom analyses.

In the comparison of IAM vs. Sham groups in SAMR1 male mice, 93 differentially expressed miRNAs were identified ($p < 0.1$), with 54 significantly overexpressed and 39 underexpressed in the IAM group compared to the control group. The most overexpressed miRNAs include miR-6383, miR-6965-3p, and miR-742-3p. Notably, miR-499-5p, the eighth most upregulated miRNA in this group of mice, appears overexpressed in all four mouse groups, demonstrating its significance as

a typical biomarker of AMI. Among the most underexpressed miRNAs are miR-6939-3p, miR-1929-5p, and miR-6962-3p.

To address the functional implications of differentially expressed miRNAs in SAMR1 male mice, we utilized the online bioinformatics tool miRwalk to identify key biological processes underlying AMI. This tool provides target genes of the studied miRNAs and transforms the information into KEGG pathways and GO terms, highlighting significantly affected physiological pathways ($p < 0.5$) due to the expression changes of these miRNAs after infarction. The KEGG pathway analysis revealed processes related to MAPK and PI3-Akt signaling, which had the highest number of target genes for the miRNAs affected by AMI (a total of 70 genes). Additionally, the pathways with the highest gene target ratio compared to the total number of involved genes were the ErbB signaling pathway, resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors, and FoxO signaling pathway. When analyzing the GO terms associated with these differentially expressed miRNAs (Figure 14B), the term "Protein phosphorylation" had the highest number of involved genes (160), followed by "Phosphorylation," "Nervous system development," "Regulation of gene expression," "Negative regulation of cell proliferation," and "Positive regulation of gene expression." GO terms

with a higher ratio of involved genes compared to their pathway's total number of genes included "Biosynthesis of sphingomyelin," "JNK cascade," "Protein o-glycosylation," and "Activation of JUN kinase activity."

After the DESeq2 analysis, the SAMR1 female group exhibited 9 overexpressed miRNAs in the IAM vs. sham comparison. Notably, miR-3086 and miR-879 displayed the highest expression changes, while miR-149-5p showed the smallest significant increase with a fold change of 1.5 (log2). Similarly, miR-499-5p reappeared as overexpressed in the serum of female mice with IAM, consistent with its characterization as a previously described IAM biomarker in the Introduction section.

Functional analysis of the 9 differentially expressed miRNAs in SAMR1 females revealed two significantly associated KEGG pathways: MAPK signaling pathway (5 genes) and cancer-related pathways (9 genes). In terms of associated GO terms, 42 results were obtained. The GO term "Negative regulation of transcription" had the highest number of involved genes, followed by "Protein phosphorylation." GO terms with a higher gene ratio compared to their pathway's total genes included "Collagen catabolic process," "Intrinsic

apoptotic signaling pathway in response to endoplasmic reticulum stress," and "Cell fate commitment."

To examine sex differences in miRNA regulation in SAMR1 mice after AMI, a complex contrast study (2 vs. 2) was conducted, comparing the expression trends of miRNAs following AMI in male and female SAMR1 mice. This approach allows the study of the interaction between two variables: sex and infarction. Fourteen differentially expressed miRNAs were identified, indicating opposite expression trends in male and female SAMR1 mice after AMI. For example, miR-3086-5p decreased its expression in male mice but increased in females. A total of 9 miRNAs followed this same trend, while 5 miRNAs increased their expression in male IAM mice and decreased in females after AMI. Regarding the functional analysis, the KEGG pathways with the highest number of implicated genes were related to axon guidance, cAMP signaling pathway, Ras signaling pathway, Rap1 signaling pathway, and MAPK signaling pathway. The pathway with the highest gene ratio compared to its total was "Regulation of longevity". The GO terms with the most target genes were "Positive regulation of transcription," followed by "Angiogenesis" and "Phosphorylation of peptidyl-serine." The term "Calcium-dependent vesicle fusion in synaptic transmission" had the highest gene ratio.

Regarding the SAMP8 mouse group data, the DESeq2 analysis revealed a similar number of differentially expressed miRNAs in males and females, 13 and 19, respectively. Among the changed miRNAs, 10 were downregulated, while 3 miRNAs were upregulated in the IAM group. The most underexpressed miRNAs included miR-99a-3p, miR-12187-5p, and miR-6715-3p, while the most overexpressed were miR-9768-5p, miR-499-5p, and miR-30e-3p. Functional analysis using the miRwalk tool for KEGG pathways yielded no significant results for the 13 differentially expressed miRNAs in male SAMP8 mice. However, the obtained GO terms pointed to the regulation of transcription as the only significant result ($p < 0.05$). This limited outcome may be attributed to the small number of miRNAs analyzed using this tool.

For female SAMP8 mice, the DESeq2 analysis revealed 19 differentially expressed miRNAs, with 5 underexpressed and 14 overexpressed in the IAM vs. sham group. The most significantly decreased miRNA was miR-134-3p, followed by members of the miR-200 family (miR-200c-3p and miR-200b-3p) and let-7 family (let-7c-5p and let-7b-5p). The most increased miRNAs were miR-7660-3p, miR-342-5p, miR-7021-5p, and miR-9-3p. Functional analysis of these miRNAs revealed KEGG pathways related to MAPK signaling with 24 associated genes, followed by MicroRNAs in cancer and

PI3-Akt signaling pathway. The pathways with the highest gene ratio compared to their total number of genes were Regulation of longevity and Resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. Regarding the GO terms, the terms Positive regulation and Negative regulation of transcription, as well as Positive regulation of gene expression, had the highest number of target genes (50 and 40, respectively), followed by Nervous system development. The terms Ceramide transport, Exocytic neurotransmitter insertion, and Activin signaling pathway had the highest gene ratio of target genes to total genes.

To analyze sex differences in the results obtained from SAMP8 mice, a 2vs2 study comparing male and female mice was conducted. Thirty differentially expressed miRNAs were identified. Among them, 6 miRNAs increased their expression in male mice after IAM but decreased in females. This group included miR-30e-3p, which significantly increased in male SAMP8 IAM vs. sham comparison but remained unaltered in female SAMP8 mice. On the other hand, 24 miRNAs decreased their expression in male mice with IAM but increased in females after infarction. Functional analysis of these miRNAs revealed KEGG pathways related to Cancer, Axon guidance, and Neurotrophin signaling with the highest number of target genes. Long-term

depression, Gap junctions, and Regulation of longevity were the pathways with the highest gene ratio of target genes to total genes. The GO terms with the most target genes included Positive regulation and Negative regulation of transcription, followed by Positive regulation of gene expression, Negative regulation of cell proliferation, and Nervous system development. The terms mRNA destabilization, Neurotransmitter receptor localization, and mRNA splicing regulation had the highest gene ratio of target genes to total genes.

Once the miRNA expression profiles in all study groups were determined, we proceeded to validate those miRNAs that could be related to the acute phase of myocardial infarction in the SAMR1/SAMP8 murine model. We selected a group of miRNAs whose expression was significantly altered in the AMI group compared to the sham control group. The chosen miRNAs were those consistently identified in most analyses (DESeq2, edgeR, limma, and voom), which included 3 overexpressed miRNAs (miR-30e-3p, miR-148a-3p, and miR-149-5p) and 1 underexpressed miRNA (miR-423-5p) in the IAM group. After validating the isolation of small extracellular vesicles (EVs), we analyzed the expression of these miRNAs in serum samples from SAMR1/SAMP8 mice, as well as in samples from patients with IAM and control individuals.

To facilitate result visualization and comparison between sequencing (DESeq2) and qRT-PCR, we applied the exponentiation of $\log_2$ (fold change) formula to represent the differential expression of the miRNAs. The sequencing data from sham mice had a value of 1, similar to the normalized qRT-PCR values of sham mice using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.

For miR-30e-3p, both sequencing and qRT-PCR analyses showed similar expression patterns in female SAMR1 mice, but no significant changes were observed. In male SAMR1 mice, sequencing detected a significant 6-fold increase in miR-30e-3p expression in the AMI group, while qRT-PCR did not show any changes. Conversely, in female SAMP8 mice, sequencing did not reveal any changes, but qRT-PCR showed a significant increase in miR-30e-3p expression in the IAM group.

For miR-148a-3p, sequencing data indicated a significant increase in expression in male SAMR1 mice with infarction, while no changes were observed in female SAMR1 mice. However, qRT-PCR analysis showed the opposite result, with a significant increase in expression in male SAMR1 mice but no changes in female SAMR1 mice. In male and female SAMP8 mice, no significant changes were observed in either sequencing or qRT-PCR, although there was a slight

trend towards increased expression in female SAMP8 mice using qRT-PCR.

Sequencing data for miR-149-5p showed a significant increase in expression in female SAMR1 mice, but no significant changes were observed in the other groups. qRT-PCR analysis also indicated a non-significant increase in expression in female SAMR1 mice and a significant increase in female SAMP8 mice. However, no further significant changes were detected for the remaining groups.

For miR-423-5p, sequencing analysis showed a significant decrease in expression in male SAMR1 mice using the edgeR method, but this statistical significance disappeared in the DESeq2 analysis. qRT-PCR confirmed a decrease in miR-423-5p expression in male SAMR1 mice with infarction. No significant changes were observed in the expression of miR-423-5p in the other mouse groups, suggesting a potential association between this miRNA's expression and the non-senescent male mouse.

To investigate the translational potential of these miRNAs, we examined their sequence conservation with the human species. We confirmed the complete conservation of the mature sequences of the 4 studied miRNAs between mice and humans. This high sequence

conservation allowed us to determine their expression in serum samples from patients with IAM.

First, the measurement of miRNAs miR-30e-3p, miR-148a-3p, miR-149-5p, and miR-423-5p was performed in samples from IAM patients and healthy controls. Since most of them were undetectable ($Ct > 35$) in total serum, their expression was checked in the content of EVs isolated from serum. The study population consisted of 8 IAM patients from the Clinical University Hospital of Valencia and 8 healthy control samples obtained from the Puerta de Hierro Majadahonda University Hospital Biobank (HUPHM)/Puerta de Hierro-Segovia de Arana Health Research Institute (IDIPHISA).

The mean age of the control group was 62.23 ± 0.83 , and that of the infarction group was 64.93 ± 3.32 years. Both groups had an equal number of male and female samples (50% each). None of the control subjects had any cardiovascular risk factors. In the AMI group, the following cardiovascular risk factors were present: diabetes, hypertension, hypercholesterolemia, smoking, and overweight (considered obesity with a body mass index (BMI) > 30) ($n = 3$).

After isolating EVs from serum samples of AMI patients and healthy controls, the presence of typical membrane proteins of small extracellular vesicles was

confirmed through immunodetection of flotillin, Tsg101, and Alix, while the absence of β -actin, a typical membrane protein of large extracellular vesicles, was observed. The integrity and morphology of the vesicles were determined by transmission electron microscopy, confirming the presence of these vesicles and the preservation of their structure. Once characterized and the morphology of EVs isolated from serum of control individuals and AMI patients confirmed, the expression of miR-30e-3p, miR-148a-3p, miR-149-5p, and miR-423-5p was analyzed by qRT-PCR. Except for miR-423-5p, the rest of the miRNAs showed virtually undetectable relative expression in total serum, as their Ct values in qRT-PCR exceeded 35 cycles. Therefore, for miR-30e-3p, miR-148a-3p, and miR-423-5p, their relative expression in IAM patients and healthy controls is presented only in the content of EVs.

While the results of miR-30e-3p in sequencing and qRT-PCR in serum from IAM mice showed an increase in its expression, no changes were detected in the EVs of AMI patients, both in the total population ($n = 8$) and in the analysis of EV content in men and women separately.

Regarding miR-148a-5p, the significant increase observed in sequencing in AMI mice was not reproduced

significantly by qRT-PCR. However, a significant increase in its expression ($p < 0.01$) was observed in EV samples from AMI patients, mainly due to the contribution of increased miR-148a-5p in women with IAM ($p < 0.01$).

Sequencing analysis detected overexpression of miR-149-5p in the serum of AMI mice, which was subsequently validated by qRT-PCR. An increase in circulating miR-149-5p levels was also observed in EVs isolated from serum samples of AMI patients and healthy controls, although it was not significant. When studying the effect of infarction on the levels of this miRNA by separating the groups by sex, the trend was observed mainly in women with IAM.

The behaviour of miR-423 in the serum of AMI mice was consistent with sequencing results and qRT-PCR validation, confirming a significant decrease after AMI in male SAMR1 mice. In humans, the observed results for miR-423-5p levels in serum indicate a clear decrease after IAM in both the total serum fraction ($p < 0.001$) and the content of EVs isolated from these samples ($p < 0.01$). When separating the samples by patient sex, a decrease in miR-423-5p levels after the infarction was observed in all cases, with statistical significance in the free serum fraction of women with AMI ($p < 0.01$).

Once the expression of miR-30e-3p, miR-148a-3p, miR-149-5p, and miR-423-5p in samples from AMI patients was studied, their target genes and relevant KEGG pathways were analyzed using microT-CDS, TargetScan, and miRDB prediction tools. Target genes that appeared in at least 2 databases and were conserved in both humans and mice were selected through the miRwalk online platform, obtaining the KEGG pathways they were associated with. The results were represented in chord plots, depicting the target genes of the miRNAs and their relationship with the corresponding pathways. The selection of pathways for visualization was based on their statistical significance, choosing the most significant ones.

For miR-30e-3p, 429 predicted target genes were obtained in the search for hsa-miR-30e-3p, and 431 genes for mmu-miR-30e-3p. Among these results, 89 target genes overlapped between the two species, forming the basis for the miR-30e-3p chord plot. This plot displayed the 4 most significantly associated pathways with miR-30e-3p target genes: FoxO signaling pathway, sphingolipid signaling pathway, autophagy, and PI3K-Akt signaling pathway. Other pathways related to cancer pathology and human papillomavirus infection were also associated with these genes but not shown in the plot.

Functional enrichment analysis for miR-148a-3p was performed using the 351 target genes that overlapped between human (685) and mouse (519) miRNA search results. The chord plot for miR-148a-3p represented the 5 most significant pathways out of a total of 61 pathways associated with its target genes. The FoxO signaling pathway and PI3K-Akt signaling pathway appeared again, along with ErbB signaling pathway, TGF-beta signaling pathway, and regulation of actin cytoskeleton pathway.

Similarly, target genes for hsa-miR-149-5p (523) and mmu-miR-149-5p (360) were studied, and the overlapping genes between the two species (156 genes) were used to obtain associated pathways. Ten KEGG pathways were associated with miR-149-5p target genes, and the chord plot displayed the 5 most significant ones: calcium signaling pathway, cAMP signaling pathway, focal adhesion, PI3K-Akt signaling pathway, and MAPK signaling pathway. The remaining pathways not shown were related to cancer, Cushing syndrome, pancreatic secretion, Rap1 signaling pathway, and regulation of actin cytoskeleton.

Lastly, a total of 437 predicted genes were obtained for hsa-miR-423-5p, while for mmu-miR-423-5p, there were 253 genes, with 89 genes overlapping

between them. Functional analysis of these genes resulted in three associated pathways: RAS signaling pathway, MAPK signaling pathway, and PI3K-Akt signaling pathway.

8.4.5. Discussion

Cardiovascular diseases are one of the most serious health problems worldwide, causing nearly 18 million deaths annually, with 4 out of 5 attributed to myocardial infarction (MI) (WHO, 2023). To understand the molecular mechanisms involved in cardiovascular diseases, the use of animal models is a necessary step. Animal models allow for the comprehension of underlying pathophysiology and the progression of the disease leading to acute myocardial infarction (MI), as well as the exploration of new strategies in diagnosis, prevention, and treatment, with subsequent translation to clinical studies.

One of the main objectives of this study was to establish an experimental model of MI. However, creating a representative MI model that mimics human cardiac conditions is challenging. MI in patients develops as a result of the interaction of multiple causes over time, often complicated by comorbidities and prior pharmacological treatments. Various health conditions such as epilepsy, smoking, alcoholism, cancer, diabetes, and rheumatoid arthritis significantly affect MI mortality. Incidence rates are also influenced by age and sex, with higher rates in older individuals and men compared to women. The role of sex and its influence on

cardiovascular diseases has been extensively reviewed by Beale et al., highlighting sex differences in cardiac structure and function, cardiac and pulmonary circulation, and other factors explaining disparities between men and women. Studying sex differences in MI remains relevant, as there are considerable variations in vascular aging, immune system, and cardiac metabolism.

Current animal models used in laboratory settings tend to be relatively homogeneous, young, and healthy, lacking genetic predispositions or underlying medical conditions. As a result, animal studies often fail to reflect the heterogeneity observed in MI patients. Large animal models used for this purpose include pigs, sheep, and rabbits, which possess similar coronary anatomy and physiology to humans. Pigs have minimal collateral circulation and a right coronary vasculature similar to humans, with comparable metabolic activity utilizing non-esterified fatty acids for energy production. Therefore, pig models are widely used to understand genetic and cardiovascular diseases in humans.

Sheep myocardium shares many similarities with humans, such as the predominant isoform of slow β -myosin heavy chain (β -MHC). Various pathologies, including myocardial infarction and gradual heart failure induced by aortic constriction, have been developed in

sheep models. However, both pig and sheep models have drawbacks in terms of production cost and maintenance. In rabbits, cardiac anatomy, coronary branches, coronary artery path, and collateral coronary circulation are similar to humans. However, atherosclerotic plaques primarily form in the thoracic aorta and coronary lesions occur mainly in small arteries, whereas in humans, they predominantly occur in large branches of the coronary arteries.

Rodent experimental models are extensively used in myocardial infarction studies due to their practical benefits, such as small body size, easy pre- and post-surgery care, low cost, shorter generation time, and well-defined genetics. However, small animals have some disadvantages, including fundamentally different cardiac anatomy and kinetics compared to humans. For example, the resting heart rate of mice is five times higher than that of humans, and their small size can hinder organ handling.

In terms of surgical techniques, the most commonly used method for inducing myocardial infarction is through left anterior descending coronary artery (LAD) ligation. This surgical technique was first introduced in 1954 by Johns and Olson et al. and has since been widely utilized in both large and small animals

with minor modifications. In the present study, we performed this surgical technique and assessed its success at different time points. Our results demonstrate that myocardial infarction (MI) in SAMR1/SAMP8 mice using LAD ligation allows for the establishment of a murine model of MI. The occlusion was confirmed by immediate observation of paleness in the anterior wall of the left ventricle after blood supply cessation and ST segment elevation in the electrocardiogram. Histological staining with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride further confirmed myocardial necrosis by whitish coloration. This method offers advantages such as higher survival rate, uniform infarct size, and shorter surgery duration, but requires specialized personnel for the surgery.

In addition to the species and surgical technique, other factors that play a role in cardiac pathophysiology should be considered, such as aging, structural and functional alterations, and cardiovascular risk factors. Previous studies suggest that aging induces changes in cardiac architecture and function, as well as inflammation, oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, apoptosis signaling, and mitochondrial dysfunction. However, few models address the relevance of aging in myocardial infarction, despite the increasing lifespan and aging population. The use of aged mice (more than two years) to study the effects of aging poses

challenges due to the high cost and space required for long-term maintenance. The senescence-accelerated mouse (SAM) model has been widely employed to investigate age-related diseases, including Alzheimer's. SAM mice have been used to analyze vascular aging and the role of nitric oxide and other endothelial mediators. Aged SAMP8 mice exhibit increased oxidative stress, mitochondrial dysfunction, endoplasmic reticulum stress, inflammatory gene expression, and HMGB1-TLR2/TLR4 signaling pathways, leading to cardiac remodeling. The SAMP8 mouse model is valuable for studying the relationship between aging, cardiovascular homeostasis alterations, and adverse cardiac remodelling. It allows for a comparison between young and aged mice at 6 months, highlighting clear differences in vasculature due to aging. The SAMR1/SAMP8 mice provide a suitable model to study the effects of aging and sex differences in MI.

Non-coding RNA studies have been conducted in the SAMR1/SAMP8 mouse model, particularly in Alzheimer's research, exploring their potential as biomarkers and therapies. Based on previous studies and the established surgical technique in this experimental model, we aimed to investigate the transcriptomic profile of circulating miRNAs after acute myocardial infarction.

One of the main objectives of this work is to use the murine experimental myocardial infarction model to determine the presence of miRNAs as potential biomarkers for AMI. Although serum troponin is currently used as a diagnostic marker for myocardial infarction, its release time often leads to low sensitivity. Circulating miRNAs have been studied as potential biomarkers for myocardial infarction due to their stability and specificity. Numerous studies have shown that miRNAs are released from the heart into circulation after myocardial injury, and their expression is elevated and dynamic during this time.

In the SAMR1/SAMP8 mouse model of AMI, we examined the expression of previously established miRNAs as biomarkers in numerous murine models and in a large number of AMI patient samples. Four circulating miRNAs, miR-1-3p, miR-133-3p, miR-208-3p, and miR-499-5p, which are also abundant in the heart, were found to increase in AMI patients. We studied the expression of these miRNAs in the serum of mice subjected to AMI to determine if their profile was comparable to that observed in humans.

After AMI, there was a general increase in the four studied miRNAs in the serum of SAMR1/SAMP8 mice compared to their control groups, consistent with previous findings in humans and other murine models.

The expression of miR-1-3p and miR-133-3p increased in most AMI groups by 5 to 10 times compared to the control group. However, the increase was considerably greater for miR-208-3p and miR-499-5p, reaching expression values up to 40 times higher than the control group. The increase in these four miRNAs after AMI has been described in numerous studies. For example, Wang et al. measured circulating miRNA levels in AMI patients and healthy subjects, observing a significant upregulation of miR-1, miR-133, and miR-499 in the circulation of AMI patients. Other small-scale studies have also confirmed the association of these four miRNAs with AMI in cultured cardiomyocytes and patients.

In another study, Oerlemans et al. determined the potential value of circulating miRNAs, including miR-1, miR-21, miR-146a, miR-208a, and miR-499, in a cohort of 332 AMI patients. They found that the combination of miR-1, miR-21, and miR-499 could have a higher diagnostic value than cardiac troponin T (cTnT). Additionally, miR-208b and miR-499 showed higher expression levels in AMI patients compared to those without infarction in a study with 424 patients, correlating well with cardiac troponins. Based on these findings, the measurement of these circulating miRNAs was performed in the SAMR1/SAMP8 murine infarction model to validate the increased expression of these miRNAs

after AMI. Samples were collected at three different time points, 1, 4, and 24 hours after surgery, to establish an optimal time for sample collection that detects changes in miRNA expression while remaining in the acute phase of infarction.

In this study, the levels of these circulating miRNAs showed a descending expression in the sham group as hours passed after surgery. This can be clearly seen in the SAMR1/SAMP8 mouse groups, where there is a drastic decrease in expression at 24 hours compared to the mice sacrificed at 1 hour. Although the exact cause is difficult to determine, our hypothesis is that there is an acute release from the infarcted myocardium. The analysis of miR-1-3p, miR-133-3p, miR-208-3p, and miR-499-5p in the serum of SAMR1/SAMP8 mice after AMI surgery, compared to their sham controls, revealed an increase in their expression in most groups at 4 hours, with a linear increase in the case of miR-208 and miR-499. This is consistent with a study by Cheng et al., who measured circulating expression of miR-1, miR-133, miR-208, and miR-499 in mouse plasma and observed an increase at 6 hours after AMI. Another study found increased levels of these four miRNAs in rat plasma within the range of 3 to 6 hours after AMI. These results also align with other published studies in AMI patients within the <12-hour sample collection range.

The aforementioned studies demonstrate the increased expression of these specific myocardial and skeletal muscle miRNAs in circulation after infarction, resulting from the damage and regeneration of necrotic tissue in the heart. Their secretion is associated with antiapoptotic, antifibrotic, and antioxidant effects, essential signals for inducing repair of damaged cardiac tissue. These signals are characteristic of the acute phase of infarction and decrease over time after peaking between 4 and 6 hours. In summary, the increased expression of typical infarction biomarker miRNAs in the serum and the successful generation of myocardial infarction in SAMR1/SAMP8 mice validate this new model for studying miRNAs in the context of AMI and senescence.

One of the aims of this study was to analyze the miRNA expression profile in the SAMR1/SAMP8 murine senescence model after myocardial infarction through initial sequencing analysis to identify new miRNAs involved in the acute phase of MI.

Next-generation sequencing technology is widely used to discover new miRNAs associated with various pathologies and is preferred for the discovery of novel RNA sequences. It allows for simultaneous detection of isomiRs (miRNAs with sequence variations)

and other small RNA species. Microarrays have also been commonly used for miRNA research but have limitations in absolute quantification, identification of new miRNAs, and differentiation between canonical miRNAs and isomiRs. Additionally, microarrays require large amounts of RNA, which is a limiting factor for mouse serum samples.

In this study, sequencing results varied depending on the algorithm used for differential miRNA expression analysis. DESeq2 yielded the highest number of miRNAs, while edgeR, limma, and voom detected a lower but complementary number of miRNAs.

Following the differential expression analysis in SAMR1/SAMP8 mice groups, an enrichment analysis was conducted to study the underlying biological processes and affected physiological pathways. The KEGG pathways and Gene Ontology (GO) terms were obtained using the miRwalk online tool. Interestingly, the MAPK signaling pathway was significantly affected by differentially expressed miRNAs in all three mouse groups, SAMR1 males and females, and SAMP8 females. MAPKs play a crucial role in converting extracellular stimuli into a wide range of cellular responses, including proliferation, migration, differentiation, apoptosis, and cardiac remodelling after

AMI. The PI3-Akt signaling pathway was also directly linked to differentially expressed miRNAs in SAMR1 males and SAMP8 females after AMI. This pathway regulates the growth and survival of cardiomyocytes, reducing negative effects such as hypertrophy, necrosis, fibrosis, and inflammation in the myocardium following AMI.

Furthermore, differentially expressed miRNAs in SAMR1 and SAMP8 female mice were associated with cancer-related biological pathways. There is clear evidence of a high risk of developing MI in cancer patients, particularly within the first six months of cancer diagnosis. The similarities in cellular processes between cancer and MI, including hypoxia, inflammatory cytokine release, and expression of angiogenic factors, contribute to the development of tumor growth in cancer and myocardial necrosis and subsequent cardiac regeneration in MI. The EGFR inhibitor resistance pathway was also related to differentially expressed miRNAs in SAMR1 mice and SAMP8 females. Tyrosine kinase inhibitors are widely used in cancer treatment but have been reported to have cardiotoxic effects and influence cardiovascular calcification. Mutations in EGFR are present in over 80% of non-small cell lung cancers, and there is emerging evidence of their association with cardiovascular health.

In conclusion, this study identified new miRNAs and revealed their involvement in critical signaling pathways and biological processes related to MI and cancer. These findings contribute to the understanding of the molecular mechanisms underlying these pathologies and may lead to the development of novel therapeutic strategies for cardiac regeneration and treatment of MI and cancer.

In SAMR1 male mice, two pathways directly related to differentially expressed miRNAs were identified: the ErbB protein family signaling pathway and the FoxO signaling pathway. The relationship between the ErbB signaling pathway and myocardial infarction (MI) has been extensively studied. In vitro and in vivo studies with mice have demonstrated its association with fibrosis regulation following MI, as well as inflammatory processes, apoptosis, and senescence of cardiac fibroblasts. Similarly, the FoxO signaling pathway has been explored in relation to cardiovascular diseases in numerous reviews and research articles. For example, in an in vitro study, FoxO3a was found to promote mitophagy and suppress cardiac hypertrophy. Another investigation revealed that FoxO4 activates the transcription of Arg1, leading to decreased nitric oxide and increased neutrophil infiltration in response to myocardial infarction.

In SAMP8 female mice, the longevity regulation pathway is also noteworthy, as its alteration by the changed miRNAs after MI in these mice supports the effect of senescence on the modified miRNA expression profile. Regarding the Gene Ontology (GO) terms obtained in these comparisons, positive and negative regulation of transcription and gene expression regulation stand out, as they are directly involved in the role of miRNAs as effectors of transcriptional alterations.

The functional enrichment analysis of differentially expressed miRNAs in the sequencing also considered those that changed in opposite directions between males and females after MI. This comparison, referred to as a complex contrast study, resulted in different KEGG pathways and GO terms, including the MAPK signaling pathway, cAMP signaling pathway, Ras and Rap1 signaling pathways, axon guidance, and longevity regulation. Some of the GO terms associated with these miRNAs were positive transcriptional regulation, angiogenesis, peptidyl-serine phosphorylation, and calcium-dependent activation of synaptic vesicle fusion.

Interestingly, the miRNAs affected in opposite directions in male and female SAMR1 mice after MI are directly related to the MAPK signaling pathway, which

has already been discussed in relation to MI. They are also associated with the cAMP signaling pathway, which restores the vascular endothelial barrier function, preventing the release of proinflammatory cytokines. In a study with a porcine model of carotid artery injury, increased cAMP concentrations induced early reendothelialization of the injured segments and reduced fibromuscular proliferation.

The relationship between the Ras signaling pathway and MI has recently been reviewed, explaining the role of RhoA in the regulation of cardiac regeneration, fibrosis, hypertrophy, cell proliferation, and apoptosis after MI, highlighting its potential as a new therapeutic strategy. Additionally, a recent research article proposes the involvement of the Rap1 signaling pathway in regulating injury after ischemia/reperfusion through Vitexin, a flavonoid compound. The study suggests that Rap1 signaling contributes to reducing infarct size, cardiomyocyte apoptosis, and reactive oxygen species production. Similar results were obtained in another study with rats, confirming the involvement of the Rap1 signaling pathway in the pathogenesis of ischemia/reperfusion after MI.

Axon guidance is directly related to the miRNAs altered in opposite directions after MI in SAMR1 and

SAMP8 mice. This process refers to the development of axons by neurons to establish connections with other cells in the nervous system. Netrin-1, a regulator of angiogenesis in response to ischemia, plays a cardioprotective role after MI.

The complex contrast analysis in SAMP8 mice also indicated the affected axon guidance pathway, as well as pathways related to cancer, neurotrophin signaling, long-term depression, GAP junctions, and longevity regulation. Regarding GO terms, positive and negative regulation of transcription, positive regulation of gene expression, mRNA destabilization and splicing were notable, all linked to the regulatory function of miRNA transcription. These complex contrast studies reveal the significant role of sex differences in cardiovascular events such as MI. Males and females are subject to distinct biological regulation, highlighting the importance of investigating sex differences in the context of MI.

Once the expression profile of miRNAs was analyzed through sequencing, the expression of four miRNAs potentially related to the acute phase of myocardial infarction in the SAMR1/SAMP8 murine model, as well as sex and aging, was studied using qRT-PCR. The selection of these miRNAs focused on those

consistently identified in most analyses (DESeq2, edgeR, limma, and voom), identifying three overexpressed miRNAs (miR-30e-3p, miR-148a-3p, and miR-149-5p) in the AMI group compared to the sham group. Additionally, an underexpressed miRNA (miR-423-5p) was chosen, which showed significant change only through edgeR analysis.

Next-generation sequencing technology is widely used for discovering new sequences, but due to the higher sensitivity of qRT-PCR, it is necessary to individually validate the expression of differentially expressed miRNAs after sequencing analysis.

The homology of the miRNAs under study with their human counterparts was also confirmed, allowing for the measurement of miRNAs in serum samples from AMI patients and in small extracellular vesicles (EVs), as well as comparing their expression through sequencing and qRT-PCR in a new cohort of mice. As previously mentioned, miRNAs are transported associated with proteins or enclosed within EVs, which can originate from different cell types and target different cell types as autocrine and paracrine signaling. Villarroya-Beltri et al. (2013) demonstrated the mechanism that determines selective packaging of certain miRNAs in EVs, involving small RNA sequences present in specific miRNAs.

Based on our sequencing results, miR-30e-3p showed a significant increase in SAMP8 mouse serum, indicating a potential involvement of sex and senescence in its expression. qRT-PCR analysis also confirmed the participation of sex and senescence, but with a reversed trend, as increased expression was observed in SAMP8 female mice. Discrepancies between sequencing results and individual miRNA expression measured by qRT-PCR have been the subject of numerous studies and reviews. One investigation found that 15-20% of the genes obtained in an analysis were non-concordant, meaning they did not match between the two methods. Therefore, when studying genes with low expression, such as circulating miRNAs, it is recommended to validate the results using qRT-PCR. Additionally, qRT-PCR is highly specific, sensitive, and reproducible, making it the preferred technique for individual miRNA studies.

However, in the case of samples from MI patients, only miR-30e-3p was detectable in the EV fraction, where no changes were observed, as its Ct values exceeded 35 cycles in the total serum fraction. Other studies have also confirmed its transport through EVs, demonstrating its value as a mediator of intercellular communication. The relationship between miR-30e-3p, sex differences, aging, and MI has not been investigated to date. However, our study found a

connection with these two variables, as miR-30e-3p was overexpressed in the serum of male SAMP8 mice following MI, while no changes were observed in females, similar to SAMR1 mice. The miR-30e-3p belongs to the miR-30 family, which includes miR-30a, miR-30b, miR-30c, miR-30d, and miR-30e. They are abundantly expressed in the heart and involved in the pathophysiology of various cardiovascular diseases, including myocardial hypertrophy, myocardial infarction, heart failure, and ischemia/reperfusion injury. Direct association between miR-30e-3p and myocardial infarction has been poorly studied. One investigation in male rats detected decreased levels of miR-30e-3p in the left ventricle after MI, while another study in mice and rats with MI observed increased expression of the miR-30 family in the myocardium following MI.

In humans, circulating miR-30e-5p has been studied after MI, and elevated levels of miR-30e-5p were detected upon admission in patients who developed heart failure and left ventricular dysfunction within the following six months. Although our study focused on miR-30e-3p, the similarities in results support the possibility that miR-30e plays an important role in post-MI conditions through its overexpression. The miR-30 family also plays a significant role in inhibiting cardiac ischemic injury and mediates angiotensin II-induced myocardial

hypertrophy. Specifically, miR-30a transported by EVs can enhance autophagy in cardiomyocytes exposed to hypoxia, while reduced miR-30e expression may inhibit apoptosis to protect the heart from myocardial ischemia/reperfusion injury.

However, other studies have demonstrated that overexpression of miR-30a inhibits autophagy to alleviate hypoxia/reoxygenation injury in cardiomyocytes. Moreover, overexpression of miR-30e-5p decreases hypoxia-induced apoptosis, protecting cardiomyocytes, while another study showed that overexpression of miR-30e-3p could promote autophagy and inhibit apoptosis in cardiomyocytes exposed to intermittent hypoxia. These findings suggest that the role of miR-30 family members in protecting cardiomyocytes varies depending on different physiological conditions. Additionally, functional enrichment analysis of miR-30e-3p identified pathways directly associated with this miRNA, including Autophagy through target genes RAB39B and SH3GLB1. RAB39B is an oncogenic RAS family gene that encodes a Rab family protein involved in vesicle trafficking and directly related to autophagy. SH3GLB1 gene encodes the endophilin-B1 protein, belonging to the Bin/Amphiphysin/Rvs167 protein family, which plays a crucial role in mitochondrial fission and fusion, as well as autophagy and apoptosis. Other pathways resulting from

the functional enrichment analysis of miR-30e-3p include the FoxO signaling pathway, sphingolipid signaling pathway, and PI3-Akt signaling pathway, all of which are important in the pathology of MI.

The increased expression of miR-148a-3p observed in the serum of male SAMR1 mice after MI was not reproduced in the RT-qPCR analysis. Again, there was low concordance between the two analysis methods, sequencing and qRT-PCR, but without devaluing either, it reinforces the strategy of finding new sequences through massive sequencing methods followed by individual validation. However, in the serum of MI patients, an increase in miR-148a-3p expression was observed in the female group. Similar to the previous miRNA, its presence was only detected in the fraction transported by EVs. In the literature, its transport through small EVs has also been studied in various research articles. In a murine model of hepatic fibrosis, miR-148a-3p was identified in EVs released by mesenchymal stem cells as part of fibrosis treatment, regulating the inflammatory microenvironment and wound repair. Another study detected miR-148a-3p in EVs obtained from macrophages and found that these vesicles reduced infarct size in an in vivo model of ischemia/reperfusion in rats.

In another model with rats and ischemia/reperfusion, a decrease in miR-148a-3p expression in the myocardium after ischemia and reperfusion was observed. Additionally, overexpression of miR-148a-3p in the myocardium resulted in several beneficial effects, including enhanced proliferation and migration pathways, reduced myocardial injury markers, decreased antioxidant function in myocardial tissue, and increased production of IL-10, an anti-inflammatory cytokine. Currently, there is no evidence in the literature regarding the role of miR-148a-3p as a possible circulating biomarker after MI, in murine models or human samples. Its potential relationship with sex differences is also unknown. In our study, miR-148a-3p was found to be overexpressed mainly in the serum of women with MI, indicating a possible sex-dependent regulation. Recent studies have explored the relationship of miR-148a-3p with other cardiovascular pathologies, such as atherosclerosis, the leading cause of MI. Atherosclerosis has been associated with overexpression of miR-148a-3p, which leads to reduced inflammation factors (TNF, IL-1, IL-6) and increased p-eNOS (endothelial nitric oxide synthase), suggesting that modulating miR-148a-3p could be a potential target for developing new therapeutic strategies for cardiovascular diseases.

Another member of the miR-148a-3p family, miR-148-5p, has also been linked to atherosclerosis. It suppresses ITGB1 (integrin β 1) and regulates the proliferation and apoptosis of macrophages along with the lncRNA RAPIA. Furthermore, miR-148a-3p inhibits cellular apoptosis and the levels of IL-6 and TNF- α in oxLDL-induced THP-1 macrophages, indicating its role in attenuating apoptosis and inflammation in macrophages.

Functional enrichment analysis of miR-148a-3p in our study revealed its involvement in several signaling pathways, including FoxO signaling, PI3-Akt signaling, ErbB signaling, and TGF- β signaling. The relationship between miR-148a-3p and the FoxO signaling pathway has been demonstrated in endothelial cells, where miR-148a-3p overexpression suppresses FOXO3 and FOXO4, exacerbating atherosclerosis. Similarly, miR-148a-3p activates the PI3-Akt signaling pathway, promoting differentiation and inhibiting apoptosis of satellite cells in skeletal muscle, suggesting its role in promoting myogenesis. The ErbB signaling pathway, which includes various surface receptors, includes ERRFI1 (ErbB receptor feedback inhibitor). ERRFI1 is a direct target of miR-148a-3p, and miRNA overexpression promotes endothelial cell proliferation, confirming its role in promoting tumor angiogenesis in gliomas. The TGF- β signaling pathway, another pathway identified in the

functional enrichment analysis, has been extensively explored in hepatocellular carcinoma, the most common liver cancer. In vitro and patient sample studies have shown that miR-148a-3p represses carcinoma progression by decreasing the expression of genes involved in the TGF- β pathway, such as SMAD2. Lower serum levels of miR-148a-3p and higher levels of TGF- β 1 in patients with hepatocellular carcinoma have been associated with metastasis and multinodular lesions. These findings suggest that inhibition of SULT2B1b or miR-148a-3p could be potential therapeutic strategies for treating atherosclerosis and associated inflammation.

Regarding miR-149-5p, its levels in SAMR1/SAMP8 mice after AMI significantly increased in the SAMR1 female group through sequencing analysis, while qRT-PCR showed a significant increase in the SAMP8 females and a trend of overexpression in the SAMR1 females. miR-149-5p was only detected in the content of EVs and showed an increasing trend in AMI patient samples, specifically in females.

Limited data is available regarding the detection of miR-149-5p in EV-contained serum after AMI. However, it has been observed to be transported in EVs in the peripheral blood of lung adenocarcinoma patients, where in vitro overexpression promoted tumour cell

growth and inhibited apoptosis. miR-149-5p has also been identified in EVs derived from bone marrow macrophages treated with zoledronic acid, which regulates biological functions such as angiogenesis in endothelial cells.

Specific exploration of miR-149-5p overexpression after MI in the literature is lacking. However, its association with injury caused by ischemia/reperfusion has been investigated. In vitro studies have shown that miR-149-5p overexpression inhibits cell viability and promotes pyroptosis in myocardial cells exposed to 2 hours of hypoxia. Additionally, it reduces ischemia/reperfusion-induced apoptosis by inhibiting the expression of IL-6 in myocardial cells. In the present study, an increase in circulating miR-149-5p was detected in SAMP8 mice after AMI, establishing a link between the pathology and aging. This connection has been previously studied, as miR-149-5p has been proposed as a biomarker for diagnosing coronary heart disease in older individuals, where a decrease in its expression in the plasma of coronary heart disease patients compared to healthy controls was observed.

miR-149-5p has been implicated in various diseases, including acute myeloid leukemia, type 1

diabetes, renal cell carcinoma, and metabolic disorders. Numerous studies have demonstrated its involvement in cell proliferation and its importance in heart and blood vessel development and cardiovascular pathophysiology. Its mechanism of action involves direct regulation of cellular function, post-transcriptional control of genes, and activation of key intracellular signaling pathways. For example, miR-149-5p has been shown to be downregulated in astrocytomas, where it acts as a tumor suppressor by inhibiting cell proliferation and migration. However, in acute myeloid leukemia, it accelerates disease progression by promoting cell proliferation and arresting the cell cycle and apoptosis. It has also been observed that its overexpression inhibits the proliferation, invasion, and migration of smooth muscle cells. Furthermore, a direct relationship has been identified with the circular non-coding RNA circDHCR24, whose overexpression can increase MMP9 expression by acting as a sponge for miR-149-5p, thereby affecting cell proliferation.

Additionally, a connection has been observed between miR-149-5p and CD47, which regulates the development of necrotic atherosclerotic plaques. miR-149-5p also regulates the development of hepatic fibrosis by targeting TGF- β 2 in vivo and in vitro. It has been identified as an anti-inflammatory and fibrotic factor, and

its inhibition improved COL22A1 expression, indicating an anti-inflammatory and fibrotic effect of miR-149-5p in cardiac function, inflammation, and fibrosis. It has also been discovered as an angiogenic suppressor through direct interaction with its target gene FOXO1.

Functional analysis in the present study revealed promising pathways related to cardiovascular diseases for miR-149-5p, including the calcium signaling pathway, cAMP signaling pathway, focal adhesion, PI3-Akt signaling pathway, and MAPK signaling pathway. These findings partially align with a study conducted in bovine adipocytes, where transfection with miR-149-5p resulted in the identification of altered genes and directly affected KEGG pathways, including calcium signaling, cAMP signaling, PI3-Akt signaling, and MAPK signaling. All of these pathways have been established to be related to AMI pathology, but a direct connection with miR-149-5p provides new avenues of research to uncover its role in these signaling pathways.

In the present thesis, miR-423-5p was also studied. It showed underexpression in male SAMR1 mice through sequencing analysis, which was confirmed by qRT-PCR. In patient samples, it was detected in the total fraction of serum as well as in EV content, and in both cases, a decrease was observed after myocardial

infarction. The transport of miR-423-5p by EVs has been previously described in various studies. It has been found to be transported in EVs released by human adipose tissue-derived stem cells, playing a significant role in tissue regeneration by promoting angiogenesis. It has also been identified in EVs derived from cancer cells following treatment with the anticancer drug sorafenib.

The direct relationship of miR-423-5p with AMI as a potential circulating biomarker has been poorly studied in the literature. A study conducted by Nabialek et al. found an initial overexpression of the miRNA in the plasma of AMI patients, followed by normalization after 6 hours. This result contrasts with our study, highlighting the need for further research on miR-423-5p expression after AMI.

MiR-423-5p has also been studied as a potential biomarker in heart failure and coronary artery disease, and its involvement in cardiovascular pathology is well-documented. It has also been speculated to be involved in lupus nephritis through modulation of the TNIP2-NF- κ B axis. Furthermore, miR-423-5p is decreased in patients with heart failure during the first 48 hours after hospital admission, and this decrease has been associated with an increased risk of mortality at 180 days and 1 year. In a study conducted in the Chinese

population, the inclusion of miR-423-5p along with traditional risk factors significantly improved the ability to discriminate and reclassify events of coronary artery disease. Higher circulating levels of miR-423-5p were associated with a lower risk of death. In mice, miR-423-5p plays a role in cardiomyocyte apoptosis through its regulation of the OGT gene, which is necessary for cell division and embryogenesis. Overexpression of miR-423-5p in murine cardiomyocytes inhibits OGT expression and AMPK phosphorylation, leading to increased cardiomyocyte apoptosis through regulation of proapoptotic proteins p53 and caspase-3. Suppression of OGT in cardiomyocytes is involved in the induction of heart failure. Functional enrichment analysis conducted in this thesis revealed KEGG pathways associated with miR-423-5p and its target genes, including the Ras signaling pathway, MAPK signaling pathway, and PI3-Akt signaling pathway. These findings align with a previous study, indicating a direct relationship between these signaling pathways and angiogenesis, highlighting the proangiogenic value of miR-423-5p.