

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO



**“Caracterización de los Competing Endogenous RNAs en la hipertensión arterial
primaria”**

Allan Javier Peñaloza Otarola

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER EN GENÉTICA**

Director de Tesis: Prof. Dr. Vinicius Maracaja-Coutinho
Co-Director: Prof. Patricia Iturra

Fecha: 14-08-2020

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

Allan Javier Peñaloza Otarola

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magíster en Genética en el Examen de Defensa de Tesis el día 13 de agosto del 2020.

Prof. Dr. Vinicius Maracaja-Coutinho

Director de Tesis

Advanced Center for Chronic Diseases
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

Prof. Patricia Iturra

Directora de Tesis

Programa de Genética Humana
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Comisión informante de Tesis

Prof. Dr. Ricardo Armisen Prof. Dr. Ricardo Soto Prof. Dr. Hugo Verdejo

Prof Dr. Patricio Gonzales

Presidente Comisión

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Vinicius, por ser un gran profesor y mentor, por su dedicación y completo compromiso hacia la formación profesional de sus alumnos. A la profesora Paricia, por su dedicación y buena disposición para resolver dudas y colaborar con el Dr. Vinicius en la ardua labor de mentor e investigador.

Agradezco, a mi madre, Jacqueline Otarola, que posee una gran calidad humana y profesional brindando apoyo en todo momento. Sobre todo en los momentos adversos, junto con su gran disposición y orientación en mi vida personal.

Agradezco al Laboratorio de Bioinformática Integrativa, parte del Advanced Center for Chronic Diseases, por dar lugar al desarrollo de la presente Tesis de Magister en Genética y apoyarme como alumno e investigador. Quisiera agradecer a sus miembros en especial a Victor Aliaga, Raúl Arias, Thais Ratis y Adolfo Rojas, por compartir el pequeño pero acogedor espacio del laboratorio y apoyarme durante el desarrollo del presente trabajo.

Agradezco al Laboratorio de Minería de Datos y al profesor Elmer Fernandez, de la Universidad Nacional de Córdoba, por invitarme a una estancia de investigación en laboratorio en Córdoba, Argentina, y a todo su equipo de investigación por ayudar a complementar mi formación científica. También la Red de Macrouiversidades de América Latina y el caribe, por apoyarme con una beca para poder realizar esta pasantía en el extranjero.

Agradezco a mis amigos Erick Suazo, quien es un gran amigo en todo momento, Misael Zarate, por ser la voz que siempre me hace reflexionar y darme otra perspectiva de las diversas situaciones personales como profesionales, José Gomez por su calidad humana y paciencia.

Agradezco a mis dos mejores amigos Patricio Valdivia y Felipe Mauna por su apoyo a distancia, comprensión y amistad durante todos estos años. Finalmente, quisiera también agradecer a todas mis amistades que por motivo de espacio no puedo continuar nombrando.

¡Muchas Gracias!

¿Cambias los pasos en la danza de la vida?

o

¿La danza de la vida cambia tus pasos?

Índice

Resumen	9
Abstract	10
Introducción	11
1.1. La hipertensión	11
1.2. Transcriptómica de la hipertensión arterial primaria	11
1.3. Los RNAs no codificantes y la hipertensión arterial primaria	12
1.4. Los <i>Competing Endogenous RNAs</i> (ceRNAs)	13
1.5. Meta-análisis de expresión diferencial de transcritos	14
1.6. Biología de redes y de sistemas	15
Hipótesis	17
Objetivos	17
3. 1. Objetivo general	17
3.2. Objetivo específico	17
Metodología	18
4.1. Definiendo una red global de interacción de miRNA-lncRNA-mRNA en el genoma humano	18
4.1.1. Actualización del repertorio de lncRNAs en el genoma humano	18
4.1.2. Generando un catálogo de interacciones entre miRNAs y mRNAs en el genoma humano	18
4.1.3. Generando un catálogo de interacciones entre miRNAs y lncRNAs	19
4.1.4. Unificando una red global humana de miRNAs, lncRNAs y mRNAs	19
4.2. Perfiles de expresión de miRNAs, lncRNAs y mRNAs en la enfermedad de hipertensión	19
4.3. Definiendo las redes de interacción de ceRNAs asociadas con hipertensión arterial primaria	21
4.3.1. Construcción y análisis de los nodos de redes de ceRNAs	21
4.3.2. Análisis estadístico de las redes de ceRNAs	¡Error! Marcador no definido.
Resultados	22
5.1. Análisis de los perfiles de expresión de miRNAs, lncRNAs y de genes codificantes de proteínas asociados con hipertensión arterial primaria a partir de datos disponibles en repositorios públicos	22
5.1.1. Levantamiento público de estudios transcriptómicos de miRNAs, mRNAs y lncRNAs relacionados con la hipertensión esencial y re- anotación de plataformas de <i>microarray</i> .	22
5.1.2 MicroRNAs diferencialmente expresados en hipertensión arterial primaria.	25
5.1.3. Genes codificantes de proteínas diferencialmente expresados en hipertensión arterial primaria.	30
3.1.4. LncRNAs diferencialmente expresados en hipertensión arterial primaria.	33

3.2. Definir las redes de interacción de competing endogenous RNAs asociados a hipertensión arterial primaria.	36
3.2.1. Catálogo de interacciones entre miRNAs, lncRNAs y mRNAs en el genoma humano.	36
3.2.2. Catálogo de interacciones entre miRNAs, lncRNAs y mRNAs asociados con la hipertensión arterial primaria	40
Discusión	47
Conclusión	52
Bibliografía	53
Anexo	65

Índice de tablas

Tabla 1. Tabla de contrastes de las vías KEGG de los 16 miRNAs identificados	27
Tabla 2. Listado de genes codificantes de proteínas sobre- y sub-regulados en la hipertensión arterial primaria con el meta-análisis.	32
Tabla 3. Listado de lncRNAs sobre- y sub-regulados en la hipertensión arterial primaria con el meta-análisis.	35
Tabla 4. Tabla resumen de los miRNAs compartidos por las metodologías de combining y Vote-counting que hacen parte de una posible red bajo la hipótesis de ceRNA.	41
Tabla 5. Tabla resumen de los mRNAs compartidos por las metodologías de combining y Vote-counting.	42

Anexo

Anexo 3.- Tabla de contrastes de <i>vote-counting</i> MetaVolcanoR con los miRNAs sobre-regulados y sub-regulados.	¡Error! Marcador no definido.
Anexo 4. Tabla de contrastes de <i>combining</i> MetaVolcanoR con los miRNAs sobre-regulados y sub-regulados.	68
Anexo 5. Tabla de <i>Competing Endogenous RNAs</i> .	73

Índice de figuras

Figura 1. Resumen de los estudios seleccionados.	23
Figura 2. Re- anotación de las plataformas de microarray.	24
Figura 3. Resultados del meta-análisis de expresión diferencial de microRNAs involucrados con la hipertensión arterial primaria.	26
Figura 4. Resultados del meta-análisis de expresión diferencial de mRNAs involucrados con la hipertensión arterial primaria.	31
Figura 5. Contrastes de las vías reportadas como enriquecidas por EnrichR de los 112 mRNAs (codificantes de proteínas) identificados por meta-análisis.	33
Figura 6. Resultados del meta-análisis de expresión diferencial de lncRNAs involucrados con la hipertensión arterial primaria.	35
Figura 7. Anotaciones recuperadas de las bases de datos de genes codificantes (mRNA) con interacción con miRNA.	37
Figura 8. Diagrama de Venn con las interacciones predichas entre miRNAs y mRNAs.	38
Figura 9. Tipos de anotación encontrados en la base de datos de lncBase.	39
Figura 10. Diagrama de venn con las interacciones entre miRNAs y lncRNAs.	39
Figura 11. Cantidad de moléculas únicas de lncRNA, miRNA, mRNA encontradas en la interacción de las bases de datos de miRDB, TargetMiner, TargetScanHuman, TarBase, lncBase, starBase.	40
Figura 12. Red de interacción no dirigida de ceRNAs identificados bajo la hipótesis de ceRNAs.	44
Figura 13. Valores de expresión de mRNAs - miRNAs - lncRNAs separados por miRNA.	45
Figura 14. Red de interacción no dirigida de ceRNAs identificados bajo la hipótesis de ceRNAs para los lncRNAs, mRNAs y miRNAs que presentan una correlación positiva.	46

Anexo

Anexo 1. Representación esquemática de la regulación génica mediada por los ceRNAs.	65
Anexo 6. Valores de expresión de mRNAs - miRNAs - lncRNAs.	83

Resumen

La hipertensión arterial es una patología que consiste en el aumento de la presión sanguínea arterial. La hipertensión arterial primaria es la que surge sin causa específica identificable. Este tipo de hipertensión se estima que afecta al 40% de la población adulta mundial. En Chile se estima que alrededor del 27.6% de la población sufre de hipertensión arterial y alrededor del 27.53% de la población afectada fallece por trastornos derivados de esta condición. En el último tiempo, muchos estudios se han centrado en investigar el rol de los lncRNAs en el mecanismo de *Competing endogenous RNAs* (ceRNAs) en enfermedades humanas. Este mecanismo es una forma novedosa de regular la expresión genética a través de la captura de microRNAs (miRNAs) por parte de los ARN largos no codificantes (lncRNAs). Bajo este concepto se plantea la hipótesis del presente trabajo en la cual se estudia la expresión de genes de respuesta para la hipertensión arterial primaria y sus posibles interacciones en el mecanismo de ceRNAs. Utilizando herramientas de bioinformática en las bases de datos de GEO y SRA, minería de datos y meta-análisis, identificamos la putativa participación de 2 lncRNAs (*LINC01128* y *SNHG5*) como capturadores del miRNA hsa-miR-92a-3p regulando la expresión de los genes *ACSL4*, *LMBR1L*, *CCN2*, *APLP2*, *ANXA1*, *HIPK3* y *SURF4*, identificando el mecanismo de ceRNAs en la condición de hipertensión arterial primaria.

scripts disponibles en https://github.com/negroenvidoso/Script_data_analisis

Abstract

Hypertension is a pathology that consists of an increase in arterial blood pressure. Primary arterial hypertension is that which arises without a specific identifiable cause. This type of hypertension is estimated to affect 40% of the world's adult population. In Chile it is estimated that around 27.6% of the population suffers from arterial hypertension and around 27.53% of the affected population dies from disorders derived from this condition. In recent times, many studies have focused on investigating the role of lncRNAs in the mechanism of endogenous Competing RNAs (ceRNAs) in human diseases. This mechanism is a novel form of regular gene expression through the capture of microRNAs (miRNAs) by long non-coding RNAs (lncRNAs). Under this concept, the hypothesis of the present work is proposed in which the expression of response genes for primary arterial hypertension and their possible interactions in the mechanism of ceRNAs is studied. Using bioinformatics tools in GEO and SRA databases, data mining and meta-analysis. We identified the putative participation of 2 lncRNAs (LINC01128 and SNHG5) as capturers of the hsa-miR-92a-3p miRNA, regulating the expression of the ACSL4, LMBR1L, CCN2, APLP2, ANXA1, HIPK3 and SURF4 genes. identifying the mechanism of ceRNAs in the condition of primary arterial hypertension.

scripts available at https://github.com/negroenvideoso/Script_data_analysis

1. Introducción

1.1. La hipertensión

Hipertensión arterial es una patología en la que la presión arterial es consistentemente elevada en las arterias (Cheng & Joe, 2015). La presión sanguínea es la fuerza que ejerce la sangre circulante contra las paredes de las arterias cuando el corazón bombea sangre a todo el cuerpo (Kearney *et al.*, 2005). La hipertensión puede ser considerada una enfermedad silenciosa, debido a que no posee signos de advertencia o síntomas. Además, es clasificada como un factor de riesgo importante para diferentes enfermedades cardiovasculares, como miocardiopatías (Lip, 2000), enfermedades de las arterias coronarias (McInnes, 1995) y enfermedades vasculares periféricas (Murakami, 2015). En Chile, de acuerdo con la estadística nacional de salud reportada el año 2017, la prevalencia de hipertensión arterial en la población es de un 27.6% (MINSAL, 2017).

La hipertensión arterial se puede clasificar como primaria (esencial) o secundaria. La hipertensión arterial primaria no está asociada con ninguna causa médica anterior, y representa alrededor del 95% de los casos. Los casos restantes, alrededor del 5%, se clasifican en hipertensión arterial secundaria, que afectan personas que tienen una causa médica identificable preexistente, como por ejemplo la presencia de enfermedades renales, diabetes o obesidad (Centers for Disease Control and Prevention, 2012). El manejo clínico de este tipo de hipertensión está limitado por el desconocimiento de los principales factores asociados al desarrollo de la condición. Por otro lado, la hipertensión arterial primaria es heredable (Doris, 2002). Estudios de gemelos muestran que un 30 a 50% de la variación fenotípica de la presión arterial es atribuible a la variabilidad genética (Butler, 2010).

1.2. Transcriptómica de la hipertensión arterial primaria

Diferentes proyectos de investigación han utilizado el perfil de expresión génica para estudiar la hipertensión arterial primaria. Un estudio realizado por Marques y colaboradores, en tejido renal de pacientes con hipertensión arterial primaria y controles normotensos, destacó 14 genes que se expresan diferencialmente en la médula renal. Experimentos adicionales proporcionaron información de los mecanismos funcionales para los genes *REN*, que codifica para renina; y *CD36*, que codifica para CD36 (Marques *et al.*, 2011). Un estudio realizado por Korkor y colaboradores en células de sangre periférica, encontró genes expresados diferencialmente en la actividad del receptor de clase II, del complejo de histocompatibilidad principal y a la respuesta inmune (Korkor *et al.*, 2011). Stoynev y colaboradores estudiaron los

perfiles de expresión génica en sangre periférica entre pacientes con hipertensión, pacientes con diabetes tipo 2 y controles, y descubrieron que el gen *PDGFRB*, que codifica para el factor de crecimiento beta derivado de plaquetas, esencial para el desarrollo vascular, está sobre-regulado en la condición de hipertensión arterial y diabetes. Además, hubo una serie de otros genes que codifican moléculas de adhesión y factores de crecimiento que se presentaron como diferencialmente expresados (Stoynev *et al.*, 2014). Por otra parte, el gen *HMGAI* se ha estudiado ampliamente como un factor proinflamatorio en las enfermedades cardiovasculares (Viemann *et al.*, 2011), señalando la importancia y el rol funcional de este gen en la hipertensión arterial primaria. Otro gen asociado a la enfermedad sería *NOS3*. Su sobreexpresión en este tipo de patología refleja una respuesta a la elevada producción de peroxinitrito, siendo también asociado a una inflamación del tejido afectado (Hein *et al.*, 2009). Adicionalmente otros estudios a su vez han identificado genes asociados a la respuesta genética a la condición de hipertensión arterial primaria, que podrían ser importantes candidatos para la comprensión de cómo esta condición funciona a nivel molecular (Textoris *et al.*, 2013; Parthenakis *et al.*, 2016; Romaine *et al.*, 2016; Creemers *et al.*, 2012, Akehurst *et al.*, 2015; Marques *et al.*, 2011).

1.3. Los RNAs no codificantes y la hipertensión arterial primaria

Los RNAs no codificantes de proteínas (ncRNAs) comprenden las unidades transcripcionales más representativas del genoma de mamíferos (Maracaja-Coutinho *et al.*, 2019a; Kalvari *et al.*, 2018). Dos de las clases de RNAs más estudiadas son los microRNAs (miRNA) y los RNAs largos no codificantes (lncRNAs). Los miRNAs hacen parte del gran grupo de RNAs pequeños, que comprende aquellas familias de RNAs con menos de 200 nucleótidos de tamaño. Ellos actúan como reguladores post-transcripcionales, llevando a la degradación o impidiendo la traducción de RNAs mensajeros (mRNAs).

Es de conocimiento público el hecho de que los miRNAs pueden participar en el desarrollo de la hipertensión esencial a través de su interacción con las regiones 3' UTR de los genes objetivos que están implicados en la regulación de la presión sanguínea. Un ejemplo, sería el caso del SNP rs5186, ubicado en la región 3'UTR de angiotensina II tipo 1 (*AGTRI*). Este polimorfismo altera la eficiencia de unión del miRNA hsa-miR-155 al mRNA de *AGTRI* (Sethupathy *et al.*, 2007). Específicamente, el estudio mostró que hsa-miR-155 podría unirse de forma más eficiente al alelo 1166A de rs5186, pero no al alelo 1166C, lo cual se demostró en un número significativo de pacientes con hipertensión esencial. Por lo tanto, el SNP puede

impedir la unión de hsa-miR-155 y causar el aumento de los niveles de *AGTRI*, resultando en un aumento en la presión arterial en pacientes hipertensos (Arora *et al.*, 2013).

Diferente de los miRNAs, los estudios sobre el papel fisiológico de los lncRNAs en la regulación de la presión arterial aún se encuentran en una fase temprana de investigación. Hay un número limitado de investigaciones en humanos que relacionan la hipertensión esencial con lncRNAs. Investigaciones realizadas por Gopalakrishnan y colaboradores, se llevaron a cabo la secuenciación de lncRNAs en tres cepas de rata ampliamente utilizadas en investigación de hipertensión: la rata hipertensiva Dahl sensible a la Sal (S), la rata espontáneamente hipertensa (SHR) y la rata normotensa Dahl resistente a Sal (R) (Gopalakrishnan *et al.* 2015). Por comparación de los perfiles de lncRNAs entre las ratas S hipertensas y las ratas normotensas R, se esperaba identificar los lncRNAs implicados en la regulación de la presión arterial. Se encontraron que 186 lncRNAs se expresan en S pero no en R, mientras que 199 lncRNAs se expresan en R pero no en S. De manera similar, 199 lncRNAs se expresan en S pero no en SHR, mientras que 208 ncRNAs se expresan en SHR y no en S (Gopalakrishnan *et al.* 2015), demostrando que los lncRNAs tienen respuesta en la patología de hipertensión arterial.

El rol de los lncRNAs en la hipertensión esencial aún es poco estudiado (Bink, Lozano-Vidal, & Boon, 2019). Gran parte del trabajo en esta área se ha centrado casi exclusivamente en miRNAs, a pesar de la rápida expansión de la investigación de lncRNAs y la importancia funcional bien establecida para algunos lncRNAs en la regulación génica. La falta de una caracterización sistemática de los lncRNAs es un cuello de botella para el estudio de los lncRNAs en la hipertensión esencial (Leimena & Qiu, 2018; Wu, Jose, & Zeng, 2018; Bink, Lozano-Vidal, & Boon, 2019), y podría revelar informaciones importantes para la comprensión de las bases moleculares de esta enfermedad.

1.4. Los *competing Endogenous RNAs* (ceRNAs)

Recientemente, se ha propuesto a los *Competing Endogenous RNAs* (ceRNAs) como un nuevo mecanismo regulador entre dos clases de RNAs no codificantes (miRNAs y lncRNAs) y RNAs codificantes. La hipótesis del funcionamiento de este mecanismo consiste en que los lncRNAs pueden funcionar como ceRNAs para capturar a los miRNAs, interactuando competitivamente, llevando a una disminución de la degradación del mRNA blanco (Salmena *et al.*, 2011). Lo que ocurre es una comunicación cruzada entre mRNAs y lncRNAs, compitiendo por sitios de unión de miRNAs (Anexo 1) (Salmena *et al.*, 2011; Bosson

et al., 2014; Tay *et al.*, 2011). Algunos casos específicos de estas interacciones cruzadas entre ceRNAs y mRNAs han sido asociadas a distintas enfermedades humanas, como cáncer, Alzheimer e infecciones virales (Karreth & Pandolfi, 2013; Wang *et al.*, 2018; Ghosal *et al.*, 2014).

En el último tiempo se ha intentado descubrir los mecanismos asociados con las enfermedades cardiovasculares a nivel de ceRNAs (Wang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016). Un caso interesante es el RNA largo circular *HRCR*, que fue descrito como capaz de inhibir la hipertrofia y la insuficiencia cardíaca al funcionar como “esponja” de miRNAs, capturando a miR-223 (Wang *et al.*, 2016) y regulando los niveles transcripcionales del gen *ARC*. Wang y colaboradores describieron que el lncRNA *CHRF* actúa como esponja endógena de miR-489, regulando la expresión de *Myd88* en la hipertrofia cardíaca (Wang *et al.*, 2014). El lncRNA *APF* actúa como esponja de miR-188-3p, disminuyendo la degradación de *ATG7*, que regula la autofagia y el infarto al miocardio (Wang *et al.*, 2015).

Los ceRNAs todavía no están completamente estudiados. Solo unos pocos lncRNAs han sido funcionalmente anotados como ceRNA (Zhang *et al.*, 2016; Song *et al.*, 2017). En consideración al gran número y limitado conocimiento de los lncRNAs, se espera que muchos otros lncRNAs estén relacionados funcionalmente con mRNAs o miRNAs. Esta asociación se ha demostrado en varias enfermedades, pero aún no se ha estudiado en la hipertensión esencial (Karreth & Pandolfi, 2013; Wang *et al.*, 2018; Ghosal *et al.*, 2014).

1.5. Meta-análisis de expresión diferencial de transcritos

El meta-análisis se define como el análisis estadístico de una colección de resultados analíticos con el fin de integrar los hallazgos (Lipsey & Wilson, 2001). Dichos análisis son una herramienta útil en la investigación donde las informaciones sobre una patología específica están disponibles en varios estudios similares (Haase *et al.*, 2009). Si se consideran por separado cada estudio cuenta con una información limitada, de manera que cualquier estudio puede ser demasiado pequeño o limitado en su alcance, pudiendo llegar a conclusiones inequívocas o generales sobre la condición. La combinación de resultados en dichos estudios representa una alternativa efectiva para fortalecer la evidencia sobre dicha patología de estudio. En este contexto, el uso de un meta-análisis para la caracterización de los competing endogenous RNAs en hipertensión esencial permitirá identificar nuevos aspectos que nos permitirían dilucidar este mecanismo de regulación genética.

En literatura científica se describen varios métodos de meta-análisis, dos de los enfoques más utilizados son: ‘*Vote-counting*’ y ‘*Combining p-value*’. El primer, consiste en visualizar los genes en función del número de estudios en los cuales fueron identificados como expresados diferencialmente, junto con la asignación de la consistencia del signo de cambio. En otras palabras, un gen que se expresó de manera diferencial en cinco estudios, de los cuales tres de ellos fueron regulados negativamente, obtendrá un puntaje de consistencia de signo de $2 + (-3) = -1$. El segundo enfoque, por otro lado, resume los Fold-Change de un gen en los diferentes estudios según la media o mediana, además de resumir los *p-values* de la expresión diferencial utilizando el método de Fisher para la determinación de los genes con expresión diferencial con significancia estadística en el grupo de estudios analizados. Estos enfoques nos permitirán describir los genes codificantes de proteínas, miRNAs, y RNAs largos no codificantes de proteínas; y cómo estos tres interactúan y regulan la expresión genética en esta condición. Dada la recopilación bibliográfica realizada para el presente trabajo, reuniremos todos los estudios disponibles para la hipertensión arterial primaria, disponibles en dos repositorios públicos de NCBI (bases de datos SRA y GEO), los cuales cuentan con una cantidad de datos que nos permitiría comprender un poco más sobre el rol de los diferentes tipos RNAs (mRNAs, microRNAs, lncRNAs) en esta patología.

1.6. Biología de redes y de sistemas

La hipertensión es una patología multifactorial (Thongboonkerd, 2005), de manera que los procesos biológicos y moleculares son controlados por múltiples moléculas que interactúan entre ellas, en las cuales sus relaciones y niveles de actividades son reguladas de manera dinámica y compleja. Por lo cual es poco probable que la complejidad de tal patología se entienda completamente en un solo estudio de ciencias ómicas. La integración de las ciencias ómicas individuales es necesaria para la investigación de la hipertensión arterial primaria. Con el poder de la bioinformática todos los campos de las ciencias ómicas son complementarios y sirven como piezas individuales del rompecabezas para cumplir con la imagen dinámica de la biología y la fisiología de las enfermedades médicas. Recientemente, un enfoque desde la biología de sistemas ha estado emergiendo en el estudio global de sistemas biológicos y han incluido las ciencias ómicas como uno de sus procedimientos analíticos fundamentales (Morel *et al.*, 2004).

La investigación biológica, ha proporcionado una gran cantidad de conocimiento acerca de los componentes celulares individuales y sus funciones. A pesar de su enorme éxito, cada vez está más claro que raramente una función biológica discreta puede atribuirse a una molécula individual. En cambio, la mayoría de las características biológicas surgen de interacciones complejas entre los numerosos constituyentes de la célula, como las proteínas, el DNA, el RNA y las moléculas pequeñas (Barabasi et al., 2004). La identificación de todos los genes y proteínas en un organismo proporciona un catálogo de los componentes individuales que son base para la generación de redes de interacción, que son diagramas exhaustivos de las interacciones bioquímicas celulares, que proporcionan conocimiento sobre el sistema biológico y sus mecanismos de regulación. La biología de sistemas consiste en el análisis matemático y computacional de estos datos, con el objetivo de modelar sistemas biológicos complejos. Es un campo interdisciplinario de la biología que tiene como foco la integración de múltiples datos complejos con sistemas biológicos utilizando un abordaje holístico, a contrario de los abordajes reduccionistas más tradicionales.

Los sistemas biológicos complejos pueden ser representados y analizados a través de redes computables. Estas redes biológicas ofrecen una representación matemática de conexiones existentes dentro del sistema, donde subunidades son conectadas con un todo, a ejemplo de redes de proteínas que interactúan entre ellas y hacen parte de una misma vía metabólica. La aplicación de la biología de redes y sistemas a la investigación de la hipertensión esencial debería resultar en una mejor comprensión de la patogenia y fisiopatología de esta misma. Este abordaje surge como una herramienta poderosa para estudiar las posibles relaciones entre redes de microRNAs, lncRNAs y genes codificantes de proteínas, resultando en una mejor comprensión de cómo estas moléculas podrían estar asociadas con la enfermedad.

2. Hipótesis

La expresión de genes de respuesta para la hipertensión arterial primaria es regulada por lncRNAs y miRNAs conformando el mecanismo de regulación genética denominado Competing Endogenous RNAs.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Describir las redes de regulación mediadas por el mecanismo de *competing endogenous RNAs* en la hipertensión arterial primaria.

3.2. Objetivo específico

- 1. Analizar los perfiles de expresión de miRNAs, lncRNAs y de genes codificantes de proteínas asociados con hipertensión arterial primaria a partir de datos disponibles en repositorios públicos.**
- 2. Definir las redes de interacción de *competing endogenous RNAs* asociados a hipertensión arterial primaria.**

4. Metodología

4.1. Definiendo una red global de interacción de miRNA-lncRNA-mRNA en el genoma humano

4.1.1. Actualización del repertorio de lncRNAs en el genoma humano

El repertorio de lncRNAs disponibles en el genoma humano fue actualizado a partir de la integración de los RNAs largos no codificantes disponibles en las bases de datos Ensembl versión GRCh38.95 (Zerbino *et al.*, 2018) y GENCODE versión M29 (Frankish *et al.*, 2019). Además, se incluyeron aquellos lncRNAs identificados por nuestro grupo en un trabajo publicado el año 2018, donde se caracteriza nuevas clases de lncRNAs sintéticos entre humanos y ratones, en los cuales parte de ellos están relacionados con la regulación topológica estructural del DNA (Amaral *et al.*, 2018). Las redundancias entre los tres grupos de lncRNAs fueron eliminadas utilizando intersectBed, de BEDtools (Quinlan & Hall, 2010). Para ser considerado como un transcrito independiente, cada lncRNA posee un solapamiento entre los exones de otros lncRNAs menor del 50%. Este paso es fundamental debido a las constantes actualizaciones en el repertorio de lncRNAs disponibles en ambas bases de datos de referencia.

4.1.2. Generando un catálogo de interacciones entre miRNAs y mRNAs en el genoma humano

Se utilizó como referencia para los microRNAs (miRNAs) humanos aquellos disponibles en la base de datos miRBase v22.1 (Kozomara *et al.*, 2019). Para los genes codificantes de proteínas, se contó como referencia los transcritos y sus anotaciones disponibles en GENCODE versión M29 (Frankish *et al.*, 2019). Las interacciones entre los miRNAs y sus mRNAs blancos fue recopilada a partir de la integración de la información disponible en cuatro bases de datos: TargetMiner (Bandyopadhyay & Mitra, 2009), miRDB (Wong & Wang, 2015), TargetScanHuman (Agarwal *et al.*, 2015) y TarBase v8.0 (Karagkouni *et al.*, 2018). Estas bases de datos se seleccionaron luego de una exploración manual en el portal *The Non-coding RNA Databases Resource* (NRDR), desarrollado por nuestro grupo, que posee una categorización de la información almacenada en 229 bases de datos públicas de RNAs no codificantes (Maracaja-Coutinho *et al.*, 2019b; Paschoal *et al.*, 2012). El cruce de informaciones se realizó utilizando *scripts in-house* desarrollados en lenguaje Perl, Python y R. Las interacciones fueron

categorizadas de acuerdo con las informaciones disponibles en las bases de datos como: (i) validadas experimentalmente o (ii) predichas computacionalmente. Aquellas validadas experimentalmente siempre serán clasificadas como interacciones reales y serán consideradas en los análisis. Las interacciones obtenidas a través de predicciones computacionales se contabilizaron solamente si la interacción entre un miRNA y un mRNA estaba presente en al menos tres de bases de datos utilizadas.

4.1.3. Generando un catálogo de interacciones entre miRNAs y lncRNAs

Para investigar las relaciones reguladoras de miRNA con los lncRNA en humanos, los sitios objetivos de miRNA fueron obtenidas utilizando dos abordajes: (i) recuperaremos las interacciones entre miRNAs y lncRNAs disponibles en las bases de datos LncBase (Paraskevopoulou *et al.*, 2015) y starBase (Li *et al.*, 2013). Las interacciones recuperadas de bases de datos y anotadas como experimentalmente validadas se consideraron como interacciones reales. Las interacciones anotadas como predicción en las bases fueron mantenidas como predichas.

4.1.4. Unificando una red global humana de miRNAs, lncRNAs y mRNAs

La red final de interacciones entre miRNAs, lncRNAs y mRNAs fue recopilada utilizando *scripts* desarrollados *in-house* en lenguaje Perl, Python y R, y visualizada usando Cytoscape (Shannon *et al.*, 2003), disponible en el sitio web <https://cytoscape.org/>.

4.2. Perfiles de expresión de miRNAs, lncRNAs y mRNAs en la enfermedad de hipertensión

Todos los perfiles de expresión génica fueron descargados de *Gene Expression Omnibus* (GEO, Barrett *et al.*, 2012) y *Sequence Read Archive* (SRA, Leinonen *et al.*, 2010). GEO y SRA son repositorios públicos de datos de expresión génica. En el presente trabajo se investigó los perfiles de expresión referente a 5 estudios para la patología de hipertensión arterial primaria disponibles en GEO y SRA (anexo 2). Los criterios utilizados para elegir estos estudios fueron: (I) en primera instancia deben estar catalogados como hipertensión arterial primaria, es decir, deben corresponder a hipertensión arterial y sin causa de origen conocida; (II) la capacidad de poseer información recuperables, en otras palabras, el estudio debe

contener todas sus sondas publicadas; (III) el ensayo debe ser reproducible junto con la cantidad de muestras suficientes para realizar un contraste en la expresión diferencial entre individuos normotensos (control) y individuos con la condición de hipertensión arterial primaria (condición); (IV) las muestras utilizadas en estos estudios sean del mismo tejido.

Para analizar los datos de RNA-seq tanto de RNAs largo cuanto de RNAs pequeños utilizamos abordajes ya implementadas en nuestro grupo, que han sido utilizadas en diferentes publicaciones (Amaral *et al.*, 2018; Huanca-Mamani *et al.*, 2018; Matamala *et al.*, 2018; Orell *et al.*, 2018). Las lecturas brutas tienen sus calidades evaluadas usando Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014). Lecturas de buena calidad ($Q > 30$) fueron mapeadas contra el genoma humano (versión hg18) usando HISat2 (Kim *et al.*, 2015). La cuantificación de expresión de mRNAs y lncRNAs se realizó usando cuffquant y cuffnorm (Trapnell *et al.*, 2012), con las referencias definidas en el tópico “*Definiendo una red global de interacción de miRNA-lncRNA-mRNA en el genoma humano*”, y normalizadas en *Fragments Per Kilobases per Million* (FPKM). Los transcritos diferencialmente expresados fueron obtenidos usando DESeq2 (Love *et al.*, 2014). Las categorías de ontologías génicas y vías metabólicas enriquecidas fueron obtenidas usando EnrichR (Mi, Muruganujan & Thomas, 2012). Para los datos de RNAs pequeños, las lecturas de buena calidad fueron mapeadas contra el genoma humano usando Bowtie1 (Langmead *et al.*, 2009). Las lecturas fueron asociadas a los miRNAs de referencia de miRBase usando el mismo abordaje descrito por nuestro grupo en Matamala *et al.*, 2018. Obtuvimos la expresión de los miRNAs normalizados en FPKM usando un *script* en R desarrollado *in-house*.

Las plataformas de microarreglo tuvieron sus datos brutos en formato CEL procesados usando el paquete affy, de R (Gautier *et al.*, 2004). El control de calidad fue analizado usando el paquete de Bioconductor arrayQualityMetrics (Kauffmann *et al.*, 2008). Los datos se normalizaron usando la función RMA del paquete affy. Para definir los transcritos diferencialmente expresados utilizamos el test t de Student, comparando los casos y controles. Diferentes puntos de corte de *fold-change* y de p-valor (Benjamini y Hochberg) fueron evaluados. La integración entre los genes diferencialmente expresados obtenidos en cada bioestudio fue realizado utilizando la herramienta de meta-análisis MetaVolcano (<https://bioconductor.org/packages/devel/bioc/html/MetaVolcanoR.html>).

4.3. Definiendo las redes de interacción de ceRNAs asociadas con hipertensión arterial primaria

4.3.1. Construcción y análisis de los nodos de redes de ceRNAs

Se seleccionó el 10% superior de los nodos con los grados más altos como nodos centrales. Para analizar la distribución de los nodos centrales, clasificaremos los nodos centrales en tres categorías propuestas por Xu y colaboradores (Xu *et al.*, 2015): nodos centrales específicos, nodos *hub* diferenciales y nodos centrales de ceRNAs comunes. Los nodos centrales específicos se definen como específicos para la enfermedad de hipertensión; los nodos *hub* diferenciales son los que se encuentran compartidos en más de una red de interacción de ceRNA; los nodos centrales de ceRNAs comunes se definen como los ceRNAs con nodos centrales en más de una red de interacción.

Una vez obtenida la red de interacción global de los ceRNA, realizamos un mapa de todos los transcritos diferencialmente expresados en los perfiles de expresión en la red de interacción global de ceRNAs. En donde se extrajeron todos los miRNA, lncRNAs y mRNAs relacionados con la hipertensión arterial primaria. Eso resultó en un conjunto de redes de ceRNAs asociadas a hipertensión arterial primaria. Finalmente, para determinar los ceRNAs que cumplen con la hipótesis de ceRNAs (Song *et al.*, 2017), se realizó una prueba de proporcionalidad directa para los valores de expresión de mRNAs-lncRNAs; e inversa para los valores de expresión de mRNAs-miRNAs y lncRNAs-miRNAs a través del programa R, similar a los utilizados por Sumazin *et al.*, 2011 y Song *et al.*, 2017. Para todas las interacciones encontradas que cumplan con un valor de p ajustado < 0.01 en la prueba de proporcionalidad y de $R > 0$, fueron utilizados para la construcción de una red final de interacción de ceRNAs.

5. Resultados

5.1. Analizar los perfiles de expresión de miRNAs, lncRNAs y de genes codificantes de proteínas asociados con hipertensión arterial primaria a partir de datos disponibles en repositorios públicos

5.1.1. Levantamiento público de estudios transcriptómicos de miRNAs, mRNAs y lncRNAs relacionados con la hipertensión esencial y re-anotación de plataformas de microarray.

Realizando una recopilación en las bases de datos GEO y SRA de NCBI, se encontraron 15 estudios transcriptómicos referentes a hipertensión definidas como primaria, en los cuales se utilizaron diferentes plataformas de medición de expresión génica (Figura 1). De estos, se seleccionaron para este trabajo cinco estudios, catalogados como hipertensión arterial primaria; de los cuales tres corresponden a estudios de miRNAs (GSE75670, GSE118578, GSE112093); y dos a estudios RNA total (GSE75360 y PRJNA480270). El estudio GSE75360 fue realizado utilizando microarreglos de cDNA, mientras que el estudio PRJNA480270 fue realizado utilizando secuenciación de ARNs Totales (RNA-seq). A partir de estos dos últimos estudios somos capaces de recuperar información referente a mRNAs y lncRNAs.

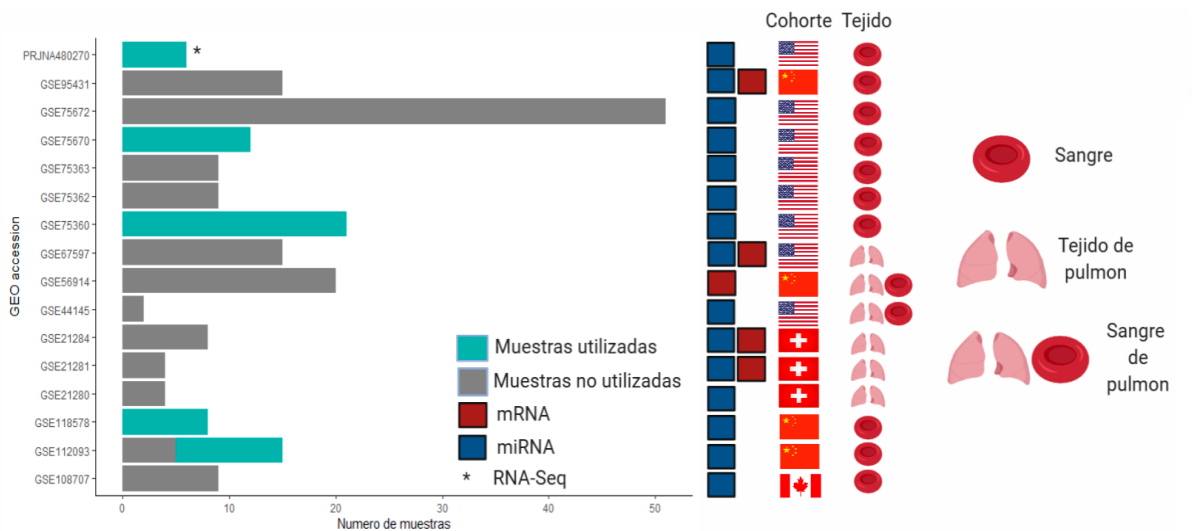


Figura 1. Resumen de los estudios seleccionados en donde de color celeste se muestran las muestras y estudios utilizados, de color gris las muestras y estudios no utilizados, de color azul si es estudio de miRNA y de color rojo si es estudio de mRNA. El asterisco representa el único estudio que fue realizado utilizando secuenciación de RNAs. Además, la figura destaca el tejido de donde fueron obtenidas las muestras junto con el país de procedencia.

Para poder seguir con los meta-análisis de los estudios públicos disponibles para hipertensión arterial primaria, es necesario realizar una re- anotación de las plataformas de microarreglos utilizadas. La re- anotación es debido a que las plataformas utilizan diferentes identificadores para los microRNAs, lncRNAs o mRNAs. Estas anotaciones han cambiado a lo largo del tiempo en las bases de datos públicas. Los tres estudios referentes a miRNAs fueron realizados en plataformas de microarreglos diferentes, por lo cual su re- anotación fue de manera independiente (Figura 2A). Esta se realizó a partir del cruce de diferentes archivos disponibles en diferentes versiones de miRBase (Kozomara *et al.*, 2018), usando scripts desarrollados *in-house* en lenguaje Python y Perl. La re- anotación de la plataforma de RNA total GPL10558 fue realizada a partir del mapeo de las secuencias de cada sonda contra el genoma humano (versión hg38) usando la herramienta BLAT (Kent, 2002). Las sondas fueron obtenidas a partir del sitio web de Affymetrix (www.affymetrix.com). Para ser considerado un mapeo válido las secuencias deberían tener al menos 90% de identidad y de cobertura. Luego, las coordenadas genómicas de las sondas mapeadas fueron cruzadas contra el set de lncRNAs y de transcritos codificantes de proteínas definidos previamente por el Laboratorio de Bioinformática Integrativa, considerando una cobertura de 70% entre las coordenadas genómicas de las sondas en relación a los transcritos (Amaral *et al.*, 2018).

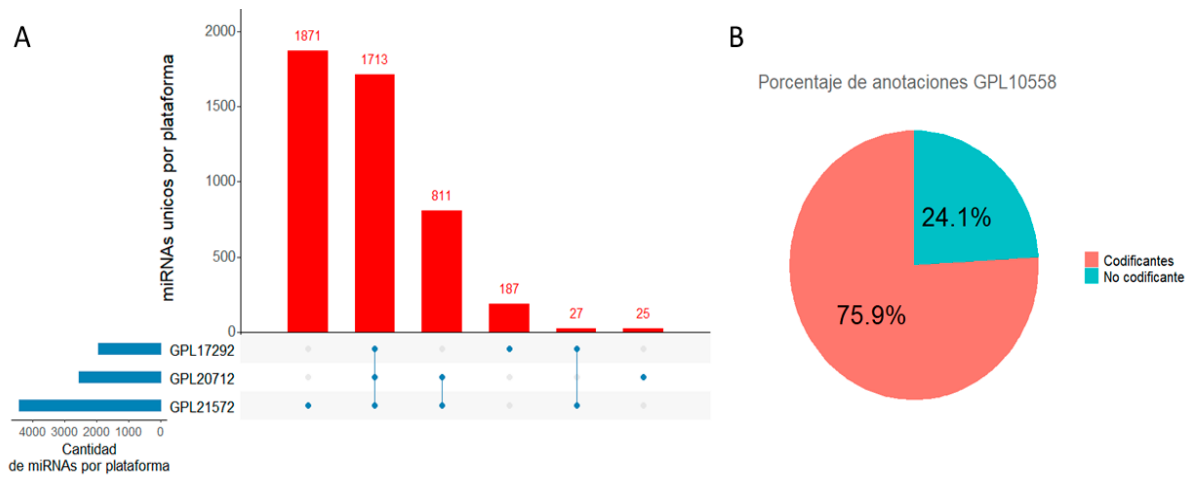


Figura 2. Re- anotación de las plataformas de microarray. (A) Re- anotación de las plataformas de microarreglo de microRNAs con estudios disponibles para hipertensión arterial primaria. Las barras rojas representan el número de miRNAs compartidos entre las diferentes plataformas. Las barras azules representan la cantidad de sondas disponibles en cada plataforma. Notar que algunas plataformas poseen sondas redundantes para diferentes miRNAs. Las líneas y puntos en azul representan los grupos de miRNAs con sondas compartidas entre las diferentes plataformas (B) Porcentaje de transcritos codificantes (color rojo) y no codificantes de proteínas (lncRNAs, color azul) que están representados en la plataforma GPL10558.

La base de datos miRBase contiene 2.654 miRNAs maduros de humano reportados. Sin embargo, en miRBase se encuentran almacenadas las secuencias 3p y 5p, las cuales se originan a partir de la hebra de la cual la enzima Dicer corta el precursor del miRNA. Los miRNAs 3p corresponden a los de la hebra en sentido 3'-5' del RNA, mientras que los miRNAs 5p corresponden a los de la hebra en sentido 5'-3'. Por lo cual, en la base de datos de miRBase se tienen un total de 4.796 secuencias de miRNAs para el genoma humano. En el diseño de las plataformas de miRNAs los fabricantes Affymetrix, Agilent y Exiqon utilizan todas las secuencias reportadas en miRBase (Rekker *et al.*, 2014), de manera que en las plataformas se encuentran sondas para detectar las variantes 3p y 5p de los miRNAs.

Referente a la re- anotación de las plataformas de miRNAs, utilizamos como referencia los 4.796 microRNAs reportados en miRBase. La plataforma GPL21572 es la que contiene el mayor número de sondas para detectar miRNAs, diseñada para detectar 4.422 miRNAs, de los cuales 1871 miRNAs son exclusivos para esta plataforma. La plataforma GPL20712 posee 2.549 miRNAs, de los cuales 25 son exclusivos de esta plataforma, mientras que la plataforma GPL17292 contiene un total de 1.927 miRNAs, siendo 182 exclusivos (Figura 2A). Por otro lado, detectamos que 1.713 miRNAs son compartidas por las tres plataformas, 811 secuencias son compartidas por las plataformas GPL20712 y GPL21572, mientras que solo 27 secuencias

son compartidas por las plataformas GPL17292 y GPL21572. Un total de 374 miRNAs de miRBase no estaban representados en ninguna de las plataformas disponible.

Nuestro laboratorio realizó recientemente una actualización del catálogo de transcritos de lncRNAs humanos, a partir de la integración y eliminación de redundancias referente a lncRNAs disponibles en tres bases de datos: GENCODE (Frankish et al., 2019), ENSEMBL (Zerbino et al., 2018) y un trabajo anterior de nuestro grupo (Amaral et al., 2018). Del total de 51.750 transcritos no codificantes de proteínas obtenidas previamente por el Laboratorio de Bioinformática Integrativa, verificamos que 18.439 estaban representados en la plataforma de microarreglo GPL10558. Para los genes codificantes de proteínas, del total de 83.623 transcritos disponibles en la base de datos GENCODE; verificamos la presencia de 58.214 transcritos en la misma plataforma (Figura 2B). Estos resultados demuestran una buena representatividad para transcritos codificantes y de lncRNAs en esta plataforma, revelando ser útil para nuestro trabajo.

5.1.2 MicroRNAs diferencialmente expresados en hipertensión arterial primaria.

Luego de re-anotadas las plataformas de miRNAs, pasamos a realizar un meta-análisis de expresión diferencial explorando datos disponibles en los tres estudios mencionados anteriormente. Para tanto, pre-procesamos y normalizamos uniformemente los tres conjuntos de datos, y luego realizamos un análisis de expresión diferencial para cada uno de ellos.

Utilizando el abordaje de meta-análisis más simple, “*Vote-counting*”, con un \log_2FC de 0.5 y *p-value* inferior a 0.05, se identifican 38 miRNAs como diferencialmente expresados (Figura 3A). De estos, 9 miRNAs se encuentran regulados positivamente, mientras que 29 negativamente. Esta metodología clasifica los miRNAs según el número de estudios en los que se definieron como expresados diferencialmente, de acuerdo con el valor *p* definido y los umbrales de Fold-Change. Al utilizar un segundo abordaje de meta-análisis, “*Combining p-value*”, obtuvimos 105 miRNAs perturbados (Figura 3A). De estos, 59 miRNAs se encuentran regulados positivamente, mientras que 46 están regulados negativamente. Este abordaje aplica el método de Fisher para combinar valores *p* de expresión diferencial de estudios independientes, considerando también la media o mediana del Fold-Change entre los estudios, junto con la consistencia del signo de expresión (regulado positiva o negativamente). Este signo representa el número de estudios en los que un dado miRNA tiene el mismo signo de Fold-

Change. Por ejemplo, un miRNA detectado en cinco estudios de los cuales en tres de ellos se reguló negativamente, se obtendrá un puntaje de consistencia de signo de $2 + (-3) = -1$. Esta puntuación tiende a cero cuando un miRNA está mal representado en los estudios combinados o presenta perturbación contradictoria.

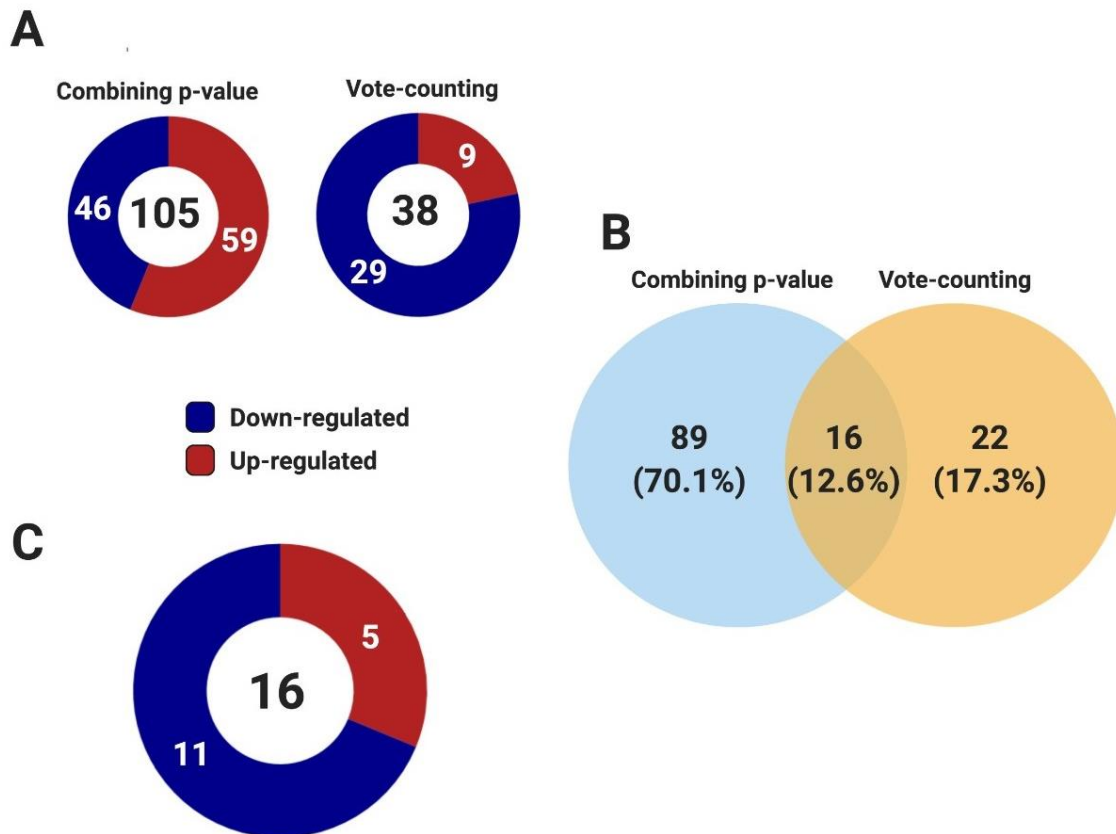


Figura 3. Resultados del meta-análisis de expresión diferencial de microRNAs involucrados con la hipertensión arterial primaria (A) miRNAs con expresión diferencial para las metodologías de meta-análisis *Combining p-value* y *Vote-counting*. En color rojo corresponden a los miRNAs expresados diferencialmente regulados de forma positiva y de color azul los miRNAs regulados de forma negativa. (B) Diagrama de Venn comparando los resultados obtenidos utilizando las dos metodologías de meta-análisis de expresión génica diferencial utilizadas en este trabajo. (C) Gráfico de anillo representando los 16 miRNAs detectados por ambas metodologías de meta-análisis como regulados de forma positiva o negativa. En color rojo corresponden a los miRNAs expresados diferencialmente regulados de forma positiva y de color azul los miRNAs regulados de forma negativa.

Al combinar ambos métodos de meta-análisis, verificamos un total de 127 miRNAs (Figura 3B Anexo 2) identificados como expresados diferencialmente por las dos metodologías. De estos, 89 fueron identificados exclusivamente por el abordaje “*Combining p-value*”, mientras que 22 fueron identificados únicamente por el abordaje “*Vote-counting*”.

Un total de 16 miRNAs fueron identificados de manera consistente por ambos abordajes (Figura 3B). Para estos 16 miRNAs, cinco se presentaron como regulados positivamente (hsa-miR-4466, hsa-miR-3158-5p, hsa-miR-5587-5p, hsa-miR-3131, hsa-miR-921), y once regulados de manera negativa (hsa-miR-483-3p, hsa-miR-4323, hsa-miR-4290, hsa-miR-1470, hsa-miR-4313, hsa-miR-4714-5p, hsa-miR-3156-3p, hsa-miR-4763-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-518b). Estos miRNAs fueron considerados como diferencialmente expresados en la hipertensión arterial primaria y seleccionados para los siguientes análisis de este trabajo.

Con el objetivo de identificar las posibles vías metabólicas reguladas por estos microRNAs, realizamos una búsqueda computacional utilizando la herramienta miRPath v3 (Vlachos *et al.*, 2015), por las vías metabólicas de KEGG reguladas por los 16 miRNAs seleccionados en nuestro meta-análisis, a partir de datos validados de manera experimental. En esta búsqueda, utilizamos p valor ajustado de corte de 0.05, y un valor de *score* de microT-CDS de 0.8, conforme lo sugerido por la propia herramienta. Nuestro análisis reveló un total de 40 vías metabólicas de KEGG que podrían estar siendo reguladas por un número que varía entre 4 y 12 miRNAs (Tabla 1). Además, identificamos diversas vías directamente relacionadas con la hipertensión y otras enfermedades cardiovasculares, tales como: “*Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)*”, “*Neurotrophin signaling pathway*”, “*ErbB signaling pathway*”, “*Focal adhesion*”, “*MAPK signaling pathway*”, “*Platelet activation*” y “*Estrogen signaling pathway*”.

Tabla 1. Tabla de contrastes de las vías metabólicas KEGG de los 16 miRNAs identificados por las metodologías *Combining p-value* y *Vote-counting*. La columna KEGG pathway corresponde a la vía metabólica enriquecida, p - value corresponde al valor de significancia de asociación, genes a la cantidad de genes involucrados en la ruta metabólica mencionada y la columna miRNAs al número de miRNAs involucrados en la ruta metabólica

KEGG pathway	<i>p-value</i>	Genes	miRNAs
Glioma	7.17E-06	25	7
Fatty acid degradation	0.00010059	7	4
Proteoglycans in cancer	0.00105066	55	11

Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	0.00115586	41	10
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)	0.00133453	19	7
Neurotrophin signaling pathway	0.00251281	39	10
Gap junction	0.00371206	27	10
ErbB signaling pathway	0.00543607	31	10
Axon guidance	0.00543607	38	10
Regulation of actin cytoskeleton	0.00543607	57	11
Fatty acid metabolism	0.00573924	10	6
Lysine degradation	0.00573924	13	8
Phosphatidylinositol signaling system	0.00573924	23	9
Endocytosis	0.00573924	56	9
TGF-beta signaling pathway	0.00573924	24	10
Thyroid hormone signaling pathway	0.00582037	35	8
Prostate cancer	0.00582037	28	8
GABAergic synapse	0.00582037	25	9
Choline metabolism in cancer	0.00582037	30	9
Thyroid hormone synthesis	0.00639912	16	8
FoxO signaling pathway	0.01216699	40	9
Transcriptional misregulation in cancer	0.01216699	46	10

Dorso-ventral axis formation	0.0131765	12	6
Focal adhesion	0.01727658	54	12
Valine leucine and isoleucine degradation	0.01832261	7	4
Platelet activation	0.01832261	35	9
Morphine addiction	0.02018234	24	9
Nicotine addiction	0.0257001	11	9
MAPK signaling pathway	0.02602559	61	12
Renal cell carcinoma	0.03175213	23	9
mTOR signaling pathway	0.03313499	20	7
Acute myeloid leukemia	0.03818351	18	7
GnRH signaling pathway	0.03818351	26	9
Thyroid cancer	0.03998593	9	7
Chronic myeloid leukemia	0.04287266	23	8
Shigellosis	0.04533444	18	9
cAMP signaling pathway	0.04533444	50	10
Adrenergic signaling in cardiomyocytes	0.04935802	37	10
Estrogen signaling pathway	0.04935802	26	11

5.1.3. Genes codificantes de proteínas diferencialmente expresados en hipertensión arterial primaria.

Referente al meta-análisis de los genes codificantes de proteínas asociados con la hipertensión arterial primaria, utilizamos los conjuntos de datos obtenidos a partir de experimentos de RNA-seq (PRJNA480270) y microarreglos de cDNA (GSE75360), que tenían como foco medir la expresión del RNA total. Para el análisis del estudio GSE75360, utilizamos las sondas re-annotadas en el primer tópico de este informe. Primero, los datos brutos fueron obtenidos de la base de datos GEO. Luego, dividimos el estudio en dos grupos: el grupo GSE75360_a corresponde a seis individuos control y cinco casos de hipertensión arterial primaria de población con ascendencia africana; mientras que el grupo GSE75360_b que cuenta con cinco individuos control y cinco individuos casos que pertenece a población caucásica Norteamericana. Estos dos grupos fueron tratados como estudios independientes. Luego, los valores crudos obtenidos fueron sometidos a una normalización a través de una curva normal estándar con valor de z para eliminar todos los valores iguales a 1. Illumina describe que todas las sondas que presenten un valor igual a 1 en este proceso de normalización deben ser eliminadas para reducir el error de detección por complementariedad. Posteriormente a esta normalización, los datos fueron analizados siguiendo el protocolo normalmente utilizado en análisis de microarreglos. En este caso, utilizamos el mismo protocolo descrito anteriormente para los análisis de los microarreglos de miRNAs.

Para los análisis de los estudios obtenidos por RNA-seq, primeramente, evaluamos la calidad de las lecturas brutas usando la herramienta *Trimmomatic* (Bolger *et al.*, 2014), utilizando un valor Q de cutoff de 30. Las lecturas de buena calidad fueron mapeadas contra el genoma humano (versión hg38) usando la herramienta *HISat2* (Kim *et al.*, 2015), mientras que sus cuantificaciones y normalizaciones fueron realizadas usando usando *Cuffquant* y *Cuffnorm*, parte del paquete *Cufflinks*. Finalmente, los transcritos diferencialmente expresados fueron obtenidos usando *DESeq2* (Love *et al.*, 2014). Similar a los análisis de miRNAs, para los genes codificantes de proteínas consideramos como diferencialmente expresados aquellos transcritos con un p-valor inferior a 0.05 y una tasa de cambio > 0.5 y < -0.5 .

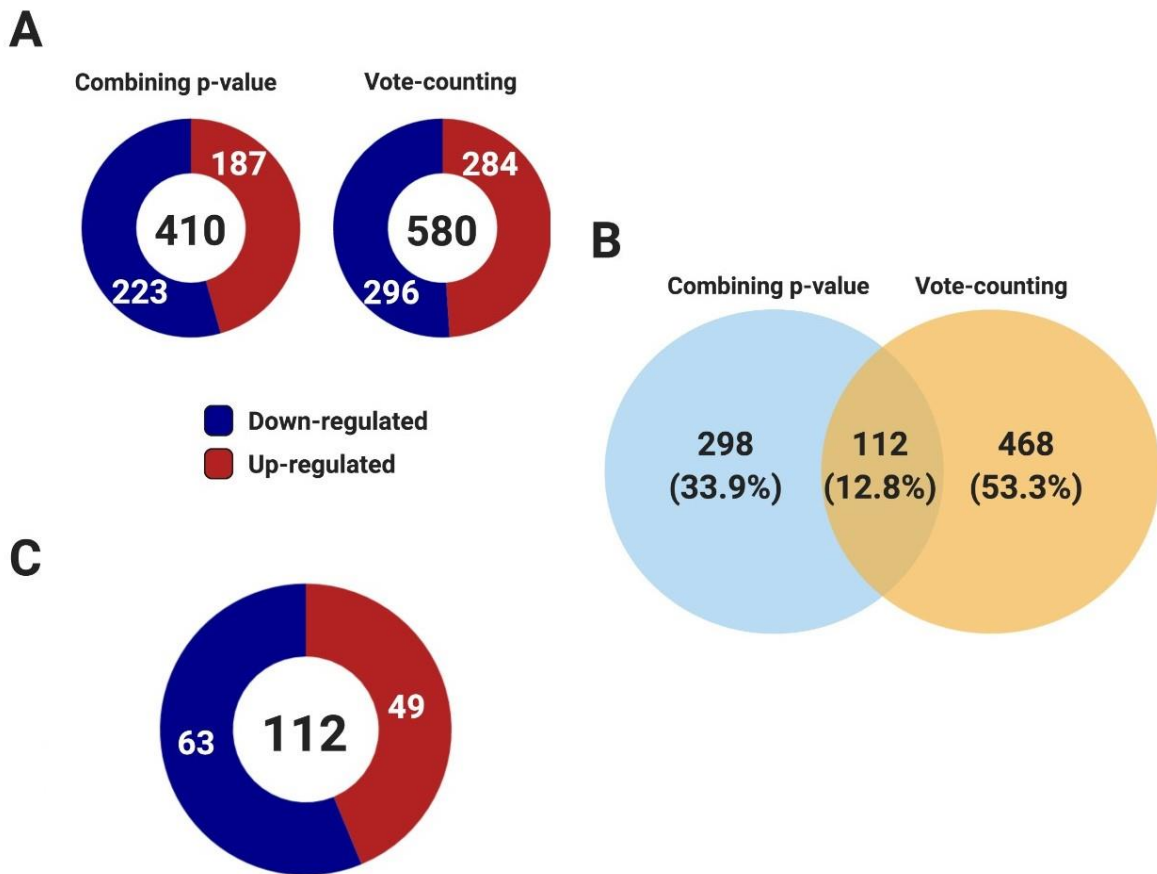


Figura 4. (A) mRNAs con expresión diferencial para las metodologías *Combining p-value* y *Vote-counting*. En color rojo corresponden a los mRNAs expresados diferencialmente regulados de forma positiva y de color azul los mRNAs regulados de forma negativa. (B) Diagrama de Venn comparando los resultados obtenidos utilizando las dos metodologías de meta-análisis de expresión génica diferencial utilizadas en este trabajo. (C) Gráfico de anillo representando los 112 mRNAs detectados por ambas metodologías de meta-análisis como regulados de forma positiva o negativa. En color rojo corresponden a los mRNAs expresados diferencialmente regulados de forma positiva y de color azul los mRNAs regulados de forma negativa.

Utilizando el abordaje de meta-análisis más simple, “*Vote-counting*”, se identificó 580 mRNAs, de los cuales 284 transcritos codificantes se encuentran sobre regulados y 296 transcritos codificantes sub-expresados (Figura 4A). Por otro lado, utilizando el abordaje de “*Combining p-value*”, obtuvimos 410 mRNAs desregulados (Figura 4A), de los cuales 187 están sobre-regulados y 223 sub-regulados. Al combinar ambos métodos de meta-análisis, identificamos 112 mRNAs perturbados (Figura 4C), de los cuales 49 se presentaron como sobre-regulados y 63 como sub-regulados (Figura 4C y Tabla 2).

Tabla 2. Listado de genes codificantes de proteínas sobre- y sub-regulados (p-valor <0.05; tasa de cambio (*Fold-Change*) >0.5 y <-0.5) en la hipertensión arterial primaria de acuerdo con el meta-análisis realizado.

Cambio Asociado	Símbolo del Gen
Sobre-Regulados	<i>ANKRD44, ACSL4, WIPI1, PANX2, TCF7, APLP2, WDFY1, CST3, BMF, RELB, ENG, TRIM16L, PPP6R3, HIPK3, ID2, CCN2, SRGN, TMEM189-UBE2V1, MT2A, NR1H2, SERINC3, ANXA1, GPAT3, LMBR1L, TPM1, HAPLN3, CMTM3, SURF4, MPZL2, TAGLN, FERMT3, PLOD2, MOV10, CSRP1, SQSTM1, MGAT4B, ZNF219, POLR2J3, ZNF32, EHBP1L1, PLAAT3, VWAI, PDGFA, OSTC, ITPRIPL2, TAX1BP3, TNFRSF6B, CEBPA, MTRNR2L1</i>
Sub-Regulados	<i>ANKIB1, TRAF3IP2, SLC12A2, SEC61A2, ISOC1, SLC44A1, TCOF1, MARK2, LXN, ZNF213, ZW10, DOCK9, NECAP1, ECHDC1, CWF19L1, ACO2, PSMA3, POLA1, TSPAN13, MANSC1, SMAP1, WIPF1, SUMO1, OSBPL9, GTF3C3, RAD23B, MYO1B, RAB2B, SYT11, MYH10, CCNA1, FBXO21, IL6, GATA4, RNF38, KIF13A, UACA, ACTR1A, KLRG1, LRIG3, PHLDA1, COP1, SF3B4, EBAG9, ADD3, TRPT1, SCHIP1, RASGRP3, KIT, DIP2A, BPNT1, CCNYLI, TGFBR2, ANKRD55, DENND2B, CPT1C, RAPH1, CD34, NPM1, GLRX5, TRAK1, PDE4B, LIX1L</i>

Analizando los genes codificantes sobre-regulados de manera compartida entre ambas metodologías de meta-análisis, identificamos que algunos de estos genes (e.g. *ANKRD44, ACSL4, WIPI1, PANX2, ENG* y *TRIM16L*) se encuentran reportados en literatura científica como responsables de inicio de señalización celular asociadas a diversas enfermedades cardiovasculares y enfermedades renales (Tzimas *et al.*, 2019; Ikawa *et al.*, 2019; Conen *et al.*, 2009; Marques *et al.*, 2010). Por otro lado, entre los transcritos sub-regulados identificados se reportan genes en que su inhibición está asociada a la respuesta de regulación de presión sanguínea (e.g. *TRAF3IP2, SLC12A2, SEC61A2, ISOC1, SLC44A1* y *TCOF1*), junto con señalización de cascada para la protección de tejido cerebral (e.g. *ISOC1, SLC44A1, TCOF1* y *MARK2*) (Somanna *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015; Vendrov *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2018). Estos transcritos en condición control son movilizados a su tejido blanco o de acción debido que sus señalizadores no se encuentran en el mismo tejido encargado de la síntesis. (Wu *et al.*, 2018).

Con el objetivo de identificar las posibles vías metabólicas reguladas por estos genes codificantes de proteínas, realizamos una búsqueda computacional utilizando la herramienta enrichR (Chen *et al.*, 2013), por las vías metabólicas de WikiPathways reguladas por los 112

mRNAs seleccionados en nuestro meta-análisis, considerando datos validados de manera experimental, asociando cada gen a cada vía reportada. Utilizamos p valor ajustado de corte de 0.05, y un valor de *odds ratio* de 5, conforme lo sugerido por la propia herramienta. Nuestro análisis reveló 10 vías metabólicas en que estos genes podrían estar participando en la condición estudiada. Además, identificamos diversas vías vinculadas con la hipertensión arterial primaria, tales como “*Extracellular vesicles in the crosstalk of cardiac cell*”, “*Hypothesized Pathways in Pathogenesis of Cardiovascular Disease*”, “*Transcription factor regulation in adipogenesis*” y “*Cytokines and Inflammatory Response*” (Figura 5), basado en lo reportado previamente por (Loyer *et al.*, 2018; Ceriello & Motz, 2004; Rosen *et al.*, 2000).

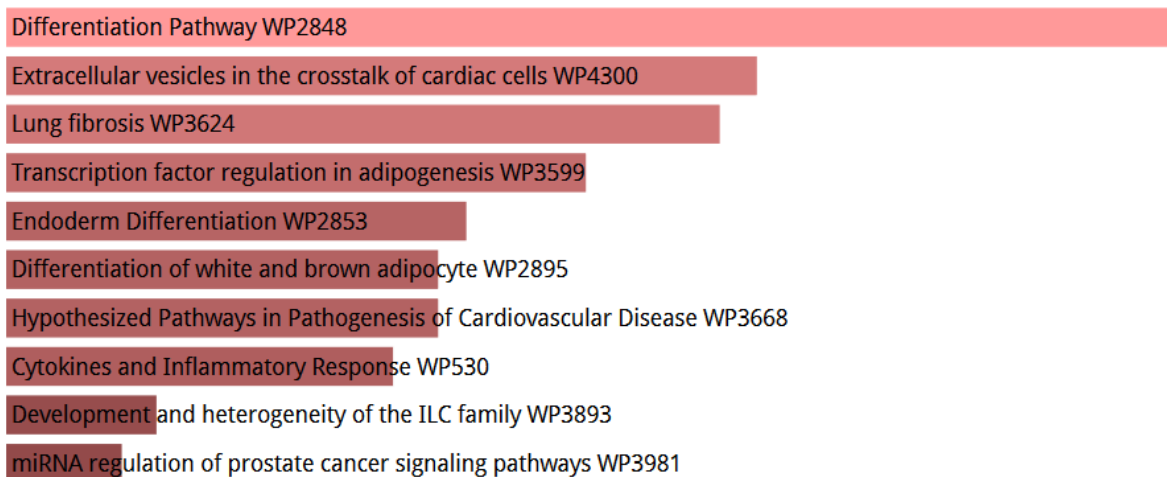


Figura 5. Contrastes de las vías metabólicas reportadas como enriquecidas por EnrichR utilizando los 112 mRNAs (codificantes de proteínas) identificados por las metodologías *Combining p-value* y *Vote-counting*, ordenadas por ranking de *p-value*.

3.1.4. LncRNAs diferencialmente expresados en hipertensión arterial primaria.

Referente a los lncRNAs, utilizamos las mismas plataformas utilizadas en el punto anterior, ya que los estudios utilizados consisten en muestras de RNA total, que también permiten el análisis del repertorio de lncRNAs. Es importante mencionar que la plataforma de microarreglo (GSE75360) tiene una cierta limitación ya que cuenta con un total de 18.439 sondas para lncRNAs. Sin embargo, estudios anteriores de nuestro grupo han revelado que este tipo de plataforma aún sigue siendo una fuente de información importante para la caracterización de lncRNAs en enfermedades humanas (Amaral *et al.*, 2018; De Lima *et al.*, 2019). Para los análisis de expresión diferencial de los transcritos no codificantes proteínas, utilizamos el mismo abordaje bioinformático utilizado en el punto anterior para los estudios

desarrollados utilizando microarreglos de cDNA y secuenciación de RNAs. Utilizando el enfoque de *“Vote-counting”*, identificamos 24 lncRNAs expresados diferencialmente, de los cuales 14 se presentaron como sobre-regulados y 10 como sub-regulados (Figura 6A). Por otro lado, aplicando la metodología de *“Combining p-value”*, solo fue posible detectar 3 lncRNAs diferencialmente expresados, estando todos sobre regulados (Figura 6A).

Al analizar los lncRNAs diferencialmente expresados de manera compartida entre ambas metodologías de meta-análisis, sólo fuimos capaces de encontrar un único lncRNA de manera consistente entre ambos abordajes (Figura 6B). De esta manera, consideramos como diferencialmente expresados un total de 26 lncRNAs, detectados por la unión de ambas metodologías de meta-análisis, en la cual 16 se presentaron como sobre-regulados y 10 como sub-regulados en la hipertensión primaria (Figura 6C y Tabla 3)

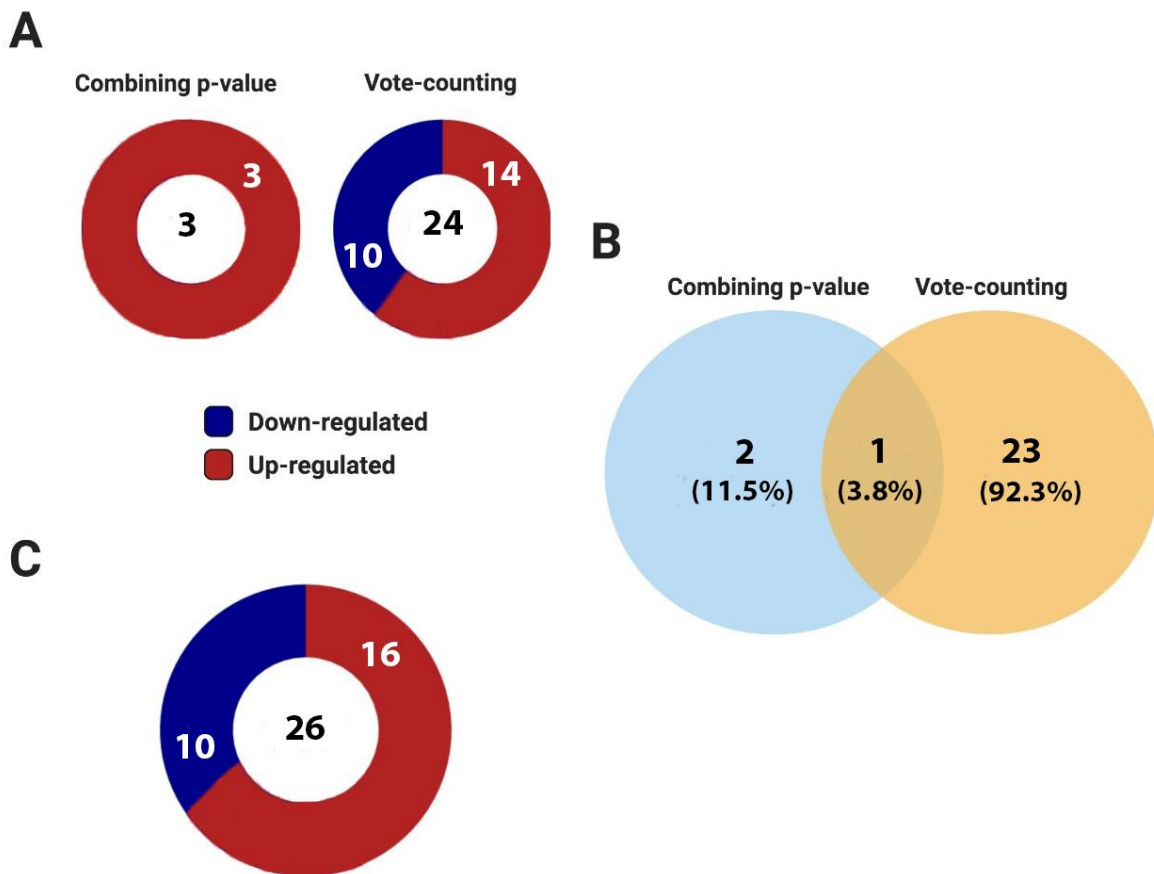


Figura 6. (A) lncRNAs con expresión diferencial para las metodologías *Combining p-value* y *Vote-counting*. En color rojo corresponden a los lncRNAs expresados diferencialmente regulados de forma positiva y de color azul los lncRNAs regulados de forma negativa. (B) Diagrama de Venn comparando los resultados obtenidos utilizando las dos metodologías de meta-análisis de expresión génica diferencial utilizadas en este trabajo. (C) Gráfico de anillo representando los 26 lncRNAs detectados por la unión de ambas metodologías de meta-análisis como regulados de forma positiva o negativa. En color rojo corresponden a los lncRNAs expresados diferencialmente regulados de forma positiva y de color azul los lncRNAs regulados de forma negativa.

Analizando los lncRNAs sobre-regulados identificados, detectamos que algunos lncRNAs (e.g. *ENSG00000108448*, *SNHG5*, *AATBC*, *LINC01128*) reportados en literatura científica como participantes en regulación de rutas para enfermedades como preeclampsia, derrame cerebral y enfermedades cardiovasculares secundarias (Jiang & Ning, 2020; Hattori *et al.*, 2019; He *et al.*, 2018). Por otro lado, entre los transcritos sub-regulados identificados no encontramos información en literatura referente a su participación en rutas metabólicas de enfermedades cardiovasculares u otras patologías, a excepción del lncRNA *SNHG1*, reportado como un regulador en la hipertrofia de cardiomiocitos, en la cual se destaca que un aumento en la expresión de este lncRNA favorece el desarrollo de esta condición (Yan *et al.*, 2019).

Tabla 3. Listado de lncRNAs sobre- y sub-regulados (p-valor <0.05; tasa de cambio (*Fold-Change*) >0.5 y <-0.5) en la hipertensión arterial primaria de acuerdo con el meta-análisis realizado.

Cambio Asociado	Símbolo del Gen
Sobre-Regulados	<i>ENSG00000108448</i> , <i>SNHG5</i> , <i>AATBC</i> , <i>LINC01128</i> , <i>FTX</i> , <i>ENSG00000232063</i> , <i>USP27X-AS1</i> , <i>ENSG00000241449</i> , <i>ENSG00000247970</i> , <i>ENSG00000275450</i> , <i>TCONS_00068790</i> , <i>TCONS_00223888</i> , <i>TCONS_00328489</i> , <i>TCONS_00328865</i> , <i>TCONS_00018168</i>
Sub-Regulados	<i>EPB41L4A-AS1</i> , <i>ENSG00000229272</i> , <i>MUC20-OT1</i> , <i>ENSG00000255229</i> , <i>SNHG1</i> , <i>ENSG00000267383</i> , <i>TCONS_00068791</i> , <i>TCONS_00279671</i> , <i>TCONS_00281624</i> , <i>TCONS_00315613</i>

3.2. Definir las redes de interacción de competing endogenous RNAs asociados a hipertensión arterial primaria.

3.2.1. Catálogo de interacciones entre miRNAs, lncRNAs y mRNAs en el genoma humano.

Para definir una red global de interacción entre miRNAs, lncRNAs y mRNAs, utilizamos como referencia todos los miRNAs disponibles para humanos de la base de datos de miRBase v22.1. Esta base de datos es un repositorio público que contiene las anotaciones y secuencias de miRNAs. A su vez, la base de datos es responsable por la nomenclatura de los miRNAs (Kozomara et al., 2019). Todas las anotaciones disponibles cuentan con una curación manual, y reportan actualmente un total de 4.796 miRNAs.

Para generar un catálogo de interacciones entre miRNAs y mRNAs, se utilizaron las bases de datos con predicción de interacciones TargetMiner, miRDB y TargetScanHuman. Para esto, fue necesario realizar una anotación de los IDs relacionados con cada gen, debido a que ninguna de estas bases de datos posee una anotación consenso, conteniendo IDs de diferentes tipos de anotación (*Entrez GeneID*, *Gene Symbol*, *RefSeq*, etc). La unificación de la anotación de cada gen se realizó a través de las herramientas Biomart *Perl-api*, parte de BiomartR (Durinck et al., 2009) y anotación manual usando scripts *in-house* desarrollados en Python y Perl. Para cada gen disponible en las bases de datos, se obtuvo su *Gene ID* (Ensembl), *Transcript ID* (Ensembl), el *Transcript ID* por versión de ensamblaje de Ensembl y el NCBI ID (*Entrez GeneID*). De la base de datos de mirDB se recuperó el 99.6% (Figura 7A) de las informaciones referente a los mRNAs, de TargetMiner el 99.5% (Figura 7B), de Tarbase el 99.9% (Figura 8C), y de TargetScanHuman el 98.9% (Figura 7D).

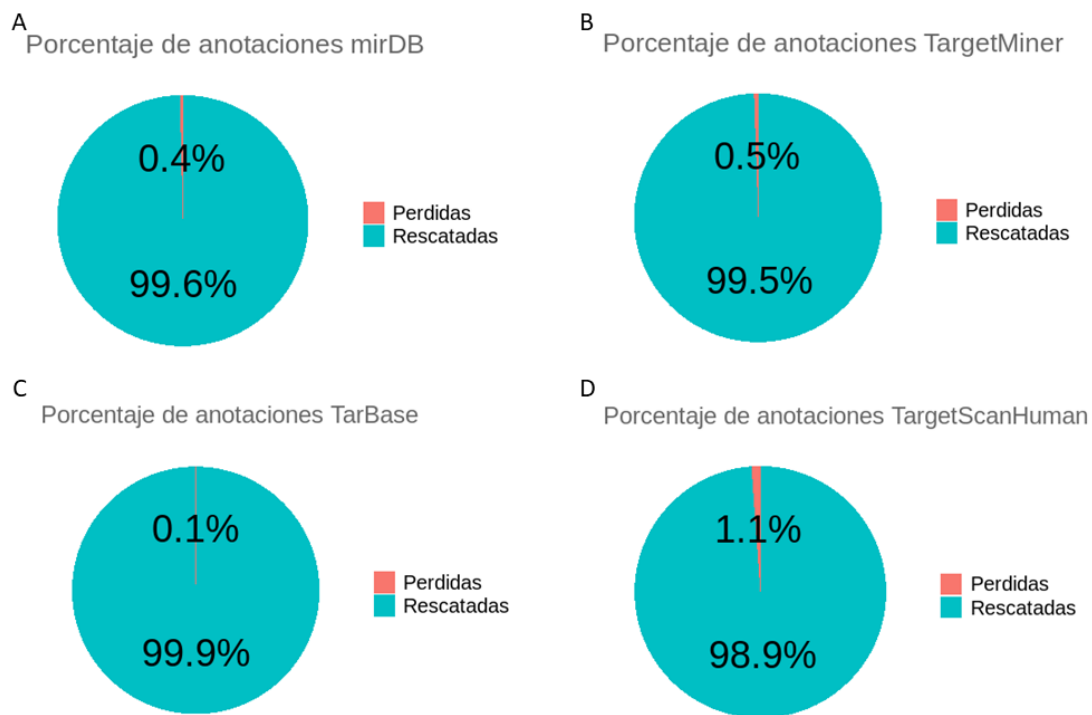


Figura 7. Anotaciones recuperadas de las bases de datos de genes codificantes (mRNA) con interacción con miRNA realizadas a través del programa Biomart. En azul se representa el porcentaje de genes anotados, en rojo se representa el porcentaje de genes sin información disponible.

Una vez obtenidas las interacciones entre miRNAs y mRNAs disponibles en las bases de datos TargetScanHuman, TargetMiner y miRDB, que son bancos con predicción de interacciones, se realizó una comparación para identificar las interacciones comunes registradas en los tres bancos. En esta comparación, se obtuvieron 36.378 interacciones compartidas por las tres bases de datos (Figura 8). Estas interacciones fueron consideradas de alta confiabilidad y utilizadas a lo largo de este trabajo. Por otro lado, la base de datos TarBase es una base de datos con interacciones validadas experimentalmente, por lo cual todas las interacciones depositadas son interacciones reales, las cuales fueron catalogadas de esta manera y también utilizadas a lo largo del trabajo.

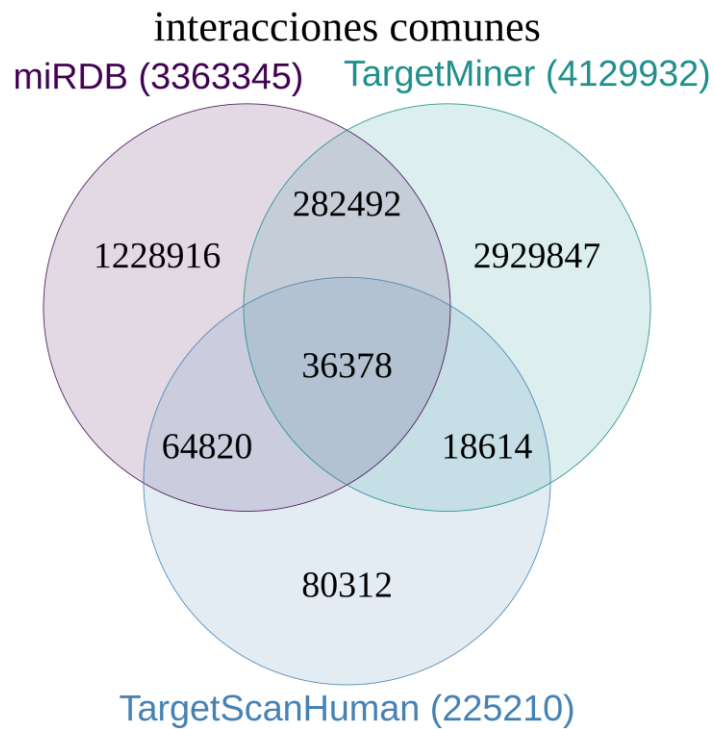
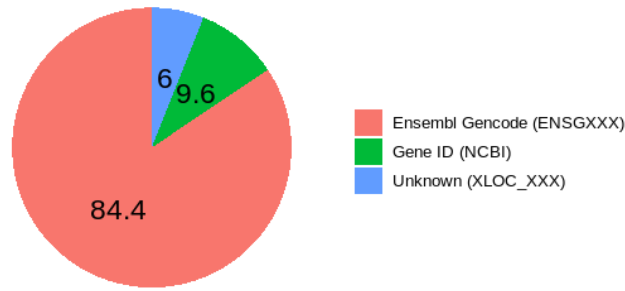


Figura 8. Diagrama de Venn con las interacciones predichas entre miRNAs y mRNAs disponibles en miRDB (Rojo), TargetMiner (Verde), TargetScanHuman (Azul). En la zona central se encuentra el número de interacciones comunes entre las bases de datos.

Referente a las interacciones entre miRNAs y lncRNAs, utilizamos las bases de datos de LncBase y StarBase. Las interacciones presentes en estas dos bases de datos corresponden a interacciones validadas experimentalmente. Realizamos un procedimiento similar al realizado anteriormente para la recuperación de los IDs asociados a cada uno de los lncRNAs representados en estas bases de datos. Para las anotaciones para los lncRNAs disponibles en la base de datos de LncBase, el 84% correspondía a la anotación de Ensembl *Gene ID*, mientras que el 9.6% tenía la anotación de *Entrez GeneID*. Los 6% restantes correspondían a IDs desconocidos, normalmente generados por software de reconstrucción de transcritos, como *Cufflinks*. La recuperación de la información para estas anotaciones está descrita en la Figura 9. A su vez, la anotación referente a los lncRNAs pertenecientes a interacciones reportadas en la base de datos de starBase, su anotación fue realizada en base a los nombres de genes disponibles en HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee). Este comité es el responsable por la nomenclatura de genes humanos, de manera que la recuperación de la anotación de Ensembl (*Gene ID* y *Gene ID versión*) fue total, permitiendo una recuperación del 100% de la información depositada.

Anotaciones de IncBase

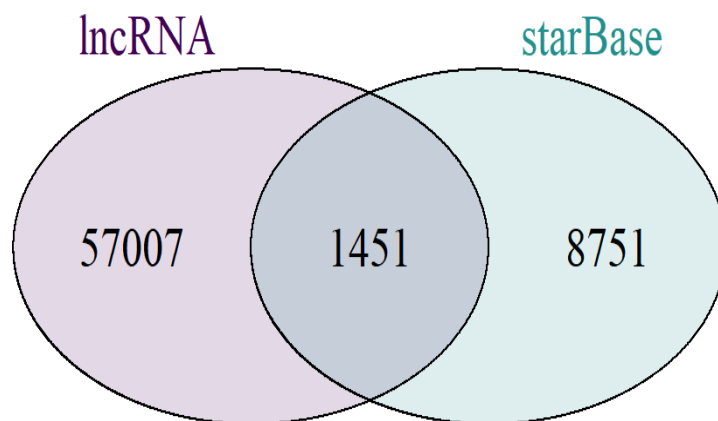


Reultados en %

Figura 9. Tipos de anotación encontrados en la base de datos de IncBase, Rojo corresponde a Gene ID de Ensembl, verde a NCBI ID (Entrez GeneID), azul corresponde a las anotaciones obtenidas por perfiles de expresión independientes.

Una vez recuperadas todas las anotaciones, utilizamos scripts desarrollados *in-house* en lenguaje Python para realizar un cruce de información entre las interacciones validadas disponibles en las dos bases de datos. Obtuvimos un total de 67.209 interacciones, de las cuales 57.007 estaban disponibles exclusivamente en la base de datos IncBase, mientras que 8.751 estaban representadas exclusivamente en la base de datos starBase, y solamente 1.451 interacciones estaban compartidas entre ambas bases de datos (Figura 10). Como hemos mencionado anteriormente, todas estas interacciones fueron validadas experimentalmente y fueron consideradas para nuestro trabajo.

Interacciones comunes lncRNAs



numero total de interacciones 67209

Figura 10. Diagrama de venn con las interacciones entre miRNAs y lncRNAs disponibles en IncBase (rojo) y starBase (verde). En la zona central se encuentra el número de interacciones comunes entre las bases de datos.

Una vez realizada la recuperación de la información y actualizada a su anotación de Gene ID de Ensembl, se generó un catálogo integrando todas las interacciones reportadas con miRNAs de las bases de datos de genes codificantes (mRNAs) y de lncRNAs, generando un catálogo que contiene la interacción de cada miRNA, con sus respectivos blancos de mRNAs o lncRNAs. Además, recopilamos la información si esta interacción se encuentra validada o predicha. En el catálogo generado, se identificó un total de 105.411.466 interacciones bajo la hipótesis de *Competing Endogenous RNA*. Del total de las interacciones, se obtuvo la interacción de miRNAs con 19.039 genes codificantes (mRNAs) y con 7.469 lncRNAs compitiendo bajo esta hipótesis con 944 miRNAs (Figura 11). Este catálogo de interacción fue utilizado para identificar aquellas interacciones encontradas bajo la hipótesis de *Competing Endogenous RNA* asociados a la hipertensión arterial primaria, descritos en el tópico 3.2.2.

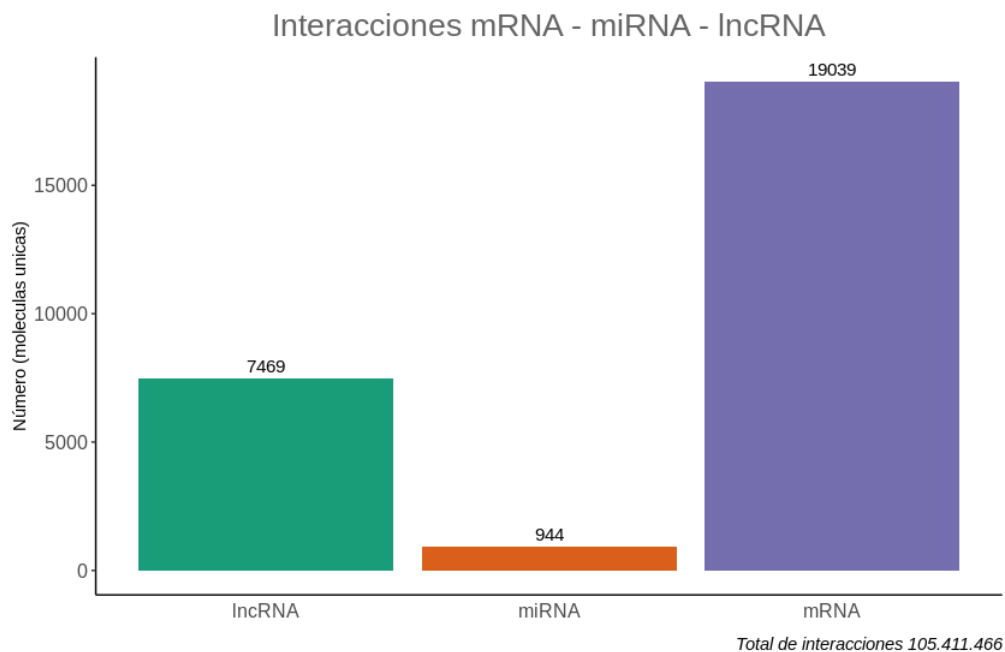


Figura 11. Cantidad de moléculas únicas de lncRNA (verde), miRNA (rojo), mRNA (genes codificantes de proteínas) (morado) encontradas en la interacción de las bases de datos de miRDB, TargetMiner, TargetScanHuman, TarBase, lncBase, starBase.

3.2.2. Catálogo de interacciones entre miRNAs, lncRNAs y mRNAs asociados con la hipertensión arterial primaria

En una comparación de los 16 miRNAs asociados con la hipertensión arterial primaria obtenidos a través de nuestro meta-análisis, contra el catálogo de interacciones recuperadas en el tópico anterior, fuimos capaces de identificar cinco de ellos (hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-483-3p, hsa-miR-518b y hsa-miR-921) como posibles participantes de redes

de ceRNAs (Tabla 4). Entre los miRNAs identificados, se destaca el hsa-miR-106b-5p, que posee un total de 819.308 interacciones. A su vez, este se encuentra ampliamente descrito como un miRNA biomarcador para enfermedades coronarias (Zhang et al., 2015). Otro punto a destacar de este miRNA, es el alto número de interacciones que posee en el catálogo, de las cuales todas se encuentran validadas experimentalmente, por lo cual es un candidato a futuras validaciones experimentales referente a su rol en una red de ceRNAs.

Tabla 4. Tabla resumen de los miRNAs compartidos por las metodologías de *combining* y *Vote-counting* que hacen parte de una posible red bajo la hipótesis de ceRNA. La columna de interacciones corresponde a todas las interacciones reportadas para el miRNA en el catálogo generado, mRNA corresponde a los RNA codificantes de proteínas con interacción con el miRNA, y lncRNA corresponde a los RNA largos no codificantes que presentan interacción con el miRNA.

miRNA	Número de interacciones combinadas	Número de interacciones con mRNAs	Número de interacciones con lncRNAs
hsa-miR-106b-5p	819.308	1.969	203
hsa-miR-92a-3p	367.488	1.421	132
hsa-miR-483-3p	19.810	273	70
hsa-miR-518b	667	27	23
hsa-miR-921	168	23	6

Utilizando los datos obtenidos previamente para los 112 mRNAs asociados a hipertensión arterial primaria obtenidos a través del meta-análisis, contra el catálogo de interacciones recuperadas en el tópico anterior se identificaron 31 mRNAs como posibles participantes de redes de ceRNAs (Tabla 5). Entre los genes identificados, se destaca el gen *HIPK3* que posee un total de 41.820 interacciones, en la cual participan 139 miRNAs y 4.180 lncRNAs. Este gen se encuentra ampliamente descrito como un gen principal en la respuesta a diversas enfermedades incluida la hipertensión arterial primaria ya que es un modificador de cromatina y actúa como un factor de transcripción (Conte & Pierantoni, 2018), lo que indica que una sobreexpresión de este gen tiende a regular la expresión de otros genes. Este gen presenta interacciones con los miRNAs hsa-miR-106b-5p y hsa-miR-92a-3p, los cuales interactúan con 4.180 lncRNAs.

Tabla 5. Tabla resumen de los mRNAs compartidos por las metodologías de *combining* y *Vote-counting*. La columna de interacciones corresponde a todas las interacciones reportadas para el miRNA en el catálogo generado, mRNA corresponde a los RNA codificantes de proteínas con interacción con el miRNA, y lncRNA corresponde a los RNA largos no codificantes que presentan interacción con el miRNA, el valor 0 representa que no se posee información en la base de datos.

Gene stable ID	HGNC symbol	Interacciones totales	Número de miRNAs con interacción	Número de lncRNAs con interacción
ENSG00000110422	<i>HIPK3</i>	41.820	139	4.180
ENSG00000163513	<i>TGFBR2</i>	39.384	102	3.850
ENSG00000068366	<i>ACSL4</i>	38.245	112	3.834
ENSG00000137075	<i>RNF38</i>	31.795	114	3.973
ENSG00000001629	<i>ANKIB1</i>	29.204	81	3.375
ENSG00000161011	<i>SQSTM1</i>	25.801	92	3.595
ENSG00000119318	<i>RAD23B</i>	24.498	83	3.609
ENSG00000148248	<i>SURF4</i>	24.140	78	3.258
ENSG00000139636	<i>LMBR1L</i>	23.835	58	2.786
ENSG00000084234	<i>APLP2</i>	22.607	100	3.733
ENSG00000118523	<i>CCN2</i>	20.416	103	3.538
ENSG00000173166	<i>RAPH1</i>	20.327	103	3.979
ENSG00000110075	<i>PPP6R3</i>	17.389	75	3.233
ENSG00000139289	<i>PHLDA1</i>	14.955	65	3.050
ENSG00000135108	<i>FBXO21</i>	12.828	66	3.096

ENSG00000070540	<i>WIPI1</i>	12.739	35	2.131
ENSG00000181163	<i>NPM1</i>	12.181	33	2.264
ENSG00000093144	<i>ECHDC1</i>	11.354	44	2.201
ENSG00000128641	<i>MYO1B</i>	8.814	48	2.810
ENSG00000137177	<i>KIF13A</i>	8.664	47	2.732
ENSG00000088387	<i>DOCK9</i>	7.436	35	2.610
ENSG00000089818	<i>NECAP1</i>	7.436	35	3.140
ENSG00000138107	<i>ACTRIA</i>	7.341	40	2.308
ENSG00000101868	<i>POLA1</i>	7.137	36	2.684
ENSG00000135046	<i>ANXA1</i>	5.565	28	1.918
ENSG00000117859	<i>OSBPL9</i>	3.841	22	1.823
ENSG00000149573	<i>MPZL2</i>	3.498	17	1.766
ENSG00000174059	<i>CD34</i>	1.786	8	1.155

Utilizando los análisis previamente realizados, identificamos 3 miRNAs (hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-92a-3p y hsa-miR-921) que se encuentran regulando la expresión de 28 genes (Tabla 4), que podrían ser regulados por 4 lncRNAs (*LINC01128*, *EPB41L4A-AS1*, *SNHG5* y *SNHG1*). (Figura 12). En torno al lncRNA *SNHG1* existen interacciones con los 3 miRNAs detectados. Este lncRNA es reportado que su sobre-expresión activa mecanismos para la prevención de enfermedades cardio y cerebrovasculares (Zhang *et al.*, 2018). Por otro lado, la inhibición de este lncRNA actúa en la apoptosis de células endoteliales.

La detección de estos lncRNAs expresados en la hipertensión arterial primaria con asociación a miRNAs y, a su vez, con genes codificantes de proteínas en la enfermedad, sugiere un fuerte indicio de que el mecanismo de *competing endogenous RNAs* podría actuar

secuestrando los miRNAs hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-92a-3p y hsa-miR-921, permitiendo regular la expresión de los genes mencionados anteriormente, y así efectuar su respuesta participando en mecanismos de señalización de la respuesta a las vías metabólicas de respuesta de renina y renina-angiotensina-aldosterona (RAAS).

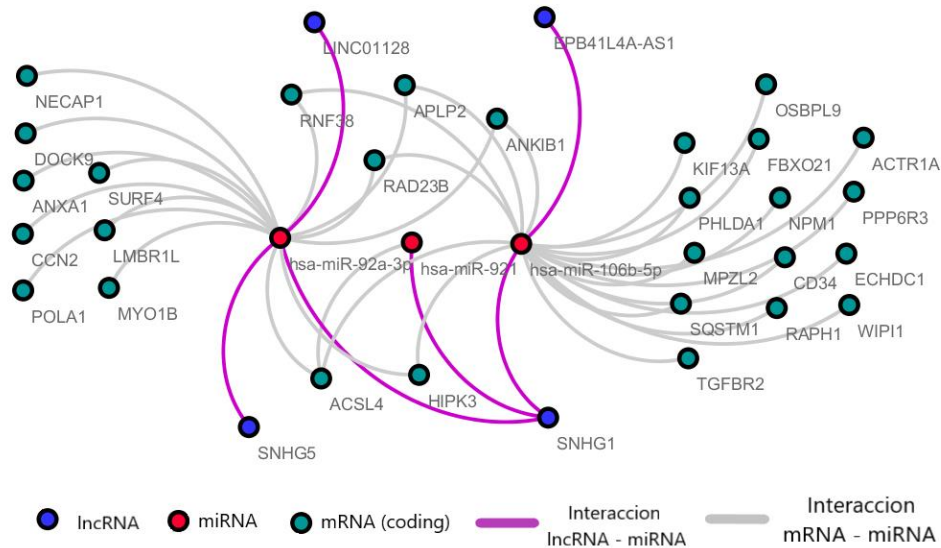


Figura 12. Red de interacción no dirigida de ceRNAs identificados bajo la hipótesis de ceRNAs. los nodos de color rojo representan los miRNAs, de color azul los RNAs no codificantes largos (lncRNAs), de color verde los RNAs codificantes de proteínas (mRNAs). las líneas de color morado corresponden a la interacción entre miRNA y lncRNA y de color gris la interacción entre miRNA y mRNA.

El mecanismo de acción para los *competing endogenous RNAs* está reportado en literatura con una relación de proporcionalidad directa entre la expresión de los mRNAs con lncRNAs, mientras que la relación de proporción entre los lncRNAs y los mRNAs con el miRNAs esta debe ser inversamente proporcionales (Cesana et al., 2011). Esto se debe principalmente por la premisa de que el lncRNA, al encontrarse sobre-regulado, captura al miRNA, impidiendo su ligación con el gen codificante blanco, permitiendo su expresión. Es decir, si el gen está sobre-regulado, el miRNA debería encontrarse sub-regulado y el lncRNA sobre-regulado. Esta relación a su vez puede encontrarse de forma inversa, es decir, un gen sub-regulado debe presentar un miRNA sobre-regulado y a su vez un lncRNA sub-regulado. Bajo esta premisa, evaluamos las tasas de cambio para determinar la relación de expresión entre los miRNAs, lncRNAs y mRNAs (Figura 13), y filtrar aquellos candidatos que podrían estar participando directamente de las posibles redes de ceRNAs.

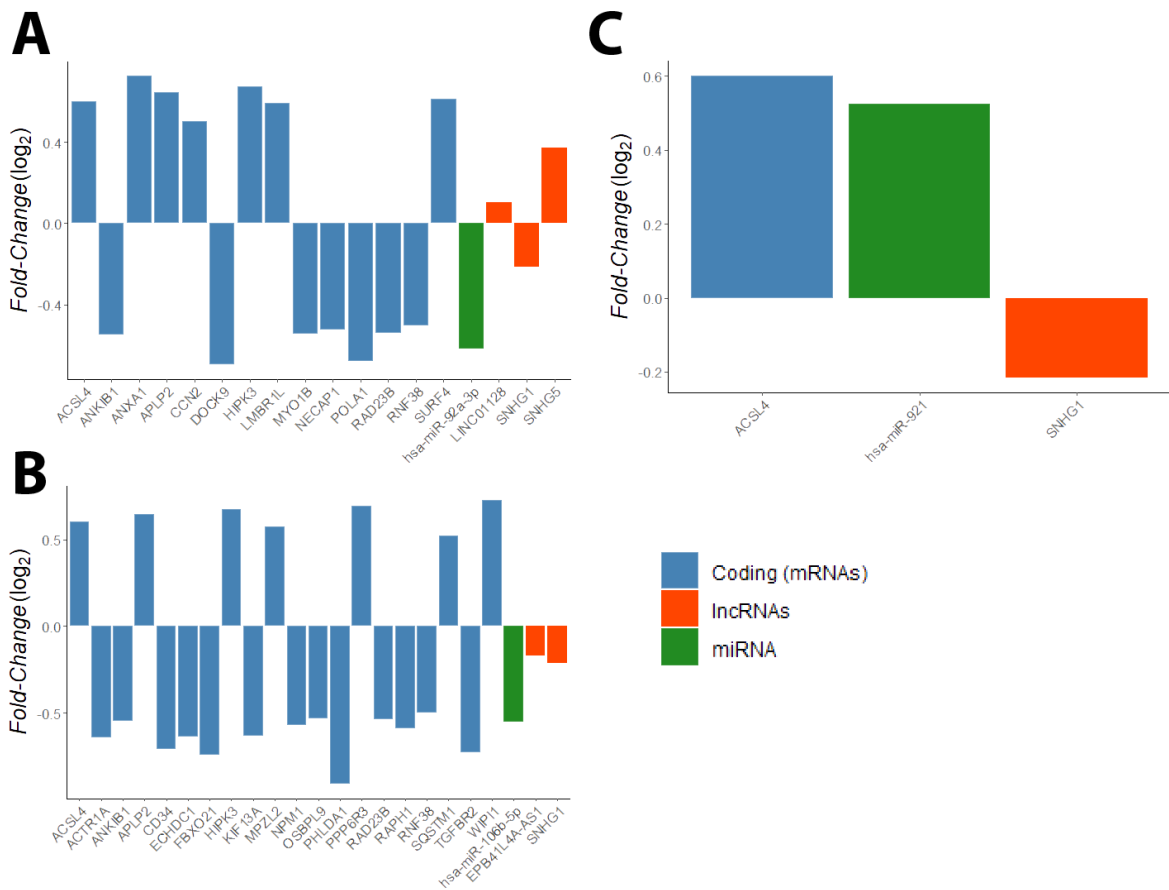


Figura 13. Valores de expresión de mRNAs - miRNAs - lncRNAs separados por miRNA. A Tasas de cambio en logaritmo en base dos para los mRNAs (azul) y lncRNAs (rojos) con interacción con el miRNA hsa-miR-92a-3p (verde). B Tasas de cambio en logaritmo en base dos para los mRNAs (azul) y lncRNAs (rojos) con interacción con el miRNA hsa-miR-106b-5p (verde). C Tasas de cambio en logaritmo en base dos para los mRNAs (azul) y lncRNAs (rojos) con interacción con el miRNA hsa-miR-921 (verde).

Bajo la hipótesis de los ceRNAs, identificamos una tendencia en este comportamiento regulando posiblemente el miRNA hsa-miR-92a-3p (Figura 13A). Este miRNA es capturado por los lncRNAs *LINC01128* y *SNHG5*, lo que se ve reflejado en una expresión negativa del miRNA hsa-miR-92a-3p. Esta regulación podría estar permitiendo la sobre-expresión de los genes *ACSL4*, *ANXA1*, *APLP2*, *CCN2*, *HIPK3*, *LMBR1L*, y *SURF4* (Figura 14 y Anexo 5).

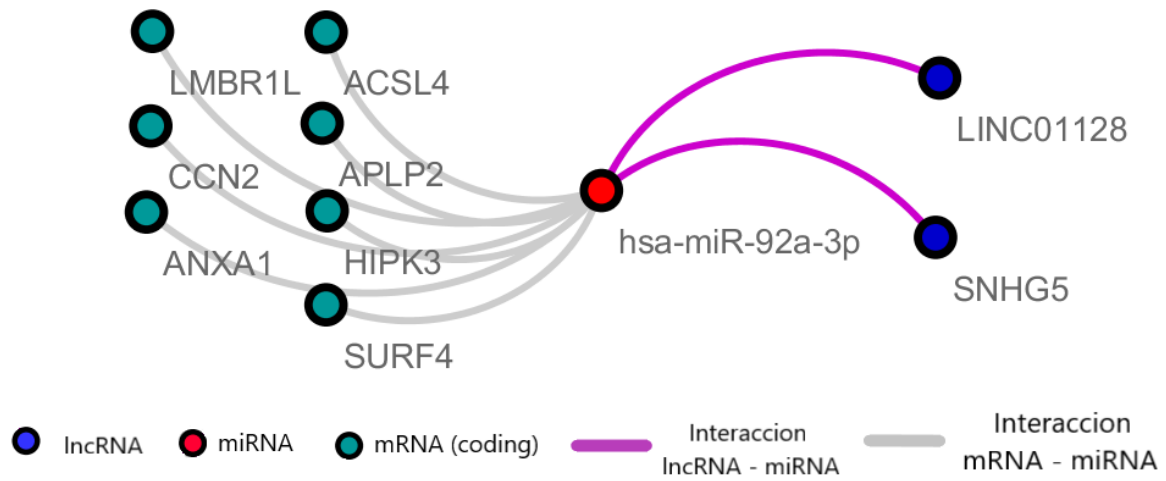


Figura 14. Red de interacción no dirigida de ceRNAs identificados bajo la hipótesis de ceRNAs para los lncRNAs, mRNAs y miRNAs que presentan una correlación positiva. los nodos de color rojo representan los miRNAs, de color azul los RNAs no codificantes largos (lncRNAs), de color verde los RNAs codificantes de proteínas (mRNAs). las líneas de color morado corresponden a la interacción entre miRNA y lncRNA y de color gris la interacción entre miRNA y mRNA.

6. Discusión

Para identificar el conjunto de microRNAs, genes codificantes de proteínas y RNAs no codificantes perturbados en la hipertensión arterial primaria, utilizamos dos abordajes de meta-análisis, aplicados a los estudios públicos de expresión génica disponibles en bases de datos. Utilizando la combinación entre estos dos abordajes, fuimos capaces de encontrar 16 miRNAs perturbados en la hipertensión arterial primaria. Entre los miRNAs expresados diferencialmente destacamos hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-92a-3p y hsa-miR-921, que ya están reportados como miRNAs circulantes y biomarcadores para enfermedades coronarias. (Harrington *et al.*, 2011; Solayman *et al.*, 2016; Deiuliis *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015). Además, se tiene conocimiento en literatura que el miRNA hsa-miR-106b-5p participa en el sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS), actuando como inhibidor de este sistema, por lo cual al disminuir la expresión de este miRNA el complejo pasa a modo activo, disminuyendo la presión arterial a través de la proteína renina (Deiuliis *et al.*, 2014).

Además, nuestros análisis revelaron que estos 16 miRNAs actúan posiblemente regulando vías metabólicas reportadas como asociadas a procesos relacionados con diferentes enfermedades cardiovasculares. Dos de estas vías son reguladas por 12 de los miRNAs identificados: “*Focal adhesion*” y “*MAPK signaling pathway*”. Ambas vías participan en el mecanismo de señalización celular, activando una cascada de señalización para la modulación de expresión génica a nivel de núcleo celular (Orton *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2003). Además, Orton y colaboradores describen que la vía MAPK / ERK está relacionada con la activación del sistema RAAS. El sistema RAAS funciona cuando el complejo GRB2-SOS se acopla al EGFR fosforilado, activando SOS. El SOS activado promueve la eliminación del PIB, que es un miembro de la subfamilia RAS (especialmente H-RAS o K-RAS). RAS puede entonces unirse a GTP y volverse activo (Zarich *et al.*, 2006). Otra vía metabólica identificada por EnrichR fue la de miocardiopatía ventricular derecha arritmogénica (ARVC), regulada por siete miRNAs, que están involucrados en el trastorno eléctrico del corazón (Te Riele *et al.*, 2014), en el que el músculo cardíaco es reemplazado por tejido fibroso cicatrizante (Te Riele *et al.*, 2014). Cuando se presenta esta condición se describe que el órgano más afectado es el corazón y, en específico, se afecta el ventrículo derecho. Por otra parte, la ruta metabólica “*Platelet activation*” (Activación plaquetaria), tiene como principal efector el gen *NOS3*, quien participa en la síntesis de eNOS. Este gen es primordial en el mecanismo de regulación de la presión arterial (Wang *et al.*, 2019). Wang y colaboradores, describen que la ruta específica de

acción que presenta *eNOS* no está descrita. Sin embargo, existen fuertes indicios que uno de sus mecanismos es a través de la regulación de la proteína G, permitiendo la fosforilación de receptores celulares para disminuir la concentración de iones de calcio en el medio celular, provocando la relajación vascular.

Referente al análisis de los mRNAs, utilizamos los dos métodos anteriores para la realización del meta-análisis de expresión génica diferencial para los estudios seleccionados. Utilizando la combinación entre estos dos abordajes, fuimos capaces de encontrar 112 genes codificantes expresados diferencialmente en la condición. Los transcritos de los genes identificados presentan su principal rol de acción en los tejidos endoteliales (tejido perteneciente a los vasos sanguíneos), ventrículo derecho y tejido renal (Marques *et al.*, 2010). Marques y colaboradores, describen que los transcritos de estos genes son detectables en el plasma sanguíneo, siendo movilizados al órgano blanco para ejercer su rol de señalización celular. Al analizar el enriquecimiento funcional, identificamos las vías metabólicas “*Extracellular vesicles in the crosstalk of cardiac cell*”, “*Hypothesized Pathways in Pathogenesis of Cardiovascular Disease*”, “*Transcription factor regulation in adipogenesis*” y “*Cytokines and Inflammatory Response*”. Estas vías metabólicas, en literatura científica, se mencionan como rutas de respuesta a diferentes condiciones, como, por ejemplo, promoviendo la respuesta al estrés oxidativo celular, desencadenando mecanismo de respuesta para la protección de tejido cerebral y mecanismos de respuesta anti-inflamatorios (Ceriello & Motz, 2004; Rosen *et al.*, 2000; Storjord *et al.*, 2020). Todos los mecanismos mencionados anteriormente se asocian con la respuesta a la patología de hipertensión arterial primaria, actuando desencadenando la activación de la ruta metabólica de RAAS y eNOS de formas indirectas y no completamente descritas (Wang *et al.*, 2019; Ceriello & Motz, 2004; Storjord *et al.*, 2020).

Por otro lado, la caracterización del rol de los lncRNAs en asociación con las enfermedades cardiovasculares está todavía en etapas iniciales (Sekar *et al.*, 2020). Sin embargo, ya es conocido que los lncRNAs cumplen funciones estructurales en la regulación de enfermedades, actuando por ejemplo en la regulación de la expresión de miRNAs y mRNAs, a través de medios directos e indirectos (Jiang & Ning, 2020). En nuestro meta-análisis identificamos un total de 26 lncRNAs diferencialmente expresados, entre los cuales un grupo menor se encuentran caracterizados, con sus mecanismos de acción bien definidos. Un ejemplo sería el lncRNA *SNHG5*, que es conocido por regular la expresión del miRNA hsa-miR-26a, a

través de la captura de este, y permitir la expresión de los genes conformantes de la proteína N-cadherin, el cual es un factor importante en la respuesta a preeclampsia (Jiang & Ning, 2020). A su vez, este lncRNA fue demostrado por Jiang y Ning que en hipertensión se encuentra expresado diferencialmente en tejido cardíaco, renal y plasma sanguíneo, demostrando también ser un lncRNA circulante. Estudios realizados por Zhang y colaboradores indican que lncRNAs circulantes pueden ser biomarcadores de enfermedades cardíacas, dado que existe una transducción de señales entre el corazón y los riñones, en la cual genes que presentan mayor expresión a nivel renal deben ser movilizados a el tejido blanco de acción (Zhang et al., 2019).

En este trabajo, también realizamos una recopilación de un catálogo de todas las interacciones posibles entre miRNAs y lncRNAs o mRNAs, bajo la hipótesis de ceRNAs. Este trabajo resultó en la generación de una base de datos actualizada, curada de forma manual, contando con anotaciones actualizadas y de fácil seguimiento bibliográfico. Sin embargo, uno de los principales desafíos encontrados fue el hecho de que cada base de datos posee una forma de anotación, que se debe al criterio del grupo de investigación que la desarrolló. A pesar de indicar en sus publicaciones originales, o descripción en sus sitios web, que utilizan la anotación más amigable para el usuario, muchas de estas bases de datos solo actualizan sus repositorios adicionando más información a la base de datos para obtener el mayor de número de interacciones posible, generando redundancia en la base de datos y no actualizando los identificadores disponibles en las principales bases de datos primarias (e.g. NCBI, Ensembl). Eso resulta en una dificultad para el rescate de anotaciones. Los repositorios que contienen información actualizada como los sitios de NCBI y Ensembl, realizan una actualización continua para los genes codificantes y lncRNAs humanos, lo que provoca que las anotaciones almacenadas en los repositorios no sea la actualmente utilizada.

Al contrastar los mRNAs expresados diferencialmente expresados en la hipertensión primaria, verificamos que 31 poseen interacción en el catálogo desarrollado y podrían estar siendo regulados por el mecanismo de ceRNAs. Algunos de estos genes (*ACSL4*, *CCN2*, *APLP2*, *ANXA1*) están involucrados en la osmoregulación, estabilización de la presión sanguínea, ubiquitinación, activación del sistema RAAS y angiotensin II, regulación del gen eNOS y mediación de la inflamación vascular (Philippe *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2018; Iadecola & Davisson, 2008; Savoia & Schiffrin, 2006).

Por otro lado, al contrastar los miRNAs diferencialmente expresados que podrían participar en el mecanismo de ceRNAs en la hipertensión arterial primaria, verificamos que 5

de los 16 miRNAs perturbados en la condición interactúan con mRNAs y lncRNAs. En un análisis del miRNA regulado de forma positiva (sobre-regulado) y participante de posibles redes de ceRNAs, encontramos a hsa-miR-921. Este miRNA es reportado como participante en la respuesta anti-inflamatoria regulando la expresión del gen *ADAMTS1* (Yang *et al.*, 2013). Por otro lado, entre los miRNAs regulados de forma negativa encontramos a hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-483-3p y hsa-miR-518b. Estos miRNAs se encuentran reportados como participantes en el sistema RAAS, biomarcadores de riesgo para enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares; y en la regulación del gen *RAP1B* que participa en vías de regulación de adhesión, crecimiento y diferenciación celular (Deiuliis *et al.*, 2014; Solayman *et al.*, 2016; Teng & Meng, 2019; Liu *et al.*, 2018).

Finalmente, al filtrar la red por los niveles de cambio de expresión entre los miRNAs, lncRNAs y mRNAs, llegamos a una red compuesta por el miRNA (hsa-miR-92a-3p), dos lncRNAs (*LINC01128* y *SNHG5*) y siete genes codificantes de proteínas (*ACSL4*, *LMBR1L*, *CCN2*, *APLP2*, *ANXA1*, *HIPK3* y *SURF4*). Estos dos lncRNAs ya han sido reportados como ceRNAs, regulando genes codificantes de proteínas en diferentes enfermedades a través del secuestro de los miRNAs que los regulan (Hu *et al.*, 2019; He *et al.*, 2017). Además, los genes codificantes de proteínas posiblemente regulados (figura 14) por los ceRNAs *LINC01128* y *SNHG5* se encuentran en rutas de señalización de homeostasis celular, regulación de cascada señalización de proteína G, y actúan en respuesta para la protección del tejido cerebral, que son rutas primordiales en la respuesta a la patología de hipertensión arterial primaria (Bottalico *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2008). Los investigadores Iadecola y Davisson, en su trabajo realizado el año 2008, indican que el órgano más afectado por el aumento de la presión sanguínea es el cerebro, por lo cual encontrar que los genes identificados y mencionados anteriormente compartan rutas de señalización con vías metabólicas relacionadas con el cerebro, que es un órgano blanco de la hipertensión arterial primaria.

El gen *ACSL4* está catalogado como un regulador de acetil co-enzima alfa, que está ligado en las rutas metabólicas de lípidos, y también tiene rol en la respuesta a apoptosis férrica en los músculos lisos, provocando daño en los tejidos vasculares (Moerke *et al.*, 2019). La inhibición total de este gen desencadena el síndrome de Alport. Este síndrome es un trastorno genético que presenta falla renal progresiva (Gross *et al.*, 2003). El rol preciso que está cumpliendo este gen en la hipertensión arterial primaria aún no está reportado, sin embargo, bajo el conocimiento que se tiene, el presente gen estaría afectando dos tejidos relacionados a

la hipertensión (vasos sanguíneos y riñón), está asociado a la apoptosis de células pertenecientes al músculo liso presente en los vasos sanguíneos y es un factor de riesgo para enfermedades renales de forma indirecta (Gross et al., 2003; Moerke *et al.*, 2019). Por otro lado, el gen *ANXA1* ha sido descrito como un señalizador clave en la respuesta antiinflamatoria (Senchenkova *et al.*, 2019). Senchenkova y colaboradores, describen que el efecto de este gen en la vía metabólica de “*Platelet activation*”, activa los receptores de proteína G para la regulación de la enzima fosfolipasa intracelular para ejercer un efecto de activación en las integrinas *alfa II beta*. El gen *APLP2* es un gen descrito como blanco de renina, actuando como un señalizador en el ventrículo izquierdo, permitiendo que renina se concentre en este lugar específico del corazón para desencadenar el mecanismo de respuesta de vasoconstricción y de protección del tejido cardíaco (Kurdi *et al.*, 2004). Evaluando el gen *CCN2* y su efecto en la condición de estudio, su principal rol es ser un inductor de síntesis de receptores de renina, induciendo a *TGFβ* y aumentando la sensibilidad de este receptor a renina (Leask, 2010). Los genes *HIPK3*, *LMBR1L*, y *SURF4* no se encuentran reportados en literatura asociados a hipertensión arterial primaria. Sin embargo, sí se encuentran reportados en otras condiciones como diabetes mellitus tipo 2 y preeclampsia, actuando como osmoreguladores (Cai et al., 2020; Zhu et al., 2009; Seoane et al., 2014) Comparando nuestros resultados con los estudios realizados por Song y colaboradores (2017), quien realizó un análisis de redes de ceRNAs utilizando 22 set de datos de enfermedades cardiovasculares, verificamos que ellos no describen en sus estudios una red de interacción individual para cada patología estudiada, tampoco una red de interacción global para el genoma humano o mismo una red asociada con hipertensión. De esta manera, el presente trabajo aporta información nueva y complementaria, reportando una red de interacción global para el genoma humano integrando 6 bases de datos, que podrá servir como base para cualquier estudio de redes de ceRNAs en diferentes enfermedades o condiciones de interés, Además de una red de interacción compuesta por un miRNA, regulada por dos lncRNAs, que podría tener un rol importante en la hipertensión esencial primaria.

7. Conclusión

Los estudios antes mencionados sugieren que los lncRNAs están implicados en los mecanismos de respuesta genética para la hipertensión arterial primaria. Sin embargo, aún queda mucha investigación para dilucidar en específico el rol de los lncRNAs en hipertensión arterial esencial. Solo basándonos en el mecanismo de ceRNAs, identificamos una red de interacción que sugiere que los lncRNAs *LINC01128* y *SNHG5* capturan el miRNA hsa-miR-92a-3p permitiendo la expresión de los genes *ACSL4*, *LMBR1L*, *CCN2*, *APLP2*, *ANXA1*, *HIPK3* y *SURF4*. Estos lncRNAs, genes codificantes de proteínas y el miRNA están reportados como parte clave en la respuesta genética a enfermedades cardiovasculares. La identificación de estos genes junto con el desarrollo de una base de datos validada experimentalmente y curada de forma manual es una fuente importante de conocimiento para la comprensión del rol que cumplen los lncRNAs en la hipertensión arterial primaria.

8. Bibliografía

- Akehurst, C., Small, H. Y., Sharafetdinova, L., Forrest, R., Beattie, W., Brown, C. E., ... & McBride, M. W. (2015). Differential expression of microRNA-206 and its target genes in preeclampsia. *Journal of hypertension*, 33(10), 2068.
- Arora, P., Wu, C., Khan, A. M., Bloch, D. B., Davis-Dusenbery, B. N., Ghorbani, A., ... & Kim, S. (2013). Atrial natriuretic peptide is negatively regulated by microRNA-425. *The Journal of clinical investigation*, 123(8), 3378-3382.
- Bink, D. I., Lozano-Vidal, N., & Boon, R. A. (2019). Long Non-Coding RNA in Vascular Disease and Aging. *Non-coding RNA*, 5(1), 26.
- Bosson, A. D., Zamudio, J. R., & Sharp, P. A. (2014). Endogenous miRNA and target concentrations determine susceptibility to potential ceRNA competition. *Molecular cell*, 56(3), 347-359.
- Bottalico, B., Larsson, I., Brodzki, J., Hernandez-Andrade, E., Casslén, B., Marsal, K., & Hansson, S. R. (2004). Norepinephrine transporter (NET), serotonin transporter (SERT), vesicular monoamine transporter (VMAT2) and organic cation transporters (OCT1, 2 and EMT) in human placenta from pre-eclamptic and normotensive pregnancies. *Placenta*, 25(6), 518-529.
- Brosnihan, K. B., Moriguchi, A., Nakamoto, H., Richard H, D., Ganten, D., & Carlos M, F. (1994). Estrogen augments the contribution of nitric oxide to blood pressure regulation in transgenic hypertensive rats expressing the mouse Ren-2 gene. *American journal of hypertension*, 7(7_Pt_1), 576-582.
- Buroker, N. E., Ning, X. H., Zhou, Z. N., Li, K., Cen, W. J., Wu, X. F., & Chen, S. H. (2013). Circulating miRNAs from dried blood spots are associated with high altitude sickness. *J Med Diagn Meth*, 2(125), 2.
- Butler, M. G. (2010). PEDIATRIC HYPERTENSION: GENETICS OF HYPERTENSION• CURRENT STATUS. *Le Journal medical libanais. The Lebanese medical journal*, 58(3), 175.
- Carvalho, B. S., & Irizarry, R. A. (2010). A framework for oligonucleotide microarray preprocessing. *Bioinformatics*, 26(19), 2363-2367.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2012). Vital signs: awareness and treatment of uncontrolled hypertension among adults--United States, 2003-2010. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 61, 703.

- Cheng, X., & Joe, B. (2015, August). Genetics of Hypertension. In *Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function to Disease* (Vol. 7, No. 3, pp. 1-56). Morgan & Claypool Life Sciences.
- Creemers, E. E., Tijssen, A. J., & Pinto, Y. M. (2012). Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease?. *Circulation research*, *110*(3), 483-495.
- Davis, S., & Meltzer, P. S. (2007). GEOquery: a bridge between the Gene Expression Omnibus (GEO) and BioConductor. *Bioinformatics*, *23*(14), 1846-1847.
- Deiuliis, J., Mihai, G., Zhang, J., Taslim, C., Varghese, J. J., Maiseyeu, A., ... & Rajagopalan, S. (2014). Renin-sensitive microRNAs correlate with atherosclerosis plaque progression. *Journal of human hypertension*, *28*(4), 251-258.
- Dickinson, B. A., Semus, H. M., Montgomery, R. L., Stack, C., Latimer, P. A., Lewton, S. M., ... & van Rooij, E. (2013). Plasma microRNAs serve as biomarkers of therapeutic efficacy and disease progression in hypertension-induced heart failure. *European journal of heart failure*, *15*(6), 650-659.
- Doris, P. A. (2002). Hypertension genetics, single nucleotide polymorphisms, and the common disease: common variant hypothesis. *Hypertension*, *39*(2), 323-331.
- Frankish, A., Diekhans, M., Ferreira, A. M., Johnson, R., Jungreis, I., Loveland, J., ... & Barnes, I. (2018). GENCODE reference annotation for the human and mouse genomes. *Nucleic acids research*, *47*(D1), D766-D773.
- Freedman, J. E., Ercan, B., Morin, K. M., Liu, C. T., Tamer, L., Ayaz, L., ... & Camci, C. (2012). The distribution of circulating microRNA and their relation to coronary disease. *F1000Research*, *1*.
- Ghosal, S., Das, S., Sen, R., & Chakrabarti, J. (2014). HumanViCe: host ceRNA network in virus infected cells in human. *Frontiers in genetics*, *5*, 249.
- Gopalakrishnan, K., Kumarasamy, S., Mell, B., & Joe, B. (2015). Genome-wide identification of long noncoding RNAs in rat models of cardiovascular and renal disease. *Hypertension*, *65*(1), 200-210.
- Guo, L., Yang, Y., Liu, J., Wang, L., Li, J., Wang, Y., ... & Yuan, J. X. J. (2014). Differentially expressed plasma microRNAs and the potential regulatory function of Let-7b in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *PloS one*, *9*(6), e101055.
- Haase, M., Bellomo, R., Devarajan, P., Schlattmann, P., Haase-Fielitz, A., & Group, N. M. A. I. (2009). Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis

- and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *American Journal of Kidney Diseases*, 54(6), 1012-1024.
- Hein, T. W., Singh, U., Vasquez-Vivar, J., Devaraj, S., Kuo, L., & Jialal, I. (2009). Human C-reactive protein induces endothelial dysfunction and uncoupling of eNOS in vivo. *Atherosclerosis*, 206(1), 61-68.
- Hromadnikova, I., Kotlabova, K., Hympanova, L., & Krofta, L. (2016). Gestational hypertension, preeclampsia and intrauterine growth restriction induce dysregulation of cardiovascular and cerebrovascular disease associated microRNAs in maternal whole peripheral blood. *Thrombosis research*, 137, 126-140.
- Huber, W., Carey, V. J., Gentleman, R., Anders, S., Carlson, M., Carvalho, B. S., ... & Gottardo, R. (2015). Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nature methods*, 12(2), 115.
- Iadecola, C., & Davisson, R. L. (2008). Hypertension and cerebrovascular dysfunction. *Cell metabolism*, 7(6), 476-484.
- Janaszak-Jasiecka, A., Siekierzycka, A., Bartoszewska, S., Serocki, M., Dobrucki, L. W., Collawn, J. F., ... & Bartoszewski, R. (2018). eNOS expression and NO release during hypoxia is inhibited by miR-200b in human endothelial cells. *Angiogenesis*, 21(4), 711-724.
- Jin, H. F., Du, S. X., Zhao, X., Wei, H. L., Wang, Y. F., Liang, Y. F., ... & Du, J. B. (2008). Effects of endogenous sulfur dioxide on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Acta Pharmacologica Sinica*, 29(10), 1157-1166.
- Jusic, A., Devaux, Y., & EU-CardioRNA COST Action (CA17129). (2019). Noncoding NAs in Hypertension. *Hypertension*, 74(3), 477-492.
- Jusic, A., Devaux, Y., & EU-CardioRNA COST Action (CA17129). (2019). Noncoding RNAs in Hypertension. *Hypertension*, 74(3), 477-492.
- Kalvari, I., Argasinska, J., Quinones-Olvera, N., Nawrocki, E. P., Rivas, E., Eddy, S. R., ... & Petrov, A. I. (2017). Rfam 13.0: shifting to a genome-centric resource for non-coding RNA families. *Nucleic acids research*, 46(D1), D335-D342.
- Karreth, F. A., & Pandolfi, P. P. (2013). ceRNA cross-talk in cancer: when ce-bling rivalries go awry. *Cancer discovery*, 3(10), 1113-1121.
- Kearney, P. M., Whelton, M., Reynolds, K., Muntner, P., Whelton, P. K., & He, J. (2005). Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *The lancet*, 365(9455), 217-223.

- Kent, W. J. (2002). BLAT—the BLAST-like alignment tool. *Genome research*, 12(4), 656-664.
- Korkor, M. T., Meng, F. B., Xing, S. Y., Zhang, M. C., Guo, J. R., Zhu, X. X., & Yang, P. (2011). Microarray analysis of differential gene expression profile in peripheral blood cells of patients with human essential hypertension. *International journal of medical sciences*, 8(2), 168.
- Kozomara, A., Birgaoanu, M., & Griffiths-Jones, S. (2018). miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic acids research*, 47(D1), D155-D162.
- Kreth, S., Ledderose, C., Schütz, S., Beiras, A., Heyn, J., Weis, F., & Beiras-Fernandez, A. (2014). MicroRNA-150 inhibits expression of adiponectin receptor 2 and is a potential therapeutic target in patients with chronic heart failure. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 33(3), 252-260.
- Kriegel, A. J., Baker, M. A., Liu, Y., Liu, P., Cowley Jr, A. W., & Liang, M. (2015). Endogenous microRNAs in human microvascular endothelial cells regulate mRNAs encoded by hypertension-related genes. *Hypertension*, 66(4), 793-799.
- Leimena, C., & Qiu, H. (2018). Non-coding RNA in the pathogenesis, progression and treatment of hypertension. *International journal of molecular sciences*, 19(4), 927.
- Lip, G. Y. H. (2000). Hypertensive heart disease: a complex syndrome or a hypertensive cardiomyopathy?. *Eur Heart J*, 21, 1653-1665.
- Lipsey, M. W., & Wilson, D. B. (2001). Practical meta-analysis. Sage Publications, Inc.
- Liu, M., Wang, Y., Lu, H., Wang, H., Shi, X., Shao, X., ... & Wang, Y. L. (2018). miR-518b Enhances human trophoblast cell proliferation through targeting Rap1b and activating Ras-MAPK signal. *Frontiers in endocrinology*, 9, 100.
- Liu, P. F., Yan, P., Zhao, D. H., Shi, W. F., Meng, S., Liu, Y., ... & Xie, L. X. (2018). The effect of environmental factors on the differential expression of miRNAs in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a pilot clinical study. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*, 13, 741.
- Maracaja-Coutinho V., Arias-Carrasco R., Nakaya H.I., Aliaga-Tobar V. (2019) Predicting RNA Families in Nucleotide Sequences Using StructRNAfinder. In: Kollmar M. (eds) Gene Prediction. Methods in Molecular Biology, vol 1962. Humana, New York, NY
- Marques, F. Z., Campain, A. E., Tomaszewski, M., Zukowska-Szzechowska, E., Yang, Y. H. J., Charchar, F. J., & Morris, B. J. (2011). Gene expression profiling reveals renin mRNA

- overexpression in human hypertensive kidneys and a role for microRNAs. *Hypertension*, 58(6), 1093-1098.
- McInnes, G. T. (1995). Hypertension and coronary artery disease: cause and effect. *Journal of hypertension. Supplement: official journal of the International Society of Hypertension*, 13(2), S49-56.
- Ministerio de Salud Pública, S. (2017). Encuesta Nacional de Salud 2016-2017 Primeros Resultados. *Santiago*.
- Murakami, K. (2015). Non-coding RNAs and hypertension—unveiling unexpected mechanisms of hypertension by the dark matter of the genome. *Current hypertension reviews*, 11(2), 80-90.
- Niculescu, L. S., Simionescu, N., Sanda, G. M., Carnuta, M. G., Stancu, C. S., Popescu, A. C., ... & Sima, A. V. (2015). MiR-486 and miR-92a identified in circulating HDL discriminate between stable and vulnerable coronary artery disease patients. *PloS one*, 10(10), e0140958.
- Parthenakis, F. I., Marketou, M. E., Kontaraki, J. E., Maragoudakis, F., Maragkoudakis, S., Nakou, H., ... & Vardas, P. E. (2016). Comparative microRNA profiling in relation to urinary albumin excretion in newly diagnosed hypertensive patients. *Journal of human hypertension*, 30(11), 685.
- Prada C, Nakaya H (2019). *MetaVolcanoR: Gene expression meta-analysis visualization tool*. R package version 0.99.14.
- Rhodes, C. J., Im, H., Cao, A., Hennigs, J. K., Wang, L., Sa, S., ... & Tojais, N. F. (2015). RNA sequencing analysis detection of a novel pathway of endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 192(3), 356-366.
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., & Smyth, G. K. (2015). limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic acids research*, 43(7), e47-e47.
- Romaine, S. P., Charchar, F. J., Samani, N. J., & Tomaszewski, M. (2016). Circulating microRNAs and hypertension—from new insights into blood pressure regulation to biomarkers of cardiovascular risk. *Current opinion in pharmacology*, 27, 1-7.
- Salmena, L., Poliseno, L., Tay, Y., Kats, L., & Pandolfi, P. P. (2011). A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language?. *Cell*, 146(3), 353-358.
- Savoia, C., & Schiffrin, E. L. (2006). Inflammation in hypertension. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 15(2), 152-158.

- Sente, T., Van Berendoncks, A. M., Hoymans, V. Y., & Vrints, C. J. (2016). Adiponectin resistance in skeletal muscle: pathophysiological implications in chronic heart failure. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, 7(3), 261-274.
- Sethupathy, P., Borel, C., Gagnebin, M., Grant, G. R., Deutsch, S., Elton, T. S., ... & Antonarakis, S. E. (2007). Human microRNA-155 on chromosome 21 differentially interacts with its polymorphic target in the AGTR1 3' untranslated region: a mechanism for functional single-nucleotide polymorphisms related to phenotypes. *The American Journal of Human Genetics*, 81(2), 405-413.
- Solayman, M. H. M., Langaee, T., Patel, A., El-Wakeel, L., El-Hamamsy, M., Badary, O., & Johnson, J. A. (2016). Identification of suitable endogenous normalizers for qRT-PCR analysis of plasma microRNA expression in essential hypertension. *Molecular biotechnology*, 58(3), 179-187.
- Song, C., Zhang, J., Qi, H., Feng, C., Chen, Y., Cao, Y., ... & Li, C. (2017). The global view of mRNA-related ceRNA cross-talks across cardiovascular diseases. *Scientific reports*, 7(1), 10185.
- Stoynev, N., Dimova, I., Rukova, B., Hadjidekova, S., Nikolova, D., Toncheva, D., & Tankova, T. (2014). Gene expression in peripheral blood of patients with hypertension and patients with type 2 diabetes. *Journal of Cardiovascular Medicine*, 15(9), 702-709.
- Tay, Y., Kats, L., Salmena, L., Weiss, D., Tan, S. M., Ala, U., ... & Lieberman, J. (2011). Coding-independent regulation of the tumor suppressor PTEN by competing endogenous mRNAs. *Cell*, 147(2), 344-357.
- Teng, L., & Meng, R. (2019). Long Non-Coding RNA MALAT1 Promotes Acute Cerebral Infarction Through miRNAs-Mediated hs-CRP Regulation. *Journal of Molecular Neuroscience*, 69(3), 494-504.
- Textoris, J., Ivorra, D., Amara, A. B., Sabatier, F., Ménard, J. P., Heckenroth, H., ... & Mege, J. L. (2013). Evaluation of current and new biomarkers in severe preeclampsia: a microarray approach reveals the VSIG4 gene as a potential blood biomarker. *PloS one*, 8(12), e82638.
- Tijssen, A. J., Creemers, E. E., Moerland, P. D., de Windt, L. J., van der Wal, A. C., Kok, W. E., & Pinto, Y. M. (2010). MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure. *Circulation research*, 106(6), 1035.
- Viemann, D., Schmolke, M., Lueken, A., Boergeling, Y., Friesenhagen, J., Wittkowski, H., ... & Roth, J. (2011). H5N1 virus activates signaling pathways in human endothelial cells resulting in a specific imbalanced inflammatory response. *The Journal of Immunology*, 186(1), 164-173.

- Wang, F., Li, L., Xu, H., Liu, Y., Yang, C., Cowley Jr, A. W., ... & Liang, M. (2014). Characteristics of long non-coding RNAs in the Brown Norway rat and alterations in the Dahl salt-sensitive rat. *Scientific reports*, 4, 7146.
- Wang, K., Liu, C. Y., Zhou, L. Y., Wang, J. X., Wang, M., Zhao, B., ... & Feng, C. (2015). APF lncRNA regulates autophagy and myocardial infarction by targeting miR-188-3p. *Nature communications*, 6, 6779.
- Wang, K., Liu, F., Liu, C. Y., An, T., Zhang, J., Zhou, L. Y., ... & Zhao, Y. F. (2016). The long noncoding RNA NRF regulates programmed necrosis and myocardial injury during ischemia and reperfusion by targeting miR-873. *Cell death and differentiation*, 23(8), 1394.
- Wang, M., Gu, S., Liu, Y., Yang, Y., Yan, J., Zhang, X., ... & Su, P. (2019). miRNA-PDGFRB/HIF1A-lncRNA CTEPHA1 Network Plays Important Roles in the Mechanism of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *International heart journal*, 18-479.
- Wang, Y., Liu, J., Wu, H., & Cai, Y. (2018). Combined biomarkers composed of environment and genetic factors in stroke. *Bioscience trends*.
- Wang, Z., Xu, P., Chen, B., Zhang, Z., Zhang, C., Zhan, Q., ... & Peng, W. (2018). Identifying circRNA-associated-ceRNA networks in the hippocampus of A β 1-42-induced Alzheimer's disease-like rats using microarray analysis. *Aging (Albany NY)*, 10(4), 775.
- Wang, Z., Xu, P., Chen, B., Zhang, Z., Zhang, C., Zhan, Q., ... & Peng, W. (2018). Identifying circRNA-associated-ceRNA networks in the hippocampus of A β 1-42-induced Alzheimer's disease-like rats using microarray analysis. *Aging (Albany NY)*, 10(4), 775.
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. Springer.
- Wu, G., Jose, P. A., & Zeng, C. (2018). Noncoding RNAs in the regulatory network of hypertension. *Hypertension*, 72(5), 1047-1059.
- Yang, H., Kim, G. D., Park, H. R., & Park, Y. S. (2013). Comparative mRNA and microRNA expression profiling of methylglyoxal-exposed human endothelial cells. *BioChip Journal*, 7(2), 143-150.
- Zerbino, D. R., Achuthan, P., Akanni, W., Amode, M. R., Barrell, D., Bhai, J., ... & Gil, L. (2017). Ensembl 2018. *Nucleic acids research*, 46(D1), D754-D761.
- Zhang, A., Zhang, J., Kaipainen, A., Lucas, J. M., & Yang, H. (2016). Long non-coding RNA: A newly deciphered "code" in prostate cancer. *Cancer letters*, 375(2), 323-330.

- Zhang, W., Shang, T., Huang, C., Yu, T., Liu, C., Qiao, T., ... & Liu, C. (2015). Plasma microRNAs serve as potential biomarkers for abdominal aortic aneurysm. *Clinical biochemistry*, 48(15), 988-992.
- Zhang, X., Guo, J., Fan, S., Li, Y., Wei, L., Yang, X., ... & Ping, Z. (2013). Screening and identification of six serum microRNAs as novel potential combination biomarkers for pulmonary tuberculosis diagnosis. *PloS one*, 8(12), e81076.
- Zhao, X., Jia, Y., Chen, H., Yao, H., & Guo, W. (2019). Plasma-derived exosomal miR-183 associates with protein kinase activity and may serve as a novel predictive biomarker of myocardial ischemic injury. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 18(1), 179-187.
- Zhao, Y., Wang, C., Wang, C., Hong, X., Miao, J., Liao, Y., ... & Liu, Y. (2018). An essential role for Wnt/ β -catenin signaling in mediating hypertensive heart disease. *Scientific reports*, 8(1), 1-14.
- Steemers, F. J., & Gunderson1, 2, K. L. (2005). Illumina, Inc.
- Badimon, J. J., Fuster, V., Chesebro, J. H., & Badimon, L. (1993). Coronary atherosclerosis. A multifactorial disease. *Circulation*, 87(3 Suppl), II3-16.
- Orton, R. J., Sturm, O. E., Vyshemirsky, V., Calder, M., Gilbert, D. R., & Kolch, W. (2005). Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway. *Biochemical Journal*, 392(2), 249-261.
- Chen, C. S., Alonso, J. L., Ostuni, E., Whitesides, G. M., & Ingber, D. E. (2003). Cell shape provides global control of focal adhesion assembly. *Biochemical and biophysical research communications*, 307(2), 355-361.
- Zarich, N., Oliva, J. L., Martínez, N., Jorge, R., Ballester, A., Gutiérrez-Eisman, S., ... & Rojas, J. M. (2006). Grb2 is a negative modulator of the intrinsic Ras-GEF activity of hSos1. *Molecular biology of the cell*, 17(8), 3591-3597.
- Vlachos, I. S., Zagganas, K., Paraskevopoulou, M. D., Georgakilas, G., Karagkouni, D., Vergoulis, T., ... & Hatzigeorgiou, A. G. (2015). DIANA-miRPath v3. 0: deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic acids research*, 43(W1), W460-W466.
- Te Riele, A. S., Tandri, H., & Bluemke, D. A. (2014). Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC): cardiovascular magnetic resonance update. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance*, 16(1), 50.
- Engreitz, J. M., Haines, J. E., Perez, E. M., Munson, G., Chen, J., Kane, M., ... & Lander, E. S. (2016). Local regulation of gene expression by lncRNA promoters, transcription and splicing. *Nature*, 539(7629), 452-455.

Conte, A., & Pierantoni, G. M. (2018). Update on the regulation of HIPK1, HIPK2 and HIPK3 protein kinases by microRNAs. *MicroRNA*, 7(3), 178-186.

Moerke, C., Theilig, F., Kunzendorf, U., & Krautwald, S. (2019). ACSL4 as the First Reliable Biomarker of Ferroptosis Under Pathophysiological Conditions. In *Ferroptosis in Health and Disease* (pp. 111-123). Springer, Cham.

Gross, O., Beirowski, B., Koepke, M. L., Kuck, J., Reiner, M., Addicks, K., ... & Weber, M. (2003). Preemptive ramipril therapy delays renal failure and reduces renal fibrosis in COL4A3-knockout mice with Alport syndrome. *Kidney international*, 63(2), 438-446.

Zhang, L., Luo, X., Chen, F., Yuan, W., Xiao, X., Zhang, X., ... & Liu, Y. (2018). LncRNA SNHG1 regulates cerebrovascular pathologies as a competing endogenous RNA through HIF-1 α /VEGF signaling in ischemic stroke. *Journal of cellular biochemistry*, 119(7), 5460-5472.

Cesana, M., Cacchiarelli, D., Legnini, I., Santini, T., Sthandier, O., Chinappi, M., ... & Bozzoni, I. (2011). A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA. *Cell*, 147(2), 358-369.

Gu, S., Li, G., Zhang, X., Yan, J., Gao, J., An, X., ... & Su, P. (2015). Aberrant expression of long noncoding RNAs in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Molecular medicine reports*, 11(4), 2631-2643.

Jiang, X., & Ning, Q. (2020). Long noncoding RNAs as novel players in the pathogenesis of hypertension. *Hypertension Research*, 1-12.

Zhang, X., Nie, X., Yuan, S., Li, H., Fan, J., Li, C., ... & Chen, C. (2019). Circulating long non-coding RNA ENST00000507296 is a prognostic indicator in patients with dilated cardiomyopathy. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 16, 82-90.

Rekker, K., Saare, M., Roost, A. M., Kubo, A. L., Zarovni, N., Chiesi, A., ... & Peters, M. (2014). Comparison of serum exosome isolation methods for microRNA profiling. *Clinical biochemistry*, 47(1-2), 135-138.

Tzimas, C., Rau, C. D., Buergisser, P. E., Jean-Louis Jr, G., Lee, K., Chukwunke, J., ... & Tsai, E. J. (2019). WIPI1 is a conserved mediator of right ventricular failure. *JCI insight*, 4(11).

Ikawa, T., Watanabe, Y., Okuzaki, D., Goto, N., Okamura, N., Yamanishi, K., ... & Higashino, H. (2019). A new approach to identifying hypertension-associated genes in

the mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats and stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Journal of hypertension*, 37(8), 1644.

Conen, D., Cheng, S., Steiner, L. L., Buring, J. E., Ridker, P. M., & Zee, R. Y. (2009). Association of 77 polymorphisms in 52 candidate genes with blood pressure progression and incident hypertension: the Women's Genome Health Study. *Journal of hypertension*, 27(3), 476.

Marques, F. Z., Campain, A. E., Yang, Y. H. J., & Morris, B. J. (2010). Meta-analysis of genome-wide gene expression differences in onset and maintenance phases of genetic hypertension. *Hypertension*, 56(2), 319-324.

Somanna, N. K., Yariswamy, M., Garagliano, J. M., Siebenlist, U., Mummidi, S., Valente, A. J., & Chandrasekar, B. (2015). Aldosterone-induced cardiomyocyte growth, and fibroblast migration and proliferation are mediated by TRAF3IP2. *Cellular signalling*, 27(10), 1928-1938.

Wang, J., Gong, L., Tan, Y., Hui, R., & Wang, Y. (2015). Hypertensive epigenetics: from DNA methylation to microRNAs. *Journal of human hypertension*, 29(10), 575-582.

Vendrov, A. E., Madamanchi, N. R., Hakim, Z. S., Rojas, M., & Runge, M. S. (2006). Thrombin and NAD (P) H oxidase-mediated regulation of CD44 and BMP4-id pathway in VSMC, restenosis, and atherosclerosis. *Circulation research*, 98(10), 1254-1263.

Wu, K., Zhao, Q., Li, Z., Li, N., Xiao, Q., Li, X., & Zhao, Q. (2018). Bioinformatic screening for key miRNAs and genes associated with myocardial infarction. *FEBS open bio*, 8(6), 897-913.

Jiang, X., & Ning, Q. (2020). Long noncoding RNAs as novel players in the pathogenesis of hypertension. *Hypertension Research*, 1-12.

Sekar, D., Nallaswamy, D., & Lakshmanan, G. (2020). Decoding the functional role of long noncoding RNAs (lncRNAs) in hypertension progression. *Hypertension Research*, 1-2.

Chen, E. Y., Tan, C. M., Kou, Y., Duan, Q., Wang, Z., Meirelles, G. V., ... & Ma'ayan, A. (2013). Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC bioinformatics*, 14(1), 128.

Amaral, P. P., Leonardi, T., Han, N., Viré, E., Gascoigne, D. K., Arias-Carrasco, R., ... & Maracaja-Coutinho, V. (2018). Genomic positional conservation identifies topological anchor point RNAs linked to developmental loci. *Genome biology*, 19(1), 32.

de Lima, D. S., Cardozo, L. E., Maracaja-Coutinho, V., Suhrbier, A., Mane, K., Jeffries, D., ... & Nakaya, H. I. (2019). Long noncoding RNAs are involved in multiple immunological pathways in response to vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(34), 17121-17126.

Hattori, H., Hiura, H., Kitamura, A., Miyauchi, N., Kobayashi, N., Takahashi, S., ... & Arima, T. (2019). Association of four imprinting disorders and ART. *Clinical epigenetics*, *11*(1), 21.

He, W., Wei, D., Cai, D., Chen, S., Li, S., & Chen, W. (2018). Altered long non-coding RNA Transcriptomic profiles in ischemic stroke. *Human gene therapy*, *29*(6), 719-732.

Yan, S. M., Li, H., Shu, Q., Wu, W. J., Luo, X. M., & Lu, L. (2019). LncRNA SNHG1 exerts a protective role in cardiomyocytes hypertrophy via targeting miR-15a-5p/HMGA1 axis. *Cell Biology International*.

Ceriello, A., & Motz, E. (2004). Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, *24*(5), 816-823.

Rosen, E. D., Walkey, C. J., Puigserver, P., & Spiegelman, B. M. (2000). Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes & development*, *14*(11), 1293-1307.

Storjord, E., Hennø, L. T., Mollnes, T. E., & Brekke, O. L. (2020). Analysis of cytokines. *Tidsskrift for Den norske legeforening*.

Harrington, D., Hytopoulos, E., & Phelps, B. (2011). *U.S. Patent Application No. 12/964,719*.

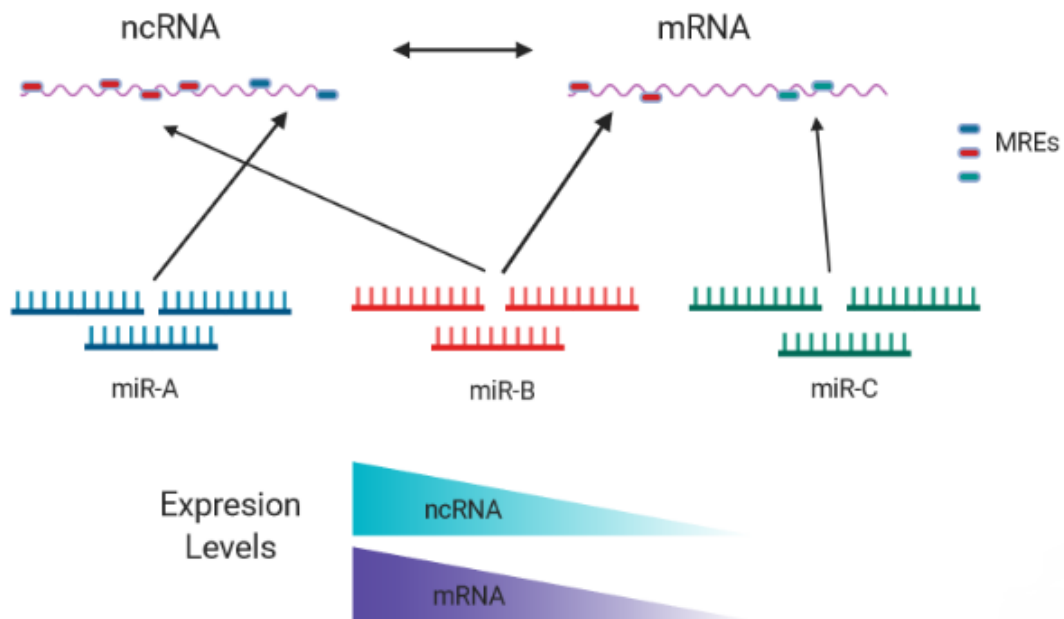
Solayman, M. H. M., Langaee, T., Patel, A., El-Wakeel, L., El-Hamamsy, M., Badary, O., & Johnson, J. A. (2016). Identification of suitable endogenous normalizers for qRT-PCR analysis of plasma microRNA expression in essential hypertension. *Molecular biotechnology*, *58*(3), 179-187.

Loyer, X., Zlatanova, I., Devue, C., Yin, M., Howangyin, K. Y., Klaihmon, P., ... & Fleischmann, B. K. (2018). Intra-cardiac release of extracellular vesicles shapes inflammation following myocardial infarction. *Circulation research*, *123*(1), 100-106.

Ceriello, A., & Motz, E. (2004). Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, *24*(5), 816-823.

Rosen, E. D., Walkey, C. J., Puigserver, P., & Spiegelman, B. M. (2000). Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes & development*, *14*(11), 1293-1307.

9. Anexo



Anexo 1. Representación esquemática de la regulación génica mediada por los ceRNAs. (adaptación de Subramanian, 2014)

Anexo 2. Tabla de selección de estudios. En donde la columna ID corresponde al código de almacenado en NCBI, la columna título corresponde al nombre de la publicación, y la columna autor corresponde a la cita del autor correspondiente del estudio.

ID	Título	Autor
GSE75670	Racial differences in microRNA and gene expression in hypertensive women	Dluzen et al., 2016.
GSE118578	Screening of differentially expressed microRNAs of essential hypertension in Uyghur Population	Ye et al., 2019.
GSE112093	Expression data of different types of OSAHS patients	Yang et al., 2018.
GSE75360	Racial differences in microRNA and gene expression in hypertensive women (mRNA)	Dluzen et al., 2016.
PRJNA480270	Argininosuccinate lyase deficiency causes an endothelial-dependent form of hypertension	Kho et al., 2018.

Anexo 3.- Tabla de contrastes de *vote-counting* MetaVolcanoR con los miRNAs up-regulated y down-regulated. La columna gene corresponde a el nombre del miRNA, las columnas de deg_1 hasta deg_3 corresponden a los estudios analizados, ndeg a la cantidad de estudios en que está presente el miRNA expresado diferencialmente, ddeg corresponde a la sumatoria de la ausencia o presencia de los estudios, los valores positivos corresponden a si el miRNA se encuentra up-regulated y negativo down-regulated, idx corresponde a la sumatoria de ndeg y ddeg para el cálculo de identidad, degvcount corresponde a un resumen del miRNA si se encuentra up-regulated o down-regulated

gene	deg_1	deg_2	deg_3	ndeg	ddeg	idx	degvcount
hsa-let-7b-3p	0	-1	-1	2	-2	-4	0.Down-regulated
hsa-miR-106b-5p	0	-1	-1	2	-2	-4	0.Down-regulated
hsa-miR-1229-3p	NA	-1	-1	2	-2	-4	0.Down-regulated
hsa-miR-1255b-2-3p	NA	-1	-1	2	-2	-4	0.Down-regulated
hsa-miR-129-2-3p	0	-1	-1	2	-2	-4	0.Down-regulated
hsa-miR-138-1-3p	0	1	1	2	2	4	2.Up-regulated
hsa-miR-1470	NA	-1	-1	2	-2	-4	0.Down-regulated
hsa-miR-15a-3p	0	-1	-1	2	-2	-4	0.Down-regulated
hsa-miR-191-5p	0	-1	-1	2	-2	-4	0.Down-regulated
hsa-miR-30d-5p	0	-1	-1	2	-2	-4	0.Down-regulated
hsa-miR-3131	NA	1	1	2	2	4	2.Up-regulated
hsa-miR-3156-3p	NA	-1	-1	2	-2	-4	0.Down-regulated
hsa-miR-3158-5p	NA	1	1	2	2	4	2.Up-regulated
hsa-miR-3166	NA	-1	-1	2	-2	-4	0.Down-regulated
hsa-miR-34c-3p	1	1	0	2	2	4	2.Up-regulated
hsa-miR-4290	NA	-1	-1	2	-2	-4	0.Down-regulated

hsa-miR-4313	NA	-1	-1	2	-2	-4	0.Down-regulated
hsa-miR-4323	NA	-1	-1	2	-2	-4	0.Down-regulated
hsa-miR-4466	NA	1	1	2	2	4	2.Up-regulated
hsa-miR-4668-5p	NA	-1	-1	2	-2	-4	0.Down-regulated
hsa-miR-4697-3p	NA	-1	-1	2	-2	-4	0.Down-regulated
hsa-miR-4699-3p	NA	-1	-1	2	-2	-4	0.Down-regulated
hsa-miR-4714-5p	NA	-1	-1	2	-2	-4	0.Down-regulated
hsa-miR-4720-3p	NA	-1	-1	2	-2	-4	0.Down-regulated
hsa-miR-4722-3p	NA	-1	-1	2	-2	-4	0.Down-regulated
hsa-miR-4763-5p	NA	-1	-1	2	-2	-4	0.Down-regulated
hsa-miR-4764-3p	NA	-1	-1	2	-2	-4	0.Down-regulated
hsa-miR-483-3p	NA	-1	-1	2	-2	-4	0.Down-regulated
hsa-miR-5087	NA	-1	-1	2	-2	-4	0.Down-regulated
hsa-miR-518b	NA	-1	-1	2	-2	-4	0.Down-regulated
hsa-miR-5587-5p	NA	1	1	2	2	4	2.Up-regulated
hsa-miR-563	NA	-1	-1	2	-2	-4	0.Down-regulated
hsa-miR-662	NA	-1	-1	2	-2	-4	0.Down-regulated
hsa-miR-765	NA	1	1	2	2	4	2.Up-regulated
hsa-miR-921	NA	1	1	2	2	4	2.Up-regulated
hsa-miR-92a-3p	0	-1	-1	2	-2	-4	0.Down-regulated
hsa-miR-96-5p	0	-1	-1	2	-2	-4	0.Down-regulated

hsa-miR-99b-5p	1	0	1	2	2	4	2.Up-regulated
----------------	---	---	---	---	---	---	----------------

Anexo 4. Tabla de contrastes de *combinig* MetaVolcanoR con los miRNAs up-regulated y down-regulated. la columna gene corresponde al nombre del miRNA, metap corresponde al valor promedio del miRNA en los distintos estudios, metafc corresponde al fold change promedio en los distintos estudios por miRNA.

gene	metap	metafc	idx
hsa-miR-483-3p	4,61E-06	-1,29069412561091	-6,88693019516653
hsa-miR-4323	3,00E-05	-1,36114333215332	-6,1561748197595
hsa-miR-4649-3p	2,58E-05	-1,3006000579835	-5,96672279510488
hsa-miR-4646-3p	4,38E-06	-1,07398980096788	-5,7546545614344
hsa-miR-4327	6,27E-05	1,32849580600426	5,58320420956633
hsa-miR-4769-3p	5,09E-05	-1,26517344818376	-5,43163896405466
hsa-miR-3180-5p	1,34E-05	-1,08884905506083	-5,30419677790434
hsa-miR-1281	1,18E-05	-1,01591874549427	-5,00805568740817
hsa-miR-4290	0,000129630414121	-1,24555956663374	-4,84185509849851
hsa-miR-3945	2,65E-05	1,03783118271008	4,75005607125425
hsa-miR-4466	0,000107739333938	1,16402874688723	4,61843038758916
hsa-miR-1207-5p	6,18E-06	0,785681411001158	4,09245690092351
hsa-miR-3158-5p	9,77E-05	0,990932993155714	3,9737718890888
hsa-miR-1260a	0,006842806700687	-1,75616970382477	-3,80169598742046
hsa-miR-3162-3p	1,29E-05	-0,771538685949288	-3,77314209088246
hsa-miR-3960	0,000846722334841	1,1837337362941	3,63673660629881
hsa-miR-4723-3p	4,52E-05	-0,783714548820284	-3,40480103701551

hsa-miR-150-3p	1,36E-05	0,694961057252925	3,38185494319459
hsa-miR-5587-5p	1,49E-05	0,696098617194129	3,36033438034936
hsa-miR-1825	2,53E-05	-0,730403269449326	-3,35784562769347
hsa-miR-4741	9,41E-06	0,628522926545445	3,15917843454833
hsa-miR-4739	6,04E-05	0,709824975889003	2,99464017429769
hsa-miR-3141	7,83E-05	0,702669097608217	2,88544479371184
hsa-miR-3682-3p	7,67E-05	0,695572502059965	2,86260753065251
hsa-miR-3131	0,000496063837563	0,793677812286321	2,62267851328613
hsa-miR-1224-3p	6,52E-05	-0,61270506865777	-2,56449221728264
hsa-miR-22-3p	0,000326934010378	-0,730380417955956	-2,54577008762608
hsa-miR-1225-5p	0,000106062063606	0,63641341195701	2,52938687471725
hsa-miR-483-5p	9,85E-05	0,630052475789076	2,52444031154598
hsa-miR-1273g-3p	0,001389950075222	-0,87929914451313	-2,51215835810615
hsa-miR-4472	0,000740979808877	0,789609450517031	2,47163046907404
hsa-miR-4436b-5p	3,56E-05	-0,545784438400674	-2,42814524010498
hsa-miR-936	0,000196367119987	0,643454506716812	2,38524160564549
hsa-miR-1470	5,88E-05	-0,56247764388722	-2,37978245252583
hsa-miR-4313	2,11E-05	-0,508301867057365	-2,3763274613523
hsa-miR-92b-3p	0,000189798058852	-0,612804135058819	-2,28067819503589
hsa-miR-1224-5p	0,000227601667546	0,62081485194668	2,26151959011019
hsa-miR-4632-3p	0,006717606550738	-1,03123247013716	-2,24064689256983

hsa-miR-4476	0,003993235782766	0,927712184126906	2,22528006583892
hsa-miR-4728-3p	0,000463570534333	-0,658006356123503	-2,19371697880984
hsa-miR-4701-5p	6,15E-05	-0,509524260649483	-2,14551209450996
hsa-miR-4783-3p	6,75E-05	0,513631722389988	2,14227490349561
hsa-miR-5009-3p	0,00302310078058	0,845832977975834	2,1311162589939
hsa-miR-4800-5p	0,000325329676611	0,606324061772945	2,11466207159298
hsa-miR-4714-5p	6,15E-05	-0,501058212620478	-2,11007273894026
hsa-miR-4755-3p	0,00073573993688	0,647650430046986	2,02926733466007
hsa-miR-1185-2-3p	0,000158675851476	0,523092062117563	1,98748262101923
hsa-miR-4286	0,008709932449513	-0,952738411015078	-1,96262703872001
hsa-miR-4687-3p	0,002557814709376	0,753109357034997	1,95215805008934
hsa-miR-551a	0,025647589240522	-1,22701528773101	-1,95212420569225
hsa-miR-652-5p	0,001980388813688	0,711293658835111	1,92280425282503
hsa-miR-33b-3p	0,000552714922313	-0,58092867348956	-1,89237446263772
hsa-miR-3156-3p	0,004953978600103	-0,809808776810045	-1,86664637954098
hsa-miR-4417	0,001302156628156	0,6433794299383	1,85636632889992
hsa-miR-134-5p	0,000571833337462	0,56799170751692	1,8418440502931
hsa-miR-3198	0,000782736981945	0,591670834513212	1,83795690033746
hsa-miR-4430	0,000782828314025	0,587668918797763	1,82549563455149
hsa-miR-4763-5p	0,000617094418151	-0,568378620947478	-1,82429552104395
hsa-miR-5585-3p	0,002689371767584	0,707728258319752	1,81910873326218

hsa-miR-4793-5p	0,000294001915025	0,501930000328574	1,77264100572182
hsa-miR-4746-3p	0,000886817482558	0,564200196439928	1,72203251790118
hsa-miR-664a-3p	0,010132030880808	-0,84717712229334	-1,68952829605954
hsa-miR-939-5p	0,000709561527676	0,534999401815006	1,6847184341681
hsa-miR-4267	0,001875091706628	0,607886940403685	1,65769400113741
hsa-miR-921	0,000725100281217	0,525897586754497	1,65110907648414
hsa-miR-4499	0,002330542991959	0,621604959936827	1,63640171216714
hsa-miR-1226-5p	0,001645041275717	0,587524697257921	1,63556488320967
hsa-miR-92a-3p	0,002267482803515	-0,615808467201986	-1,62847839466511
hsa-miR-5195-3p	0,00129888302538	0,553132506299142	1,59657823736552
hsa-miR-3667-5p	0,000733507644282	0,503076178003938	1,57694025117365
hsa-miR-371b-3p	0,041281473323772	-1,1202121699108	-1,55064788370994
hsa-miR-4270	0,002169241402456	0,579120378420907	1,54259838572243
hsa-miR-106b-5p	0,001697261585837	-0,551339950947709	-1,52735017068074
hsa-miR-3911	0,002735596126097	0,583056825688469	1,49434433691489
hsa-miR-575	0,012039559590545	0,765787130885944	1,46984370119271
hsa-miR-3622a-3p	0,013444444694872	-0,782533847333015	-1,46447854886633
hsa-miR-4279	0,043328933854341	-1,04939007999509	-1,43055164050721
hsa-miR-4633-3p	0,004990852792875	0,610722462708681	1,40577637907057
hsa-miR-940	0,002069895086243	-0,517405535304663	-1,3887431892582
hsa-miR-1976	0,011797109619848	-0,715447599318692	-1,37954350723856

hsa-miR-4707-3p	0,002452158098112	0,52476848252231	1,36988268964997
hsa-miR-3194-5p	0,008472158375463	0,659296400132034	1,36606605352352
hsa-miR-4763-3p	0,009014902228478	0,66590715293709	1,36180608420195
hsa-miR-4467	0,010301720053545	0,676402375413741	1,34407256940791
hsa-miR-650	0,002506040365227	0,507454579506514	1,31989541930392
hsa-miR-197-3p	0,008922498787795	-0,638035410905413	-1,30766218964419
hsa-miR-4700-3p	0,006518977609063	-0,594567548588388	-1,2996179426667
hsa-miR-4634	0,010385146851142	0,626073908762167	1,24187229056014
hsa-miR-197-5p	0,021357816725103	-0,731005795187881	-1,22110361920541
hsa-miR-5196-3p	0,004993287841369	-0,521803351412781	-1,20098958474945
hsa-miR-4429	0,008436130892696	0,547328088640587	1,13508001851824
hsa-miR-518b	0,008528090330076	-0,548290141667043	-1,13449356421413
hsa-miR-4442	0,0146905191174	0,608133443412603	1,11468601406824
hsa-miR-642a-5p	0,012218437727881	-0,563250069270254	-1,07748855088921
hsa-miR-193a-5p	0,016675581310733	-0,5749927752473	-1,02229059011933
hsa-miR-4505	0,010534275932226	0,510276971917438	1,00901929108432
hsa-miR-3648	0,031106040071545	0,663312690013659	0,999715218314854
hsa-miR-4687-5p	0,035801972130884	-0,668150204850431	-0,966207367481638
hsa-miR-3679-5p	0,013313257596259	0,507320778066307	0,951589530503816
hsa-miR-624-5p	0,036745024407722	0,65639602566886	0,941797975840557
hsa-miR-4268	0,022606273412952	-0,54310399132194	-0,893824811991958

hsa-miR-4516	0,040700821308428	0,626854328054847	0,871576268711191
hsa-miR-574-5p	0,044781652094353	-0,605958341236267	-0,817377138854036
hsa-miR-4281	0,030350588613171	0,526127534678718	0,798573672201915
hsa-miR-762	0,037905842086978	0,505464676189496	0,718413836148495

Anexo 5. Tabla de competing endogenous RNAs. La columna Gen ID corresponde al código del gen en Ensembl, miRNA corresponde al nombre del miRNA, Validación interacción Gen - miRNA corresponde a si la interacción entre el gen y mirna si se encuentra validada o predicha, lncRNA corresponde al codigo de ensembl del lncRNA y Validación interacción lncRNA - miRNA corresponde si la interacción entre lncRNA y miRNA se encuentra validada o predicha.

Gen ID	miRNA	Validacion interacción Gen - miRNA	lncRNA	Validacion interacción lncRNA - miRNA
ENSG00000001629	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000001629	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000224032	validated
ENSG00000001629	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000001629	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000224032	validated
ENSG00000001629	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000001629	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000224032	validated
ENSG00000001629	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000001629	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000224032	validated
ENSG00000001629	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000001629	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000224032	validated
ENSG00000068366	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000255717	validated

ENSG00000068366	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000224032	validated
ENSG00000068366	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000068366	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000224032	validated
ENSG00000068366	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000068366	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000224032	validated
ENSG00000068366	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000068366	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000224032	validated
ENSG00000070540	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000070540	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000224032	validated
ENSG00000084234	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000084234	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000224032	validated
ENSG00000093144	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000093144	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000224032	validated
ENSG00000110075	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000110075	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000224032	validated
ENSG00000110422	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000110422	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000224032	validated
ENSG00000110422	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000110422	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000224032	validated

ENSG00000117859	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000117859	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000224032	validated
ENSG00000119318	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000119318	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000224032	validated
ENSG00000135108	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000135108	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000224032	validated
ENSG00000137075	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000137075	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000224032	validated
ENSG00000137075	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000137075	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000224032	validated
ENSG00000137177	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000137177	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000224032	validated
ENSG00000138107	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000138107	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000224032	validated
ENSG00000139289	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000139289	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000224032	validated
ENSG00000149573	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000149573	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000224032	validated
ENSG00000161011	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000255717	validated

ENSG00000163513	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000163513	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000224032	validated
ENSG00000173166	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000173166	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000224032	validated
ENSG00000174059	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000174059	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000224032	validated
ENSG00000181163	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000181163	hsa-miR-106b-5p	validated	ENSG00000224032	validated
ENSG00000001629	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000203875	validated
ENSG00000001629	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000228794	validated
ENSG00000001629	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000068366	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000203875	validated
ENSG00000068366	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000228794	validated
ENSG00000068366	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000084234	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000203875	validated
ENSG00000084234	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000228794	validated
ENSG00000084234	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000084234	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000203875	validated
ENSG00000084234	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000228794	validated

ENSG00000084234	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000088387	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000203875	validated
ENSG00000088387	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000228794	validated
ENSG00000088387	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000088387	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000203875	validated
ENSG00000088387	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000228794	validated
ENSG00000088387	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000089818	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000203875	validated
ENSG00000089818	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000228794	validated
ENSG00000089818	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000089818	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000203875	validated
ENSG00000089818	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000228794	validated
ENSG00000089818	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000089818	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000203875	validated
ENSG00000089818	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000228794	validated
ENSG00000089818	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000089818	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000203875	validated
ENSG00000089818	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000228794	validated
ENSG00000089818	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000089818	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000203875	validated
ENSG00000089818	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000228794	validated
ENSG00000089818	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000255717	validated

ENSG00000101868	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000203875	validated
ENSG00000101868	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000228794	validated
ENSG00000101868	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000110422	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000203875	validated
ENSG00000110422	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000228794	validated
ENSG00000110422	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000110422	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000203875	validated
ENSG00000110422	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000228794	validated
ENSG00000110422	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000110422	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000203875	validated
ENSG00000110422	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000228794	validated
ENSG00000110422	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000110422	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000203875	validated
ENSG00000110422	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000228794	validated
ENSG00000110422	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000110422	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000203875	validated
ENSG00000110422	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000228794	validated
ENSG00000110422	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000110422	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000203875	validated
ENSG00000110422	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000228794	validated
ENSG00000110422	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000110422	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000203875	validated

ENSG00000110422	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000228794	validated
ENSG00000110422	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000110422	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000203875	validated
ENSG00000110422	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000228794	validated
ENSG00000110422	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000110422	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000203875	validated
ENSG00000110422	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000228794	validated
ENSG00000110422	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000118523	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000203875	validated
ENSG00000118523	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000228794	validated
ENSG00000118523	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000119318	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000203875	validated
ENSG00000119318	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000228794	validated
ENSG00000119318	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000128641	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000203875	validated
ENSG00000128641	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000228794	validated
ENSG00000128641	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000135046	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000203875	validated
ENSG00000135046	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000228794	validated

ENSG00000135046	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000137075	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000203875	validated
ENSG00000137075	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000228794	validated
ENSG00000137075	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000137075	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000203875	validated
ENSG00000137075	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000228794	validated
ENSG00000137075	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000137075	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000203875	validated
ENSG00000137075	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000228794	validated
ENSG00000137075	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000139636	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000203875	validated
ENSG00000139636	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000228794	validated
ENSG00000139636	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000139636	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000203875	validated
ENSG00000139636	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000228794	validated
ENSG00000139636	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000139636	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000203875	validated
ENSG00000139636	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000228794	validated
ENSG00000139636	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000255717	validated

ENSG00000139636	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000203875	validated
ENSG00000139636	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000228794	validated
ENSG00000139636	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000139636	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000203875	validated
ENSG00000139636	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000228794	validated
ENSG00000139636	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000139636	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000203875	validated
ENSG00000139636	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000228794	validated
ENSG00000139636	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000148248	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000203875	validated
ENSG00000148248	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000228794	validated
ENSG00000148248	hsa-miR-92a-3p	validated	ENSG00000255717	validated
ENSG00000068366	hsa-miR-921	validated	ENSG00000255717	validated

Anexo 6. Valores de expresión de mRNAs - miRNAs - lncRNAs separados por cada mRNA específico en tasas de cambio en logaritmo en base dos para los mRNAs (azul), lncRNAs (rojos) y miRNA (verde).

