



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA**

TITULO

**ANÁLISIS MIRNAS COMO REGULADORES CLAVE EN LA DILATACIÓN DE AORTA
ASCENDENTE EN PACIENTES CON VÁLVULA AORTICA BIVALVA OPERADOS POR
ESTENOSIS AORTICA**

**TESIS DE POSGRADO
PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALIDAD EN:
CIRUGÍA CARDIOTORÁCICA**

**PRESENTA:
ANTONIO DE JESUS SANCHEZ GARCIA
RESIDENTE DE CIRUGÍA CARDIOTORÁCICA**

**MAURICIO SOULE EGEA
TUTOR CIRUGIA CARDIOTORACICA Y JEFE DE SERVICIO**

**MARIA ELENA SOTO LOPEZ
TUTOR Y ASESOR METODOLOGICO DE TESIS
INVESTIGADORA EN CIENCIAS MEDICAS SNI-III**

**GIOVANNY FUENTEVILLA-ÁLVAREZ
TUTOR ASESOR BIOLOGIA MOLECULAR**



Dirección de Enseñanza

CIUDAD DE MEXICO, JULIO DEL 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CERTIFICAN:

Que el **Dr. Antonio de Jesús Sánchez García**, ha realizado bajo su dirección y supervisión la Tesis titulada "**ANÁLISIS MIRNAS COMO REGULADORES CLAVE EN LA DILATACIÓN DE AORTA ASCENDENTE EN PACIENTES CON VÁLVULA AORTICA BIVALVA OPERADOS POR ESTENOSIS AORTICA**" y que dicho trabajo reúne las condiciones de rigor y originalidad científica necesarias para ser presentado como tesis.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente certificación en la

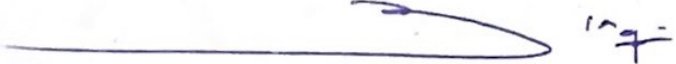
Ciudad de México a 8 días del mes de julio del año 2024.

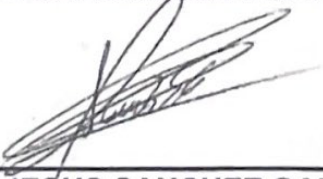


Dirección de Enseñanza


DR. CARLOS RAFAEL SIERRA FERNÁNDEZ
DIRECTOR DE ENSEÑANZA
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ


DR. MARIA ELENA SOTO LOPEZ
ASESOR Y TUTOR METODOLÓGICO Y ESTADÍSTICO DE TESIS
INVESTIGADORA EN CIENCIAS MEDICAS SNI-III
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ


DR. BENJAMÍN IVÁN HERNÁNDEZ MEJÍA
PROFESOR TITULAR DEL CURSO
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ


DR. ANTONIO DE JESUS SANCHEZ GARCIA
AUTOR DE TESIS
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, por guiarme en el inicio de este gran proyecto de conocimiento y vida. Al darme la fortaleza, paciencia y humildad para seguir adelante.

A mis padres, que siempre me han brindado su apoyo para cumplir mis objetivos, expresarles mi más profundo agradecimiento por todo su apoyo, amor y sacrificio en toda mi vida y en mi formación académica. Su constante apoyo y guía han sido fundamentales hacia el éxito personal y académico. Gracias por ser mi inspiración y por creer en mí. Su amor sin duda ha sido mi mayor motivación.

A Michelle, quien fue el ingrediente perfecto para poder alcanzar esta victoria, quiero agradecerle por tu amor, paciencia y apoyo incondicional durante mi formación académica. Tu presencia ha sido mi mayor fuente de inspiración y motivación en los momentos más difíciles. Gracias por acompañarme, escucharme, alentarme y por siempre creer en mí. Tu amor y comprensión han sido los pilares en este proceso.

A mis maestros expresar mi más sincero agradecimiento, quienes con su dedicación, conocimiento y apoyo incondicional, han sido fundamentales en mi formación académica. Gracias por inspirarme, motivarme y guiarme en este camino hacia la excelencia. Su influencia ha dejado una huella imborrable en mi desarrollo profesional y personal.

A mi siempre y querida casa el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chavez por su invaluable apoyo y recursos brindados durante mi formación y donde sin duda fue una de las mejores etapas de mi vida. Su compromiso con la investigación y la excelencia en el campo de la cardiología han sido fundamentales para el desarrollo de este trabajo.

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	2
III. MARCO TEORICO	2
A. Biología de los microRNAs	3
B. miRNAs y enfermedades cardiovasculares	3
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	6
Hipótesis.....	6
A. Hipótesis alterna	6
B. Hipótesis nula.....	6
V. JUSTIFICACIÓN	6
VI. OBJETIVOS.....	7
VII. DISEÑO DEL ESTUDIO	8
VIII. PACIENTES Y MÉTODO	8
A. Lugar o sitio del estudio.....	8
B. Criterios de selección	8
1. Criterios de inclusión.....	8
2. Criterios de exclusión.....	8
3. Criterios de eliminación.....	9
IX. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	11
X. RESULTADOS.....	12
XI. DISCUSIÓN	24
XII. CONCLUSIONES	27
XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	27

I. RESUMEN

La válvula aórtica bivalva es una de las malformaciones cardíacas congénitas más prevalentes, con una incidencia global del 1% al 2%, está asociada con un alto riesgo de disfunción de la válvula aórtica y complicaciones de la aorta.

La evolución puede ser compleja y heterogénea, se acompaña de muchos eventos vasculares adversos y la presentación es observada en forma aguda y crónica. Se ha propuesto que los efectos hemodinámicos y el trastorno genético primario interactúan en diversos grados, causando simultáneamente la progresión de la aortopatía. Los microRNAs (miRNA) son una de clase ácido ribonucleico (RNA) no codificante de pequeño tamaño con alrededor de 20 a 25 nucleótidos, que se encuentran involucrados en la regulación de la expresión génica. Estos miRNA's regulan funciones de muchos tipos celulares y están directamente asociadas con la fisiopatología de un gran número de enfermedades cardiovasculares

Los miRNA's circulantes se han sugerido como posibles biomarcadores de enfermedad en aorta bivalva por lo cual será importante identificar si hay asociación con el tipo de aortopatía. Existe poca información de las vías de señalización involucradas, así como la interacción de los miRNA's con la progresión de la aortopatía.

El estudio de la participación de diversos mecanismos de daño asociados en aorta bivalva permite establecer una comprensión de los mecanismos implicados en la función reguladora del miRNA's lo cual podría reflejar procesos de remodelación en la aorta proximal en pacientes con aortopatía bivalva. El análisis de cada uno puede permitir a futuro definir dianas diagnósticas y terapéuticas. Hay información suficiente de como algunos miRNA's participan de forma específica en Insuficiencia cardíaca, arritmias, hipertrofia ventricular, enfermedad coronaria, IAM, y calcificación de la válvula. Algunos otros han sido enfocados a evaluar la morfología valvular y otros en la participación del estrés. Por lo que en este estudio nos enfocaremos en la identificación de miRNA-17-5p, hsa-let-7e, miRNA-196a-5p y la patología de válvula aórtica y de aorta.

TITULO

ANÁLISIS MIRNAS COMO REGULADORES CLAVE EN LA DILATACIÓN DE AORTA ASCENDENTE EN PACIENTES CON VÁLVULA AORTICA BIVALVA OPERADOS POR ESTENOSIS AORTICA

Objetivo: Cuantificar la expresión de los miRNA-17-5p, hsa-let-7e, miRNA-196-5p en tejido valvular de pacientes con aorta bivalva e Identificar miRNA y el tipo de aortopatía y tipo de válvula aórtica bicúspide.

Material y Método: Un total de 78 pacientes con aorta bivalva fueron incluidos, 17 (22%) mujeres y 61 (78) hombres con edad promedio general de 58 ± 12 . De los cuales 40 (52%) casos con aorta bivalva y 38 (48) controles con aorta trivalva. Se trata de un estudio observacional, analítico, prospectivo, el estudio se realizó en el Instituto Nacional de Cardiología, Ciudad de México, del año 2023-2024.

Resultados: Las cirugías realizadas fueron 27 Bentall y de Bono 9 (22.5%) pacientes, bivalva y 18 (47.3%) trivalva, procedimiento de Wheat 16 (20.5%) pacientes, bivalva 10 (25%) y trivalva 6 (15.7%), Cambio valvular aórtico 26 (33%) pacientes, bivalva 19 (47.5%) y trivalva 7 (18.4%), prótesis mecánica 46 (63%) pacientes, bivalva 28 (70%) y trivalva 21 (55%), prótesis biológica 27 (35%) pacientes, bivalva 10 (25%) y trivalva 17 (45%).

La mortalidad se presentó en tres pacientes (3.8%), se presentaron en los casos de aorta bivalva (7.5%), las causas fueron por choque cardiogénico.

La sobrevida a 30 días es menor en el grupo de aorta bivalva lo cual es del 92.3% posterior a lo cual se mantiene hasta los 26 meses de seguimiento y en los casos tratados con aorta trivalva fue del 100% en esta serie y se mantuvo hasta los 26 meses del seguimiento de estos pacientes.

Conclusiones:

este trabajo confirma el papel crucial de los miRNAs en la patogénesis de la dilatación aórtica en pacientes con VAB, subrayando su potencial como herramientas diagnósticas y terapéuticas. La integración de estos biomarcadores en la práctica clínica podría mejorar significativamente el manejo y tratamiento de pacientes con enfermedades aórticas

Palabras Clave: aorta bivalva, miRNA's, estenosis aortica.

II. INTRODUCCIÓN

La válvula aórtica bivalva (VAB) es una de las malformaciones cardíacas congénitas más comunes, con una incidencia global del 1% al 2%. Esta condición está asociada con un alto riesgo de disfunción valvular aórtica y complicaciones aórticas, y acompañada de diversos eventos vasculares adversos. Se ha propuesto que la interacción entre efectos hemodinámicos y trastornos genéticos primarios contribuye a la progresión de la aortopatía en estos pacientes.

Los miRNAs tienen un importante papel para la regulación de la expresión génica post-transcripcional; tal es el caso, que han sido propuestos como potenciales biomarcadores para la enfermedad. Este estudio se enfoca en la identificación y análisis de miRNAs específicos como miRNA-17-5p, hsa-let-7e y miRNA-196a-5p, y su asociación con la patología. La identificación de estos miRNAs no solo podría ayudar a entender mejor los mecanismos subyacentes de la aortopatía bivalva, sino también a desarrollar nuevas dianas diagnósticas y terapéuticas.

Comprender el estudio de los miRNAs en válvula aortica bivalva y pared de aorta, es de suma importancia, ya que permite tener una comprensión más profunda de sus roles en la remodelación de la aorta ascendente y su progresión en la aortopatía. Dando pie a mejores estrategias que mejoren los resultados clínicos en los pacientes con esta patología congénita.

III. MARCO TEORICO

En los últimos años, se ha descubierto que los microRNAs (miRNAs) resultan ser reguladores centrales del desarrollo del corazón y potenciales biomarcadores en diversas enfermedades cardiovasculares. Gracias a su capacidad para dirigirse a miles de moléculas de ácido ribonucleico mensajero (RNAm), los miRNAs tienen un fuerte impacto en la regulación genética y las vías funcionales celulares, controlando la expresión de componentes clave en la transducción de señales en diferentes niveles. Como resultado, la posibilidad de medir sus niveles mediante métodos no invasivos ha abierto una nueva vía en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de muchas enfermedades complejas (1).

A. Biología de los microRNAs

Los microRNA (miRNA) son pequeños RNA no codificantes que regulan la expresión génica post-transcripcionalmente al unirse a las regiones 3' no traducidas de sus RNAm objetivo y conducen a la represión traslacional y la degradación del RNAm. Esta unión resulta en la inhibición de la traducción del RNAm en proteínas o en la degradación del RNAm, lo que disminuye la cantidad de proteína producida a partir de ese gen en particular.

El proceso de regulación mediado por los miRNAs es importante para una variedad de funciones celulares y procesos biológicos. También se ha demostrado que los miRNAs están involucrados en el desarrollo y progresión de diversas enfermedades, incluyendo enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedades neurológicas y metabólicas, entre otras.

La presencia de una cantidad significativa de miRNAs en el ambiente extracelular, como en el suero, plasma y otros fluidos corporales resultó en un descubrimiento central en la medicina traslacional representando una aplicación potencial en la práctica clínica. Estos miRNAs son exportados de forma selectiva al espacio extracelular y se incorporan en vesículas extracelulares (exosomas, microvesículas) o lipoproteínas que los protegen de la degradación, en el espacio extracelular se han asociado con diversas enfermedades, incluyendo enfermedades cardiovasculares, lo que sugiere su potencial uso como novedosos biomarcadores no invasivos para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de diversas enfermedades (2).

B. miRNAs y enfermedades cardiovasculares

Se han identificado numerosos miRNAs que están asociados con enfermedades cardiovasculares. Estos miRNAs han sido objeto de investigación en estudios clínicos y experimentales para comprender su papel en la fisiopatología cardiovascular y su potencial como biomarcadores o posibles dianas terapéuticas. Los miRNAs a los que se enfocara el estudio se enlistan a continuación:

- a) miRNA-17-5p: Su sobreexpresión conduce a una disminución de la actividad de los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas de matriz y a la activación simultánea de las metaloproteinasas y, por tanto, inducen una dilatación aórtica progresiva con degradación de la matriz extracelular. Recientemente un estudio analizó la expresión de este miRNA en pacientes con válvula aórtica bivalva, confirmando que existe una mayor expresión de miRNA relacionados con miR-17 en tejido menos dilatado en comparación con tejido muy dilatado del mismo.
- b) hsa-let-7e: se considera un miRNA relacionado con el endotelio y se encuentra altamente expresado la dilatación de aorta ascendente. Los estudios han revelado la expresión aberrante de miembros let-7 en enfermedades cardiovasculares, como hipertrofia cardíaca, fibrosis cardíaca, miocardiopatía dilatada (MCD), infarto de miocardio (IM), arritmia, angiogénesis, válvula aórtica bivalva, aterosclerosis e hipertensión. Let-7 participa en la diferenciación cardiovascular de células madre embrionarias. TLR4, LOX-1, Bcl-xl y AGO1 son ahora los genes blanco, identificados de let-7. Se sospecha que el let-7b circulante es el biomarcador del infarto de miocardio agudo y el let-7i, el biomarcador de la MCD. Se necesitan más estudios para identificar los objetivos genéticos y las vías de señalización de let-7 en las enfermedades cardiovasculares más específicamente en válvulas bivalvas. Let-7 podría ser un objetivo terapéutico potencial para las enfermedades cardiovasculares.
- c) miRNA-196a-5p: En el genoma de los vertebrados, los genes miR-196 están incrustados dentro de grupos de genes del factor de transcripción Hox. La familia miR-196 incluye miR-196a1, miR-196a2 y miR-196b transcritos a partir de tres genes diferentes ubicados

en los cromosomas 17q21, 12q13 y 7p15, respectivamente, HOXB8, que es esencial para la diferenciación mieloide, podría ser el objetivo de miR-196a2 demostrado por Kawasaki y Taira, en 2004. En un estudio previo, Xu et al. (2009) descubrieron que el genotipo CC miR-196a2 rs11614913 aumentaba el riesgo de enfermedad coronaria al aumentar la cantidad de miR-196a2 maduro y afectar la unión de HOXB8 a miR-196a2 maduro, alterando así la señalización de miR-196a-HOXB8-Sonic hedgehog (Shh). Poca información existe de este miRNA y su asociación con la válvula bivalva sin embargo se ha demostrado que este miR tiene una mayor regulación negativa en las valvas aórticas estenóticas de pacientes con VAB en comparación con pacientes con VAT, lo cual podría estar asociado con la calcificación de diferentes estructuras en el corazón.

Estudios de asociación miRNAs

Aortopatía asociada a la válvula aórtica bicúspide (VAB)

Existe debate sobre la patogénesis subyacente de la aortopatía asociada a la válvula aórtica bicúspide (VAB). Además de las bases genéticas del VAB, también se ha reconocido un papel de las fuerzas hemodinámicas en el desarrollo de la enfermedad, donde la formación anormal de las cúspides durante la embriogénesis conduce a un flujo y una tensión de corte alterados. En este contexto, se ha demostrado que los miRNAs llenan el vacío entre los factores genéticos y hemodinámicos, regulando la expresión génica y respondiendo a cambios ambientales a nivel postranscripcional (3).

De hecho, diferentes miRNAs, han demostrado ser sensibles a la tensión de corte en las células endoteliales de la válvula aórtica, lo que potencialmente desencadena enfermedades valvulares, razón por la cual se les atribuye un carácter mecanosensible (4).

Existe evidencia acumulada que sugiere que la alteración en los patrones de expresión de miRNAs podría modificar la homeostasis del tejido valvular, lo que conduce a la estenosis aórtica con válvulas bicúspides. Los datos obtenidos sobre los niveles de expresión de miRNAs en las células endoteliales aisladas y las diferencias entre las válvulas aórticas bicúspides sugieren que el metabolismo desregulado de especies reactivas de oxígeno que conducen a la apoptosis podría contribuir a desencadenar la degeneración de la válvula aórtica.

Más aún, Du et al demostraron un notable aumento de miRNAs en las valvas de válvulas aórticas bicúspides (VAB) en comparación con las válvulas aórticas tricúspides (VAT), lo cual se correlacionó inversamente con una mayor expresión de RNAm de SMAD7 tanto en células intersticiales de válvulas humanas como porcinas. Además, los autores examinaron los cambios funcionales entre las VAB y las VAT, mostrando una mayor expresión de MMP2 y MMP9 en las valvas de las VAB, lo que indica un desorden en la matriz extracelular de las valvas de las VAB, probablemente induciendo calcificación valvular (5,6).

En la investigación de Poggio et al., realizaron un estudio experimental in vitro que demostró que los procesos biológicos que ocurren a nivel del endotelio involucrados en las etapas iniciales de la estenosis aórtica con válvulas bicúspides difieren entre sí pues encontraron diferencias en la expresión basal de varios miRNAs entre las células endoteliales aisladas de las válvulas. Los análisis funcionales de las vías revelaron una posible alteración en la vía del metabolismo de peróxido de hidrógeno, lo que lleva a un daño excesivo en el ADN, y de la vía de señalización apoptótica intrínseca, confirmando que las células endoteliales de válvulas aórticas bicúspides tienen un deterioro en el metabolismo del peróxido de hidrógeno, lo que lleva a un aumento en la apoptosis (7,8).

Un grupo de pacientes que se sometieron a reparación/reemplazo electivo de la válvula aórtica con reemplazo aórtico proximal debido a la enfermedad de VAB, con o sin aneurisma aórtico concomitante; el análisis de miRNAs del tejido aórtico incluyó miRNAs entre los cuales se

encontraban miRNAs así como un análisis de la expresión de MMP2, TIMP1/2 a nivel de RNAm y proteína, es decir, los microRNAs del tejido aórtico pueden reflejar procesos de remodelación de la aorta proximal en la aortopatía de VAB, y estos microRNAs específicos del tejido aórtico pueden ejercer efectos reguladores en la aortopatía a través de su impacto en la homeostasis de MMPs/TIMPs en el nivel de la curvatura mayor (10,11).

Sophocleous et al. estudiaron cambios regionales alrededor de la pared de la aorta ascendente (AoA) en pacientes con VAB y aortopatía, integrando datos moleculares e imágenes clínicas en pacientes a los que se les resecó quirúrgicamente tejido aórtico y midieron marcadores moleculares a lo largo de la circunferencia de AoA. Compararon los perfiles de miRNAs, contenido proteico, fragmentación y degeneración de la elastina ente segmentos circunferenciales dilatados (anterior/derecho) vs no dilatados (posterior/izquierdo); los análisis identificaron cinco miRNAs diferencialmente expresados a lo largo de la circunferencia de AoA (12).

Zhang et al. analizaron el perfil de expresión y el mecanismo de los miRNAs circulantes en exosomas plasmáticos relacionados con VAB y AoA, en comparación con individuos sanos con válvula aórtica tricúspide y bajo riesgo cardiovascular, mediante secuenciación de RNA pequeño para identificar los miRNAs específicos. Los niveles de expresión de miRNAs exosomales aumentados se alteraron significativamente en la enfermedad de VAB; miRNAs está involucrado en la aparición y desarrollo de VAB y su complicación de dilatación de AoA al regular la señalización de TGF- β , este miRNA podría dirigirse a SMAD2 y disminuir los niveles de proteína de SMAD2 y P-SMAD2 (13).

En un estudio mediante micromatrices (*microarrays*) en muestras de tejido de individuos con válvula aórtica tricúspide sana, pacientes con VAB y pacientes con VAB para comparar e identificar los miRNAs específicos asociados con la VAB y la dilatación aórtica.

Los patrones de expresión de los miRNAs candidatos se validaron mediante reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) en una cohorte independiente. Observaron que los niveles de expresión de los miRNAs circulantes están significativamente influenciados por la morfología de la válvula aórtica (bicúspide/tricúspide) y podrían estar funcionalmente involucrados en la regulación de la señalización del TGF- β 1 (16).

Aneurismas aórticos

Hasta la fecha, la mayoría de las investigaciones relacionadas con los miRNAs se han centrado en la remodelación vascular y la patogénesis de la formación de aneurismas aórticos (AA), excluyendo a los pacientes con válvula aórtica bicúspide (VAB).

Calcificación

El desarrollo de la enfermedad valvular aórtica calcificada (EVAC) es un proceso complejo de calcificación ectópica que involucra varios factores que conducen a la estenosis de la válvula aórtica, cambios hemodinámicos y, en casos graves, incluso la muerte súbita.

Se han propuesto diversas rutas, la evidencia más reciente sugiere que la proteína morfogenética ósea 2 (BMP2) puede inducir la activación proosteogénica de las células intersticiales de la válvula (VICs) aórtica. Se demostró que los miRNAs participan en la regulación de la diferenciación osteogénica en las VICs. El análisis de predicción de objetivos y el ensayo de doble luciferasa confirmaron que los miRNAs se une preferentemente a BMP2. Además, se examinó el efecto del eje miRNAs/BMP2 en la diferenciación osteogénica en las VICs mediante el enfoque de ganancia y pérdida de función en las valvas calcificadas de la válvula aórtica in vivo; es decir, el miRNAs regula la diferenciación osteogénica en las VICs a través de la

regulación negativa de BMP2, lo que destaca que miRNAs podría ser un objetivo terapéutico potencial para la EVAC (17,18,19).

En un estudio extenso, Zheng et al. En su análisis sugirió vías potencialmente importantes en la inflamación y la fibrocalcificación durante la patogénesis de la EVAC, y los patrones de células inmunes en la EVAC indicaron que los macrófagos M0 y las células B de memoria estaban significativamente aumentados, y que muchos genes en las células inmunes también se expresaban de manera diferente (20,21).

Por lo tanto, la identificación de estas especies moleculares están asociados a la patología aórtica que han demostrado la complejidad y la diversidad de los mecanismos moleculares que subyacen en estas patologías. Los miRNAs presentes en la enfermedad valvular aórtica calcificada y con dilatación de aorta, tienen un papel fundamental en la regulación de vías de señalización, procesos celulares y cambios en la expresión génica que contribuyen a la progresión y el desarrollo de estas enfermedades. La identificación de estos miRNAs dan pie a futuras investigaciones que evalúen las conexiones entre estos miRNAs y las alteraciones en VAB, así como aorta ascendente. Generando nuevas oportunidades para desarrollar diferentes manejos dirigidos a la modulación de estas moléculas reguladoras con el fin de prevenir estas enfermedades.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿La expresión de los miRNA-17-5p, hsa-let-7e, miRNA-196-5p y hsa-miR-16 se asocian a la patología de válvula aórtica bicúspide en pacientes mexicanos?

Hipótesis

A. Hipótesis alterna

Existe una asociación significativa entre los perfiles de expresión de miRNAs y la presencia de patología aórtica en pacientes.

B. Hipótesis nula

No hay asociación significativa entre los perfiles de expresión de miRNAs y la presencia de patología aórtica en pacientes.

V. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades aórticas representan una preocupante carga de morbilidad y mortalidad a nivel global, y su prevalencia está en aumento. México no es ajeno a este escenario, con un creciente número de pacientes que buscan atención médica en centros especializados como el Instituto Nacional de Cardiología (INC). A pesar de este panorama, existe una brecha de conocimiento en cuanto a la comprensión precisa de los mecanismos subyacentes a estas enfermedades, lo que limita la capacidad de desarrollar estrategias de prevención y tratamiento efectivas.

Como se ha descrito, los miRNA's han surgido como elementos clave en la regulación de la expresión génica, se ha demostrado que desempeñan un papel importante en el desarrollo y la progresión de diversas enfermedades, incluidas las patologías aórticas. Estas especies genéticas en poblaciones específicas puede influir en la expresión de miRNA y, por lo tanto, en la predisposición a enfermedades aórticas. Dada la diversidad genética única de la población mexicana y la alta prevalencia de enfermedades cardiovasculares en el país, es esencial llevar a cabo un estudio centrado en la población con presencia de aorta bivalva.

El Instituto Nacional de Cardiología es un centro de referencia en México, con una amplia experiencia en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades cardiovasculares, incluidas las aórticas. Un estudio que investigue la asociación de diversos miRNA con enfermedades aórticas en pacientes mexicanos atendidos en este Instituto puede proporcionar información valiosa. La realización de un estudio a nivel local permitirá la identificación de perfiles de expresión de miRNA específicos para esta población, lo que podría conducir a la identificación de biomarcadores útiles para el diagnóstico temprano, la estratificación de riesgos y el monitoreo de la progresión de enfermedades aórticas.

VI. OBJETIVOS

VI.I. Objetivo general:

Cuantificar la expresión de los miRNA-17-5p, hsa-let-7e, miRNA-196-5p en tejido valvular de pacientes con aorta bivalva e Identificar miRNA y el tipo de aortopatía y tipo de válvula aórtica bicúspide.

VI.II. Objetivos específicos:

1. Comparar los niveles de miRNAs en una muestra de pacientes con patología aórtica.
2. Evaluar la expresión de hsa-let-7e, miRNA-17-5p, miRNA-196-5p con diámetros de la dilatación aorta torácica
3. Correlacionar la expresión de los miRNA's en el tipo de patología aortica y el tipo de válvula bicúspide
4. Determinar in-silicio los genes blancos que se encuentren asociados con la presencia de aorta bivalva.
5. Evaluar la asociación de miRNA's estudiados con complicaciones por cirugía o Re operaciones
6. Correlacionar los miRNA's con la morfología de aorta bivalva
7. Correlacionar miRNA's con FEVI
8. Correlacionar miRNA's con presencia de trastornos del ritmo.
9. Evaluar asociación de miRNA's e insuficiencia cardiaca preservada, moderadamente reducida y reducida.
10. Evaluar correlación entre miRNA's y biomarcadores de dislipidemia
11. Evaluar la relación entre los perfiles de expresión de miRNAs y características clínicas en una muestra de pacientes con patología aórtica, como la presencia de dilatación aortica, disección, hipertensión y otros factores de riesgo cardiovasculares.
12. Describir las variables sociodemográficas de la muestra de pacientes.

VII. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio observacional, analítico, prospectivo.

VIII. PACIENTES Y MÉTODO

A. Lugar o sitio del estudio

El estudio se realizará en el Instituto Nacional de Cardiología, Ciudad de México

B. Criterios de selección

1. Criterios de inclusión

Se incluirán en el estudio a pacientes:

1. Adultos mayores de 18 años.
2. Pacientes que han sido diagnosticados con patología aórtica confirmada por pruebas de imagen, como ecocardiografía, tomografía computarizada o resonancia magnética.
3. Pacientes que reciben atención médica en el Instituto Nacional de Cardiología.
4. Tanto pacientes de género masculino como femenino.
5. Pacientes dispuestos a proporcionar muestras de tejido para análisis de miRNAs.
6. Pacientes que proporcionen información detallada sobre sus antecedentes médicos, incluyendo condiciones cardiovasculares previas y tratamientos recibidos.
7. Pacientes que otorguen su consentimiento informado para participar en el estudio.
8. Pacientes mexicanos con al menos 2 generaciones anteriores de origen

2. Criterios de exclusión

Se excluirán del estudio las siguientes pacientes:

1. Individuos menores de 18 años.
2. Pacientes con patología aórtica que no hayan sido confirmados mediante pruebas de imagen.
3. Pacientes con enfermedades concomitantes que puedan influir significativamente en la expresión de miRNAs, como patologías autoinmunes sistémicas.
4. Pacientes que han recibido tratamientos específicos que puedan alterar la expresión de miRNAs, como terapias inmunosupresoras.
5. Pacientes con dificultades cognitivas que tengan dificultad para la comprensión de los procedimientos y requisitos del estudio.
6. Pacientes que se nieguen a proporcionar muestras o información médica relevante.
7. Mujeres embarazadas o en período de lactancia por las posibles implicaciones para la

interpretación de los resultados.

3. Criterios de eliminación

1. Retiro voluntario del paciente del estudio durante cualquier etapa.
2. Incumplimiento sustancial de los procedimientos de recolección de muestras o la provisión de información requerida.
3. Deterioro de la calidad de las muestras, lo que podría afectar la precisión de los análisis.
4. Incapacidad de obtener una cantidad suficiente de muestras para el análisis de miRNAs.

Recolección de Muestras:

Técnica quirúrgica

Para técnica quirúrgica para el cambio valvular aórtico posteriormente al protocolo de anestesiología y paciente con anestesia general, posterior a la apertura esternal y de pericardio, se administra heparina, se cánula paciente y se inicia circulación extracorpórea, ya en hipotermia leve se realiza pinzamiento aórtico y administración de cardioplejia anterógrada, se realiza aortotomía, se visualiza válvula aórtica y se realiza resección de la misma con tijera metzenbaum y con pinzas de allis para poder realizar una completa resección y sin lesionar estructuras adyacentes como el anillo aórtico, valva anterior de válvula mitral, septum interventricular y ostiums coronarios, posterior al retiro de valvas, se colocan punto en anillo aórtico y de coloca prótesis valvular, se verifica correcto funcionamiento, se toma muestra de pared de aorta, posteriormente se realiza aortografía, se asciende temperatura y despinza aorta, posteriormente se realiza separación de circulación extracorpórea y se da por finalizado procedimiento quirúrgico.

La recolección de la muestra de pared aorta se realizó en las cirugías de cambio valvular aórtico, Bentall y De Bono y procedimiento de wheat, en pacientes con aorta bivalva como trivalva, tomando una pequeña muestra para pacientes que se les realiza cambio valvular aórtico, a los pacientes que se les realiza sustitución de anillo aórtico y aorta ascendente se realiza mayor recolección de pared aorta.

Tras la resección, las muestras se lavaron con solución salina estéril para eliminar la sangre y se congelaron inmediatamente y fueron almacenadas a -80° C.

Procesamiento de Muestras

Pulverización de Muestras: Las muestras congeladas se pulverizaron utilizando nitrógeno líquido para mantener la integridad del RNA y evitar la degradación. Este proceso se llevó a cabo en un mortero preenfriado, pulverizando hasta obtener un polvo fino. El tejido se resuspendió en una solución de Tripure (un reactivo basado en fenol y guanidina tiocianato) para la extracción de RNA total. La resuspensión se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante Tripure™ (Roche Molecular Biochemicals), asegurando una homogenización adecuada del tejido. Las muestras resuspendidas en Tripure se almacenaron a -80 grados Celsius hasta su posterior procesamiento. Este almacenamiento garantiza la estabilidad del RNA y previene su degradación

Extracción del RNA total.

El RNA total se extrajo del tejido adiposo epicárdico y mediastino que se encontraba congelado a -70°C , utilizando el reactivo TripureTM (Roche Molecular Biochemicals), posteriormente se realizó la retrotranscripción con 1ug de RNA total para la síntesis de cDNA siguiendo el protocolo del kit “HighCapacity cDNA Reverse Transcription” (Applied Biosystems), el cDNA se guarda a -20°C .

PCR-Tiempo real

La expresión del Let7a-5p (hsa-let-7a-5p), miRNA17a-5p (hsa-miR-17-5p) y miRNA-196a-5p (hsa-miR-196a-5p) en pared de aorta de paciente con aorta bivalva y trivalva, se cuantificó empleando ensayos TaqMan para microRNA utilizando el equipo 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Las condiciones de ciclaje fueron 2 min a 50°C y 10 min a 95°C , seguidos por 40 ciclos de 15s a 95°C y 1min a 60°C .

Los niveles de expresión se determinaron por duplicado y se normalizaron con el gen endógeno miRNA-16-5p (hsa-miR-16-5p) en pared de aorta de paciente con aorta bivalva y trivalva. Se realizó una cuantificación relativa por medio de la siguiente fórmula: $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando el software SPSS versión 21 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). La normalidad de cada variable se determinó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para representar las variables cuantitativas, se utilizó la media $\pm$ desviación estándar (DE), y las variables cualitativas se reportaron como frecuencias con sus respectivos porcentajes. Las variables se compararon utilizando las pruebas t de Student o U de Mann-Whitney para 2 grupos. Se empleó el análisis de correlación de Pearson para evaluar la asociación entre los niveles de expresión de miR y los parámetros bioquímicos clínicos. El valor diagnóstico de la expresión de miR se evaluó calculando el área bajo la curva (AUC) en modelos ROC para definir el punto de corte óptimo.

Tamaño de muestra

El Cálculo de tamaño de muestra estimado fue Mediante prueba de dos medias: tomando en cuenta los resultados de este artículo Wu et al., *Progressive Aortic Dilation Is Regulated by miR-17-Associated miRNAs*. J Am Coll Cardiol. 2016 Jun 28;67(25):2965-77. doi: 10.1016/j.jacc.2016.04.027. PMID: 27339495.

Su formula es la siguiente

Cálculo del tamaño muestral:

$$N = Z_{\alpha}^2 \frac{s^2}{\delta^2}$$

N: tamaño muestral;
 Z_{α} : nivel de confianza;
 s^2 : varianza poblacional;
 δ : precisión de la estimación.

Corrección para muestra finita:

$$N_c = \frac{N}{1 + \frac{N}{PT}}$$

N_c : tamaño muestral corregido;
N: tamaño muestral calculado;
PT: tamaño de la población.

El calculo se hizo en base a la expresión del miRNA en cada situación de la aorta cuando hubo dilatación leve y severa y en nuestro caso no tenemos aorta normal, por lo que el calculo se considerara con un error alfa de 0.05 y poder de 0.80 que da un total de 64 casos por grupo.

	Error α	Poder	Delta	Tamaño de muestra requerido
Cálculo de la expresión de miRNA17 en pacientes con dilatación aortica leve vs severa 1.5 vs 1 respectivamente	0.05	0.80	2.82	64 casos por grupo
Cálculo de la expresión de miRNA17 en Cálculo de la expresión de miRNA17 en pacientes con dilatación aortica leve vs severa 1.8 vs 1 respectivamente pacientes con dilatación aortica leve vs severa 1.8 vs 1 respectivamente	0.01	0.99	4.92	194 casos por grupo
Cálculo de la expresión de miRNA17 en pacientes con dilatación aortica leve vs normal 1.5 vs 0.6 respectivamente	0.05	0.80	2.91	21 casos por grupo
Cálculo de la expresión de miRNA17 en pacientes con dilatación aortica leve vs normal 1.5 vs 0.6 respectivamente	0.01	0.99	5.01	62 casos por grupo
Cálculo de la expresión de miRNA17 en pacientes con dilatación aortica severa vs normal 1 vs 0.6 respectivamente	0.05	0.80	2.82	100 por grupo
Cálculo de la expresión de miRNA17 en pacientes con dilatación aortica severa vs normal 1 vs 0.6 respectivamente	0.01	0.99	4.92	330 por grupo

IX. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos serán analizados en el programa SPSS versión 19 (SPSS Inc. Chicago USA). Se llevara acabo un análisis descriptivo de todas las variables y estos resultados serán expresados como la media $\pm$ desviación estándar (DS). La comparación entre grupos se realizará mediante la prueba t de Student para variables continuas. En el caso de las variables que no presenten una distribución normal, se llevará a cabo la prueba U de Mann-Whitney o Kruskal Wallis. Posteriormente se llevará a cabo un análisis de regresión logística binaria con la construcción del modelo de acuerdo a las variables que resulten de importancia. Finalmente, se realizará un análisis de correlación por medio de la prueba de Spearman. Los resultados con valores de p <0.05 serán considerados significativos.

X. RESULTADOS

Un total de 78 pacientes con aorta bivalva fueron incluidos, 17 (22%) mujeres y 61 (78) hombres con edad promedio general de 58 ± 12 . Las características demográficas se muestran en Tabla 1.

Tabla 1. Características demográficas de los pacientes incluidos en el estudio datos de casos y controles en general.

	Total	Mujeres n=17	Hombres n=61	p
Edad	48 ± 12	60 ± 12	58 ± 12	NS
IMC	26 ± 5	26 ± 2	26 ± 5	NS
Laboratorio				
Mediana (Min-Max) Q1,Q2,Q3				
BH	14 (8.7-17.8) 12-14-16)	13.1(9.9-16.9) 11.8-13.1-14.8	14.6 (8.7-17.8) 13-15-16)	0.03
Leucocitos	7.6 (3.5-18.3) 6-7.1-8.5	7.3 (3.5-17.2) 5.7-7.3-8.6	7 (3.8-18.3) 6-7-9	NS
Linfocitos	1.7 (0.4-9.3) 1.3-1.7-3.2	2.1 (1-9.3) 1.4-2.1-2.8	1.6 (0.4-4.2) 1.3-1.6-2.2	NS
Neutrófilos	4.2 (1.1-14.1) 3.1-4.2-5.1	4.1 (1.1-14.1) 2.8-4.1-6.0	4.3 (2-13.8) 3.2-4.3-5.2	NS
Plaquetas	200 (86-453) 175-200-247	233(152-453) 187-233-319	196 (86-427) 163-196-247	NS
Colesterol total	143 (46-246) 121-143-178	144 (76-218) 112-144-177	143 (46-246) 124-143-183	NS
HDL	40 (14.72) 33-40-46	41 (33-68) 38-41-51	(39-14-72) 31-39-45	0.07
LDL	89 (24-190) 69-89-109	80 (24-147) 55-80-107	90 (26-190) 72-90-110	NS
Triglicéridos	113 (53-245) 84-110-134	106 (55-192) 87-106-159	110 (53-245) 83-110-131	NS
Glucosa	99 (77-199) 90-99-112	115(77-199) 86-115-145	99 (79-189) 92-99-107	NS
Urea	22 (9.3-277) 16-22-29	23 (9.3-34.6) 14-23-28	22(10-277) 16.6-22-28	NS
Creatinina	1.0 (1.0-6.0) 0.8-1.0-1.3	0.74 (1-2) 0.61-0.74-0.98	1 (1-6) 0.87-1-1.3	0.003
Ácido Úrico	6 (2.3-13.1) 4.6-6-7.3	4.6 (3-8) 3.9-4.6-6.3	6.1 (2.3-13.1) 5.1-6.1-7.7	0.01
VSG	5 (1-59) 2.5-5-18	10 (2-59) 3-10-48	5 (1-23) 2.5-5-10.2	NS
PCR	5 (2-612) 1.3-5-26.4	4.9 (0.3-299) 0.8-4.9-37.5	5.7 (2-612) 1.5-5.7-31.2	NS
Comorbilidades n (%)				
DM	12 (15.4)	7 (41)	5 (8)	0.003
HAS	29 (37.2)	9 (53)	20 (33)	0.08
Dislipidemia	12 (15.4)	3 (18)	9 (15)	NS

EPOC	6 (7.7)	1 (4.5)	5 (8.1)	NS
IAM previo	4 (5.1)	1 (4.5)	3 (4.9)	NS

Tabla 2. La distribución de las características demográficas en relación a casos con aorta bivalva versus aorta trivalva

	Total n=78	Casos con aorta bivalva n=40	Controles con aorta trivalva n=38	p
Hombres	61 (78)	29 (73)	32 (84)	NS
Mujeres	17 (22)	9 (23)	8 (21)	NS
Edad	48 ± 12	54 ± 10	62 ± 13	0.007
IMC	26 ± 5	26 ± 5	27 ± 4	NS
Laboratorio Mediana (Min-Max) Q1, Q2, Q3				
BH	14 (8.7-17.8) 12-14-16)	12.2 (9.7-17.8) 13.1-14.2-16	14.2 (9.7-17.8) 13.1-14.2-15.7	NS
Leucocitos	7.6 (3.5-18.3) 6-7.1-8.5	7.1 (3.5-11.7) 6.37.1-8.4	7.1 (3.9-18.3) 5.4-7.1-9.1	NS
Linfocitos	1.7 (0.4-9.3) 1.3-1.7-3.2	2.1 (0.7-4.2) 1.6-2.1-2.6	1.5 (0.4-9.3) 1.2-1.5-2.0	0.01
Neutrófilos	4.2 (1.1-14.1) 3.1-4.2-5.1	4.1 (1.1-7.7) 3.4-4.1-4.7)	4.5 (2.0-14.1) 3.0-4.5-6.8	NS
Plaquetas	200 (86-453) 175-200-247	214 (98-377) 176-214-254	199 (86-453) 168-199-243)	NS
Colesterol total	143 (46-246) 121-143-178	142 (46-246) 121-142-171	148 (76-218) 119-148-183	NS
HDL	40 (14-72) 33-40-46	40 (14-61) 33-40-45	42 (19-72) 33-42-51	NS
LDL	89 (24-190) 69-89-109	89 (26-190) 70-89-107	89 (23-150) 69-89-119	NS
Triglicéridos	113 (53-245) 84-110-134	113 (55-190) 87-113-132	103 (53-245) 82-103-139	NS
Glucosa	99 (77-199) 90-99-112	99 (77-189) 89-99-107	101 (79-199)- 90-101-119	NS
Urea	22 (9.3-277) 16-22-29	21 (9-277) 16-21-29	22 (10-45) 16-22-28	NS
Creatinina	2.0 (1.0-6.0) 0.8-1.0-1.3	0.97 (1-6) 0.81-0.97-1.31	1.0 (1-2) 0.80-1.0-1.3	NS
Ácido Úrico	6 (2.3-13.1) 4.6-6-7.3	6 (3.7-10.1) 4.6-6-7.3	6 (2.3-13.1) 4.6-6-7.5	NS
VSG	5 (1-59) 2.5-5-18	4 (1-6) 4-6-8	6 (2-59) 3-6-23	NS
PCR	5 (2-612) 1.3-5-26.4	6.7 (3-312) 1.4-6.7-16.1	4.3 (2-299) 1.2-4.3-72.5	NS
DM	12 (15.4)	9 (23)	3 (7.8)	0.04
HAS	29 (37.2)	14 (35)	15 (39)	NS

Dislipidemia	12 (15.4)	6 (15)	6 (16)	NS
EPOC	6 (7.7)	1 (2.5)	5 (13)	NS
IAM previo	4 (5.1)	2 (5)	2 (5.1)	NS

Tabla 3. Frecuencia y promedios de parámetros de imagen y cardiovasculares entre pacientes con válvula bivalva y trivalva

	Total n=78	Casos con aorta bivalva n=40	Controles aorta trivalva n=38	con p
Válvula nativa		36 (90)	38 (100)	NS
Estenosis aortica		27 (68)	14 (37)	0.01
Doble lesión aortica		18 (45)	14 (37)	NS
Coartación aortica		2 (5)	0 (0)	NS
FEVI	51 (15-74) 37-51-60	51 (15-74) 37-51-60		
PSAP	33 (10-98) 27-33-42	34 (10-80) 25-34-43	32 (10-98) 27-31-39	NS
Gradiente medio	31 (2-102)	46.5 (3-102) 12.4-46.5-67.7	7 (2-90) 3-7-40	0.0001
Área valvular	0.70 (0.20-4.20) 0.51-0.70-1.20	0.53 (0.20-1.0) 0.49-0.53-0.70	1.3 (0.38-4.9) 0.77-1.3-2.0	0.0001
Área valvular indexada	0.40 (0.10-3.75) 0.29-0.40-0.90	0.30 (0.10-0.60) 0.22-0.30-0.40	0.99 (0.20-3.75) 0.50-0.99-1.60	0.0001
Anillo aórtico	24 (9-40) 21-24-27	23 (9-34) 20-23-26	25(18-40) 22-25-28	0.01
Senos de valsava	36 (17-79) 31-36-42	34 (17-78) 27-33-40	39 (20-79) 33-39-47	0.007
Unión Sinotubular	31 (11-85) 27-31-40	29 (11-80) 26-29-38	35 (16-85) 28-35-44	0.02
Aorta ascendente	39 (15-100) 34-39-50	36 (15-84) 34-36-43	46(16-100) 35-46-59	0.01

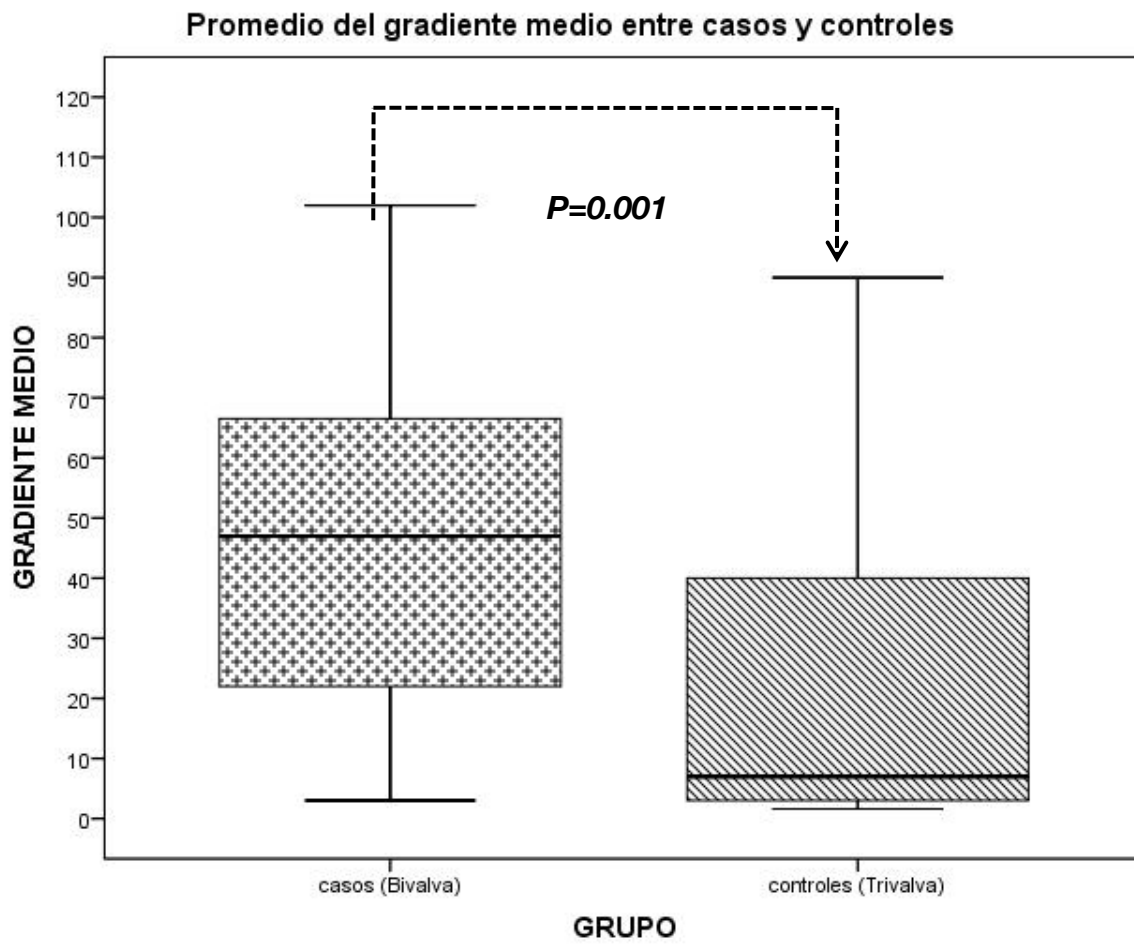


Figura 1.

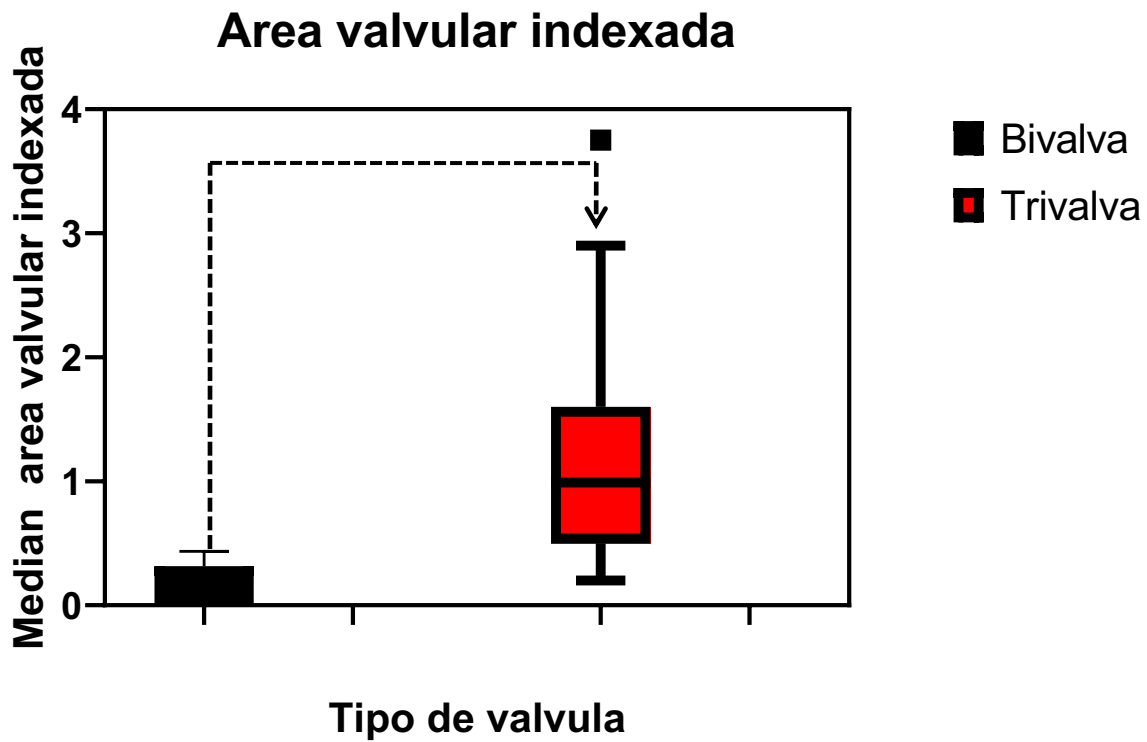
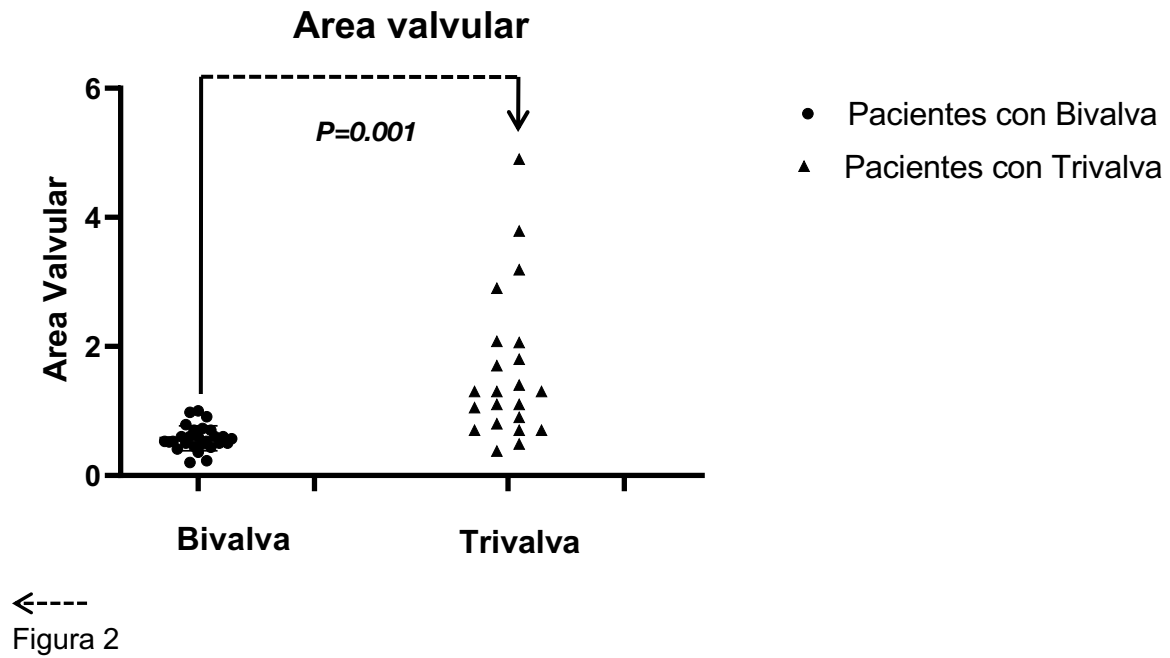


Figura 3

Tabla 4 . Tipo de cirugía realizada, frecuencia del tipo de técnica, parámetros quirúrgicos y número de fallecidos entre pacientes intervenidos por estenosis aórtica con válvula bivalva y trivalva.

Tipo de cirugía	Total n=78 (100)	Bivalva n=40 (52)	Trivalva n=38 (48)	p
Bentall y De Bono	27 (34.6)	9 (22.5)	18 (47.3)	0.01
Bentall + Arco	2 (2.5)	0 (0)	2 (5.2)	NS
Cambio valvular aórtico	26 (33)	19 (47.5)	7 (18.4)	0.008
Cambio valvular aórtico y mitral	1 (1.2)	0 (0)	1 (2.6)	NS
Wheat	16 (20.5)	10 (25)	6 (15.7)	NS
Sustitución supracoronaria	2 (2.5)	0 (0)	2 (5.2)	NS
Sustitución arco	1 (1.2)	0 (0)	1 (2.6)	NS
Sustitución aorta ascendente	1 (1.2)	1 (2.5)	0 (0)	NS
Warden	2 (2.5)	0 (0)	2 (2.6)	NS
Tipo de válvula implantada				
Mecánica	49 (63)	28 (70)	21 (55)	NS
Biológica	27 (35)	10 (25)	17 (45)	0.005
Tiempos de cirugía Mediana (Min-Max) Q1-Q2-Q3				
Pinzamiento	146 (47-305) 97-146-188	114 (47-280) 95-114-168	152 (66-305) 115-152-214	0.001
CEC	183 (71-630) 135-183-288	150 (71-568) 124-150-240	224 (76-230) 153-224-350	0.005
Sangrado	410 (3-4900) 325-420-680	370 (3-790) 230-370-480	490 (190-4900) 360-490-850	0.004
Muerte n (%)	3 (3.8)	3 (7.5)	0 (0)	0.07

La mortalidad solo se presentó en tres casos de aorta bivalva, los cuales ocurrieron en los primeros 3 días del postquirúrgico y las causas fueron por choque cardiogénico.

La sobrevida a 30 días es menor en el grupo de aorta bivalva lo cual es del 92.3% posterior a lo cual se mantiene hasta los 26 meses de seguimiento y en los casos tratados con aorta trivalva fue del 100% en esta serie y se mantuvo hasta los 26 meses del seguimiento de estos pacientes.

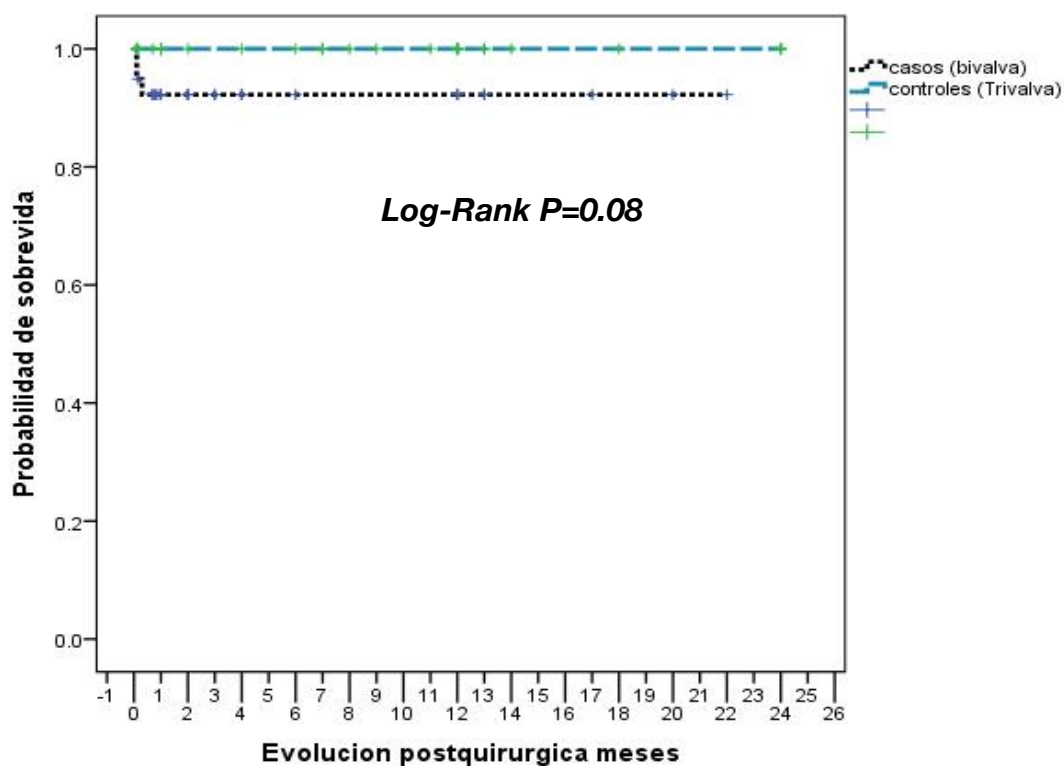


Figura 5

Tabla 5

Caso	Edad	Sexo	IMC	Comorbilidad	FEVI	AA	SV	UST	Ao Asc	Tipo de cirugía	Tipo de válvula	Causa de muerte
1	53	M	31	HAS+ IAM previo	46	26	51	38	34	Bentall	Biológica	Choque cardiogénico
2	59	M	24	HAS	54	34	78	69	71	Wheat	Biológica	Choque cardiogénico
3	64	M	23	No tenia	54	24	46	40	46	Wheat	Mecánica	Choque cardiogénico

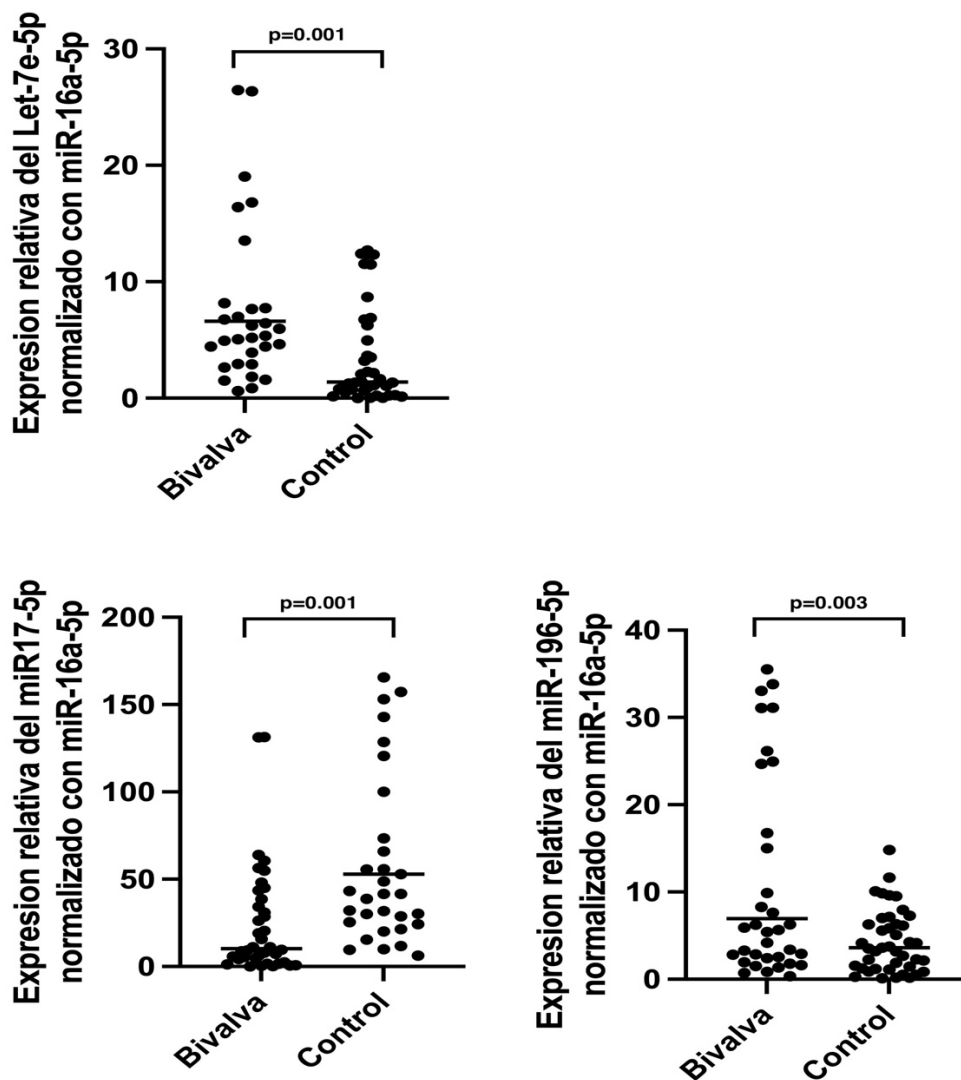


Figura 6. Comparación entre los niveles de expresión en tejido de los pacientes control y con válvula bivalva en let-7e-5p, miR-17a-5p, y miR-196-5p. Los datos se normalizaron con miR-16 y se expresan como medianas (mín. - máx.) (prueba U de Mann-Whitney). *p > 0.05.

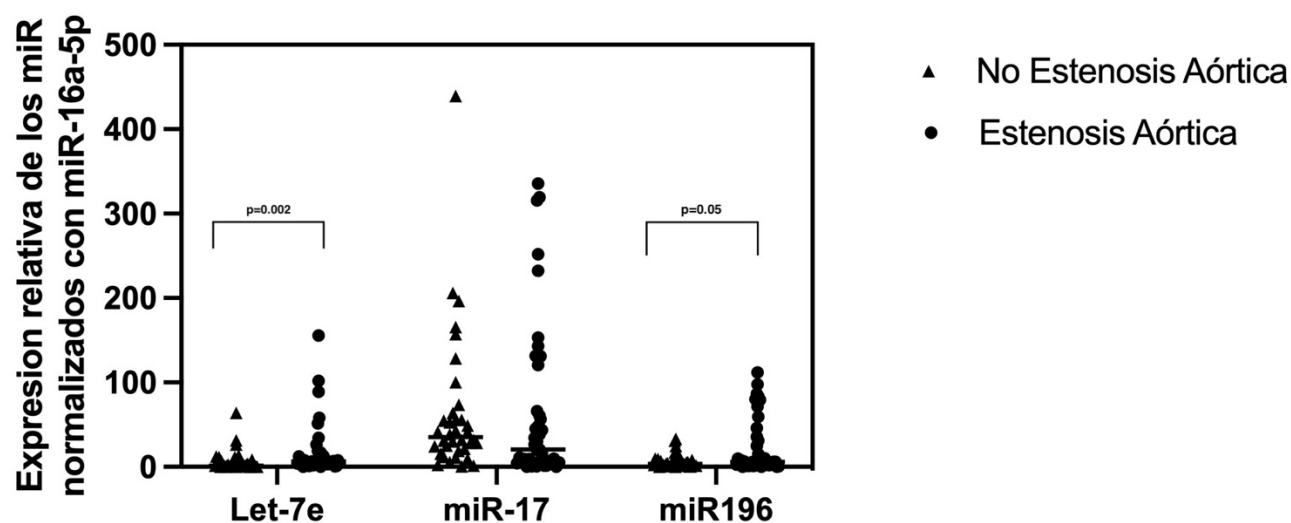


Figura 7. Comparación entre los niveles de expresión en tejido de los pacientes control y con válvula bivalva en let-7e-5p, miR-17a-5p, y miR-196-5p. estratificado por estenosis aortica. Los datos se normalizaron con miR-16 y se expresan como medianas (mín. - máx.) (prueba U de Mann-Whitney). *p > 0.05.

Tabla 6. Niveles de Expresión de microRNAs en Grupos Control y Bivalva con y sin Estenosis

	Bivalva		Control		P1	P2
	No estenosis N=10	Estenosis N=28	No estenosis N=26	Estenosis N=12		
Let-7e-5p	6.61 (1.5-64.05)	6.60 (0.62-155.43)	1.17 (0.02-12.37)	5.61 (0.01-12.67)	0.001	0.13
miR-17a-5p	15.10 (0.78-63.99)	9.43 (0.09-131.40)	42.44 (9.58-439.25)	142.98 (6.21-335.73)	0.005	0.01
miR-196-5p	6.24 (1.33-33.03)	6.94 (0.35-111.75)	2.94 (0.17-14.82)	4.14 (0.11-890.28)	0.74	0.10
p1: no estenosis Bivalva vs no estenosis control, p2: estenosis bivalva vs estenosis control						

La tabla 6 y la figura 7 muestra los niveles de expresión de los microRNAs Let-7e-5p, miR-17a-5p y miR-196-5p en diferentes grupos (control y Bivalva) con y sin estenosis. Para Let-7e-5p, los niveles en el grupo bivalva sin estenosis fueron 6.61 (1.5-64.05) y en Bivalva con estenosis 6.60 (0.62-155.43). En Control sin estenosis, los niveles fueron significativamente menores (1.17, 0.02-12.37) comparado con Control con estenosis (5.61, 0.01-12.67). La diferencia entre Bivalva sin estenosis y control sin estenosis fue significativa (P1=0.001), pero no entre los grupos con estenosis (P2=0.13). Para miR-17a-5p, en Bivalva sin estenosis, los niveles fueron 15.10 (0.78-63.99) y en Bivalva con estenosis 9.43 (0.09-131.40). En Control sin estenosis, los niveles fueron mayores (42.44, 9.58-439.25), y aún más altos en Control con estenosis (142.98, 6.21-335.73). Las diferencias fueron significativas entre Bivalva sin estenosis y Control sin estenosis (P1=0.005), así como entre los grupos con estenosis (P2=0.01). Para miR-196-5p, los niveles en Bivalva sin estenosis fueron 6.24 (1.33-33.03) y en Bivalva con estenosis 6.94 (0.35-111.75). En

Control sin estenosis, los niveles fueron 2.94 (0.17-14.82) y en Control con estenosis 4.14 (0.11-890.28). No se encontraron diferencias significativas entre los niveles del grupo Bivalva sin estenosis y Control sin estenosis ($P1=0.74$), ni entre los grupos con estenosis ($P2=0.10$).

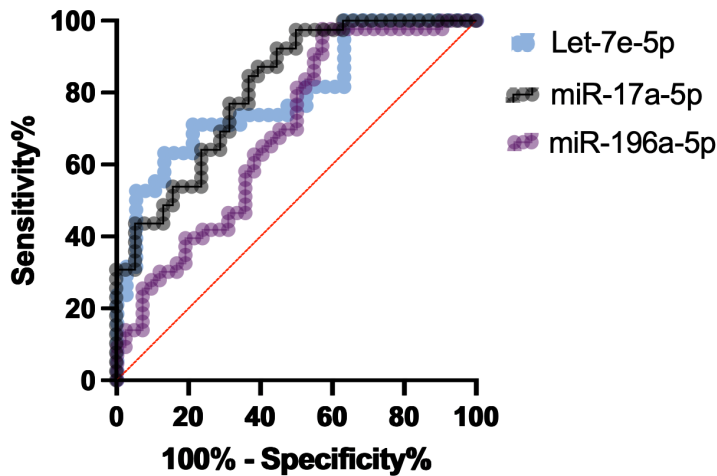
Tabla 7. Niveles de Expresión de microRNAs en Relación con la Dilatación de Aorta y el Tipo de Válvula (Bivalva vs. Control)

	Bivalva		Control		P1	P2
	No dilatación de aorta N=22	Dilatación de aorta N=16	No dilatación de aorta N=18	dilatación de aorta N=20		
Let-7e-5p	5.27 (7.60 - 5.53)	21.58 (29.75 - 31.11)	1.84 (120.52 - 3.17)	0.99 (40.13 - 3.96)	0.001	0.13
miR-17a-5p	0.62 (0.0940 - 0.35)	1.50 (0.78 - 1.61)	0.22(9.87- 0.19)	0.01 (6.22 - 0.11)	0.005	0.01
miR-196-5p	155.43 (131.20 - 97.87)	101.90 (131.40 - 111.75)	12.67 (439.25 - 80.28)	12.37 (232.11 - 14.82)	0.74	0.10
p1: no dilatación Bivalva vs no dilatación control, p2: dilatación bivalva vs dilatación control						

La tabla 7 presenta los niveles de expresión de tres microRNAs (Let-7e-5p, miR-17a-5p y miR-196-5p) en diferentes grupos definidos por la presencia o ausencia de dilatación de la aorta y el tipo de válvula (Bivalva y Control). Los datos se muestran como medianas con rangos intercuartílicos.

Para Let-7e-5p, los niveles en Bivalva sin dilatación de aorta (N=22) fueron 5.27 (7.60 - 5.53), y en Bivalva con dilatación de aorta (N=16) fueron notablemente mayores, con una mediana de 21.58 (29.75 - 31.11). En el grupo Control, los niveles fueron 1.84 (120.52 - 3.17) sin dilatación de aorta (N=18), y 0.99 (40.13 - 3.96) con dilatación de aorta (N=20). Las comparaciones revelaron una diferencia significativa entre Bivalva sin dilatación de aorta y Control sin dilatación ($P1=0.001$), mientras que no hubo diferencia significativa entre Bivalva con dilatación de aorta y Control con dilatación ($P2=0.13$).

Para miR-17a-5p, se observaron niveles más bajos en Bivalva sin dilatación de aorta (0.62, 0.094 - 0.35) en comparación con Bivalva con dilatación (1.50, 0.78 - 1.61). En el grupo Control, los niveles fueron 0.22 (9.87 - 0.19) sin dilatación de aorta y 0.01 (6.22 - 0.11) con dilatación. Las comparaciones mostraron diferencias significativas tanto entre Bivalva sin dilatación y Control sin dilatación ($P1=0.005$), como entre Bivalva con dilatación y Control con dilatación ($P2=0.01$).



miR	AUC	CI 95%	p
Let-7e	0.7916	0.6911-0.8920	0.0001
miR-17a	0.8117	0.7185 -0.9050	0.0001
miR-196	0.6899	0.5769 - 0.8030	0.0026

AUC: area bajo la curva, IC intervalo de confianza

Figura 8. Análisis de la curva ROC. Se realizó un modelo ROC para diferenciar entre el grupo de control y el grupo Bivalva. Se analizó toda la población, que incluyó a 39 pacientes con válvula bivalva y 39 control; el punto de corte óptimo se definió para maximizar la suma de sensibilidad y especificidad de los miRNAs.

La Figura 8 muestra la capacidad discriminativa de los microRNAs clave (Let-7e, miR-17^a y miR-196) mediante el área bajo la curva (AUC), junto con sus intervalos de confianza del 95% (IC 95%) y valores de significancia estadística (p).

Let-7e exhibió un AUC estadísticamente significativo de 0.7916 (IC 95%: 0.6911-0.8920, $p = 0.0001$), indicando una fuerte capacidad para distinguir entre grupos. De manera similar, miR-17^a mostró un AUC de 0.8117 (IC 95%: 0.7185-0.9050, $p = 0.0001$), subrayando su potencial diagnóstico. En contraste, miR-196 demostró un AUC más modesto de 0.6899 (IC 95%: 0.5769-0.8030, $p = 0.0026$), sugiriendo una capacidad discriminativa menos pronunciada en comparación con los otros dos micros.

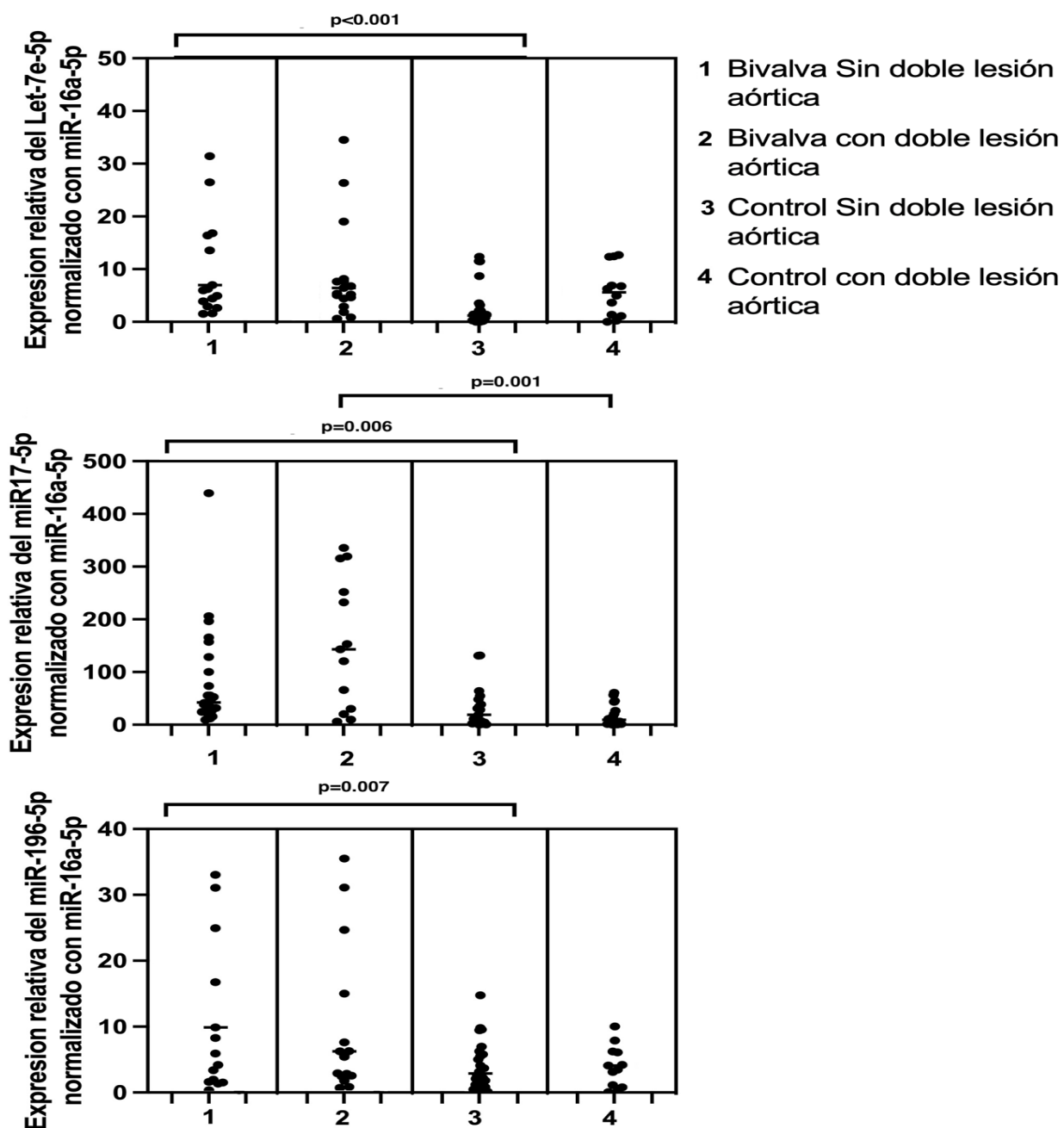


Figura 9. Comparación entre los niveles de expresión en tejido de los pacientes control y con válvula bivalva en let-7e-5p, miR-17^a-5p, y miR-196-5p. estratificado por doble lesión aórtica. Los datos se normalizaron con miR-16 y se expresan como medianas (mín. – máx.) (prueba U de Mann-Whitney). * $p > 0.05$.

XI. DISCUSIÓN

El aneurisma de la aorta ascendente (AAAsc) es considerado de alto riesgo por su elevada mortalidad, debido a que la dilatación es silenciosa y conlleva a desenlaces catastróficos en diferentes padecimientos. La VAB, es un defecto cardíaco congénito común con prevalencia del 1-2% (Sillesen et al.,2021; Masri et al.,2016).

El AAAsc esta asociado a VAB entre 50-70% y la mortalidad esta incrementada en estos pacientes (Guo et al.,2018). El mecanismo de daño aun no ha sido claramente definido aunque se ha propuesto que puede estar influenciado por factores epigenéticos en interacción con diversas vías de señalización celular (Peterson et al., 2018; Maleki et al.,2019)

Se ha propuesto que esto ocurre durante el desarrollo embrionario, debido a que células endoteliales podrían sufrir varias transiciones antes de llegar a un estado bien diferenciado, lo cual podría conducir a defectos en vías de señalización durante la etapa embrionaria cuando ocurre la formación de la aorta ascendente y la válvula aortica. Por lo tanto un estado no bien diferenciado celular podría contribuir en la susceptibilidad de desarrollar aneurismas (Freiholts et al 2023).

Recientemente se ha propuesto del mismo modo que la expresión de mi RNAs en pacientes con VAB podrían influenciar los cambios estructurales y funcionales que estos pacientes presentan a lo largo de su padecimiento.

La expresión de microRNA en el tejido aórtico, podrían mostrar su participación en procesos de remodelación de la aorta en la aortopatía por VAB. Apoyando la teoría de que microRNA específicos del tejido aórtico pueden ejercer sus efectos reguladores sobre la aortopatía a través de su impacto en la homeostasis funcional y estructural (Naito et al., 2020).

Obtuvimos tejido aortico de una población homogénea, aunque hay hallazgos diferenciales en función al género, ya que encontramos mayor frecuencia de diabetes en el grupo femenino lo cual lo hemos considerado como un confusor que analizaremos al evaluar nuestros resultados. Es importante destacar que en nuestro grupo control con válvula aortica trivalva los pacientes presentaban mayor edad versus los de VAB $p= 0.007$, esta diferencia en el grupo etario era un resultado esperado ya que en este grupo de pacientes con aorta trivalva (grupo control) el origen degenerativo es una de las causas más comunes de la disfunción valvular y también de la dilatación aortica.

Este hallazgo explica el mayor requerimiento de cirugía de Bentall y de Bono en estos pacientes ya que los diámetros fueron mayores a los que presentaron los casos con VAB por lo tanto el empleo de esta técnica quirúrgica en los controles versus VAB mostro diferencia significativa estadísticamente $p=0.01$. Por otro lado, en los pacientes con VAB el hallazgo fue que tuvieron mayor frecuencia estenosis aortica lo cual conlleva a que los requerimientos de un recambio valvular fuera prioritario y esto mostro que la frecuencia del cambio valvular aórtico en VAB fuera mayor en estos y esto también tuvo diferencia estadística al compararse con el grupo control $p= 0.008$.

En VAB las complicaciones valvulares en adultos son en gente joven y esto es descrito mundialmente (Fernandes et al.,2012).

Por lo tanto el hallazgo en esta serie de VAB fue de un rango de edad entre 44 y 64 años en VAB, lo cual confirma que la población afectada en esta patología difiere al compararse con poblaciones que tienen disfunción aortica por otras causas.

Como es conocido la válvula aórtica está expuesta al alto flujo sanguíneo. Las células que pertenecen a los tejidos de la válvula aórtica son capaces de detectar y responder a los cambios en las condiciones de flujo. La VAB presenta una morfología alterada, con sólo dos cúspides anormales en lugar de tres. Esto da como resultado una alteración de la dinámica del flujo sanguíneo en las cúspides valvulares y la pared aórtica, lo que puede, a su vez, aumentar el

riesgo de desarrollar estenosis y/o insuficiencia aórtica, endocarditis, aortopatía y/o disección aórtica.

Los microRNA son hebras cortas de RNA que regulan la expresión genética mediante inhibición de sus RNAm diana. Estos miRNAs participan en la fisiopatología cardiovascular. Recientemente se ha observado que la expresión de miRNA específicos puede modularse en respuesta a cambios hemodinámicos. La expresión diferencial de miRNAs en la válvula aórtica bicúspide, en comparación con la válvula aórtica tricúspide conlleva a la búsqueda de su participación en la estructura anatómica y funcional.

En este estudio encontramos que en el grupo en general la participación de miRNAs en la doble lesión aórtica de pacientes con VAB es evidente ya que nos muestra un incremento en la expresión de Let 7e-5p, miR17-5p y miR-196-5p cuando se compara con pacientes controles y esto mostro significancia estadística $p < 0.001$, $p = 0.006$ y $p = 0.007$ respectivamente.

En los casos con VAB que presentaron estenosis aórtica, el incremento de estos tres miRNAs es relevante y la diferencia con los controles en función a los mismos miRNAs muestra diferencias significativas lo cual es un hallazgo novedoso no descrito previamente.

A la vez que llama la atención que uno de ellos Let-7e-5p confiere un factor de riesgo en Aorta bivalva y es protector en los controles.

La investigación de los miRNAs en pacientes con patologia aortica sometidos a cirugía por estenosis aórtica han proporcionado información valiosa sobre su expresión en la dilatación de la aorta ascendente. Las tablas de este estudio muestran un análisis detallado de las características clínicas y los perfiles de expresión de miRNAs en estos pacientes.

La tabla 1 destaca las características demográficas y bioquímicas de los pacientes, indicando una diferencia significativa en la biometría hemática entre mujeres y hombres, lo que podría influir en la respuesta inflamatoria y en el riesgo de complicaciones postoperatorias. Este análisis es fundamental para entender las posibles variaciones en los resultados quirúrgicos basadas en diferencias demográficas.

La expresión diferencial de miRNAs, mostrando que miRNA-17-5p se sobre expresa en tejidos altamente dilatados. Este miRNA reduce la actividad de los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas, promoviendo la degradación de la matriz extracelular y la dilatación aórtica progresiva. Este hallazgo es consistente con estudios previos que sugieren el papel de miRNA-17-5p en la remodelación vascular. Asimismo, hsa-let-7e mostró una alta expresión en la dilatación de la aorta ascendente, implicando su participación en la respuesta inflamatoria y la remodelación vascular, mientras que miRNA-196a-5p mostró una regulación negativa en valvas estenóticas, lo que podría estar asociado con la calcificación valvular.

La tabla 3 correlaciona la expresión de miRNAs con los resultados quirúrgicos y las complicaciones postoperatorias. Los pacientes con sobreexpresión de miRNA-17-5p y hsa-let-7e tuvieron una mayor incidencia de reintervenciones y complicaciones como infecciones del sitio quirúrgico (ISQ). Estas complicaciones aumentan significativamente los costos hospitalarios y la duración de la estancia postoperatoria. La identificación de estos miRNAs como biomarcadores puede mejorar las estrategias de diagnóstico y tratamiento, reduciendo la morbilidad y los costos asociados a las complicaciones quirúrgicas.

La sobrevida a 30 días es menor en el grupo de aorta bivalva lo cual es del 92.3% posterior a lo cual se mantiene hasta los 26 meses de seguimiento y en los casos tratados con aorta trivalva fue del 100% en esta serie y se mantuvo hasta los 26 meses del seguimiento de estos pacientes, lo cual va a la par de otras series en relación a la evolución que ellos presentan durante la sobrevida a la cirugía (Yang et al., 2023) y a las causas de mortalidad (Yang et al 2020).

Los resultados presentados en las tablas y figuras muestran diferencias significativas en la expresión de microRNAs específicos entre grupos control y Bivalva, con y sin estenosis, así como entre diferentes estados de dilatación de la aorta.

La expresión de Let-7e-5p fue significativamente mayor en el grupo Bivalva sin estenosis comparado con el control sin estenosis ($P1=0.001$). Este aumento podría estar relacionado con mecanismos específicos del tejido la válvula aórtica bivalva que no están presentes en el tejido valvular normal. Estudios previos han demostrado que este miRNA desempeña un papel en la regulación de la proliferación celular y la inflamación, lo que sugiere un papel potencial en la modulación de la patología valvular (Bernstein et al., 2021; Bao et al., 2013). La falta de una diferencia significativa en Let-7e-5p entre los grupos con estenosis ($P2=0.13$) indica que este microRNA podría no estar directamente relacionado con la progresión hacia la estenosis, sino más bien con la condición valvular en sí misma.

Para miR-17a-5p, se observaron niveles significativamente más bajos en Bivalva sin estenosis comparado con el control sin estenosis ($P1=0.005$), y niveles significativamente más altos en control con estenosis comparado con Bivalva con estenosis ($P2=0.01$). Los hallazgos sugieren que este miRNA podría desempeñar un papel protector en el tejido de aorta bivalva, ya que sus niveles son más bajos en ausencia de estenosis y su aumento en el control podría estar asociado con procesos inflamatorios o degenerativos que conducen a la estenosis. La literatura apoya que este miRNA está implicado en la regulación de genes asociados con la fibrosis y la inflamación, procesos clave en la patología de la estenosis valvular (Sessa et al., 2023; Lu et al., 2016).

En el miR-196-5p, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos sin estenosis ($P1=0.74$) ni entre los grupos con estenosis ($P2=0.10$). Esto indica que este miRNA podría no ser un biomarcador relevante para la diferenciación entre estos estados patológicos. Hay investigaciones que han mostrado que este miRNA tiene roles variados en diferentes tipos de tejidos y condiciones patológicas, pero su implicación específica en la estenosis valvular no está claramente definida (Chen et al., 2011; Ghafouri-Fard et al., 2021).

La tabla 7 presenta los niveles de expresión de tres microRNAs (Let-7e-5p, miR-17a-5p y miR-196-5p) en diferentes grupos definidos por la presencia o ausencia de dilatación de la aorta y el tipo de válvula (Bivalva y Control). Los datos se muestran como medianas con rangos intercuartílicos. Para Let-7e-5p, los niveles en Bivalva sin dilatación de aorta fueron significativamente mayores que en los controles sin dilatación ($P1=0.001$), lo cual es consistente con estudios que han encontrado niveles elevados de Let-7e-5p en condiciones de remodelación vascular y fibrosis (Roush et al., 2008). Para miR-17a-5p, las diferencias significativas observadas tanto en ausencia como en presencia de dilatación aórtica ($P1=0.005$ y $P2=0.01$) subrayan su importancia potencial como biomarcador en la detección de cambios patológicos en la aorta (Wu et al., 2016; Pulignani et al., 2019).

La Figura 8 muestra la capacidad discriminativa de tres microRNAs clave (Let-7e, miR-17a y miR-196) mediante el área bajo la curva (AUC), junto con sus intervalos de confianza del 95% (IC 95%) y valores de significancia estadística (p). Let-7e exhibió un AUC significativo de 0.7916 (IC 95%: 0.6911-0.8920, $p = 0.0001$), indicando una fuerte capacidad para distinguir entre grupos. De manera similar, miR-17a mostró un AUC de 0.8117 (IC 95%: 0.7185-0.9050, $p = 0.0001$), subrayando su potencial diagnóstico robusto. Estos resultados son consistentes con la literatura, donde ambos microRNAs han sido identificados como potenciales biomarcadores para diversas enfermedades cardiovasculares (Xue et al., 2019; Mamoru et al., 2011). En contraste, miR-196

demostró un AUC más modesto de 0.6899 (IC 95%: 0.5769-0.8030, $p = 0.0026$), sugiriendo una capacidad discriminativa menos pronunciada en comparación con los otros dos microRNAs (Dioguardi et al., 2022).

XII. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio proporcionan evidencia significativa sobre el posible papel regulador de los miRNAs dentro de los diversos mecanismos de daño implicados en la dilatación de la aorta ascendente. Los hallazgos en esta investigación permiten proponer su potencial utilidad dentro de la investigación para encontrar blancos terapéuticos a futuro en pacientes con válvula aórtica bivalva. La identificación de la expresión muy específica de estos miRNAs en pacientes con VAB, hace muy factible que puedan proponerse como biomarcadores, durante el estudio pre quirúrgico de estos pacientes conduciendo a mejores resultados quirúrgicos y una reducción en las complicaciones post-operatorias.

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

1. Pulignani S, Borghini A, Andreassi MG. microRNAs in bicuspid aortic valve associated aortopathy: Recent advances and future perspectives. *J Cardiol*. 2019;74(4):297–303.
2. Rana TM. Illuminating the silence: Understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(1):23–36.
3. Holliday CJ, Ankeny RF, Jo H, Nerem RM. Discovery of shear-and side-specific mRNAs and miRNAs in human aortic valvular endothelial cells. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2011;301:856–67.
4. Heath JM, Fernandez Esmerats J, Khambouneheuang L, Kumar S, Simmons R, Jo H. Mechanosensitive microRNA-181b Regulates Aortic Valve Endothelial Matrix Degradation by Targeting TIMP3. *Cardiovasc Eng Technol*. 2018;9:141–50.
5. Girdauskas E, Petersen J, Neumann N, Ungelenk M, Kurth I, Reichenspurner H, et al. MiR-145 expression and rare NOTCH1 variants in bicuspid aortic valve-associated aortopathy. *PLoS One*. 2018;13(7):e0200205.
6. Du J, Zheng R, Xiao F, Zhang S, He K, Zhang J, et al. Downregulated MicroRNA-195 in the Bicuspid Aortic Valve Promotes Calcification of Valve Interstitial Cells via Targeting SMAD7. *Cell Physiol Biochem*. 2017;44:884–96.
7. Poggio P, Songia P, Moschetta D, Valerio V, Myasoedova V, Perrucci GL, et al. MiRNA profiling revealed enhanced susceptibility to oxidative stress of endothelial cells from bicuspid aortic valve. *J Mol Cell Cardiol*. 2019;131:146–54.
8. Gallo A, Agnese V, Coronello C, Raffa GM, Bellavia D, Conaldi PG, et al. On the prospect of serum exosomal miRNA profiling and protein biomarkers for the diagnosis of ascending aortic dilatation in patients with bicuspid and tricuspid aortic valve. *Int J Cardiol*. diciembre de 2018;273:230–6.
9. Lim MSA, Portelli SS, Padang R, Bannon PG, Hambly BD, Jeremy RW, et al. Novel insights into bicuspid aortic valve (BAV) aortopathy: Long non-coding RNAs TUG1 and MIAT are differentially expressed in BAV ascending aortas. *Cardiovasc Pathol*. 2022;60:107433.
10. Naito S, Petersen J, Sequeira-Gross T, Neumann N, Duque Escobar J, Zeller T, et al. Bicuspid aortopathy—molecular involvement of microRNAs and MMP-TIMP. *Biomarkers*. 2020;25(8):711–8.
11. Naito S, Sequeira-Gross T, Petersen J, Detlef I, Sachse M, Zeller T, et al. Circulating microRNAs in the prediction of BAV aortopathy: Do the expression patterns correlate between

blood and aortic tissue? *Rev Cardiovasc Med*. 2022;23(2):047.

12. Sophocleous F, De Garate E, Bigotti MG, Anwar M, Jover E, Chamorro-Jorganes A, et al. A Segmental Approach from Molecular Profiling to Medical Imaging to Study Bicuspid Aortic Valve Aortopathy. *Cells*. 2022;11:3721.
13. Zhang H, Liu D, Zhu S, Wang F, Sun X, Yang S, et al. Plasma Exosomal Mir-423-5p Is Involved in the Occurrence and Development of Bicuspid Aortopathy via TGF- β /SMAD2 Pathway. *Front Physiol*. 2021;12:759035.
14. Maleki S, Cottrill KA, Poujade FA, Bhattachariya A, Bergman O, Gådin JR, et al. The mir-200 family regulates key pathogenic events in ascending aortas of individuals with bicuspid aortic valves. *J Intern Med*. 2019;295:104–14.
15. Ma W-G, Zhang W, Wang L-F, Zheng J, Ziganshin BA, Charilaou P, et al. Type A aortic dissection with arch entry tear: Surgical experience in 104 patients over a 12-year period. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2016;151(6):1581–92.
16. Martínez-Micaelo N, Beltrán-Debón R, Baiges I, Faiges M, Alegret JM. Specific circulating microRNA signature of bicuspid aortic valve disease. *J Transl Med*. 2017;15:76.
17. Lu P, Yin B, Liu L. MicroRNA-138 suppresses osteoblastic differentiation of valvular interstitial cells in degenerative calcific aortic valve disease. *Int Heart J*. 2019;60:136–44.
18. Yanagawa B, Lovren F, Pan Y, Garg V, Quan A, Tang G, et al. miRNA-141 is a novel regulator of BMP-2-mediated calcification in aortic stenosis. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2012;144(1):256–62.
19. Jiang Y, Ji W, Zhu J, Shen Z, Chen J. Upregulation of miR-664a-3p Ameliorates Calcific Aortic Valve Disease by Inhibiting the BMP2 Signaling Pathway. *Dis Markers*. 2022;2074356.
20. Fang M, Li B, Li X, Wang Y, Zhuang Y. MicroRNA-29b regulates pyroptosis involving calcific aortic valve disease through the STAT3/SOCS1 pathway. *Int J Cardiol*. enero de 2023;371:319–28.
21. Wang C, Han J, Liu M, Huang Y, Zhou T, Jiang N, et al. RNA-sequencing of human aortic valves identifies that miR-629-3p and TAGLN miRNA-mRNA pair involving in calcified aortic valve disease. *J Physiol Biochem*. 2022;78(4):819–31.
22. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc*. 2008;3(6):1101–8.
23. Sillesen A-S, Vøgg O, Pihl C, Raja AA, Sundberg K, Vedel C, Zingenberg H, Jørgensen FS, Vejstrup N, Iversen K et al (2021) Prevalence of bicuspid aortic valve and associated aortopathy in Newborns in Copenhagen. Denmark *JAMA* 325:561–567.
24. Masri A, Kalahasti V, Alkharabsheh S, Svensson LG, Sabik JF, Roselli EE, Hammer D, Johnston DR, Collier P, Rodriguez LL et al (2016) Characteristics and long-term outcomes of contemporary patients with bicuspid aortic valves. *J Thorac Cardiovasc Surg* 151:1650-1659.e1.
25. Guo MH, Appoo JJ, Saczkowski R, Smith HN, Ouzounian M, Gregory AJ, Herget EJ, Boodhwani M (2018) Association of mortality and acute aortic events with ascending aortic aneurysm: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Netw Open* 1:e181281.
26. Peterson JC, Chughtai M, Wisse LJ, Gittenberger-de Groot AC, Feng Q, Goumans MTH, VanMunsteren JC, Jongbloed MRM, DeRuiter MC (2018) Bicuspid aortic valve formation: Nos3 mutation leads to abnormal lineage patterning of neural crest cells and the second heart field. *Dis Model Mech* 11 6.
27. Maleki S, Poujade F-A, Bergman O, Gådin JR, Simon N, Lång K, Franco-Cereceda A, Body SC, Björck HM, Eriksson P (2019) Endothelial/epithelial mesenchymal transition in ascending aortas of patients with bicuspid aortic valve. *Front Cardiovasc Med* 6:182.
27. Freiholtz D, Bergman O, Lång K, Poujade FA, Paloschi V, Granath C, Lindeman JHN, Olsson C, Franco-Cereceda A, Eriksson P, Björck HM. Bicuspid aortic valve aortopathy is characterized by embryonic epithelial to mesenchymal transition and endothelial instability. *J Mol*

- Med (Berl). 2023 Jul;101(7):801-811. doi: 10.1007/s00109-023-02316-5. Epub 2023 May 10. PMID: 37162557; PMCID: PMC10299957.
28. Naito S, Petersen J, Sequeira-Gross T, Neumann N, Duque Escobar J, Zeller T, Reichenspurner H, Girdauskas E. Bicuspid aortopathy - molecular involvement of microRNAs and MMP-TIMP. *Biomarkers*. 2020 Dec;25(8):711-718. doi: 10.1080/1354750X.2020.1841297. Epub 2020 Nov 9. PMID: 33090032.
 29. Fernandes S, Khairy P, Graham DA, Colan SD, Galvin TC, Sanders SP, Singh MN, Bhatt A, Lacro RV. Bicuspid aortic valve and associated aortic dilation in the young. *Heart*. 2012 Jul;98(13):1014-9. doi: 10.1136/heartjnl-2012-301773. PMID: 22668868.
 30. Yang LT, Ye Z, Wajih Ullah M, Maleszewski JJ, Scott CG, Padang R, Pislaru SV, Nkomo VT, Mankad SV, Pellikka PA, Oh JK, Roger VL, Enriquez-Sarano M, Michelena HI. Bicuspid aortic valve: long-term morbidity and mortality. *Eur Heart J*. 2023 Nov 14;44(43):4549-4562. doi: 10.1093/eurheartj/ehad477. PMID: 37611071.
 31. Yang LT, Tribouilloy C, Masri A, Bax JJ, Delgado V, Girdauskas E, Evangelista A, Sundt TM 3rd, Svensson LG, Enriquez-Sarano M, Michelena HI. Clinical presentation and outcomes of adults with bicuspid aortic valves: 2020 update. *Prog Cardiovasc Dis*. 2020 Jul-Aug;63(4):434-441. doi: 10.1016/j.pcad.2020.05.010. Epub 2020 May 30. PMID: 32485187.
 32. Bernstein DL, Jiang X, Rom S. let-7 microRNAs: Their Role in Cerebral and Cardiovascular Diseases, Inflammation, Cancer, and Their Regulation. *Biomedicines*. 2021 May 26;9(6):606. doi: 10.3390/biomedicines9060606. PMID: 34073513; PMCID: PMC8227213.
 33. Bao MH, Feng X, Zhang YW, Lou XY, Cheng Y, Zhou HH. Let-7 in cardiovascular diseases, heart development and cardiovascular differentiation from stem cells. *Int J Mol Sci*. 2013 Nov 21;14(11):23086-102. doi: 10.3390/ijms141123086. PMID: 24284400; PMCID: PMC3856107.
 34. Sessa F, Salerno M, Esposito M, Cocimano G, Pomara C. miRNA Dysregulation in Cardiovascular Diseases: Current Opinion and Future Perspectives. *Int J Mol Sci*. 2023 Mar 8;24(6):5192. doi: 10.3390/ijms24065192. PMID: 36982265; PMCID: PMC10048938.
 35. Lu Z, Li S, Zhao S, Fa X. Upregulated miR-17 Regulates Hypoxia-Mediated Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Proliferation and Apoptosis by Targeting Mitofusin 2. *Med Sci Monit*. 2016 Sep 18;22:3301-8. doi: 10.12659/msm.900487. PMID: 27640178; PMCID: PMC5029176.
 36. Chen C, Zhang Y, Zhang L, Weakley SM, Yao Q. MicroRNA-196: critical roles and clinical applications in development and cancer. *J Cell Mol Med*. 2011 Jan;15(1):14-23. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01219.x. PMID: 21091634; PMCID: PMC3276076.
 37. Ghafouri-Fard S, Gholipour M, Taheri M. Role of MicroRNAs in the Pathogenesis of Coronary Artery Disease. *Front Cardiovasc Med*. 2021 Apr 12;8:632392. doi: 10.3389/fcvm.2021.632392. PMID: 33912599; PMCID: PMC8072222.
 38. Roush S, Slack FJ. The let-7 family of microRNAs. *Trends Cell Biol*. 2008 Oct;18(10):505-16. doi: 10.1016/j.tcb.2008.07.007. Epub 2008 Sep 4. PMID: 18774294.
 39. Wu, J, Song, H, Li, S. et al. Progressive Aortic Dilation Is Regulated by miR-17–Associated miRNAs. *JACC*. 2016 Jun, 67 (25) 2965–2977. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.04.027>.
 40. Xue S, Liu D, Zhu W, Su Z, Zhang L, Zhou C, Li P. Circulating MiR-17-5p, MiR-126-5p and MiR-145-3p Are Novel Biomarkers for Diagnosis of Acute Myocardial Infarction. *Front Physiol*. 2019 Feb 18;10:123. doi: 10.3389/fphys.2019.00123. PMID: 30833907; PMCID: PMC6387945.
 41. Mamoru S., Yoshitaka M., Yuji T., Tsuyoshi T., Motoyuki N. A cellular microRNA, let-7i, is a novel biomarker for clinical outcome in patients with dilated cardiomyopathy. *J. Card*.

Fail. 2011;17:923–929.

42. Dioguardi M, Cantore S, Sovereto D, La Femina L, Caloro GA, Spirito F, Scacco S, Di Cosola M, Lo Muzio L, Troiano G, Ballini A. Potential Role of miR-196a and miR-196b as Prognostic Biomarkers of Survival in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review, Meta-Analysis and Trial Sequential Analysis. *Life (Basel)*. 2022 Aug 19;12(8):1269. doi: 10.3390/life12081269. PMID: 36013448; PMCID: PMC9410063.