

**Máster en Biotecnología Avanzada 2020/2021**

**Memoria del trabajo de final del Máster:**

**ARN largos no codificantes y Fibrilación Ventricular en pacientes con Infarto Agudo de Miocardio.**

**ARN longos non codificantes e Fibrilación Ventricular en doentes con Infarto Agudo de Miocardio**

**Long non-coding RNA and Ventricular Fibrillation in patients with Acute Myocardial infarction**

**Sayira Paola Mueses Jiménez**

**Julio 2021**

*Tutores académicos: Dra. Lucía Núñez Fernández*

*Dr. Manuel Hermida Prieto*





Facultade de Ciencias

Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC)

**ARN largos no codificantes y Fibrilación Ventricular en pacientes con Infarto Agudo de Miocardio.**

**ARN longo non codificador e Fibrilación Ventricular en doentes con Infarto Agudo de Miocardio.**

**Long non-coding RNA and Ventricular Fibrillation in patients with Acute infarction of Myocardium.**

**Sayira Paola Mueses Jimenez**

La Dra. Lucía Núñez Fernández y el Dr. Manuel Hermida Prieto, en calidad de tutores, autorizan la presentación del Trabajo de Fin de Máster titulado: “ARN largos no codificantes y Fibrilación Ventricular en pacientes con Infarto Agudo de Miocardio.” realizado por D. Sayira Paola Mueses Jiménez para su defensa ante el tribunal evaluador.

**NUÑEZ  
FERNANDEZ  
Z LUCIA -  
DNI  
32842785G** Firmado digitalmente por NUÑEZ FERNANDEZ LUCIA - DNI 32842785G Fecha: 2021.07.02 19:46:31 +02'00'

**HERMIDA  
PRIETO  
MANUEL -  
32802213G** Firmado digitalmente por HERMIDA PRIETO MANUEL - 32802213G Fecha: 2021.07.02 19:50:52 +02'00'

## **Agradecimientos:**

En primer lugar, a Dios porque todo fue posible por Él. Gracias por cada promesa cumplida, por estar conmigo en todo momento, por obrar en mi favor cuando todo parecía contrario, y por renovar mis fuerzas cuando no podía continuar.

Al ministerio de Educación Superior Ciencia y Tecnología (MESCyT) gracias por contribuir en el desarrollo de esta meta, por otorgarme la beca de estudios para realizar este máster en España y obtener una formación completa, y por brindarme el privilegio de obtener más de que lo esperaba.

A mis padres, Flora Jiménez y Elio Alfonso Mueses, gracias por sus oraciones, por todo el apoyo brindado a fin de que pueda alcanzar esta meta, por ese amor que traspasa fronteras, y por direccionar mis pasos. A mis hermanos Saly e Ivan Mueses, gracias por impulsarme y acompañarme en cada etapa de mi vida. Ustedes son un pilar en mi vida, los amo.

A mis tutores, Manuel Hermida y sobre todo a Lucía Núñez por permitirme ser parte de este proyecto de investigación, por su infinita paciencia al momento de instruirme y por cada palabra de ánimo. Al coordinador del máster, Manuel Becerra por el soporte brindado en todo momento.

A mi compañero de laboratorio, Ricardo Pan por el privilegio de ser tu compañera, por cada enseñanza compartida y por ofrecerme apoyo en todo momento. Gracias por hacer de esta experiencia única e inolvidable.

A mis compañeras de piso Abigail Jazmín, Diana Díaz y en especial a Milbian Colón, por acompañarme en este maravilloso viaje y brindarme su apoyo. Gracias chicas por cada momento compartido, juntas logramos esta meta.

A mi esposo, Samy Enecia por su paciencia y comprensión, por confiar en mí, por ser mi coach y el mejor fan, y por estar para mí en los momentos buenos y los no tan buenos.

A mis compañeros de máster, pero sobre todo a Junquera López gracias por tu empatía y por brindarme tu ayuda hasta el último momento. A mis amigos y hermanos en Cristo, en especial a mis mejores amigos Maxene Francois, Leticia Medina y Jeidi Samboy, y los añadidos en este viaje Ismael Severino y Angelica Picardo. Gracias por sus oraciones, consejos y apoyo. Este logró es de todos.

## ÍNDICE

Agradecimientos

Resumen / Resumo / Summary

Palabras clave / Palabras crave / Key words

Abreviaturas

1. Introducción .....	1
2. Objetivos .....	5
3. Materiales y métodos .....	5
3.1 Pacientes incluidos en el estudio .....	5
3.1.1 Obtención de muestras y datos clínicos .....	6
3.2 Selección de los ARNlnc y genes endógenos de referencia.....	7
3.2.1 ARNlnc seleccionados .....	7
3.2.2 Genes endógenos de referencia.....	8
3.3 Análisis de expresión de ARNlnc .....	9
3.3.1 Extracción de ARN .....	9
3.3.2 <i>RT</i> y obtención de ADNc .....	11
3.3.3 <i>preAMP</i> .....	12
3.3.4 <i>qPCR</i> .....	13
3.4 Análisis estadístico .....	14
4. Resultados .....	16
4.1 Pacientes .....	16
4.2 Selección de los ARNlnc y genes endógenos de referencia.....	19
4.2.1 ARNlnc .....	19
4.2.2 Genes endógenos de referencia.....	21
4.3 Análisis de expresión y análisis de datos de los ARNlnc.....	21
5. Discusión .....	23
5.1 <i>CDKN2B-AS1</i> o <i>ANRIL</i> en el IAM durante la FV .....	23
5.2 <i>KCNQ1OT1</i> en el IAM durante la FV.....	25
6. Conclusiones/Conclusionés/Conclusions .....	26
7. Bibliografía .....	27

## **Resumen:**

**Introducción:** la muerte súbita (MS) originada por la fibrilación ventricular (FV) durante el infarto agudo de miocardio (IAM) es una de las principales causas de muerte en países occidentales. La FV es una patología asociada a factores genéticos y/o ambientales. Dentro de los factores genéticos, los ARN largos no codificantes (ARNlnc) pueden jugar un papel en la fisiopatología de la FV en el IAM.

**Objetivos:** (1) analizar la expresión de 10 ARNlnc en 24 pacientes con IAM, de los cuales 12 presentaron FV, (2) analizar la expresión de 10 ARNlnc en 24 pacientes con IAM, de los cuales 12 no presentaron FV, y (3) comparar la expresión de estos 10 ARNlnc en ambos grupos.

**Material y métodos:** se realizó una búsqueda bibliográfica para seleccionar 10 ARNlnc relacionados con enfermedad coronario y/o arritmias. El análisis de expresión de estos 10 ARNlnc se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR). Los datos de expresión se analizaron con los programas *GraphPad Prism 6* y *qBase*.

**Resultados:** de los 10 ARNlnc analizados (*MIAT*, *CDKN2B-AS1* o *ANRIL*, *MALAT*, *NEAT1*, *KCNQ1OT1*, *UCA1*, *LIPCAR*, *SLC16A1-AS1*, *TK2-4*, *TNFRSFM-AS1*), se observó una expresión significativamente menor de *CDKN2B-AS1* o *ANRIL* y de *KCNQ1OT1* en los pacientes con FV en el IAM vs pacientes con IAM sin FV ( $P \leq 0,05$ ).

**Conclusiones:** los resultados obtenidos muestran que los ARNlnc *CDKN2B-AS1* o *ANRIL* y *KCNQ1OT1* en pacientes con FV durante un IAM pueden tener un papel importante en el desarrollo de esta patología. Por lo tanto, se debe continuar con el estudio de los ARNlnc y su relación con la FV en el IAM.

## **Resumo**

**Introdución:** a morte súbita (MS) orixinada pola fibrilación ventricular (FV) durante o infarto agudo de miocardio (IAM) é unha das principais causas de morte en países occidentais. A FV é unha patoloxía asociada a factores xenéticos e/ou ambientais. Dentro dos factores xenéticos, os ARN longos non codificantes (ARNlnc) poden xogar un papel na fisiopatoloxía da FV no IAM.

**Obxectivos:** (1) analizar a expresión de 10 ARNlnc en 24 doentes con IAM, dos cales 12 presentaron FV, (2) analizar a expresión de 10 ARNlnc en 24 doentes con IAM, dos cales 12 non presentaron FV, e (3) comparar a expresión destes 10 ARNlnc en ambos os grupos.

**Material e métodos:** realizouse unha procura bibliográfica para seleccionar 10 ARNlnc relacionados con enfermidade coronaria e/ou arritmias. A análise de expresión destes 10 ARNlnc realizouse mediante a reacción en cadea da polimerase en tempo real (qPCR). Os datos de expresión analizáronse cos programas *GraphPad Prism 6* e *qBase*.

**Resultados:** dos 10 ARNlnc analizados (*MIAT*, *CDKN2B-AS1* ou *ANRIL*, *MALAT*, *NEAT1*, *KCNQ1OT1*, *UCA1*, *LIPCAR*, *SLC16A1-AS1*, *TK2-4*, *TNFRSFM-AS1*), observouse unha expresión significativamente menor de *CDKN2B-AS1* ou *ANRIL* e *KCNQ1OT1* nos doentes con FV no IAM *vs* doentes con IAM sen FV ( $P \leq 0,05$ ).

**Conclusións:** os resultados obtidos mostran que os ARNlnc *CDKN2B-AS1* ou *ANRIL* e *KCNQ1OT1* en doentes con FV durante un IAM poden ter un papel importante no desenvolvemento desta patoloxía. Por tanto, débese continuar co estudo dos ARNlnc e a súa relación coa FV no IAM.

## **Summary**

**Introduction:** sudden death (SD) caused by ventricular fibrillation (VF) during acute myocardial infarction (AMI) is one of the main causes of death in western countries. VF is a pathology associated with genetic and/or environmental factors. Among the genetic factors, long non-coding RNAs (lncRNA) may play a role in the pathophysiology of VF in AMI.

**Objectives:** (1) to analyze the expression of 10 lncRNA in 24 patients with AMI, of which 12 presented VF, (2) to analyze the expression of 10 lncRNA in 24 patients with AMI, of whom 12 did not present VF, and (3) to compare the expression of these 10 lncRNAs in both groups.

**Material and methods:** a bibliographic search was carried out to select 10 lncRNA related to coronary disease and / or arrhythmias. The analysis of the expression of these 10 lncRNA was performed by the real-time polymerase chain reaction (qPCR). Expression data was analyzed with *GraphPad Prism 6* and *qBase* programs.

**Results:** of the 10 lncRNA analyzed (*MIAT*, *CDKN2B-AS1* or *ANRIL*, *MALAT*, *NEAT1*, *KCNQ1OT1*, *UCA1*, *LIPCAR*, *SLC16A1-AS1*, *TK2-4*, *TNFRSFM-AS1*), it was observed a significantly lower expression of *CDKN2B-AS1* or *ANRIL* and *KCNQ1OT1* in patients with VF in AMI vs patients with AMI without VF ( $P \leq 0.05$ ).

**Conclusions:** the results obtained show that *CDKN2B-AS1* or *ANRIL* and *KCNQ1OT1* lncRNA in patients with VF during AMI may play an important role in the development of this pathology. Therefore, the study of lncRNA and their relationship with VF in AMI should continue.



**Palabras claves:** Infarto Agudo de Miocardio, Fibrilación Ventricular, Muerte Súbita, ARN Largos No Codificantes, Arritmias Ventriculares.

**Palabras clave:** Infarto Agudo de Miocardio, Fibrilación Ventricular, Morte Súbita, ARN Longos Non Codificantes, Arritmias Ventriculares.

**Key words:** Acute Myocardial Infarction, Ischemic Heart Disease, Ventricular Fibrillation, Sudden Death, Long Noncoding RNA, Ventricular Arrhythmias.

**Abreviaturas:**

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

ARN: ácido ribonucleico

ARNa: ARN antisentido

ARNi: ARN de interferencia

ARNlnc: ARN largos no codificantes

ARNm: ARN mensajero

ARNnc: ARN no codificantes

ARNpi: ARN que interactúan con *Piwi*

ARNpnc: ARN pequeños / cortos no codificantes

ARNpno: ARN pequeños nucleares / nucleolar

ARNr: ARN ribosomal o ribosómico

ARNt: ARN de transferencia

CEIC: Comité Ético de Investigación Clínica

CHUAC: Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña

CI: cardiopatía isquémica

Ct: Cycle threshold

CV: coeficiente de variación

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

FA: fibrilación auricular

FV: fibrilación ventricular

g: aceleración de la gravedad

IAM: infarto agudo de miocardio

IM: infarto de miocardio

INIBIC: Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña

*KCNA2*: gen que codifica la subunidad formadora del canal de potasio shaker Kv1.2

*KCNJ11*: gen que codifica la subunidad del canal de rectificación interna de potasio Kir6.2

M: media

miARN: micro ARN

MS: muerte súbita

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

preAMP: preamplificación de fragmentos de secuencia deseada

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativa

RCP: reanimación cardiopulmonar

RT: transcripción inversa o reversa

*SCN10A*: gen que codifica la subunidad alfa 10 del canal dependiente de voltaje de sodio Nav1.8

*SCN5A*: gen que codifica la subunidad alfa 5 del canal voltaje-dependiente de sodio Nav1.5

SNP: polimorfismo de nucleótido único

## 1. Introducción

La muerte súbita (MS) constituye una de las principales causas de muerte en los países occidentales, y representa un desafío para la salud pública por su frecuencia y características demográficas. La MS se define como la parada cardíaca que se produce inesperadamente y de forma repentina en personas que aparentemente gozan de un buen estado de salud (Bayés & Elousa, 2012; Santos *et al.*, 2020). La parada del corazón se produce abruptamente, y en el caso de no recibir atención médica inmediata, concluye con la muerte del paciente. Dentro de las causas cardiovasculares, alrededor del 80% es consecuencia de una cardiopatía isquémica, fundamentalmente por un infarto agudo de miocardio (IAM) (Bayés & Elousa, 2012; Rodríguez-Reyes *et al.*, 2015; Fonseca *et al.*, 2017). El IAM es un síndrome coronario agudo que se caracteriza por la aparición brusca de un cuadro de sufrimiento isquémico, falta de riego, a una parte del músculo del corazón producido por la obstrucción aguda y total de una de las arterias coronarias. Una de las principales complicaciones del IAM, y que se asocia a la MS en el marco del IAM es la fibrilación ventricular (FV), con una incidencia aproximada del 3-12% de los casos de IAM (Chorro *et al.*, 2007; Hervella *et al.*, 2020).

La FV es un trastorno del ritmo cardíaco (Figura 1) caracterizado por presentar un ritmo ventricular rápido (más de 250 latidos por minuto), irregular, de morfología caótica y que potencialmente lleva de forma irremediable a la pérdida total de la contracción cardíaca, con una falta total del bombeo sanguíneo y por tanto a la muerte del paciente de no ser tratado a través de reanimación cardiopulmonar (RCP) y/o desfibrilación (Asaria *et al.*, 2017; Glinge *et al.*, 2020; Szabó *et al.*, 2020).

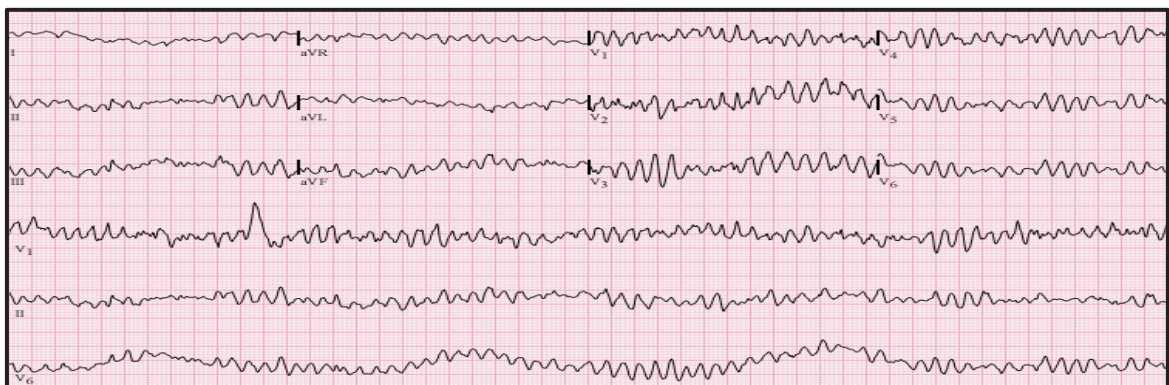


Figura 1. Ejemplo de un electrocardiograma de 12 derivaciones de los latidos ultrarrápidos e irregulares y sin patrón en la FV (Benito *et al.*, 2012).

La susceptibilidad a la FV en el contexto del IAM es multifactorial y se han identificado, entre otros factores: herencia genética, alteración de los electrolitos y disfunción hemodinámica (De Ferrari *et al.*, 2020; Glinge *et al.*, 2020). Dentro de los factores genéticos, la investigación se ha centrado en el análisis de variantes en canales iónicos asociados a la FV en el IAM, en especial en el gen *SCN5A* que codifica el canal de sodio cardíaco Nav1.5 (Jabbari *et al.*, 2017; Glinge *et al.*, 2020; Hervella *et al.*, 2020). Sin embargo, existen otros factores genéticos que pueden jugar un papel fundamental en la FV en el IAM, que aún no se han explorado en profundidad. Dentro de estos factores, destacan los ARN no codificantes (ARNnc), claves en el desarrollo y en la funcionalidad del sistema cardiovascular (Beermann *et al.*, 2016; López *et al.*, 2017; Barretta *et al.*, 2020).

En el pasado, la comunidad científica consideraba el ARNnc como “basura evolutiva” de la transcripción génica, debido a que no existían estudios que explicaran su función biológica. Sin embargo, la exploración y estudio del transcriptoma ha permitido conocer su implicación en la regulación de la expresión génica a nivel transcripcional y postranscripcional, y por ello se han identificado como elementos claves en procesos fisiológicos y patológicos (Barretta *et al.*, 2016; Beermann *et al.*, 2016; Han *et al.*, 2017; González *et al.*, 2017; Ono *et al.*, 2018).

La clasificación más común de los ARNnc se realiza en función de su longitud. Así se clasifican en ARN pequeños no codificantes/cortos (ARNpnc), aproximadamente 22 nucleótidos de longitud, y ARN largos no codificantes (ARNlnc) cuya longitud es mayor a 200 nucleótidos (González *et al.*, 2017; Ono *et al.*, 2018). Las diferentes subclases de ARNpnc está integrada por una gran familia de genes reguladores, que les permite ejercer una serie de funciones a nivel del desarrollo y proliferación celular en diferentes organismos, conformado por: ARN de interferencia (ARNi), ARN pequeños nucleares/nucleolar (ARNpno), ARN ribosomal (ARNr), ARN de transferencia (ARNt), ARN que interactúa con Piwi (ARNpi) y micro ARN (miARN) (Beermann *et al.*, 2016; Han *et al.*, 2017; González *et al.*, 2017).

Si nos centramos en los ARNlnc podemos ver que se han asociado a procesos moleculares que implican la regulación de la expresión de genes (transcripcional, postranscripcional

y actividad proteica), organización de dominios nucleares, y modificación de la cromatina. Además, la alteración de la expresión de algunos ARNlnc ha sido asociada a patologías cardiovasculares y oncológicas. Este grupo de ARNlnc está integrado por ARN antisentido, pseudogenes y ARN circulares (Vausort *et al.*, 2014; Sallam *et al.*, 2018). En la Figura 2 se muestra los diferentes mecanismos de regulación de la expresión génica de los ARNlnc: a) competidores que inhiben la unión de la proteína a su secuencia complementaria de ADN, por el anclaje a la proteína o a la secuencia, b) activador o reclutador de las modificaciones epigenéticas, y c) precursor de ARN pequeños implicados en otros procesos de regulación de la expresión génica (Corral-Vazquez *et al.*, 2017; Gomes *et al.*, 2017).

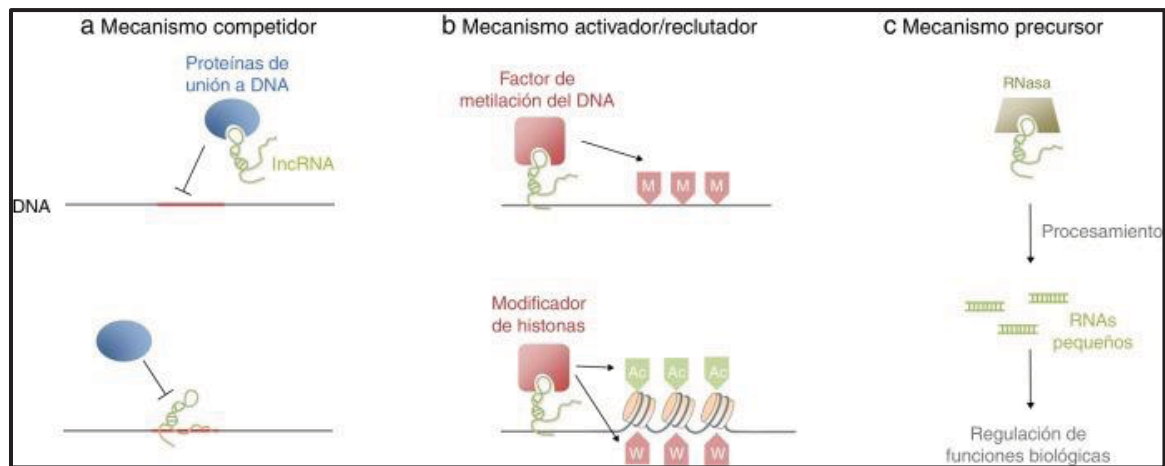


Figura 2. Mecanismos de regulación de la expresión génica realizada por los ARNlnc: a) mecanismo competidor, b) mecanismo activador o reclutador y c) mecanismo precursor (Corral-Vazquez *et al.*, 2017).

En cuanto al papel de los ARNnc en las patologías cardiovasculares, los miARN son la clase más numerosa y estudiada. Investigaciones recientes, han demostrado que la expresión en el tejido cardíaco contribuye a la función normal o patológica del sistema cardiovascular, por ejemplo, el miARN-1 promueve la diferenciación de los cardiomiocitos, entre tanto que el miARN-133 la inhibe (González *et al.*, 2017; Ono *et al.*, 2018). Además, los microARN miR-133a y miR-423-5p se han identificado como posibles biomarcadores en pacientes con insuficiencia cardíaca. Es importante destacar que los miARN son los primeros ARNnc que se han analizado en pacientes con arritmias ventriculares durante el IAM, identificado al miARN 133a/b con expresión disminuida en tejido cardíaco a los días 2-7 post-infarto (Bauters *et al.*, 2013; Giner *et al.*, 2016).

Esto demuestra que el estudio de los ARNnc puede contribuir a conocer la fisiopatología de la FV en el IAM, mejorar el pronóstico de estos pacientes, y convertirse en una diana farmacológica para nuevos tratamientos (Bauters *et al.*, 2013; Corral-Vazquez *et al.*, 2017).

Los ARNnc no han sido estudiados en el contexto de la FV durante el IAM, sin embargo, diferentes estudios apuntan a un posible papel en esta patología, ya que por una parte se han asociado al IAM y por otra parte se han asociado a las arritmias (Ishii *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2018; Yeh *et al.*, 2020). El *MIAT* fue uno de los primeros ARNnc identificados en tejido cardíaco en el estudio realizado por Ishii *et al.* 2006, el *MIAT* es descrito como un regulador en el núcleo de la célula que interactúa con factores nucleares y además es caracterizado como un ARNnc endógeno competitivo en el citoplasma. Además, en el estudio de Zhu *et al.* (2016) se observó que el *MIAT* presenta un incremento significativo en la hipertrofia cardíaca, inducida por angiotensina II (AngII), y que contribuye al desarrollo patológico del infarto de miocardio (IM).

El *CDKN2B-AS1* o *ANRIL* se ha descrito como un posible biomarcador de la enfermedad coronaria debido a su implicación en la regulación de la proliferación, adhesión celular y la apoptosis (Temel & Ergören, 2019). Los estudios realizados por Congrains *et al.* (2012) y Motterle *et al.* (2012) describieron que los niveles de expresión en sangre periférica del *CDKN2B-AS1* o *ANRIL*, se encontraban disminuido en pacientes con arteriosclerosis. Otro ARNnc asociado al IAM con elevación del segmento ST, por sus los altos niveles plasmáticos, es el *LIPCAR*. Además, este ARNnc es considerado como un biomarcador de riesgo de hospitalización y muerte cardiovascular (Li *et al.*, 2018; Temel & Ergören, 2019).

Los ARNnc además de haberse relacionado con el IAM también se han asociado a arritmias ventriculares. El ARNnc *KCNA2-AS*, por ejemplo, regula negativamente el gen *KCNA2*, que codifica la subunidad del canal del potasio *Kv1.2*, ejerciendo una función fundamental en varias actividades fisiológicas, incluyendo la frecuencia cardíaca (Ishii *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2018; Temel & Ergören, 2019). El estudio realizado por Long *et al.* (2017) observaron que el nivel de *KCNA2-AS* estaba significativamente elevando, mientras que la expresión de *KCNA2* estaba significativamente bajo en los ventrículos cardíacos de ratas con insuficiencia.

Por lo tanto, comprender las funciones de los ARNlnc en pacientes con FV durante el IAM permitiría: (1) estratificar el riesgo de desarrollar FV durante un episodio de isquemia aguda, (2) establecer una recomendación individualizada de medidas preventivas para evitar una muerte súbita, (3) abrir una nueva vía en la terapéutica de la enfermedad, ya que se están identificando ARNlnc como dianas farmacológicas y (4) profundizar en el conocimiento de los factores desencadenantes y/o facilitadores de la inestabilidad eléctrica en el miocardio isquémico.

## 2. **Objetivos**

Los objetivos de este trabajo son los siguientes:

I. Analizar la expresión de 10 ARNlnc en estudio (*MIAT, CDKN2B-AS1* o *ANRIL, MALAT, NEATI, KCNQ1OT1, UCA1, LIPCAR, SLC16A1-AS1, TK2-4, TNFRSFM-AS1*) en 12 pacientes con FV en el contexto del IAM.

II. Analizar la expresión de 10 ARNlnc en estudio (*MIAT, CDKN2B-AS1* o *ANRIL, MALAT, NEATI, KCNQ1OT1, UCA1, LIPCAR, SLC16A1-AS1, TK2-4, TNFRSFM-AS1*) en 12 pacientes con IAM sin evidencias de FV.

III. Comparar la expresión de los 10 ARNlnc en estudio (*MIAT, CDKN2B-AS1* o *ANRIL, MALAT, NEATI, KCNQ1OT1, UCA1, LIPCAR, SLC16A1-AS1, TK2-4, TNFRSFM-AS1*) en ambos grupos.

## 3. **Materiales y métodos**

### 3.1 **Pacientes incluidos en el estudio**

Para la selección de pacientes se siguieron los siguientes criterios de inclusión: pacientes de edad superior a 18 años, presencia de IAM con elevación del segmento ST y pacientes que puedan y quieran participar de forma voluntaria en el curso de este estudio y así lo manifiesten por escrito mediante su firma en el consentimiento informado.

❖ Los criterios de inclusión específicos fueron:

-Casos: Pacientes con MS por FV, resucitada en el contexto de un síndrome coronario agudo (electrocardiograma sugestivo de síndrome coronario agudo y/o lesiones coronarias sugestivas de síndrome coronario agudo con elevación del segmento ST).

-Controles: Pacientes con IAM con elevación del segmento ST sin FV ni MS.

❖ Los criterios de exclusión fueron:

-Pacientes con otras causas conocidas de MS (miocardiopatías y canalopatías, entre otras).

-Pacientes con MS de causa diferente a la isquemia (abuso de sustancias tóxicas, como la cocaína, que pueden dar lugar a un Síndrome Brugada-*like*).

### 3.1.1 Obtención de muestras y datos clínicos

La recogida de muestras se realizó en el periodo 2019-2020 de la Unidad de Hemodinámica del Servicio de Cardiología del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC). Durante el proceso de cateterismo para la reperfusión de la arteria y aprovechando la vía central de acceso, se extrajo sangre en un tubo con anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA por sus siglas en inglés). Realizada la extracción, las muestras fueron enviadas al laboratorio en las primeras 24 horas. Para la obtención del plasma, se realizó una centrifugación a 1.500 g durante 10 min, se aseguraron las condiciones de bioseguridad en todo el proceso y se verificaron que las muestras no presentaran hemólisis. En caso de presentar hemólisis las muestras no se incluían en el estudio.

Todos los pacientes incluidos en el estudio autorizaron mediante la firma del consentimiento informado, en conformidad con la guía ética de la declaración de Helsinki, el uso de las muestras para investigación. Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) de Galicia, bajo la referencia 2013/109 y las muestras pertenecían a la “Colección de muestras para la línea de investigación en hemodinámica”, recogida en el Registro Nacional de Biobancos, en el apartado de Colecciones con código C.0002483.



Los datos clínicos de las muestras fueron recogidos sistemáticamente por la Unidad de Hemodinámica en una base de datos, en la cual se pueden consultar los datos demográficos y clínicos.

### 3.2 Selección de los ARNlnc y genes endógenos de referencia

#### 3.2.1 ARNlnc seleccionados

Para la selección de los 10 ARNlnc se realizó una búsqueda sistemática siguiendo las recomendaciones del método PRISMA para revisiones sistemáticas y metaanálisis. La búsqueda de las bibliografías se realizó en las bases de datos científicas: PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>), Web of Science (<https://www.recursoscientificos.fecyt.es/>), y Scopus ([scopus.com/home.uri](https://scopus.com/home.uri)), utilizando las palabras claves *Acute Myocardial Infarction*, *Ischemic Heart Disease*, *Ventricular Fibrillation*, *Sudden Death*, *Long Noncoding RNA*, *Ventricular Arrhythmias*, y *qPCR* combinándolas a través del uso de los operadores *AND*, *OR* y *NOT*. Delimitando la búsqueda desde el año 2009-2021 en artículos completos gratuitos, ensayos clínicos y revistas científicas, en inglés o en castellano.

La combinación de palabras claves permitió la obtención de un total de 4.978 documentos. Después del recuento se procedió a la eliminación de referencias duplicadas, eliminando un total de 35, lo que nos dejó 4.943. De estos 4.943 artículos se excluyeron 4.907 después del primer cribado, por lo que se obtuvieron 45 artículos de referencia de textos completos evaluados para elegibilidad y finalmente se excluyeron 28 debido a 3 razones: 1) artículos incompletos, 2) los que utilizaron una metodología distinta, y 3) los que no evaluaron la población de interés, por lo que en definitiva se incluyeron 17 artículos para la selección de estos ARNlnc. Todo el proceso de selección en las diferentes etapas de la metodología PRISMA se detalla en la Figura 3.

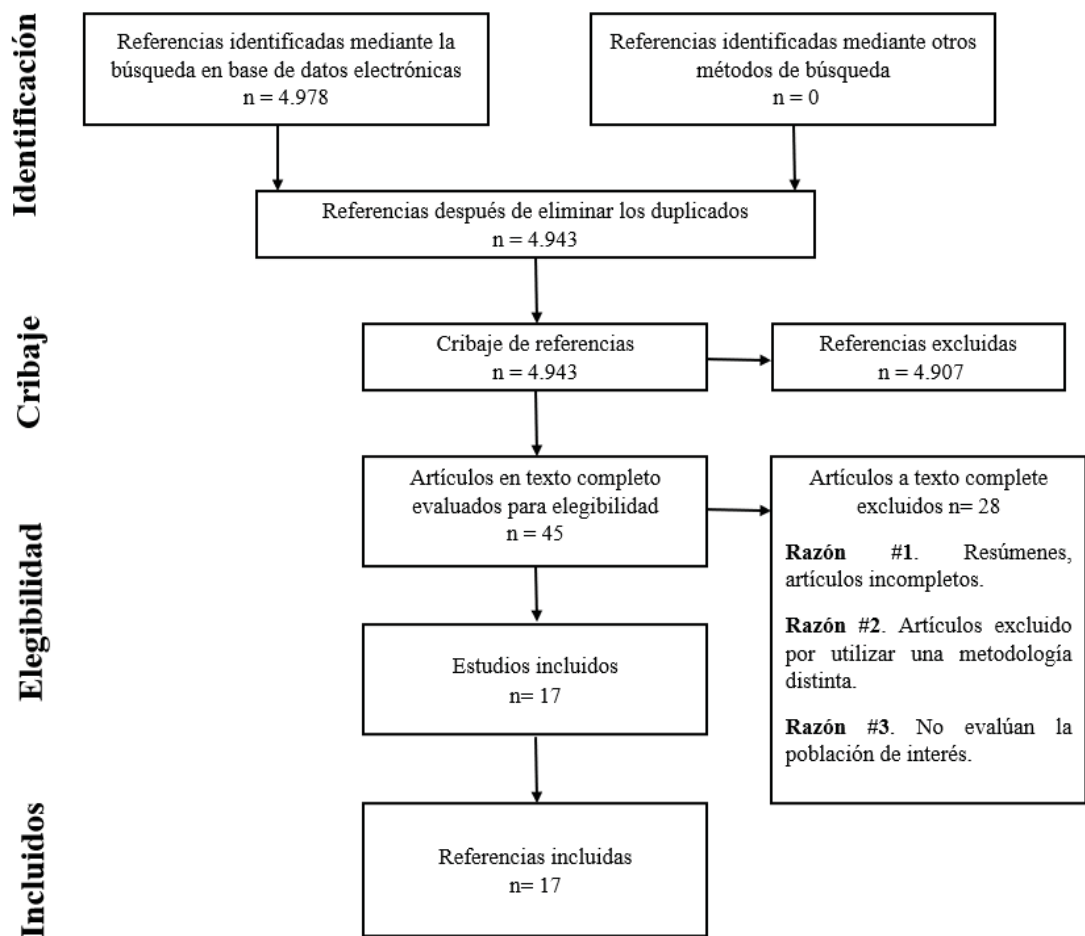


Figura 3. Diagrama de flujo PRISMA para el cribaje y selección de referencias bibliográficas.

### 3.2.2 Genes endógenos de referencia

Los genes endógenos de referencia intervienen como controles internos que permiten la corrección de las variaciones experimentales, provocadas por los errores de eficiencia o calidad del material de partida, pipeteo, componentes inhibidores, y transcripción inversa o reversa (RT por sus siglas en inglés). En función a la bibliografía investigada, se seleccionaron 8 genes endógenos de referencia (*ACTB*, *B2M*, *GUSB*, *HPRT*, *PPIA*, *RPLP0*, *TBP*, *TFRC*) y se realizó el análisis de variación biológica, en este caso pacientes IAM con y sin FV con el uso de la herramienta bioinformática *geNorma* (Primer Design, Ltd., Southampton University, Highfield Campus, Southampton Haunts, Reino Unido) (de Jonge *et al.*, 2007).

### 3.3 Análisis de expresión de ARNlnc

El estudio de la expresión de ARNlnc se llevó a cabo a través de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativa (qPCR por sus siglas en inglés) cuyas etapas son: (1) extracción de ARN, (2) retrotranscripción para obtener ADN de cadena complementaria (ADNc), (3) preamplificación de fragmentos de secuencia deseada (preAMP por sus siglas en inglés), y (4) qPCR (Figura 4).

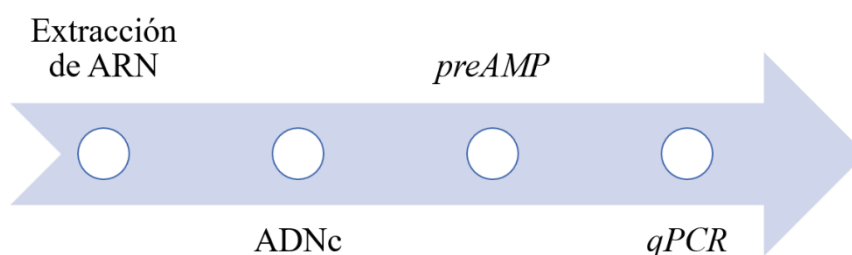


Figura 4. Esquema de las etapas en el análisis de los ARNlnc.

#### 3.3.1 Extracción de ARN

La extracción del ARN total se llevó a cabo utilizando el kit comercial *miRNeasy Serum/Plasma Advanced* (QIAGEN, Hilden), siguiendo el protocolo del fabricante que se describe en la Figura 5.

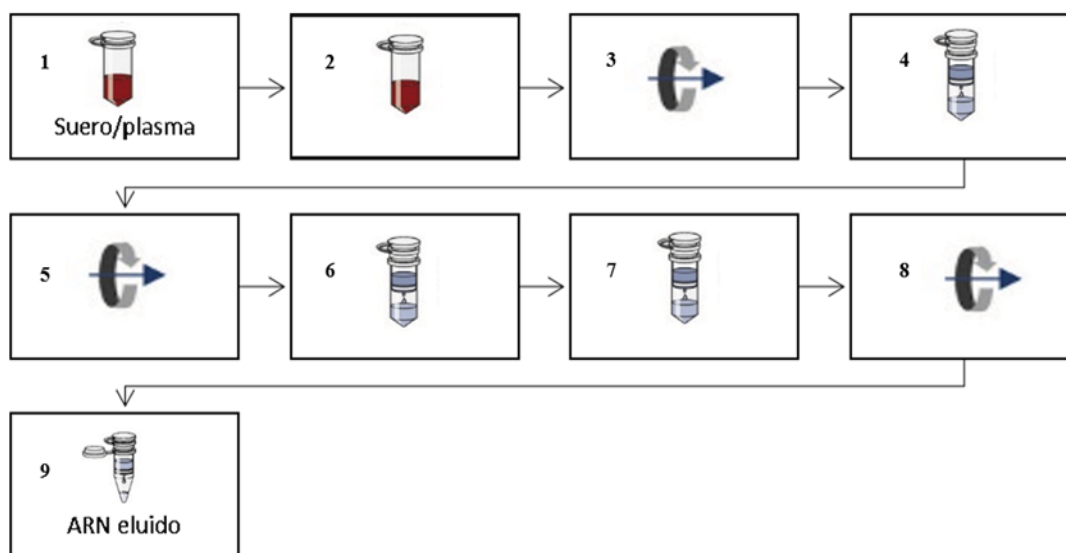


Figura 5. Procedimiento de extracción de ARN total: (1) Transferencia de plasma a un tubo *Eppendorf*. (2) Adición *Buffer RPL*. (3) Uso del *Buffer RPP*. (4) Transferencia de las muestras a las columnas del kit *RNeasy UCP MinElute*. (5) Lavado de las membranas. (6) Adición del etanol al 80%. (7) Secado de la membrana. (8) Elución del ARN. (9) ARN listo para usar.

❖ Procedimiento:

- Paso 1: Las muestras conservadas en el congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  fueron retiradas con una antelación de 30 minutos, y se descongelaron a temperatura ambiente. Una vez descongeladas, se pasó 200  $\mu\text{L}$  de plasma a un tubo *Eppendorf* de 2 mL.
- Paso 2: A continuación, se añadió 60  $\mu\text{L}$  de *Buffer RPL* a la muestra, se mezclaron con un agitador tipo vórtex durante 5 segundos y se incubó la muestra a temperatura ambiente durante 3 minutos.
- Paso 3: Pasado el tiempo de incubación, se añadió 20  $\mu\text{L}$  de *Buffer RPP*, se volvió a agitar y se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 3 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 1.2000  $g$  durante 3 minutos a temperatura ambiente para sedimentar el precipitado. Obtenido el sobrenadante ( $\sim 230$   $\mu\text{L}$  para 200  $\mu\text{L}$  de plasma) se transfirió a un nuevo tubo *Eppendorf*, agregando el mismo volumen del sobrenadante de isopropanol y realizando la homogenización de las mezclas utilizando vórtex.
- Paso 4: Cada una de las muestras se transfirió a un tubo de recogida con columna del *kit RNeasy UCP MinElute* (QIAGEN, Hilden), se centrifugó durante 15 segundos a  $\geq 8.000$   $g$  con la tapa cerrada.
- Paso 5: Desechando este filtrado, se procedió a lavar la membrana; un primer lavado con 700  $\mu\text{L}$  de *Buffer RWT* y un segundo lavado con 500  $\mu\text{L}$  de *Buffer RPE*, centrifugándose durante 15 segundos a  $\geq 8.000$   $g$  en ambos casos con la tapa cerrada y realizando el descarte del filtrado.
- Paso 6: Realizados estos lavados, se procedió a añadir 500  $\mu\text{L}$  de etanol al 80% a la columna de centrifugado *RNeasy UCP MinElute* (QIAGEN, Hilden), se volvió a centrifugar esta vez durante 2 minutos a  $\geq 8.000$   $g$  con la tapa cerrada. Se descartó el filtrado.

- Paso 7: En el tubo *Eppendorf* de 2 mL unido a la columna de centrifugado *RNeasy UCP MinElute* (QIAGEN, Hilden), se secó la membrana de silica centrifugando durante 5 minutos a máxima velocidad con la tapa abierta.
- Paso 8: Por último, ARN es eluido con 20  $\mu\text{L}$  de agua libre de *RNasa* directamente en el centro de la membrana de la columna y se realizó una centrifugación de 1 minuto a máxima velocidad, para obtener un eluyente de 18  $\mu\text{L}$  listo para su utilización en los siguientes procesos.

### 3.3.2 RT y obtención de ADNc

La *RT* es un proceso de la *qPCR* que implica la generación de ADNc a partir de ARN. Los ensayos realizados fueron llevados a cabo en un solo tubo utilizando el kit de *StaRT Reverse Transcription* (AnyGenes®, París), preparando un Mix con cebadores específicos y una vez preparado se adiciona el ARN. Este procedimiento fue realizado haciendo uso del termociclador *T100 BIO-RAD* (Tabla 1), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla 1. Procedimiento de la *RT* y obtención de ADNc

<b>A. Preparación del Mix para la RT</b>	
<b>Componentes del Mix</b>	<b>Cantidades: x1 (+10%)</b>
H <sub>2</sub> O	1,5 $\mu\text{L}$ (1,65 $\mu\text{L}$ )
<i>StaRT Buffer</i>	1 $\mu\text{L}$ (1,1 $\mu\text{L}$ )
<i>Random Primers</i>	1 $\mu\text{L}$ (1,1 $\mu\text{L}$ )
<i>dNTP Mix</i>	1 $\mu\text{L}$ (1,1 $\mu\text{L}$ )
<i>StaRT Reverse Transcriptase</i>	0,5 $\mu\text{L}$ (0,55 $\mu\text{L}$ )
<b>B. Mezcla del Mix y las muestras en estudio (10 <math>\mu\text{L}</math>)</b>	
Mix	5 $\mu\text{L}$
ARN	5 $\mu\text{L}$

Tabla 1 (continuación). Procedimiento de la *RT* y obtención de ADNc

<b>C. Proceso de <i>RT</i> en el termociclador y obtención de ADNc</b>		
<b>Pasos en el termociclador</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Temperatura</b>
1 <sup>er</sup> paso (Precalentamiento)	10 min	25 °C
2 <sup>do</sup> paso ( <i>RT</i> )	120 min	37 °C
3 <sup>er</sup> paso (Activación de enzima)	5 min	85 °C
4 <sup>to</sup> paso (Enfriamiento)	∞	4 °C

### 3.3.3 *preAMP*

La *preAMP* basada en *PCR* es un método utilizado para aumentar la concentración de ADNc obtenido en el paso de la *RT*, amplificando solo los genes diana utilizando el kit comercial *Specific PreAmplification SpeAmpn* (AnyGenes®, París). Este procedimiento fue llevado a realizados en dos fases: (1) desnaturalización y amplificación del ADNc, y (2) purificación e inactivación de la enzima (Tabla 2).

Tabla 2. Procedimiento de la *preAMP*

<b>Fase 1: Desnaturalización y amplificación del ADNc</b>					
<b>Preparación</b>		<b>Proceso de <i>preAMP</i> en el termociclador</b>			
<b>Componentes del Mix</b>	<b>Cantidades: x1 (+10 %)</b>	<b>Etapas</b>	<b>N° de ciclos</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Temperatura</b>
<i>2X Perfect Master Mix</i>	12,5 µL (13,75 µL)	Desnaturalización inicial-Activación de la <i>Hot Start Taq</i>	1	10 min	95 °C
<i>Prim</i>	7,5 µL (8,25 µL)	Pre amplificación de ADNc	10	10 s	95 °C
				30 s	60 °C

Tabla 2 (continuación). Procedimiento de la *preAMP*

Fase 2: Purificación e inactivación de la enzima (25 $\mu$ L <i>preAMP</i> )					
Preparación		Proceso de <i>preAMP</i> en el termociclador			
Componente	Cantidades	Etapas	N° de ciclos	Tiempo	Temperatura
Mix	20 $\mu$ L	Purificación	1	30 min	37 °C
ADNc	5 $\mu$ L	Nota: Se pausa el equipo y se añade 3 $\mu$ L del reactivo <i>AmpPure<sub>n</sub></i> a cada pocillo o tubo			
		Inactivación de la enzima	1	10 s	95 °C

### 3.3.4 *qPCR*

El ensayo de *qPCR* es utilizado para la medición cuantitativa de la cantidad de ADN de una muestra al mismo tiempo en que se realiza la reacción. Combinando la amplificación y la detección, esta permite la correlación del producto de la *PCR* en cada uno de los ciclos a través de la emisión de una señal fluorescente que es detectada por el equipo.

El procedimiento de *qPCR* fue realizado en una placa de 48 pocillos, donde se añadió a cada pocillo 20  $\mu$ L del Mix preparado a partir del kit de *LncRNAs qPCR assays* (AnyGenes®, París). Además, se utilizó el *SYBR Green* para evitar la amplificación de ADN genómico contaminante de la muestra. Realizado el proceso de elaboración del Mix, y mezclado con las muestras en estudio y el blanco, la placa fue colocada en el equipo LightCycler® 480 (Roche 454, Branford) para la realización de la *qPCR* (Tabla 3).

Tabla 3. Procedimiento de la *qPCR*

<b>A. Elaboración del Mix para la <i>qPCR</i></b>				
<b>Componentes</b>		<b>Cantidades: x1 (10%)</b>		
H <sub>2</sub> O		7 µL (7,7 µL)		
<i>SYBR</i>		10 µL (11 µL)		
<i>Primer</i>		1 µL (1,1 µL)		
<b>B. Mezcla del Mix y las muestras en estudio (20 µL)</b>				
Mix		18 µL		
ADNc		2 µL		
<b>B. Proceso de <i>qPCR</i> en el termociclador</b>				
<b>Etapas</b>	<b>N° de ciclos</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Modo de adquisición</b>
Desnaturalización inicial- Activación de la <i>Hot Start Taq</i>	1	10 min	95 °C	/
Amplificación	40-45	10 s	95 °C	/
		30 s	60 °C	Cuantificación
Curvas de <i>Melting</i>	1	10 s	95 °C	/
		30 s	65 °C	/
		0 s	95 °C	Continuo

### 3.4 Análisis estadístico

Durante la amplificación de la *qPCR* se genera una señal de fluorescencia que nos permite detectar la cantidad de productos amplificado de la *PCR*, dividida en 4 fases: (1) inicial o basal, (2) geométrica (exponencial), (3) lineal, y (4) estacionaria. Realizadas cada una de estas fases se obtienen los resultados de las curvas amplificadas y el umbral del ciclo o *Cycle threshold* (*Ct* por sus siglas en inglés) basado en la normalización de los datos



respecto a un gen de referencia. El valor  $Ct$  está relacionado con el número de ciclos en el ensayo de la  $PCR$  necesarios para la amplificación del ADN. Así, a menor valor  $Ct$ , mayor cantidad de amplificaciones.

El análisis estadístico de la expresión génica de los ARNlnc fue llevado a cabo en base a los datos obtenidos de la  $qPCR$  de los 24 pacientes analizados y al resultado de los genes endógenos de referencia. Los valores obtenidos para cada gen en los diferentes pacientes fueron analizados calculando el valor  $Ct$  a través de la fórmula ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) siguiendo el esquema de la Figura 6.

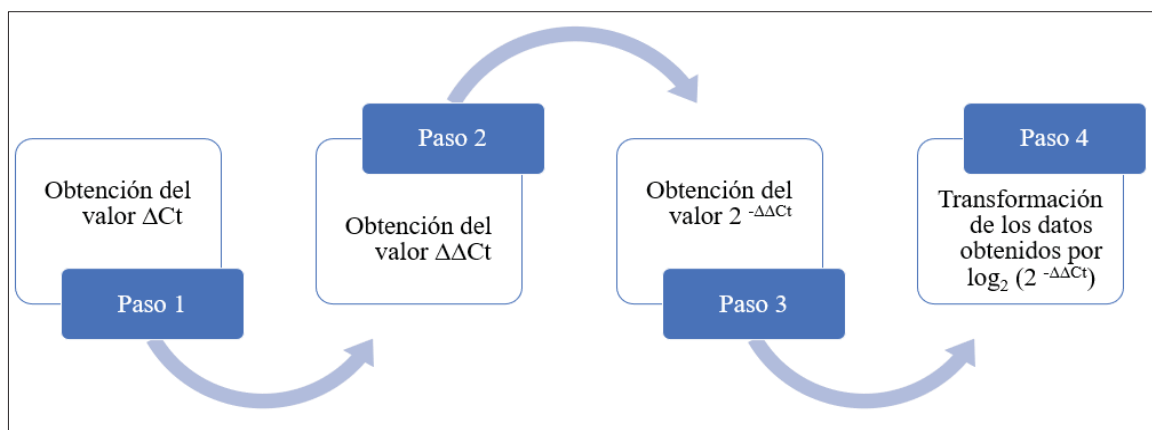


Figura 6. Pasos realizados para el análisis de los datos obtenidos.

❖ Pasos realizados para el análisis de los datos obtenidos:

- Paso 1. En una planilla de Excel “Hoja de análisis de los resultados” se calculó el incremento de  $Ct$  ( $\Delta Ct$ ), realizando una resta de la media obtenida de los valores  $Ct$  del gen objetivo frente a la media de los genes endógenos (Fórmula 1).

$$\Delta Ct = Ct_T - Ct_R$$

Fórmula 1. Fórmula utilizada para obtener el valor  $\Delta Ct$ , realizando una resta de:  $Ct_T$  (Gen objetivo o *Target*) -  $Ct_R$  (Media de los genes endógenos de referencia) (Green & Sambrook, 2018).

- Paso 2. Obtenidos los resultados de cada uno de los pacientes en estudio, se realizó una media  $\Delta Ct$ , que es la suma de todos los valores y divididos en el total, en los pacientes con y sin FV, una vez obtenido este valor se normalizaron los datos utilizando la fórmula  $\Delta\Delta Ct$  (Fórmula 2).

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \text{Media } \Delta Ct$$

Fórmula 2. Fórmula utilizada para obtener el valor  $\Delta\Delta Ct$ , realizando una resta de:  $\Delta Ct$  y la media  $\Delta Ct$  (Green & Sambrook, 2018).

- Paso 3. Se realiza el cálculo de los niveles de expresión a través del método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , que hace referencia a la eficiencia de amplificación por *PCR* uniforme del 100% en todas las muestras utilizando la fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Fórmula 3).

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Fórmula 3. Fórmula utilizada para obtener el valor  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , realizando 2 elevando y restando el valor obtenido de  $\Delta\Delta Ct$  en el paso anterior (Green & Sambrook, 2018).

- Paso 4: se aplica la ecuación logarítmica en base 2 para la transformación de los datos obtenidos utilizando la fórmula  $\log_2 2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Fórmula 4).

$$\log_2 (2^{-\Delta\Delta Ct})$$

Fórmula 4. Fórmula utilizada para obtener la función logarítmica 2 aplicada al resultado obtenido del valor  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  a cada una de las muestras de estudio (Green & Sambrook, 2018).

Tras la transformación de los datos con las fórmulas mencionadas anteriormente, se realizó un análisis de expresión, mediante el procesamiento de los datos con el programa del *GraphPad Prism 6* (GraphPad Software, Inc., California, EE. UU.). Además, se realizó una comparación de los resultados significativos en el programa *qBase* (BioGazelle, Zwijnaarde, Belgium) a fin de comparar y analizar los resultados obtenidos.

Los datos obtenidos se normalizaron con los test D' Agostino-Pearson Omnibus y Shapiro-Wilk para ajustándolos a una distribución normal. Se consideró un *P-valor*  $\leq 0,05$  como diferencia estadística significativa, y con el ajuste de los datos a una distribución normal se aplicaron pruebas paramétricas.

## 4. Resultados

### 4.1 Pacientes

Este trabajo se estableció como un estudio caso-control pareados por sexo:

- I. Grupo “control” en donde se incluyeron 12 pacientes sin FV en el IAM.

## II. Grupo “FV” caracterizado por 12 pacientes con FV durante el IAM.

Las edades de los 24 pacientes incluidos en el estudio estaban comprendidas entre 44 y 85 años. La mediana de edades de la población en estudio con FV y sin FV fue  $59 \pm 14,37$  años y el porcentaje, según sexo de los pacientes, fue de 67,7% de hombres y 33,3% de mujeres. En lo que se refiere a la localización del IAM en los pacientes con FV fue de un 58,3% de IAM anterior y un 41,7% de IAM inferior. Mientras que en los pacientes sin FV la localización anterior del IAM fue de 41,7% y la inferior de 58,3%. En cuanto al número de arterias afectadas, en pacientes con FV en el IAM el 75% presentó afectación de una única arteria y el 25% de los pacientes presentaron 3 arterias afectadas. En cambio, en los pacientes sin FV el 33,3% de los pacientes tuvieron una única arteria afectada, el 25% presentaron 2 arterias afectadas y el 41,7% a pacientes tenían las 3 arterias afectadas. En cuanto al momento en el que se produjo la FV, podemos observar que la FV se desencadenó en un 25% de los pacientes como el síntoma inicial, en un 50% de los casos la FV se produjo durante el transporte al hospital o en urgencias y por último el 25% de los pacientes presentaron la FV durante el procedimiento.

En la Tabla 4 se incluyen las características de la población estudiada, algunas de ellas mencionadas anteriormente. Entre ellas; pacientes con y sin FV, sexo, edad, localización, número de arterias afectadas, y momento de la FV.

Tabla 4. Características de la población en estudio

# Número	FV/ NO FV	Sexo (F/M)	Edad (años)	Localización del IAM	Número de arterias afectadas	Momento de la FV
1	FV	M	50	Anterior	1	Síntoma inicial
2	FV	M	45	Anterior	1	Procedimiento
3	FV	F	65	Inferior	1	Urgencias/Transporte
4	FV	M	69	Anterior	3	Procedimiento

Tabla 4 (continuación). Características de la población en estudio

# Número	FV/ NO FV	Sexo (F/M)	Edad (años)	Localización del IAM	Número de arterias afectadas	Momento de la FV
5	FV	M	47	Inferior	1	Urgencias/Transporte
6	FV	M	30	Anterior	1	Procedimiento
7	FV	F	53	Inferior	1	Urgencias/Transporte
8	FV	F	59	Inferior	1	Síntoma inicial
9	FV	M	55	Inferior	3	Urgencias/Transporte
10	FV	M	71	Anterior	3	Urgencias/Transporte
11	FV	M	57	Anterior	1	Urgencias/Transporte
12	FV	F	44	Anterior	1	N/A
13	NO FV	M	84	Inferior	2	N/A
14	NO FV	F	76	Anterior	2	N/A
15	NO FV	F	50	Anterior	1	N/A
16	NO FV	M	75	Inferior	3	N/A
17	NO FV	M	68	Anterior	1	N/A
18	NO FV	M	81	Inferior	3	N/A
19	NO FV	M	74	Inferior	3	N/A
20	NO FV	M	59	Inferior	3	N/A
21	NO FV	M	53	Anterior	1	N/A
22	NO FV	F	44	Anterior	1	N/A

Tabla 4 (continuación). Características de la población en estudio

# Número	FV/ NO FV	Sexo (F/M)	Edad (años)	Localización del IAM	Número de arterias afectadas	Momento de la FV
23	NO FV	F	85	Inferior	2	N/A
24	NO FV	M	63	Inferior	3	N/A

F: femenino; M: masculino; N/A: no aplica.

## 4.2 Selección de los ARNlnc y genes endógenos de referencia

### 4.2.1 ARNlnc

Mediante la metodología PRISMA se realizó una búsqueda sistemática en artículos científicos, revistas y ensayos clínicos y se seleccionaron 36 referencias bibliográficas para seleccionar ARNlnc que pudiesen tener un posible papel en la FV causado por un IAM. Tras la lectura y análisis de estos artículos se seleccionaron 10 ARNlnc candidatos para el estudio de pacientes con FV en el IAM: *CDKN2B-ASI* o *ANRIL*, *KCNQ1OT1*, *LIPCAR*, *MALAT 1*, *MIAT*, *NEAT1*, *SLC16A1-ASI*, *TK-2-4*, *TNFRSF14-ASI* y *UCA1* mostrados en la Tabla 5.

Tabla 5. ARNlnc objetivos resultados de la búsqueda

Nombre genético	Nombre completo	Función	Patologías asociadas	Referencias
<i>CDKN2B-ASI</i> o <i>ANRIL</i>	ARN 1 antisentido del inhibidor de quinasa 2 B dependiente de ciclina o <i>ANRIL</i>	Controlar los cambios epigenéticos	IM y arritmias cardíacas	Vausort <i>et al.</i> (2014); Li <i>et al.</i> (2019)
<i>KCNQ1OT1</i>	<i>KCNQ1</i> de cadena opuesta / transcriptor antisentido 1	Regula la transcripción de múltiples genes	Síndrome QT largo e insuficiencia cardíaca	Vausort <i>et al.</i> (2014); Yang <i>et al.</i> (2018)

Tabla 5 (continuación). ARNlnc objetivos resultados de la búsqueda

<b>Nombre genético</b>	<b>Nombre completo</b>	<b>Función</b>	<b>Patologías asociadas</b>	<b>Referencias</b>
<i>MALAT 1</i>	Transcrito 1 de adenocarcinoma de pulmón asociado a metástasis	Modular la actividad proteica en genes que favorecen la metástasis	Cardiopatía isquémica	Puthanveetil <i>et al.</i> (2015); Li <i>et al.</i> (2019)
<i>MIAT</i>	Transcriptor asociado a IM	transcripción asociada al IM	IM, FA y la fibrosis miocárdica inducida por la FA	Ishii <i>et al.</i> (2006); Yan <i>et al.</i> (2006)
<i>NEAT1</i>	Transcriptor 1 del ensamblaje del paraspeckle nuclear	Regular la transcripción de múltiples genes	IM, insuficiencia cardíaca y lesión isquémica / reperfusión	Zhao <i>et al.</i> (2018); Gast <i>et al.</i> (2019); Sun <i>et al.</i> (2020)
<i>SLC16A1-ASI</i>	<i>SLC16A1</i> ARN antisentido 1	Regular el ciclo celular	IAM	Zhou <i>et al.</i> (2016); Jansen <i>et al.</i> (2017); Zhai <i>et al.</i> (2017)
<i>TK-2-4</i>	Transcriptor del <i>lnc-TK2-4</i>	Intervenir en las regulaciones epigenéticas	Cardiomiopatía	Sarin <i>et al.</i> (2016); Huang <i>et al.</i> (2017)
<i>TNFRSF14-ASI</i>	<i>TNFRSF14</i> antisentido ARN 1	Codificar proteína	IAM	Schmidt <i>et al.</i> (2016); Zhai <i>et al.</i> (2017)
<i>UCA1</i>	Asociado a carcinoma urotelial 1	Regular la proliferación celular	IM con elevación del ST, angina inestable	Huang <i>et al.</i> (2015); Yan <i>et al.</i> (2016)

#### 4.2.2 Genes endógenos de referencia

Para comprobar que los genes endógenos de referencia eran los idóneos para ser utilizados como controles en las siguientes placas, se analizó la expresión de 8 posibles genes (*ACTB*, *B2M*, *GUSB*, *HPRT*, *PPIA*, *RPLP0*, *TBP*, *TFRC*) en las muestras de pacientes con y sin FV en el IAM.

Los resultados obtenidos tras la *qPCR* fueron importados al programa *geNorm* y clasificados según su estabilidad de expresión. En una representación gráfica se pudo observar la replicación de los genes, siendo *ACTB* y *RPLP0* aquellos que mostraron una menor desviación estándar, y una mayor estabilidad en su expresión en las muestras analizadas (Tabla 6).

Tabla 6. Resultados obtenidos del programa *geNorm* de los genes *ACTB* y *RPLP0*

Genes endógenos de referencia	M	CV
<i>ACTB</i>	1,089	0,522
<i>RPLP0</i>	1,089	0,321
<b>Media</b>	<b>1,089</b>	<b>0,422</b>

CV: coeficiente de variación; M: media

#### 4.3 Análisis de expresión y análisis de datos de los ARNlnc

El análisis de expresión de los 10 ARNlnc bajo estudio mostró una expresión significativamente menor ( $P\text{-valor} \leq 0,05$ ) en los ARNlnc *CDKN2B-AS1* o *ANRIL* y *KCNQ1OT1* en pacientes con FV frente a los pacientes sin FV en el IAM (Figura 5).

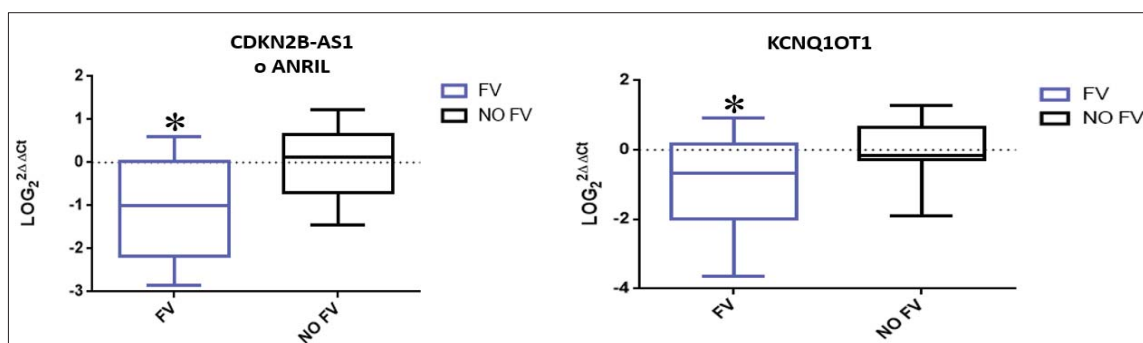


Figura 5. ARNlnc que presentaron una disminución significativa en la expresión en pacientes con FV en el IAM vs pacientes sin FV en el IAM. \*  $P\text{-valor} \leq 0,05$ .

En la tabla 7, se muestran los resultados obtenidos ( $P$ -valor  $\leq 0,05$ ) de los ARNlnc *CDKN2B-AS1* o *ANRIL* y *KCNQ1OT1* en la prueba  $t$ -test frente a los resultados obtenidos en el programa bioinformático *qBase*.

Tabla 7. Resultados obtenidos del  $t$ -test y *qBase*.

Pacientes en estudio	<i>CDKN2B-AS1</i> o <i>ANRIL</i>		<i>KCNQ1OT1</i>	
	$t$ -test ( $P$ -valor)	<i>qBase</i> ( $P$ -valor)	$t$ -test ( $P$ -valor)	<i>qBase</i> ( $P$ -valor)
FV / NO FV	0,0180	0,0243	0,0487	0,0462

A continuación, se muestran los 8 ARNlnc restantes que no mostraron resultados significativos en los pacientes con y sin FV en el IAM (Figura 6 y 7).

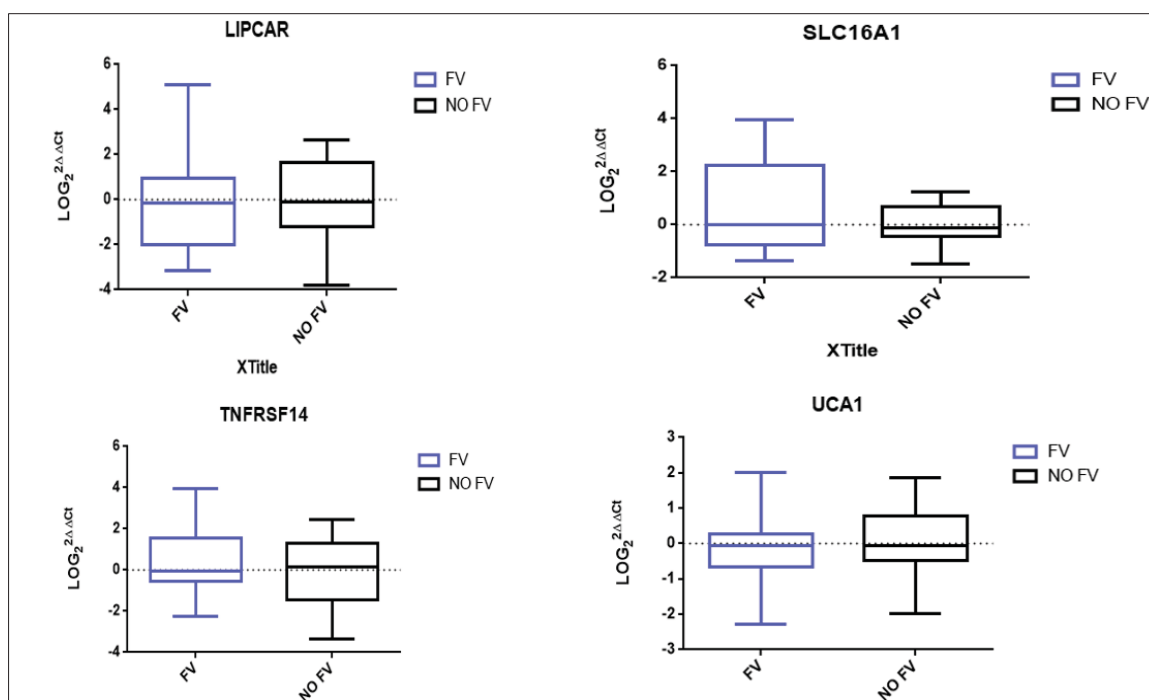


Figura 6. Resultados de la expresión relativa de los ARNlnc *TK-2-4*, *MIAT*, *MALAT1* y *NEAT1* en pacientes con y sin FV en el IAM que no presentaron una modificación significativa.



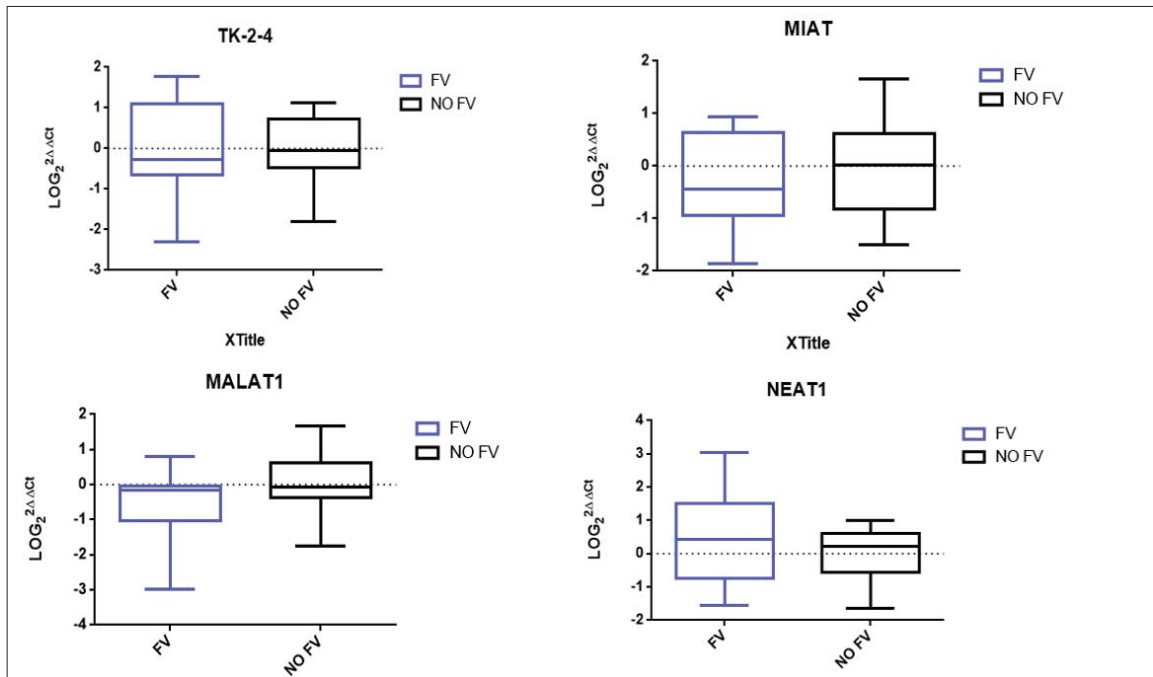


Figura 7. Resultados de la expresión relativa de los ARNlnc *LIPCAR*, *SLC16A1*, *TNFRSF14* y *UCA1* en pacientes con y sin FV en el IAM que no presentaron una modificación significativa.

## 5. Discusión

En este trabajo se analizó la expresión de 10 ARNlnc (*MIAT*, *CDKN2B-AS1* o *ANRIL*, *MALAT*, *NEAT1*, *KCNQ1OT1*, *UCA1*, *LIPCAR*, *SLC16A1-AS1*, *TK2-4*, *TNFRSFM-AS1*), en 24 pacientes con IAM, 12 de ellos con FV. Se identificaron 2 ARNlnc, *CDKN2B-AS1* y *KCNQ1OT1*, con una expresión significativamente menor en los pacientes con FV en comparación con aquellos pacientes sin FV en el IAM, en la fisiopatología de la FV en el IAM.

### 5.1 *CDKN2B-AS1* o *ANRIL* en el IAM durante la FV

El ARN 1 antisentido del inhibidor de quinasa 2B dependiente de ciclina (*CDKN2B-AS1*), también nombrado como ARN no codificante antisentido en el locus *INK4* (*ANRIL*), es un ARN no codificante de proteína largo categorizado como un ARN circular de alrededor 3,8 kb de longitud, ubicado en el brazo corto del cromosoma 9 humano en la p21, que se encuentra dentro del grupo de genes *CDKN2B-CDKN2A* (Kunnas *et al.*, 2018; Temel & Ergören, 2019).

El producto de los genes *CDKN2B-CDKN2A* es una molécula de ARN funcional que interacciona con el complejo represivo polycomb-1 (PRC1) y -2 (PRC2), y a través de estas interacciones, participa en la represión transcripcional (Manjula *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2021). Se ha evaluado que la región 9p21 es una diana importante en los estudios relacionados con el proceso de envejecimiento celular, debido a su posible asociación a enfermedades cardiovasculares, y otras patologías que incluyen varios tipos cánceres, diabetes tipo II, Alzheimer, fragilidad en los ancianos, y glaucoma (Sun *et al.*, 2018; Manjula *et al.*, 2020).

El *CDKN2B-AS1* o *ANRIL* se expresa en las células endoteliales vasculares y células del músculo liso coronario, en donde la regulación del nivel de expresión de este ARNlnc puede afectar a la proliferación y senescencia o envejecimiento de las células vasculares (Sun *et al.*, 2018). Además, la variación genética del *CDKN2B-AS1* o *ANRIL* está relacionada estrechamente con las enfermedades cardiovasculares al mediar la respuesta a través de la señalización inflamatoria (Kunnas *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2018)

En esta investigación se observó que la expresión del *CDKN2B-AS1* o *ANRIL* se encontraba disminuida en los pacientes analizados con FV durante IAM con respecto al grupo control de los pacientes sin FV en el IAM. Recientemente, este ARNlnc se asoció a otro tipo de arritmia como es la fibrilación auricular (FA), y enfermedades coronarias (Zhou *et al.*, 2016). El estudio realizado por Vausort *et al.* (2014) acerca de ARNlnc en pacientes con IAM, realizaron una comparación entre pacientes sanos y pacientes con IAM a través del análisis de los niveles de expresión de células de la sangre periférica o circulante por *qPCR*, en donde los niveles de *CDKN2B-AS1* o *ANRIL* fueron menores en pacientes con IAM en comparación con los sanos voluntarios, además se asoció a factores de riesgos cardiovasculares (edad, diabetes mellitus e hipertensión) y la alteración de la función del ventrículo izquierdo.

Por lo tanto, teniendo en cuenta los resultados de este trabajo y la bibliografía existente, el ARNlnc *CDKN2B-AS1* o *ANRIL* pudieran tener un papel en las fisiopatologías de las arritmias y la enfermedad coronaria.

## 5.2 KCNQ1OT1 en el IAM durante la FV

El *KCNQ1* de cadena opuesta o transcripto antisentido 1 (*KCNQ1OT1*) es un ARNlnc cuya función es regular la expresión de otros genes a través de transformaciones epigenéticas. Este ARNlnc está sujeto a un mecanismo que solo permite su expresión en el alelo paterno, promueve la formación de la estructura de la cromatina, y participa en el desarrollo cardíaco. Además, está localizado en la región cromosómica 11p15 siendo controlada esta región por el centro regulador de la impronta ICR2 localizado en el intrón 10 de *KCNQ1* (Zhang *et al.*, 2017; Gu *et al.*, 2019). El gen *KCNQ1* codifica para la subunidad Kv11.1 del canal del potasio a través del cual se genera la corriente  $I_{Ks}$  (Li *et al.*, 2017; Gurha, 2019).

El silenciamiento epigenético del *KCNQ1OT1* induce a la pérdida de la impronta genética o *imprinting* del *KCNQ1*, de esta forma, *KCNQ1OT1* regula la expresión de los canales cardíacos codificados por el gen *KCNQ1* (Coto *et al.*, 2017; Mejía *et al.*, 2018). Las investigaciones recientes del ARNlnc *KCNQ1OT1* en el síndrome de QT han permitido conocer sus funciones a través de la identificación de un *SPN* (rs11023840) en estos pacientes. Así, la investigación realizada por Coto *et al.* (2020) sobre un estudio cohorte de 131 pacientes con QT corto prolongado asintomático y 240 controles sanos, mostró que la expresión disminuida del ARNlnc *KCNQ1OT1* vinculado al alelo A, podría dar lugar a una expresión del gen *KCNQ1* que se relaciona a una variante de riesgo al síndrome de QT corto prolongado.

En nuestro estudio, los resultados obtenidos del ARNlnc *KCNQ1OT1* mostró una expresión disminuida en pacientes con FV en IAM, lo que permite establecer un posible vínculo con los resultados obtenidos, la bibliografía investigada, y su función metabólica en la regulación de la expresión del gen *KCNQ1*.

En consecuencia, los resultados obtenidos y las investigaciones realizadas muestran que existe una relación con los ARNlnc *CDKN2B-AS1* y *KCNQ1OT1* en la FV tras un IAM. Sin embargo, este trabajo se tiene que considerar un estudio preliminar, debido al bajo número de muestras analizadas. Sería conveniente realizar un estudio con mayor número de muestra e incorporar pacientes con factores de riesgos y extender el estudio a otras zonas geográficas a fin de confirmar su asociación en los pacientes con FV tras un IAM. De confirmarse nuestros

resultados en estudios con un mayor número de muestras estos dos ARNlnc podrían: a) ayudar a comprender la fisiopatología de la FV en el IAM, b) tener un papel en la estratificación del riesgo ante del desarrollo de la FV durante una isquemia aguda, c) ayudar a seleccionar pacientes en los que se debe establecer medidas preventivas para evitar la MS, d) abrir nuevas dianas farmacológicas, y e) estudiar a fondo los factores desencadenantes y/o facilitadores acerca de la inestabilidad eléctrica en el miocardio isquémico.

## 6. Conclusiones/Conclusións/Conclusions

### Conclusiones

Una vez realizado el trabajo de fin de máster podemos concluir:

1. El ARNlnc *CDKN2B-AS1* está significativamente menos expresado en pacientes con FV en el IAM.
2. El ARNlnc *KCNQ1OT1* está significativamente menos expresado en pacientes con FV en el IAM.
3. Ambas disminuciones podrían tener relación con la FV en el IAM, pero debido al bajo número de pacientes incluidos en este estudio, será necesario ampliar la casuística para confirmar estos resultados.

### Conclusións

Unha vez rematado o traballo de fin de máster, podemos concluir:

1. Os ARNlnc *CDKN2B-AS1* ou *ANRIL* esta significativamente menos expresado en doentes con FV en IAM.
2. Os ARNlnc *KCNQ1OT1* está significativamente menos expresado en doentes con FV en IAM.
3. Ambas as diminucións poderían estar relacionadas coa FV no IAM, pero debido ao baixo número de doentes incluídos neste estudo, será necesario ampliar a casuística para confirmar estes resultados.

## **Conclusions**

Once the master's thesis has been completed, we can conclude:

1. The *CDKN2B-AS1* lncRNA is significantly less expressed in patients with VF in AMI.
2. The *KCNQ1OT1* lncRNA is significantly less expressed in patients with VF in AMI.
3. Both decreases could be related to VF in AMI, but due to the low number of patients included in this study, it will be necessary to expand the casuistry to confirm these results.

## **7. Bibliografía**

Asaria, P., Elliott, P., Douglass, M., Obermeyer, Z., Soljak, M., Majeed, A., & Ezzati, M. (2017). Acute myocardial infarction hospital admissions and deaths in England: a national follow-back and follow-forward record-linkage study. *The Lancet Public Health*, 2(4), e191–e201. [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(17\)30032-4](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(17)30032-4)

Barretta, F., Mirra, B., Monda, E., Caiazza, M., Lombardo, B., Tinto, N., Scudiero, O., Frisso, G., & Mazzaccara, C. (2020). The hidden fragility in the heart of the athletes: a review of genetic biomarkers. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), Article 6682. <https://doi.org/10.3390/ijms21186682>

Bauters, C., Kumarswamy, R., Holzmann, A., Bretthauer, J., Anker, S. D., Pinet, F., & Thum, T. (2013). Circulating miR-133a and miR-423-5p fail as biomarkers for left ventricular remodeling after myocardial infarction. *International Journal of Cardiology*, 168(3), 1837–1840. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2012.12.074>

Bayés de Luna, A., & Elosua, R. (2012). Muerte súbita [Sudden death]. *Revista Española de Cardiología*, 65(11), 1039-1052. <https://doi.org/10.1016/j.recesp.2012.03.032>

Beermann, J., Piccoli, M. T., Viereck, J., & Thum, T. (2016). Non-coding RNAs in development and disease: background, mechanisms, and therapeutic approaches. *Physiological Reviews*, 96(4), 1297–1325. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2015>

Chorro Gascó, F., Garcia Civera, R., López Merino, V. (Eds.) (2007). *Cardiología clínica*. Universitat de València.

Congrains, A., Kamide, K., Oguro, R., Yasuda, O., Miyata, K., Yamamoto, E., Kawai, T., Kusunoki, H., Yamamoto, H., Takeya, Y., Yamamoto, K., Onishi, M., Sugimoto, K., Katsuya, T., Awata, N., Ikebe, K.,

- Gondo, Y., Oike, Y., Ohishi, M., & Rakugi, H. (2012). Genetic variants at the 9p21 locus contribute to atherosclerosis through modulation of ANRIL and CDKN2A/B. *Atherosclerosis*, *220*(2), 449–455. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.11.017>
- Corral-Vazquez, C., Blanco, J., Vidal, F., & Anton, E. (2017). RNA espermático: ¿huella de eventos pasados o dote para el embrión? [Sperm RNA: footprint of past events or a dowry for the embryo?] *Medicina Reproductiva y Embriología Clínica*, *4*(2), 59–71. <https://doi.org/10.1016/j.medre.2017.03.002>
- Coto, E., Calvo, D., Reguero, J. R., Morís, C., Rubín, J. M., Díaz-Corte, C., Gil-Peña, H., Alosno, B., Iglesias, S., & Gómez, J. (2017). Differential methylation of lncRNA KCNQ1OT1 promoter polymorphism was associated with symptomatic cardiac long QT. *Epigenomics*, *9*(8), 1049–1057. <https://doi.org/10.2217/epi-2017-0024>
- De Ferrari, G. M., Dusi, V., Ruffinazzi, M., Masiello, L. C., Ruffino, E., Cacciavillani, L., Noussan, P., Zacà, V., Sanna, T., Lazzarotti, M. L., Usmiani, T., Gneccchi, M., Parati, G., Crotti, L., & Schwartz, P. J. (2020). Risk factors for primary ventricular fibrillation during a first myocardial infarction: Clinical findings from PREDESTINATION (Primary ventricular fibrillation and sudden death during first myocardial infarction). *International Journal of Cardiology*, *302*, 164–170. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2019.10.060>
- de Jonge, H. J., Fehrmann, R. S., de Bont, E. S., Hofstra, R. M., Gerbens, F., Kamps, W. A., de Vries, E. G., van der Zee, A. G., te Meerman, G. J., & ter Elst, A. (2007). Evidence based selection of housekeeping genes. *PLoS ONE*, *2*(9), Article e898. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000898>
- Fonseca, F., Izar, M. C., Maugeri, I., Berwanger, O., Damiani, L. P., Pinto, I. M., Szarf, G., França, C. N., Bianco, H. T., Moreira, F. T., Caixeta, A., Alves, C., Soriano Lopes, A., Klassen, A., Tavares, M., Fonseca, H. A., Carvalho, A. (2017). Effects of four antiplatelet/statin combined strategies on immune and inflammatory responses in patients with acute myocardial infarction undergoing pharmacoinvasive strategy: design and rationale of the B and T types of lymphocytes evaluation in acute myocardial infarction (BATTLE-AMI) study: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*, *18*, Article 601. <https://doi.org/10.1186/s13063-017-2361-1>
- Giner, M., Montoya, M. J., Vázquez, M. A., Miranda, C., Miranda, M. J., & Pérez-Cano, R. (2016). ¿Qué son los microARNs? posibles biomarcadores y dianas terapéuticas en la enfermedad osteoporótica. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, *8*(1), 40–44. <https://doi.org/10.4321/s1889-836x2016000100007>
- Glinge, C., Engstrøm, T., Midgley, S. E., Tanck, M. W. T., Halkjær Madsen, J. E., Pedersen, F., Jacobsen, M. R., Lodder, E. M., Al-Hussainy, N. R., Stampe, N. K., Trebbien, R., Køber, L., Gerds, T., Torp-Pedersen, C., Fischer, T. K., Bezzina, C. R., Tfelt-Hansen, J., & Jabbari, R. (2020). Seasonality of ventricular fibrillation at first myocardial infarction and association with viral exposure. *PLoS ONE*, *15*(2), Article e0226936. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226936>

- Gomes, C. P. C., Spencer, H., Ford, K. L., Michel, L. Y. M., Baker, A. H., Emanuelli, C., Balligand, J. L., & Devaux, Y. (2017). The function and therapeutic potential of long non-coding RNAs in cardiovascular development and disease. *Molecular therapy - Nucleic Acids*, 8, 494–507. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.07.014>
- González, D., Gao, Q., & Cao, F. (2017). Long noncoding RNAs (LncRNAs) — The dawning of a new treatment for cardiac hypertrophy and heart failure. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1863(8), 2078–2084. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.02.024>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2018). Analysis and normalization of real-time polymerase chain reaction (PCR) experimental data. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(10). <https://doi.org/10.1101/pdb.top095000>
- Gurha, P. (2019). Noncoding RNAs in cardiovascular diseases. *Current Opinion in Cardiology*, 34(3), 241–245. <https://doi.org/10.1097/HCO.0000000000000615>
- Hervella, K., Alpert, J. S., Jaffe, A. S., Simoons, M. L., Chaitman, B. R., White, H. D., Katus, H. A., Apple, F. S., Lindahl, B., Morrow, D. A., Clemmensen, P. M., Johanson, P., Hod, H., Underwood, R., Bax, J. J., Bonow, R. O., Pinto, F., Gibbons, R. J., Fox, K. A., Wagner, D. R. (2012). Third universal definition of myocardial infarction. *European Heart Journal*, 33(20), 2551–2567. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs184>
- Hervella, M. I., Carratalá-Munuera, C., Orozco-Beltrán, D., López-Pineda, A., Bertomeu-González, V., Gil-Guillén, V. F., Pascual, R., & Quesada, J. A. (En prensa). Tendencias de mortalidad prematura por cardiopatía isquémica en España durante el periodo 1998-2018. *Revista Española de Cardiología*. <https://doi.org/10.1016/j.recesp.2020.09.012>
- Ishii, N., Ozaki, K., Sato, H., Mizuno, H., Susumu Saito, Takahashi, A., Miyamoto, Y., Ikegawa, S., Kamatani, N., Hori, M., Satoshi Saito, Nakamura, Y., & Tanaka, T. (2006). Identification of a novel non-coding RNA, MIAT, that confers risk of myocardial infarction. *Journal of Human Genetics*, 51(12), 1087–1099. <https://doi.org/10.1007/s10038-006-0070-9>
- Jabbari, R., Glinge, C., Jabbari, J., Risgaard, B., Winkel, B. G., Terkelsen, C. J., Tilsted, H. H., Jensen, L. O., Hougaard, M., Haunsø, S., Engstrøm, T., Albert, C. M., & Tfelt-Hansen, J. (2017). A common variant in SCN5A and the risk of ventricular fibrillation caused by first ST-segment elevation myocardial infarction. *PLoS ONE*, 12(1), Article e0170193. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170193>
- Kunnas, T., Piesanen, J., & Nikkari, S. T. (2018). Association of a chromosome locus 9p21.3 CDKN2B-AS1 variant rs4977574 with hypertension: the TAMRISK study. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 22(5), 327–330. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2017.0249>
- Li, M., Wang, L.-F., Yang, X.-C., Xu, L., Li, W.-M., Xia, K., Zhang, D.-P., Wu, R.-N., & Gan, T. (2018). Circulating long noncoding RNA LIPCAR acts as a novel biomarker in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Medical Science Monitor* 24, 5064–5070. <https://doi.org/10.12659/MSM.909348>

- Li, X., Dai, Y., Yan, S., Shi, Y., Han, B., Li, J., Cha, L., & Mu, J. (2017). Down-regulation of lncRNA KCNQ1OT1 protects against myocardial ischemia/reperfusion injury following acute myocardial infarction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 491(4), 1026–1033. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.08.005>
- Long, Q. Q., Wang, H., Gao, W., Fan, Y., Li, Y. F., Ma, Y., Yang, Y., Shi, H. J., Chen, B. R., Meng, H. Y., Wang, Q. M., Wang, F., Wang, Z. M., & Wang, L. S. (2017). Long noncoding RNA KCNA2 antisense RNA contributes to ventricular arrhythmias via silencing KCNA2 in rats with congestive heart failure. *Journal of the American Heart Association*, 6(12), Article e005965. <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.005965>
- López Ramírez, M., Ramos Emperador, C., Gómez Fernández, M., Peña Fernández, N. E., Fusté Pedroso, W., Tamargo Barbeito, T. O., Moya Liriano, H., López Ramírez, D (2017). Factores relacionados con la muerte súbita en pacientes con infarto agudo de miocardio. *CorSalud*, 9(2), 70–79. <http://www.revcorsalud.sld.cu/index.php/cors/article/view/149/488>
- Manjula, G., Pranavchand, R., Kumuda, I., Reddy, B. S., & Reddy, B. M. (2020). The SNP rs7865618 of 9p21.3 locus emerges as the most promising marker of coronary artery disease in the southern Indian population. *Scientific Reports*, 10(1), Article 21511. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77080-4>
- Motterle, A., Pu, X., Wood, H., Xiao, Q., Gor, S., Ng, F. L., Chan, K., Cross, F., Shohreh, B., Poston, R. N., Tucker, A. T., Caulfield, M. J., & Ye, S. (2012). Functional analyses of coronary artery disease associated variation on chromosome 9p21 in vascular smooth muscle cells. *Human Molecular Genetics*, 21(18), 4021–4029. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds224>
- Ono, K., Kuwabara, Y., Horie, T., & Kimura, T. (2018). Long non-coding RNAs as key regulators of cardiovascular diseases. *Circulation Journal*, 82(5), 1231–1236. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-18-0169>
- Puthanveetil, P., Chen, S., Feng, B., Gautam, A., & Chakrabarti, S. (2015). Long non-coding RNA MALAT1 regulates hyperglycaemia induced inflammatory process in the endothelial cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 19(6), 1418–1425. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12576>
- Rodríguez-Reyes, H., Muñoz Gutiérrez, M., Márquez, M. F., Pozas Garza, G., Asensio Lafuente, E., Ortíz Galván, F., Lara Vaca, S., & Mariona Montero, V. A.. (2015). Muerte súbita cardiaca. Estratificación de riesgo, prevención y tratamiento. *Archivos de Cardiología de México*, 85(4), 329-336. <https://doi.org/10.1016/j.acmx.2015.06.002>
- Sallam, T., Sandhu, J., & Tontonoz, P. (2018). Long noncoding RNA discovery in cardiovascular disease: decoding form to function. *Circulation Research*, 122(1), 165–171. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311802>



- Santos Medina, M., Ricardo Mora, E., Rodríguez Ramos, M., & Batista Bofill, S. (2020). Parada cardíaca súbita por arritmia ventricular en pacientes con infarto agudo de miocardio. *CorSalud*, 12(1), 46-53. <http://www.revcorsalud.sld.cu/index.php/cors/article/view/598/1095>
- Sun, C., Huang, L., Li, Z., Leng, K., Xu, Y., Jiang, X., & Cui, Y. (2018). Long non-coding RNA *MIAT* in development and disease: a new player in an old game. *Journal of Biomedical Science*, 25, Article 23. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0427-3>
- Sun, X. L., Lv, J. L., Dou, L., Chen, D., Zhu, Y. C., & Hu, X. (2020). LncRNA *NEAT1* promotes cardiac hypertrophy through microRNA-19a-3p/SMYD2 axis. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 24(3), 1367–1377. [https://doi.org/10.26355/eurev\\_202002\\_20194](https://doi.org/10.26355/eurev_202002_20194)
- Szabó, Z., Ujvárosy, D., Ötvös, T., Sebestyén, V., & Nánási, P. P. (2020). Handling of ventricular fibrillation in the emergency setting. *Frontiers in Pharmacology*, 10, Article 1640. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01640>
- Temel, Ş. G., & Ergören, M. Ç. (2019). The association between the chromosome 9p21 *CDKN2B-AS1* gene variants and the lipid metabolism: a pre-diagnostic biomarker for coronary artery disease. *Anatolian Journal of Cardiology*, 21, 31–38. <https://doi.org/10.14744/AnatolJCardiol.2018.90907>
- Vausort, M., Wagner, D. R., & Devaux, Y. (2014). Long noncoding RNAs in patients with acute myocardial infarction. *Circulation Research*, 115, 668–677. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.303836>
- Wang, Q., Zhao, J., Chang, H., Liu, X., & Zhu, R. (2021). Association between lncRNA ANRIL genetic variants with the susceptibility to ischemic stroke: from a case-control study to meta-analysis. *Medicine*, 100(11), Article e25113. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000025113>
- Wei, J. L., Wu, C. J., Chen, J. J., Shang, F. T., Guo, S. G., Zhang, X. C., & Liu, H. (2020). LncRNA *NEAT1* promotes the progression of sepsis-induced myocardial cell injury by sponging miR-144-3p. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 24(2), 851–861. [https://doi.org/10.26355/eurev\\_202001\\_20069](https://doi.org/10.26355/eurev_202001_20069)
- Yang, F., Qin, Y., Lv, J., Wang, Y., Che, H., Chen, X., Jiang, Y., Li, A., Sun, X., Yue, E., Ren, L., Li, Y., Bai, Y., & Wang, L. (2018). Silencing long non-coding RNA *KCNQ1OT1* alleviates pyroptosis and fibrosis in diabetic cardiomyopathy. *Cell Death and Disease*, 9, Article 1000. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1029-4>
- Yeh, C. F., Chang, Y. C. E., Lu, C. Y., Hsuan, C. F., Chang, W. T., & Yang, K. C. (2020). Expedition to the missing link: long noncoding RNAs in cardiovascular diseases. *Journal of Biomedical Science*, 27, Article 48. <https://doi.org/10.1186/s12929-020-00647-w>

Zhai, H., Li, X. M., Liu, F., Chen, B. D., Zheng, H., Wang, X. M., Liao, W., Chen, Q. J., Ma, Y. T., & Yang, Y. N. (2017). Expression pattern of genome-scale long noncoding RNA following acute myocardial infarction in chinese Uyghur patients. *Oncotarget*, *8*, 31449–31464. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16355>

Zhang, Z., Gao, W., Long, Q. Q., Zhang, J., Li, Y. F., Liu, D. C., Yan, J. J., Yang, Z. J., & Wang, L. S. (2017). Increased plasma levels of lncRNA H19 and LIPCAR are associated with increased risk of coronary artery disease in a chinese population. *Scientific Reports*, *7*, Article 7491. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07611-z>

Zhou, X., Han, X., Wittfeldt, A., Sun, J., Liu, C., Wang, X., Gan, L. M., Cao, H., & Liang, Z. (2016). Long non-coding RNA ANRIL regulates inflammatory responses as a novel component of NF- $\kappa$ B pathway. *RNA Biology*, *13*(1), 98–108. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1122164>

Zhu, X. H., Yuan, Y. X., Rao, S. L., & Wang, P. (2016). LncRNA MIAT enhances cardiac hypertrophy partly through sponging miR-150. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, *20*(17), 3653–3660. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27649667/>