



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DE LOS MICRORNAS EN LA REGULACIÓN
TRANSCRIPCIONAL DEL MÚSCULO LISO VASCULAR EN EL PROCESO
PATOLÓGICO DE LA ATROSCLEROSIS, MEDIANTE UN MODELO *IN VITRO***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

GERMAN GUTIÉRREZ CAMPOS



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** **Carmen Adriana Mendoza Rodríguez**

VOCAL: **Profesor:** **Samuel Canizales Quinteros**

SECRETARIO: **Profesor:** **Juan Pablo Reyes Grajeda**

1er. SUPLENTE: **Profesor:** **Nancy Monroy Jaramillo**

2° SUPLENTE: **Profesor:** **Tzvetanka Dimitrova Dinkova**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Juan Pablo Reyes Grajeda _____

SUSTENTANTE:

German Gutiérrez Campos _____

1.0 RESUMEN.....	pag 1
2.0 INTRODUCCIÓN.....	pag 3
2.1 Generalidades.....	pag 3
2.2 Fisiología vascular.....	pag 4
2.3 Fisiopatología de la aterosclerosis.....	pag 6
2.4 Células de músculo liso vascular: características.....	pag 10
2.5 MicroRNA.....	pag 13
2.6 Biogénesis de los microRNAs.....	pag14
2.7 Mecanismo de acción de los microRNAs.....	pag 17
2.8 Regulación de los microRNAs.....	pag17
2.9 Los microRNAs y las VSMC.....	pag 19
3.0 JUSTIFICACIÓN.....	pag 21
4.0 HIPÓTESIS.....	pag 21
5.0 OBJETIVOS.....	pag 22
5.1 Objetivos generales.....	pag 22
5.2 Objetivos específicos.....	pag 22
6.0 METODOLOGÍA.....	pag 22
6.1 Resumen del procedimiento seguido.....	pag 22
6.2 Cultivo celular.....	pag 23
6.3 Preparación y oxidación de las lipoproteínas de baja densidad.....	pag 24
6.4 Diseño experimental para la internalización de las lipoproteínas de baja densidad.....	pag 24
6.5 Extracción de RNA total.....	pag 25
6.6 Integridad del RNA total.....	pag 26
6.7 Análisis de expresión de los datos obtenidos en el microarreglo de expresión	pag 27

6.8 Análisis de expresión de los microRNAs asociados con los datos de expresión de mRNA	pag 28
6.8.1 Análisis de expresión en el programa Ingenuity Pathway Analysis (IPA).....	pag 28
6.8.2 Análisis de expresión en el programa Partek Pathway.....	pag 29
6.8.3 Análisis de expresión en el programa Cytoscape.....	pag 30
6.9 Validación del microarreglo de expresión.....	pag 30
6.9.1 Retrotranscripción de los microRNAs.....	pag 30
6.9.2 PCR en tiempo real.....	pag 31
7.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	pag 33
7.1 Integridad del RNA de las muestras.....	pag 33
7.2 Análisis de expresión de los datos obtenidos en el microarreglo de expresión	pag 34
7.3 Análisis de expresión de los microRNAs asociados con los datos de expresión de mRNA obtenidos en el microarreglo de expresión.....	pag 40
7.4 Validación del microarreglo de expresión	pag 59
8.0 CONCLUSIONES.....	pag 63
9.0 PERSPECTIVAS.....	pag 64
10.0 REFERENCIAS.....	pag 64
11.0 APÉNDICE.....	pag 71
11.1 Línea celular T/G HA-VSMC (ATCC® CRL-1999™).....	pag 71
11.2 Medio F-12K Nutrient mixture (Kaighn´s modification) (GIBCO® 21127-022).....	pag 72
11.3 GeneChip® miRNA 3.0 Array (Affymetrix).....	pag 73
11.4 GeneChip® Human Gene 1.0 ST Array (Affymetrix).....	pag 73
11.5 Cálculo de la expresión relativa por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$	pag 74

1.0 Esquema de las estructuras de diversos tipos de vasos sanguíneos	pag 5
2.0 Diagrama de la progresión de la lesión endotelial en la aterosclerosis.....	pag 9
3.0 Reacción de las VSMCs a un estímulo extracelular e intracelular.....	pag 12
4.0 Procesamiento de los microRNAs por medio de la vía canónica “linear”	pag 15
5.0 Diagrama esquemático de los blancos de los microRNAs identificados en las VSMCs	pag 20
6.0 Diagrama de flujo de la metodología de la obtención y del análisis de datos.....	pag 23
7.0 Diseño experimental de la internalización de las LDLs nativas y oxidadas.....	pag 25
8.0 Ejemplos de los resultados obtenidos en el bioanalizador.....	pag 33
9.0 Diagrama de Venn-Euler de las condiciones nativas de los microRNAs presentes	pag 34
10.0 Diagrama de Venn-Euler de las condiciones oxidadas de los microRNAs presentes	pag 35
11.0 Diagrama de Venn-Euler de los microRNAs compartidos tanto en las condiciones nativas como oxidadas	pag 36
12.0 Diagrama con los microRNAs a la alza o a la baja en las condiciones nativas	pag 37
13.0 Diagrama con los microRNAs a la alza o a la baja en las condiciones oxidadas	pag 37
14.0 Clúster jerárquico de los microRNAs a la alza o a la baja.....	pag 39
15.0 Diagrama de la relación de los microRNAs con el mRNA en las condiciones nativas con 1h de tratamiento.....	pag 40
16.0 Diagrama de la relación de los microRNAs con el mRNA en las condiciones nativas con 5h de tratamiento.....	pag 42
17.0 Diagrama de la relación de los microRNAs con el mRNA en las condiciones nativas con 24h de tratamiento.....	pag 44

18.0 Diagrama de la relación de los microRNAs con el mRNA en las condiciones oxidadas con 1h de tratamiento.....	pag 46
19.0 Diagrama de la relación de los microRNAs con el mRNA en las condiciones oxidadas con 5h de tratamiento.....	pag 49
20.0 Vía de señalización Wnt con los mRNA al alza o a la baja en las condiciones con tratamiento con LDL oxidadas a las 5h.....	pag 51
21.0 Diagrama de la relación del miR-30e con los mRNA en las condiciones oxidadas con 5h de tratamiento.....	pag 52
22.0 Diagrama de la relación de los microRNAs con el mRNA en las condiciones oxidadas con 24h de tratamiento.....	pag 54
23.0 Diagrama de la relación del miR-217 con los mRNA en las condiciones oxidadas con 24h de tratamiento.....	pag 55
24.0 Vías de endocitosis con los mRNA al alza o a la baja en las condiciones con tratamiento con LDL oxidadas a las 24h.....	pag 57
25.0 Red de genes asociados a los microRNAs para las condiciones tanto nativas como oxidadas.....	pag 58
26.0 Validación por PCR en tiempo real del miR-155.....	pag 59
27.0 Validación por PCR en tiempo real del miR-1972.....	pag 60
28.0 Validación por PCR en tiempo real del miR-27a.....	pag 60
29.0 Validación por PCR en tiempo real del miR-30e.....	pag 61
30.0 Validación por PCR en tiempo real del miR-217.....	pag 62
31.0 Validación por PCR en tiempo real del miR-1290.....	pag 62
32.0 Imagen al microscopio de las VSMC.....	pag 71

1.0 Valor de score de las funciones de redes asociadas en las condiciones nativas con 1h de tratamiento.....	pag 41
2.0 Valor de score de las funciones de redes asociadas en las condiciones nativas con 5h de tratamiento.....	pag 43
3.0 Vías metabólicas con mayor enrichment score en las condiciones nativas con 5h de tratamiento.....	pag 44
4.0 Valor de score de las funciones de redes asociadas en las condiciones nativas con 24h de tratamiento.....	pag 45
5.0 Vías metabólicas con mayor enrichment score en las condiciones oxidadas con 1h de tratamiento.....	pag 47
6.0 Valor de score de las funciones de redes asociadas en las condiciones oxidadas con 1h de tratamiento.....	pag 48
7.0 Vías metabólicas con mayor enrichment score en las condiciones oxidadas con 5h de tratamiento.....	pag 50
8.0 Vías metabólicas con mayor enrichment score en las condiciones oxidadas con 24h de tratamiento.....	pag 56



TESIS

ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DE LOS MICRORNAs EN LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL MÚSCULO LISO VASCULAR EN EL PROCESO PATOLÓGICO DE LA ATROSCLEROSIS, MEDIANTE UN MODELO *IN VITRO*.

1.0 RESUMEN

Durante las últimas décadas, la mortalidad por enfermedades del corazón ha mostrado un incremento constante, hasta llegar a constituirse en la primera causa de muerte en México. Entre las principales causas para el desarrollo de estas enfermedades se encuentra la aterosclerosis (NOM-037, 2012).

La aterosclerosis es una enfermedad progresiva caracterizada por la acumulación de lípidos y elementos fibrosos en las arterias de grueso y mediano calibre. La lesión temprana de la aterosclerosis consiste en la acumulación subendotelial de colesterol y macrófagos llegando a transformarse en células espumosas (Lusis, A. J., 2000).

Los microRNAs son una clase de ácido ribonucleico (RNA) no codificante, endógenos y pequeños que se pueden unir en el sitio de la región 3' no traducida de los RNA mensajeros y regular río abajo los genes codificantes de proteínas. Más importante, es que un microRNA puede regular la expresión de múltiples genes porque pueden unirse a su RNA mensajero blanco ya sea complementándose perfecta o imperfectamente. Los microRNA pueden regular directamente al menos un 30% de los genes en una célula.

Recientemente se ha conocido que los microRNAs participan en el control fenotípico de las células de músculo liso vascular. En este contexto, se han reportado nuevos descubrimientos sobre el papel fundamental de ciertos microRNAs en las células de músculo liso vascular (Zhang, C.; 2009), sin embargo se mantienen muchas interrogantes acerca de los mecanismos moleculares intrínsecos.

Con base en análisis de resultados obtenidos con microrreglos de expresión de los microRNA, se determinarán los microRNA con mayor posibilidad de estar implicados en la aterosclerosis.

Los microRNAs al alza con más alto fold change, fue el miR-27a en los tratamientos con LDL nativas y en las condiciones oxidadas fue el miR-155; mientras que el miR-1972 fue en ambas condiciones.

Los microRNAs a la baja con más bajo fold change fueron el miR-30e y el miR-1290 en las condiciones oxidadas, mientras que el miR-217 fue en ambas condiciones.

2.1 GENERALIDADES.

La aterosclerosis da lugar a enfermedades cerebrovasculares y enfermedades de la arteria coronaria a través de una lenta progresión, formando la lesión y estrechando el lumen de la arteria dañada. Una vez que ocurre la ruptura de la placa, da lugar a una trombosis, la cual es la manifestación más común de esta enfermedad cardiovascular, y con esto produce un síndrome coronario agudo e infarto al miocardio (Gerdes, N., 2013).

Las consecuencias de la aterosclerosis están agrupadas bajo el término común de “enfermedades cardiovasculares”, que se compone por las enfermedades coronarias, cerebrovasculares y otros desordenes de la circulación (Poole-Wilson, P. A.; 2007).

El tamaño del problema a nivel mundial es difícil de estimar. Puede ser que los datos más confiables son los obtenidos en los países desarrollados, ya que en muchas partes del mundo no se cuenta con suficiente capacidad institucional para obtener esta información de forma confiable (Poole-Wilson, P. A.; 2007).

En el año 2002, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que las muertes causadas por enfermedades cardiovasculares llegaron a 16.7 millones (lo que representa el 29% del total de las muertes reportadas en ese año). El mayor número de estas muertes fue en mujeres (52%). De estas defunciones, el 43% fue debido a una enfermedad arterio-coronario y 33% a una enfermedad cerebrovascular (Poole-Wilson, P. A.; 2007).

Durante las últimas décadas, la mortalidad por enfermedades cardiovasculares han mostrado un incremento constante, hasta llegar a constituirse en la primera causa de muerte en México (NOM-035, 2002). Según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) del año 2012, fue el segundo motivo de consulta de pacientes ambulatorios, con un 11.5 % (Romero-Martínez, M.; 2012)

Entre las principales causas para el desarrollo de estas enfermedades cardiovasculares, se encuentra la aterosclerosis, alteración que está estrechamente relacionada a las dislipidemias, cuyas presentaciones clínicas pueden ser: hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hipoalfalipoproteinemia e hiperlipidemia mixta (NOM-035, 2002).

2.2 FISIOLÓGIA VASCULAR

La arquitectura general celular de los vasos sanguíneos es la misma a lo largo de todo el sistema vascular. No obstante, presentan diferentes necesidades funcionales en distintas localizaciones dentro del árbol vascular dan lugar a múltiples formas de especialización vascular (Kummar,V. , 2008).

Las células endoteliales (CE) y las células de músculo liso vascular (VSMC) constituyen el grueso de la celularidad de los vasos; el resto de la pared del vaso está formada por matriz extracelular que incluye elastina, colágeno y glucosaminoglicanos. La paredes de los vasos se organizan en tres capas concéntricas: íntima, media y adventicia (Kummar,V. , 2008). La íntima consta de una sola capa células endoteliales que se continúa con las de los lechos capilares. La capa media o túnica media, consta de capas de VSMC; en las venas, está capa puede contener algunas estratificaciones de VSMC. La capa externa o adventicia, está formada por una matriz extracelular más laxa que tiene interpuestos fibroblastos, mastocitos y terminaciones nerviosas (Longo, D. L.; 2012).

Los vasos sanguíneos más pequeños, es decir, los capilares, constan de una sola capa de CE que se encuentran en yuxtaposición íntima con las células interpuestas similares a las VSMC y que se conocen como periocitos. El tono de las arteriolas musculares regula la presión arterial y el flujo a través de diversos lechos vasculares. Estas arterias más pequeñas tienen una túnica media relativamente gruesa con relación a la adventicia. Asimismo, las arterias musculares de tamaño mediano contienen una túnica media prominente. La aterosclerosis suele afectar a este tipo de arterias musculares. Las arterias elásticas de mayor tamaño tienen una túnica media mucho más estructurada que

consta de bandas concéntricas de VSMC interpuestas con matriz extracelular rica en elastina formando una doble pared entre las capas continuas de VSMC. Las arterias de mayor tamaño tienen una lámina elástica interna claramente delimitada que forma una barrera entre la íntima y la media. Una lámina elástica externa delimita la media de las arterias y la separa de la adventicia circundante (Longo, D. L.; 2012).

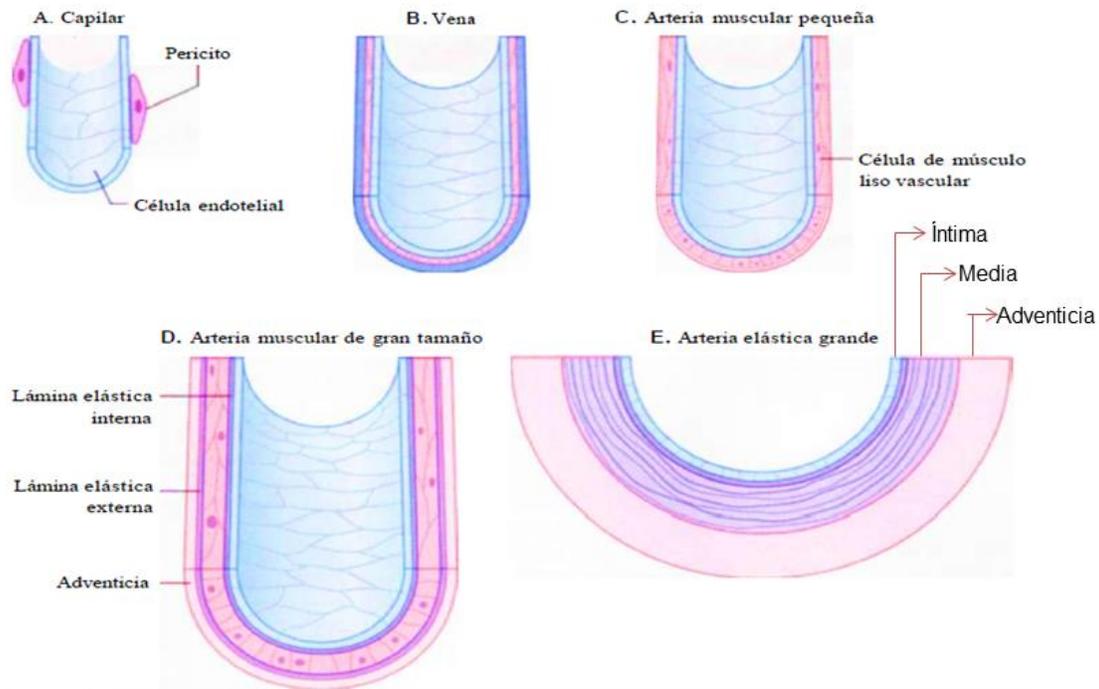


Figura 1. Esquema de las estructuras de diversos tipos de vasos sanguíneos. **A.** Los capilares constan de un tubo endotelial en contacto con una población discontinua de pericitos. **B.** Es típico que las venas tengan capas medias delgadas y adventicias más gruesas. **C.** Una arteria muscular pequeña consta de una túnica media prominente. **D.** Las arterias musculares de mayor tamaño tienen una capa media prominente con VSMC embebidas en una matriz extracelular compleja. **E.** Las arterias elásticas más grandes cuentan con capas circulares de tejido elástico que alternan con anillos concéntricos de VSMC. (Imagen modificada de Longo, D. L.; 2012).

2.3 FISIOPATOLOGÍA DE LA ATEROSCLEROSIS.

La aterosclerosis es una enfermedad progresiva caracterizada por la acumulación de lípidos y elementos fibrosos en las arterias de grueso y mediano calibre. La lesión temprana de la aterosclerosis consiste en la acumulación subendotelial de colesterol y macrófagos, llegando a transformarse en células espumosas (Lusis, A. J., 2000).

Se define a la aterosclerosis como una respuesta inflamatoria crónica de la pared arterial a la lesión endotelial. La inflamación es una respuesta fisiológica al trauma del tejido o infección, pero los leucocitos, que son las células efectoras de los procesos inflamatorios, tienen una amplia capacidad de remodelación del tejido. Por lo tanto, el paso de los leucocitos de la sangre hacia el tejido inflamado es fuertemente regulado para asegurar su localización precisa. El reclutamiento de los neutrófilos circulantes en el estroma del tejido, previo a un estímulo inicial de las quimiocinas, es esencial para el reclutamiento de los neutrófilos circulantes por las células endoteliales, son estimuladas por las quimiocinas inflamatorias (TNF- α), transitando a través de la monocapa endotelial que es regulada por un estímulo adicional (Dessi, M., 2013).

La aterogénesis es conducida por la combinación de la disrupción del equilibrio debida a la acumulación de lípidos y una inadaptación de la respuesta inmune. La enfermedad implica la inflamación crónica la pared de las arterias y una disrupción de las vías procoagulantes, el cual culmina con la ruptura de la placa y la aterotrombosis (Libby, P., 2002).

Modelos *in vivo* han demostrado a una molécula, particularmente, como un atractivo candidato para la adhesión temprana de los leucocitos mononucleares al endotelio arterial en el sitio de iniciación del ateroma. La molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1, por sus siglas en inglés) se une particularmente a monocitos y linfocitos T encontrados en ateromas naciente (Libby, P., 2002).

La progresión de la lesión se produce mediante las lesiones de las lipoproteínas modificadas, los macrófagos derivados de los monocitos, los linfocitos T y los

constituyentes celulares normales de la pared arterial. Los siguientes son dogmas fundamentales de la hipótesis de la progresión de la lesión:

- La lesión endotelial crónica resultante, produce (entre otras cosas) un aumento de la permeabilidad, adhesión de los leucocitos y trombosis.
- La acumulación de lipoproteínas (fundamentalmente lipoproteínas de baja densidad (LDL) y sus formas oxidadas) en la pared del vaso.
- La adhesión de los monocitos al endotelio, seguida de la migración en la íntima y de la transformación en macrófagos y células espumosas.
- La adhesión plaquetaria.
- La liberación del factor de las plaquetas, macrófagos y células activadas de la pared vascular, induciendo un reclutamiento VSMC, bien de la media o bien de los precursores circulantes.
- La proliferación de las VSMC y la producción de matriz extracelular.
- La acumulación lipídica, tanto extracelularmente como dentro de las células (macrófagos y VSMC).
- La acumulación de macrófagos llenos de lípidos en la íntima, da lugar a estrías grasas. Con una mayor evolución, se forma un ateroma fibrograso, el cual consiste en VSMC proliferadas, células espumosas, lípidos extracelulares y matriz extracelular (Kummar,V. , 2008).

Además de la selectividad de los leucocitos, otros factores de VCAM-1 lo hace un candidato interesante. Las células endoteliales expresan VCAM-1 en respuesta al colesterol selectivamente en áreas propensas a la formación de la lesión (Libby, P., 2002).

El mecanismo de la inducción temprana de VCAM-1 inicia después de una dieta aterogénica, probablemente esta inducción depende de la instigación de la inflamación por la acumulación en la íntima arterial de partículas modificadas de

lipoproteínas en respuesta a la hiperlipidemia. Los constituyentes de las partículas modificadas de lipoproteínas, entre ellos ciertos fosfolípidos oxidados y aldehídos de cadena corta que surgen de la oxidación de las lipoproteínas, pueden inducir una activación transcripcional del gen VCAM-1 mediado en parte por el factor nuclear κ B (NF- κ B, por su siglas en inglés). Las citosinas inflamatorias como interleucina (IL)- 1β o del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) induciendo la expresión de VCAM-1 en las células endoteliales (Libby, P., 2002).

Un nuevo paso en el proceso de reclutamiento de los neutrófilos es realizado por los lípidos mediante señalización regulada por la migración de los neutrófilos a través de las células endoteliales (Dessi, M., 2013).

Esta señal es reemplazada por el metabolismo de ácido araquidónico en el eicosanoide prostraglandina- D2 (PGD2) por la enzimas de cicloxigenasa (COX) (Dessi, M., 2013).

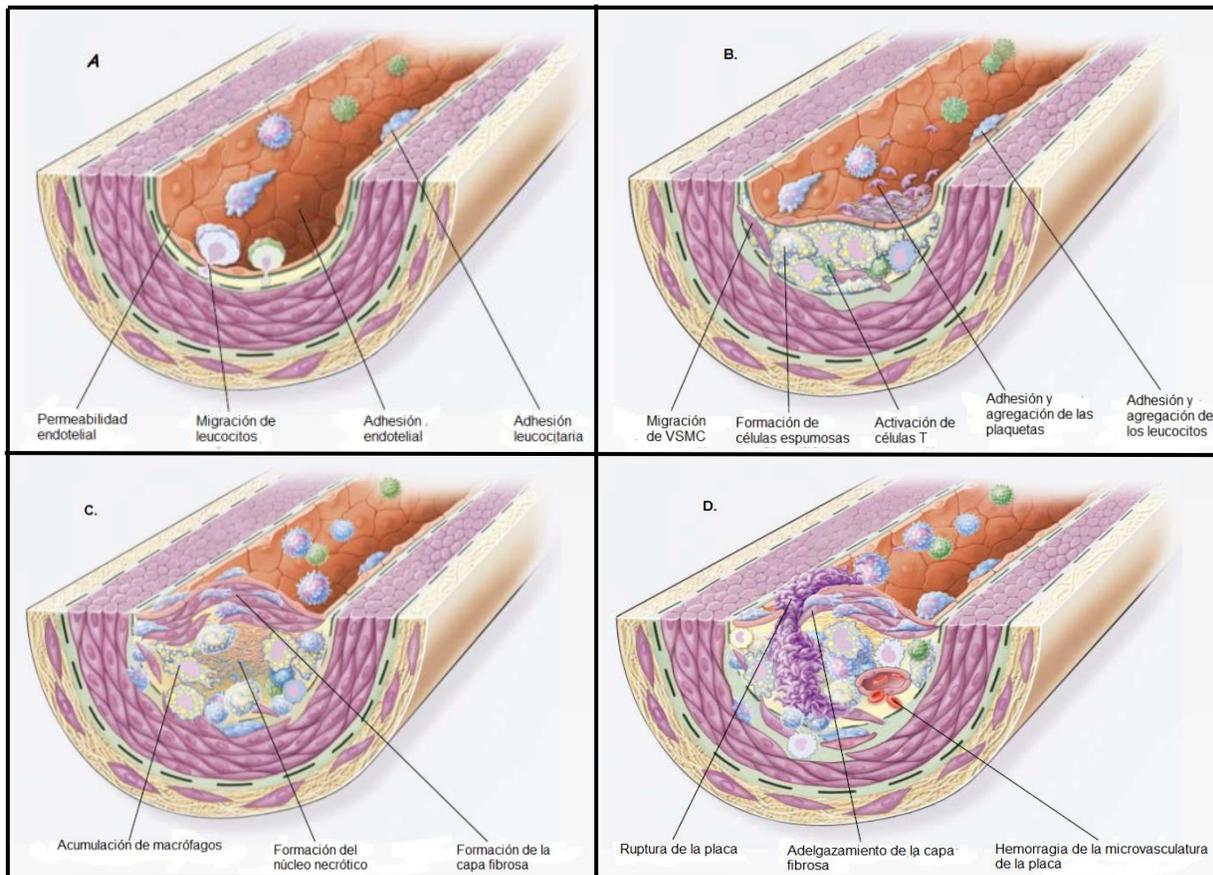


Figura 2. Diagrama de la progresión de la lesión endotelial en la aterosclerosis

A. Disfunción endotelial en estadios tempranos, que preceden a la lesión de la aterosclerosis. Estos cambios incluyen el incremento de la permeabilidad vascular a las lipoproteínas y otros constituyentes del plasma. **B.** Formación de la estría grasa, la cual consiste inicialmente de monocitos y macrófagos (células espumosas) con lípidos internalizados, siempre acompañados con linfocitos T. Después ingresan las VSMC. **C.** Formación de una lesión avanzada y complicada, donde la estría grasa progresa a un estadio intermedio y avanzado, ya que tiende a formar una capa fibrosa en las paredes obstruidas por la lesión en el lumen. Esto representa un tipo de respuesta fibrosa al daño. La capa fibrosa recubre una mezcla de leucocitos, lípidos y debris, que puede formar el núcleo necrótico. **D.** Progresión a una placa fibrosa inestable. La ruptura o ulceración de la placa fibrosa puede rápidamente desencadenar una trombosis y usualmente ocurre en los lugares donde se adelgaza la placa que cubre la lesión avanzada, a lo que se le conoce como desestabilización de la placa (Imagen modificada de Russ, R.; 1999).

2.4 CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR: CARACTERÍSTICAS.

Las VSMC son por mucho las células con mayor plasticidad de todas las células de los vasos sanguíneos, dado su habilidad de responder a diferentes factores de crecimiento. Específicamente, las VSMC pueden proliferar (hiperplasia con un incremento en el número de células), realizar hipertrofia (un incremento en el tamaño de la célula sin cambio alguno en el contenido de ácido desoxirribonucleico (DNA)), endoreduplicarse (un incremento en el contenido de DNA y usualmente también en el tamaño) y experimentar apoptosis (Berk, B. C.; 2001). El mayor problema para definir las es que éstas exhiben un amplio rango de diferentes fenotipos y además que no se terminan de diferenciar en organismos adultos. Las VSMC son susceptibles a modificaciones en su fenotipo en respuesta a un mediador inflamatorio, factores de crecimiento o inhibidores, influencia mecánica, interacciones de célula-célula y de matriz extracelular (Owens, 2004).

Las VSMCs adultas son células altamente especializadas comprometidas con la regulación del diámetro y el tono de los vasos sanguíneos, y consecuentemente en la distribución y presión sanguínea. Estás proliferan a una tasa muy baja y expresan un específico y único repertorio de proteínas contráctiles, canales iónicos, y moléculas de señalización que las diferencian de cualquier otro tipo de células. Sin embargo, las VSMCs conservan una plasticidad considerable y pueden experimentar cambios en su fenotipo muy significativos y reversibles. Gracias a estas propiedades, estas son capaces de incrementar su tasa de proliferación celular, migración, y su capacidad sintética en respuesta a un daño vascular, por lo tanto juegan un papel crítico en la reparación vascular. La otra cara de la moneda de su alta plasticidad, sugiere que éstas células pueden responder a señales inducidas por el ambiente para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares como son la aterosclerosis, hipertensión, y la formación de la neoíntima. Estas modificaciones incluyen alteraciones en la expresión de proteínas contráctiles, incremento en la producción de matriz extracelular, expresión de citocinas de inflamación y marcadores celulares, y la producción de proteasas (Cecchetti, A., 2011).

Entre los mecanismos utilizados por las VSMC para mediar estas diversas respuestas celulares, cuenta con mecanismos autocrinos y paracrinos (Berk, B. C.; 2001).

La capacidad de contracción, proliferación, migración y secreción en las VSMCs es afectada por un amplio rango de factores, incluyendo fuerzas mecánicas, agonistas contráctiles como son la angiotensina II (Ang-II), las células endoteliales, las especies reactivas de oxígeno (ROS), las interacciones entre las VSMC endoteliales, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF- β 1), y muchos otros factores de crecimiento. La modulación fenotípica depende, por lo tanto, de interacciones complejas de múltiples causas ambientales, todas siempre estableciendo un patrón de expresión genética (Owens, G.K.; 1995). En general, la pequeña barrera entre los factores intracelulares y extracelulares, es responsable de coordinar las señales “hacia afuera” y “hacia adentro”, generando las condiciones de un estado fenotípico dado (Cecchetti, A., 2011).

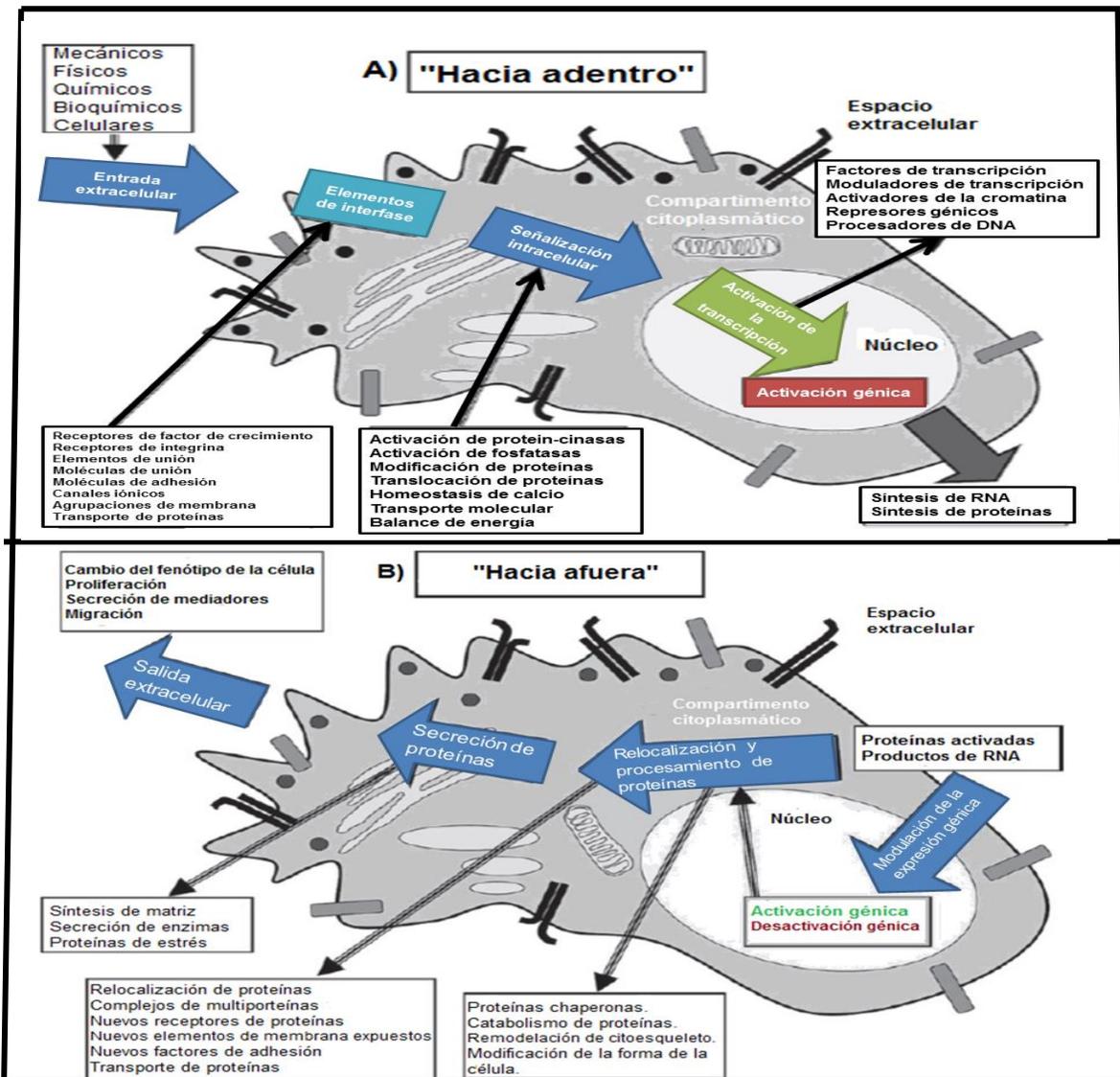


Figura 3. Respuesta de las VSMCs a un estímulo extracelular e intracelular. **A.** Activación celular dependiente de un estímulo. Las células censan el ambiente por medio de elementos de superficie dinámicos, cuya respuesta desencadena una serie de mecanismos de señalización. Las señales llegan al núcleo donde múltiples genes son activados coordinadamente. **B.** Reacción celular al estímulo. Las proteínas modificadas y la síntesis de nuevas proteínas desencadenan cambios dramáticos. La activación de vías metabólicas alternas, remodelación del citoesqueleto, exposición a un diverso repertorio de proteínas de membrana, y secreción de nuevos factores contribuye al establecimiento de un fenotipo diferente (Imagen modificada de Cecchetti, A., 2011).

Muchos factores que modulan la activación de las VSMC podrían asociarse con las señales “hacia afuera” y “hacia adentro” entre las células y el ambiente que las rodea (Cecchetti, A., 2011).

2.5 *MICRORNA*.

El descubrimiento en 1993 de moléculas endógenas pequeñas de RNA en *C. elegans* propuso el camino para la descripción de la numerosa familia los microRNA (Yates, L.A.; 2013).

De acuerdo a la actual convención, un microRNA es definido como un RNA monocatenario de entre 19 y 25 nucleótidos de longitud, que son generados por la enzima RNasa tipo III *Dicer*, a partir de un transcrito endógeno que contiene una estructura local con forma de horquilla (Ambros, V.; 2003).

La actual base de datos miRBase inevitablemente contiene un número sustancial de dudosas anotaciones (Kozomara, A.; 2014). La mayoría de las secuencias depositadas, particularmente desde el año 2007, han sido anotación con base en secuenciación masiva, que es suficientemente sensible para detectar decaimientos intermedios de otras especies de RNA. Una considerable proporción de las secuencias de los microRNAs son soportadas sólo por un número pequeño de secuencias leídas, y sus terminaciones 5' son altamente heterogéneas. Los genes de los microRNAs se encuentran bajo una fuerte presión selectiva para preservar la terminación 5' de los microRNA maduros, porque la posición del nucleótido en la secuencia semilla es importante para el reconocimiento del blanco (Chiang, H. R.; 2010). El criterio principal para considerar una auténtica determinación de los microRNAs incluye: la homogeneidad de la terminación 5' (aunque hay que tener cuidado, porque muchos auténticos loci de los miRNAs naturalmente producen procesamiento alternativo de isoformas); la abundancia de las secuencias leídas, su conservación filogenética, la evidencia del procesamiento mediado por la RNasa III y la evidencia de la asociación con las proteínas Argonauta (Ha, M.; 2014)

Los microRNAs tienen la función de guiar a las moléculas para realizar un silenciamiento postranscripcional por medio del apareamiento de bases con su blanco en el RNA mensajero (mRNA), que conduce a la escisión del mRNA o a una represión traduccional (Kim, V. N.; 2005).

2.6 BIOGÉNESIS DE LOS MICRORNAs.

La vía canónica guiada por la enzima RNasa III, genera la mayoría de los microRNAs en los animales (Ghildiyal, M.; 2009). Los transcritos primarios de microRNA (pri-miRNA) son típicamente productos de la RNA polimerasa II y las horquillas usualmente contienen dentro RNAs no codificantes o los intrones del mRNA; frecuentemente, múltiples horquillas de los pri-miRNA son codificados por un transcrito individual. Su biogénesis inicia con la escisión cerca de la base de cada horquilla del pri-miRNA por el heterodimero nuclear Drosha/DGCR8. DGCR8 (conocido como Pasha en invertebrados) es una proteína de unión a RNA de doble cadena (dsRNA) que reconoce aproximadamente 10 pares de bases proximales al tronco de la horquilla del pri-miRNA, situándose en el sitio catalítico de la enzima RNasa III Drosha (Han, J.; 2006). La escisión libera una horquilla de pre-miRNA que es típicamente de aproximadamente entre 55 y 70 nucleótidos (nt) de largo.

Los aproximadamente 2 nt que sobresalen de la horquilla del pre-miRNA son reconocidos por la Exportina-5 (Exp-5) y es acompañada por Ran-GTP, permitiendo su exportación del núcleo. En el citoplasma, la enzima Dicer RNasa III corta los pri-miRNAs aproximadamente 2 vueltas helicoidales alrededor de la horquilla, dando como resultado aproximadamente 22 nt de RNA pequeño duplicados. Una de las cadenas es usualmente preferencialmente incorporada por dentro del efector de la proteína Ago y la guía a sus blancos (Czech, B.; 2011). La selección del blanco de los microRNA en animales requiere de una complementaridad extensiva permitiendo su escisión por las proteínas Ago de clase Slicer (Karginov, F. V.; 2010). Sin embargo, la mayoría de los blancos de los microRNA carecen de suficiente apareamiento para ser cortados, y estos son

reprimidos en su sitio por deadenilación, degradación del mRNA, y/o por supresión traduccional (Fabian, M. R.; 2010).

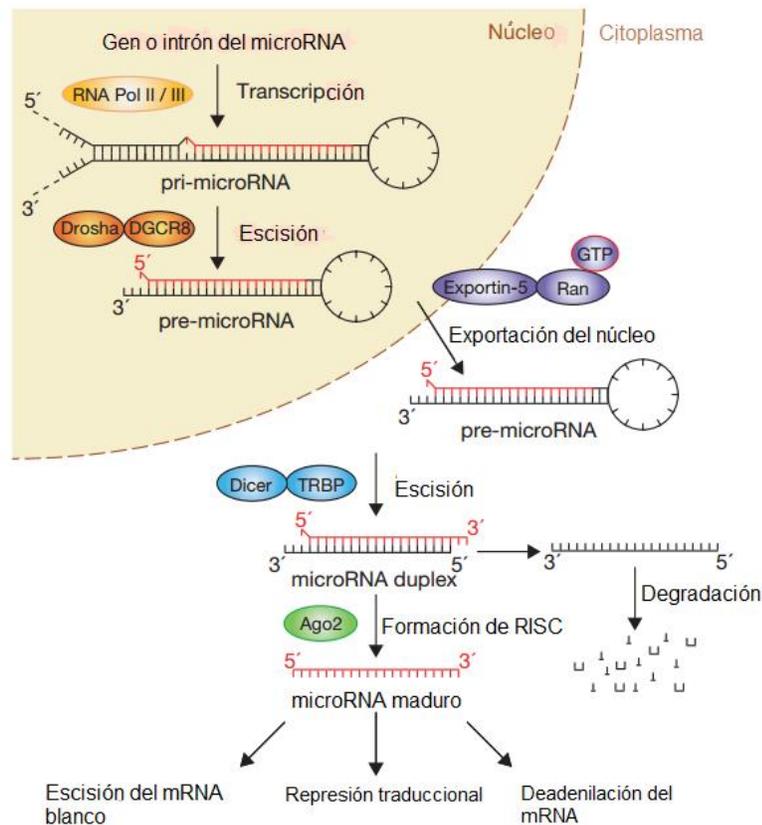


Figura 4. *Procesamiento de los microRNAs por medio de la vía canónica "linear".* Está maduración incluye la producción del transcrito primario del microRNA (pri-miRNA) por la polimerasa II o III y escindida por el complejo microprocesador Droscha-DGCR8 (Pasha) en el núcleo. La horquilla del precursor resultante, el pre-miRNA, es exportado fuera del núcleo por la Exportina-5-Ran-GTP. En el citoplasma, la RNasa Dicer en complejo con la proteína de unión a RNA de doble cadena TRBP escinde la horquilla del pre-miRNA a su tamaño de la forma madura. La cadena funcional de microRNA maduro es cargado junto con las proteínas Argonautas (Arg2) en el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), donde RISC guía el silenciamiento del mRNA blanco mediante la escisión del mRNA, represión traduccional o deadenilación, mientras que la cadena pasajera (cadena negra) es degradada (Imagen modificada de Winter, J.; et al; 2009).

A parte de la vía canónica para la biogénesis de los microRNAs, varios mecanismos alternativos pueden generar microRNAs o RNAs pequeños tipo microRNAs (Yang, J. S.; 2011). La secuenciación masiva de RNAs pequeños de células deficientes de DGCR8, Drosha o Dicer revelo microRNAs no convencionales que pueden producirse en un microprocesador independiente o de un modo independiente de Dicer (Babiarz, J. E.; 2008). La primer vía no canónica descrita, tiene lugar durante la producción del mirtron (Berezikov, E.; 2007), en la que el paso del procesamiento mediado por Dicer es puenteado y el precursor de RNA pequeño es generado a través de splicing del mRNA. (Flynt, A. S.; 2010).

El procesamiento mediado por Drosha es también puenteado en el caso de los microRNAs derivados de RNA endógeno de horquilla cortos, que son generados directamente a través de la transcripción (Babiarz, J. E.; 2008). Aunque estos RNA endógeno de horquilla cortos se transcriben inicialmente a través de RNA pol III (Xie, M.; 2013). Diferente al prototipo de pre-miRNA que tienen 2 nucleótidos de longitud que sobresalen (grupo I de pre-miRNA), algunos pre-miRNA (grupo II de pre-miRNA, incluyendo a muchos de los miembros de la familia let-7 en vertebrados) mueve un 1 nucleótido de longitud que sobresale en la región 3', obteniendo una estructura inusual de pre-miRNA. El grupo II de los pre-miRNAs son extendidos por las transferasas terminales de uridilil (incluyendo TUT2, TUT4 y TUT7). La monouridilación es requerida para un procesamiento mediado por Drosha eficiente (Heo, I.; 2012).

La existencia de vías alternativas refleja la flexibilidad evolutiva de la biogénesis de los microRNAs. Sin embargo, es notable que la gran mayoría de los microRNAs funcionales sigan la vía canónica en su biogénesis, y solamente aproximadamente el 1% de los microRNAs conservados son producidos independientemente de Dicer o Drosha en invertebrados (Ha, M.; 2014).

2.7 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS MICRORNAS.

Los microRNAs generalmente se unen con sus mRNAs blancos en la región 3' no traducidas (UTR) y más a menudo conducen a una disminución en la proteína blanco ya sea por degradación del mRNA blanco o por medio de una represión traduccional. En algunos casos, ambos mecanismos parecen ser operacionales. La extensión del apareamiento de las bases entre el microRNA y el mRNA puede ser un factor determinante para el destino final del mRNA blanco. La complementariedad del apareamiento de las bases suele ser usualmente perfecta, o cercana a lo perfecto, y está resulta en un decaimiento del mRNA (Yekta,S.; 2004).

El silenciamiento o bloqueo traduccional del mRNA blanco usualmente toma lugar por medio de apareamiento imperfecto de las bases entre uno o más microRNAs (iguales o diferentes) y la región 3'UTR del mRNA blanco (Filipowicz, W.; 2008). El resultante silenciamiento traduccional del mRNA blanco, se cree que en seguida es secuestrado por el microRNA hacia los cuerpos de procesamiento citoplasmáticos (P-bodies), donde los mRNAs no traducidos son almacenados y, por último, a veces degradado (Liu J.; 2005).

El modelo de la inhibición post-iniciación vía microRNAs podría resultar de la degradación co-traduccional de la cadena de polipéptido naciente codificada por el mRNA, o el microRNA conduciendo a una alta tasa de retorno al ribosoma e incrementando la terminación inmadura durante la elongación, resultando en una proteína incompleta cuyos productos pueden ser rápidamente degradados (Petersen,C. P.; 2006).

2.8 REGULACIÓN DE LOS MICRORNAS.

Generalmente, los microRNAs son producidos por varios procesos complejos que están controlados por una variedad de proteínas, incluyendo Drosha y Dicer. La producción de microRNAs maduros es dependiente de la acción funcional de muchas proteínas que controlan la generación de éstos (Soonhag, K.; 2009).

Los estudios en los perfiles de expresión indican que la mayoría de los microRNAs se encuentran bajo control en su desarrollo y/o en las vías de señalización tejido-específicas (Lagos-Quintana, M.; 2002). La expresión de los microRNAs podría ser regulada en múltiples pasos de la biogénesis de los RNA, aunque queda por determinar cuáles pasos son controlados y cómo se logra dicho control. La regulación transcripcional es probablemente el principal mecanismo de control (Johnson, S. M.; 2003).

Algunos microRNA parece que son controlados a un nivel post-transcripcional. Alternativamente, pueden ser unidos negativamente a factores regulatorios en el citoplasma, para así permanecen inaccesibles para Dicer hasta cierta etapa (Ambros, V.; 2003).

Las regiones promotoras de los genes que autónomamente expresan microRNAs son altamente similares a la de los genes que codifican proteínas (Ozsolak, F.; 2008). La presencia de islas CpG, secuencias de la caja TATA, elementos de inicio y ciertas modificaciones de histonas indican que los promotores de genes de microRNAs son controlados por factores de transcripción (TFs), elementos potenciadores y silenciadores, y modificaciones de cromatina, que son similares a los genes que codifican proteínas (Krol, J.; 2010).

Recientes estudios han reportado algunas regulaciones no canónicas de los microRNAs. En ellos, se encuentra que los microRNAs pueden sobrerregular la expresión genética en células quiescentes. Estos descubrimientos sugieren que la regulación traduccional del RISC fluctúa entre la activación y la represión durante el ciclo celular (Vasudevan, S.; 2007).

Otros descubrimientos revelan que la represión mediada por microRNAs podría ser revertida. Algunas proteínas unidas a RNA podrían jugar un papel en determinar las funciones del microRNA (Kedde, M.; 2008).

Descubrimientos recientes indican que la alteración de los sitios blanco de los microRNAs es un mecanismo para evitar una regulación de éste. Un caso similar, donde se ha reportado que los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en el

sitio del blanco del microRNA son presentados para anular la regulación de los microRNAs (Sethupathy, P.; 2008).

2.9 MICRORNAs Y LAS VSMC

Trabajos recientes identifican una nueva barrera regulatoria, que es un mecanismo mediado por microRNAs, superpuesto a los componentes transcripcionales de las VSMCs para ajustar aún más los niveles de proteína vía la regulación post-transcripcional, en respuesta a la variación del ambiente y las señales metabólicas resultando en cambios en las células vasculares como diferenciación, migración, proliferación y apoptosis (Cheng, Y.; 2009).

Con el reciente establecimiento de un modelo *in vitro* para la diferenciación de las VSMCs a partir células madre embrionarias, un número de microRNAs muestran cambios dinámicos (Huang, H.; 2010). Entre ellos, el miR-1 y el miR-10a mostraron una tendencia a ser sobrerregulados y bloqueados, respectivamente en la represión de la diferenciación de las VSMCs (Xie, C.; 2011). Además, la dupla individual entre estos microRNAs y dos potenciales blancos relevantes para la diferenciación, se han reportado, estos blancos de los microRNA son el miR-1: Factor como Kruppel 4 (KLF4) y el miR-10a: Deacetiasa de histona 4 (HDAC4) (Huang, H.; 2010).

La expresión del clúster del miR-143/145 es responsable de la regulación en la diferenciación de las VSMCs, el cual es controlado por el factor de respuesta en suero (SRF), Nkx2.5 y la miocardina (MyoCD) que se encuentran unidos al promotor del clúster de miR-143 y miR-145 (Cordes, K. R.; 2009).

En cultivos de VSMCs, el tratamiento con factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)-BB es un pro-proliferativo muy bien conocido, el cual desencadena el cambio fenotípico de las VSMC de contráctiles a proliferativas, así como la expresión de miR-221 y miR-222 (Davis, B. N.; 2008).

El TGF- β y la familia de proteínas morfogénicas de hueso (BMP) de factores tróficos contribuyen al cambio fenotípico de las VSMC fomentando la

contractibilidad de las VSMC mediante el aumento de la expresión del aparato contráctil (Lagna, G.; 2007). En algunos estudios se ha identificado que la inducción del fenotipo contráctil en VSMCs por TGF- β y BMPs es mediado por miR-21 (Davis, B. N.; 2008).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son un potente estimulador involucrado en la patogénesis vascular, incluyendo la aterosclerosis y la restenosis después de una angioplastia (Cordes, K. R.; 2009). La alteración de la expresión de los microRNAs ha sido demostrada en VSMCs con un tratamiento con peróxido de hidrógeno, donde el miR-21 fue altamente enriquecido (Lin, Y.; 2009).

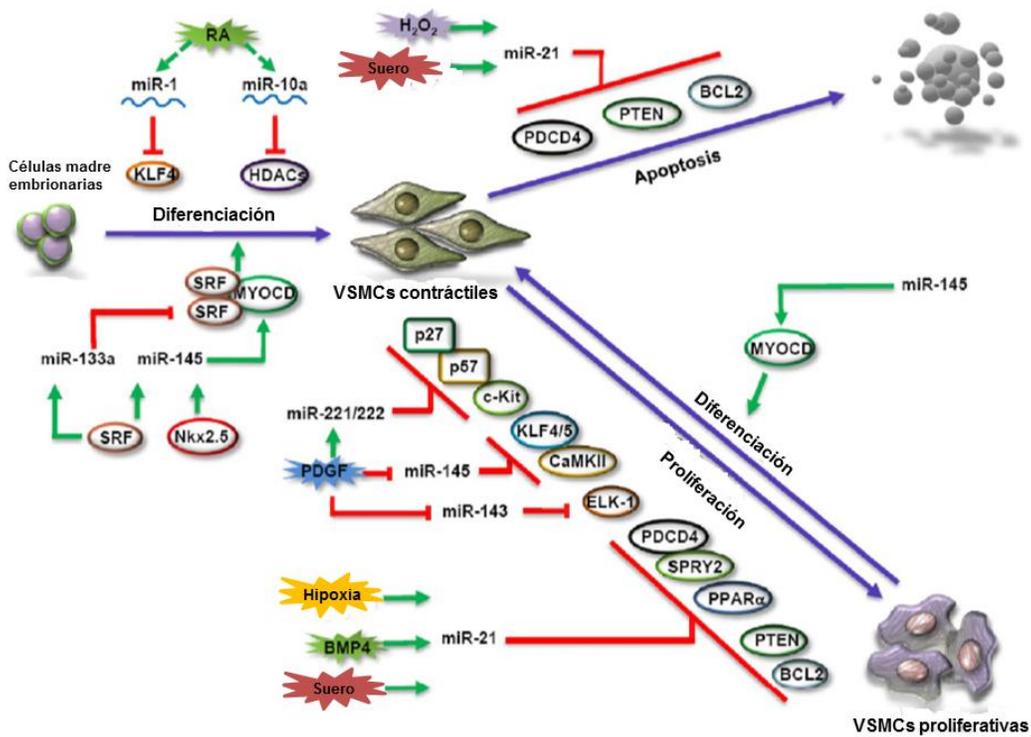


Figura 5. Diagrama esquemático de los blancos de los microRNAs identificados en VSMCs. En el diagrama se muestran los blancos que han sido reportados en VSMCs, que afectan cambios fenotípicos en ellas en su proliferación o diferenciación. Los principales microRNAs implicados hasta ahora identificados, y que se muestran en el diagrama, son miR-145, miR-43, miR-21, miR-133a, miR-1, miR-221 y miR-222 (Imagen modificada de Xie, C.; et al; 2011).

La aterosclerosis implica una serie de procesos secuenciales que incluyen la disfunción endotelial, inflamación, proliferación celular y alteración de la matriz. El cambio fenotípico de las VSMC contribuye a la patogénesis de la aterosclerosis y está ligado en todos estos procesos (Dzau, V.J.; 2002). Se ha descrito en la literatura, que los transcritos de miR-145 están implicados en la disminución a niveles casi indetectables de la lesión aterosclerótica en ratones (Boettger, T.; 2009). En la aorta de ratones knockout a ApoE se encuentra un marcado decaimiento en los niveles constitutivos de miR-143/145, y su expresión más reducida se presenta con una alimentación con dieta alta en grasa (Elia, L.; 2009). Estos resultados indican un rol de los microRNAs en la patogénesis de la aterosclerosis (Xie, C.; et al; 2011).

3.0 JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de mortalidad y una de las principales causas de discapacidad a nivel mundial. La carga económica para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares es enorme. Se estima que entre costos directos e indirectos, en Estados Unidos, excede los 400 billones de dólares (Mesah, G.A.; 2007). Mientras que para la Unión Europea fue de aproximadamente de 105 mil millones de euros en 2003, donde el 57% de estos costes son a la asistencia de pacientes hospitalizados derivado de una enfermedad cardiovascular (Fuster, V.; 2008).

Recientemente se ha descrito que los microRNAs participan en el control fenotípico de las células de músculo liso vascular. En este contexto, se han reportado nuevos descubrimientos sobre el papel fundamental de ciertos microRNA's en las células de músculo liso vascular (Zhang, C.; 2009)

4.0 HIPÓTESIS

Si existe un cambio fenotípico de las VSMC debido a los procesos de internalización de las lipoproteínas de baja densidad, entonces estos se reflejarán a nivel molecular, tanto en los RNA mensajeros y en los microRNAs que los regulan.

5.1 OBJETIVOS GENERALES.

Con base en análisis de resultados obtenidos con microrreglos de expresión de los microRNA, se determinarán los microRNA con mayor posibilidad de estar implicados en la aterosclerosis.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Realizar el cultivo de las células de VSMC, así como los tratamientos con lipoproteínas de baja densidad nativas y oxidadas.
- Realizar la extracción de RNA de las VSMC.
- Realizar los análisis de los datos obtenidos con el microrreglo de expresión GeneChip® miRNA 3.0 Array de la marca Affymetrix.
- Asociar los resultados de los microRNAs con los de mRNA obtenidos previamente con el microrreglo de expresión GeneChip® Human Gene 1.0 ST Array de la marca Affymetrix.
- Realizar la validación del microrreglo de expresión GeneChip® miRNA 3.0 Array de la marca Affymetrix, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, de 3 microRNAs al alza y 3 a la baja.

6.0 METODOLOGÍA

6.1 RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO SEGUIDO.

A continuación se muestra un diagrama donde se presenta el flujo de la obtención de los datos, así como del análisis de los mismos.

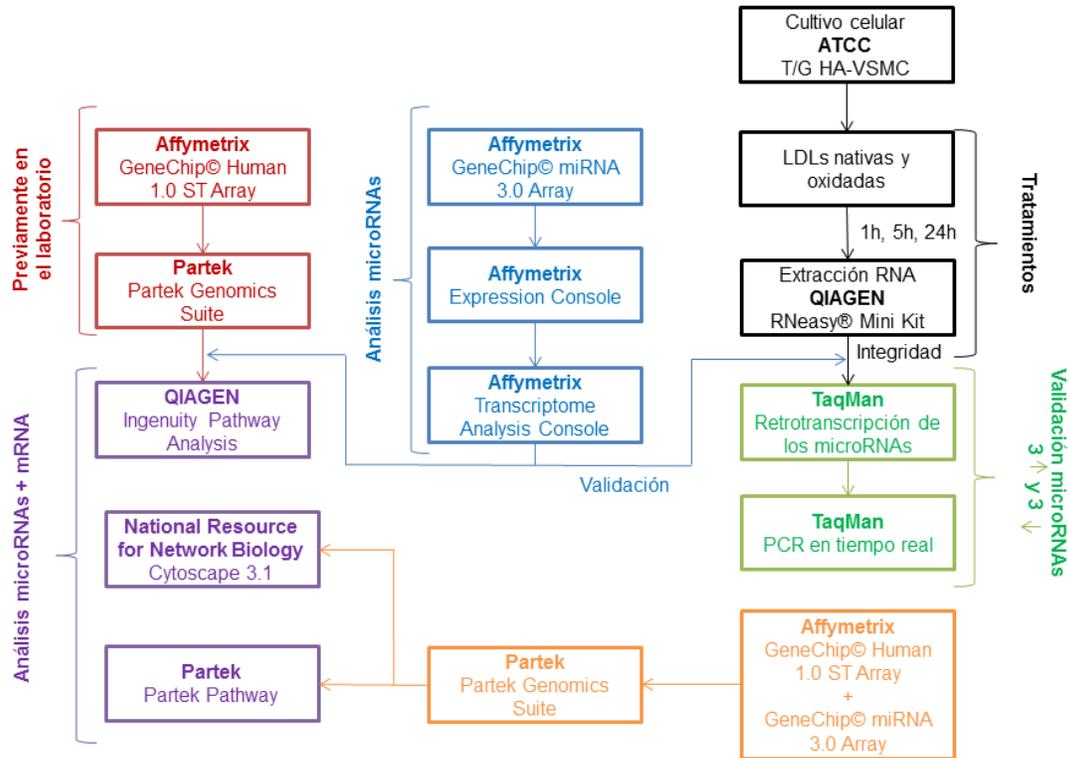


Figura 6. Diagrama de flujo de la metodología de la obtención y del análisis de datos. En el diagrama se muestran los diferentes programas y metodologías utilizadas, abarcando 4 aspectos principales: La parte del cultivo de las VSMC, así como los tratamientos y la extracción de RNA total, el análisis del microarreglo de expresión de microRNAs, así como su validación y por último, la parte del análisis donde se conjuntan los datos de mRNA con los de microRNAs, mediante diferentes estrategias.

6.2 CULTIVO CELULAR.

La línea celular humana T/G HA-VSMC de la marca ATCC (CRL-1999) obtenida de la aorta de un paciente femenino (Véase Apéndice, sección 11.1) , fue cultivada en el medio F12K (Véase Apéndice, sección 11.2), adicionando 0.05 mg/mL de ácido ascórbico; 0.01 mg/mL de insulina; 0.01 mg/mL de transferrina; 10 ng/mL de selenito de sodio; 0.03 mg/mL de Suplemento de crecimiento de células endoteliales (ECGS) ; suero fetal bovino al 10%, HEPES 10 mM; TES 10 mM , 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomomicina y 0.01% de

amfotericina B. Las células fueron cultivadas en un medio ambiente humidificado a 37 °C en una atmosfera de 95% de aire y 5% de CO₂.

6.3 PREPARACIÓN Y OXIDACIÓN DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD.

La fracción de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (densidad: 1.019-1.063 g/mL) fue aislada por ultracentrifugación secuencial de plasma humano. Las LDLs son oxidables por la exposición a 7.5 µM de CuSO₄ en buffer de fosfato salino (PBS) sin calcio y magnesio por 20 h a 37 °C. Finalmente, la reacción es detenida mediante la adición de EDTA y las LDL oxidadas son obtenidas dializándolas en 150 mM de NaCl con 100 µM de EDTA. Tanto las LDLs nativas y oxidadas se conservaron a 4°C.

6.4 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA INTERNALIZACIÓN DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD.

Las concentraciones de LDLs, tanto nativas como oxidadas, a utilizarse en los tratamientos fueron estandarizados previamente en el laboratorio.

Brevemente, las VSMCs fueron tratadas a una concentración de 2 µg/µL de LDLs nativas u oxidadas, según el tratamiento. Las células fueron expuestas en tres intervalos de tiempo, bajo el siguiente esquema:

VSMCs control sin tratamiento (C), VSMCs tratadas con LDLs nativas por 1 hora (h) (N1), VSMCs tratadas con LDLs nativas por 5 h (N5), VSMCs tratadas con LDLs nativas a las 24 h (N24), VSMCs tratadas con LDLs oxidadas por 1 h (Ox1), VSMCs tratadas con LDLs oxidadas por 5 h (Ox5) y VSMCs tratadas con LDLs oxidadas por 24 h (Ox24).

Las VSMCs fueron cultivadas en placas de 12 pozos marca UltraCruz™ Tissue Culture Plate (Santa Cruz Biotechnology Cat. Sc-204444), adicionando una concentración inicial de 1x10² células por pozo hasta llegar a un 75-85% de confluencia. Previo a la adición de las LDLs, las células fueron expuestas a medio F12K sin suero fetal bovino, por una hora. Después, se le adicionó el medio suplementado junto con las LDLs nativas u oxidadas, según sea el caso. El diseño

experimental de las placas de 12 pozos se presenta en la figura 6. Para cada tratamiento se hicieron las réplicas biológicas por cuadruplicado.

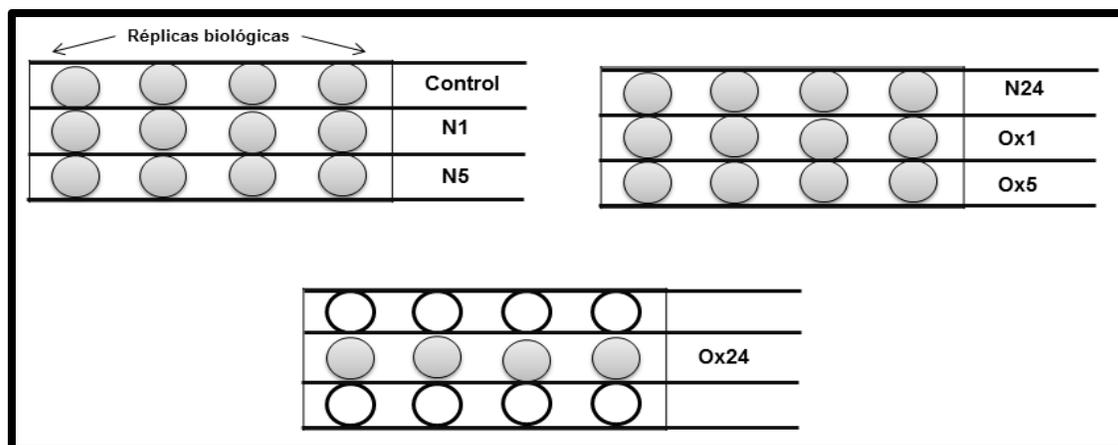


Figura 7. *Diseño experimental para la internalización de las LDLs nativas y oxidadas.* Se muestra el diseño del tratamiento para la internalización de las LDLs nativas y oxidadas, a 3 intervalos de tiempo (1 h, 5 h y 24 h).

6.5 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

El RNA total de las muestras de VSMCs, posterior a la exposición a los tratamientos con las LDLs, fueron recolectadas exponiéndolas a tripsina al 0.005 % con EDTA 1.06 mM marca ATCC (Cat. 30-2101), durante 5 minutos; transcurrido este tiempo, fue detenida la reacción con medio F12K sin suplementar. Después fueron recolectadas en tubos para su posterior centrifugación a 1000 revoluciones por minuto (rpm) por 5 minutos a 20 °C. El sobrenadante resultante fue desechado para conservar el botón con el paquete celular.

Una vez obtenido lo anterior, se prosiguió con el protocolo de extracción de RNA del kit RNeasy® Mini Kit (QIAGEN cat. 74106). Esta técnica tiene como base membranas de sílica de unión selectiva. Se adicionaron 350 µL de buffer RLT, para la disrupción de las células y su homogeneización, a cada tubo con el paquete celular de cada tratamiento y se colocaron a 4 °C las muestras. Posteriormente, se adicionó un volumen de etanol al 70%, con el fin de aumentar

la selectividad de la membrana por el RNA. Después, se procedió a tomar 700 μ L de esta mezcla para colocarlo en el tubo con la columna; para proseguir con la centrifugación a 10,000 rpm a 4°C por 15 s, posterior a este lapso se desechó el sobrenadante del tubo de recolección. Después se adicionaron 700 μ L de buffer RW1 a la columna con la membrana para realizar el lavado de la misma, prosiguiendo con su centrifugación a 10,000 rpm a 4 °C por 15 s, desechando el sobrenadante del tubo recolector. En seguida, se le agregaron 500 μ L de buffer RPE para lavado de la membrana, se centrifugo a 10,000 rpm a 4 °C por 15 s, eliminando el sobrenadante del tubo recolector; después se repitió el paso de agregar buffer RPE, sólo con la modificación de que la centrifugación fue por un lapso de tiempo de 2 minutos. Por último, se agregaron 50 μ L de agua libre de RNasa para realizar la elución del RNA presente en la membrana.

Posteriormente, las muestras fueron cuantificadas usando el espectrofotómetro NanoDrop ND-3300 (NanoDrop Technologies) y la calidad del RNA fue evaluada usando el RNA 600 Nano Assay utilizando la relación 260/280 nm.

6.6 INTEGRIDAD DEL RNA TOTAL

La integridad del RNA total fue determinada utilizando el bioanalizador Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc.). Este bioanalizador permite la caracterización cuantitativa de las muestras de RNA total basándose en los patrones de movilidad electroforética de las muestras en una matriz de gel que se introduce en chips formados por una serie de microcanales y depósitos en miniatura interconectados, a través de los cuales migran electroforéticamente los ácidos nucleicos. El chip utilizado para el análisis de las muestras fue el NanoChip® EukaryoteTotal RNA. La metodología utilizada fue la del fabricante.

Por último, el equipo asigna el número de integridad del RNA (RIN); el cual facilita la determinación objetiva de la calidad del RNA. Este valor va desde 1 al 10, y se basa en la cuantificación de productos de degradación del RNA a lo largo de toda su migración electroforética.

6.7 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LOS DATOS OBTENIDOS EN EL MICROARREGLO DE EXPRESIÓN.

Los archivos de intensidad (CEL files) obtenidos del microarreglo de expresión GeneChip® miRNA 3.0 Array de la marca Affymetrix (Véase Apéndice, sección 11.3) fueron obtenidos previamente en el laboratorio.

Los CEL files fueron cargados en el software de Expression Console versión 1.3 (Affymetrix), el cual normaliza, realiza la información de los controles de calidad (QC) y resume los datos de cientos de muestras. Estos datos son guardados en archivos con los valores de expresión resumidos (CHP files) de los CEL files individuales. Adicionalmente, la aplicación produce métricas de QC para la evaluación de los sucesos de hibridación.

Los CHP files son cargados posteriormente en el software Transcriptome Analysis Console versión 1.0 (Affymetrix). Este software permite la identificación de la expresión diferencial de los genes y exones y la visualización de los eventos de splicing alternativo para determinadas isoformas posibles del transcrito; además permite realizar pruebas estadísticas de la expresión diferencial, visualizar las razones de cambio (fold changes) de los microRNAs y ligarlas directamente con las anotaciones públicas disponibles. Primeramente se selecciona el análisis de Gene Level Differential Expression Analysis, para después importar los CHP files y asignarles las condiciones correspondientes, donde se seleccionan los triplicados de CHP files existentes por cada condición experimental. Posterior al final del análisis, se visualizan los resultados de los microRNAs y se seleccionan las condiciones comparando el control con cada condición experimental, visualizando solo los microRNAs con fold change ≥ 2 o ≤ -2 y un valor de $p \geq 0.05$.

Los resultados de estos análisis son obtenidos en formato .xls de Excel, donde fueron analizados para obtener los microRNAs con los valores de fold change que más se aumentarían o disminuirían.

Posterior a ello, las listas con los microRNAs que superaron ese umbral, se cargaron al programa de Multiexperimental Viewer (MeV), este programa es una

herramienta para análisis de datos de microarreglos que incorpora sofisticados algoritmos para realizar un “clustering” jerárquico, visualizar, clasificar, realizar análisis estadísticos y descubrimiento de temas biológicos. En este se realizaron los clústeres jerárquicos de los microRNAs que superaron el umbral; utilizando la función de clustering.

6.8 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LOS MICRORNAs ASOCIADOS A LOS DATOS DE EXPRESIÓN DE MRNA

6.8.1 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN EN EL PROGRAMA INGENUITY PATHWAY ANALYSIS.

Los análisis para determinar los genes a la alza o a la baja, fueron realizados previamente en el laboratorio, a partir del microarreglo de expresión de mRNA GeneChip® Human Gene 1.0 ST Array de Affymetrix (Véase Apéndice, sección 11.4). Los resultados de este análisis fueron exportados a formato .xls.

Los archivos .xls obtenidos de este análisis previo, junto con los obtenidos del análisis del microarreglo de expresión de microRNAs, fueron editados para solo tener en el archivo las columnas del nombre del gen/microRNA, el fold change y la del valor de p; estos archivos fueron cargados al programa Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (QIAGEN). El programa IPA consiste en una aplicación basada en la web y soportada en el sistema Java™ que es capaz de analizar, integrar los datos de microarreglos de genes, microRNAs y SNPs.

Una vez cargadas las listas, se procedió a realizar una rutina, llamada IPA Core Analysis, de únicamente los resultados de cada condición; esta función nos ofrece una evaluación rápida de las vías metabólicas y de señalización; de las redes moleculares y de los procesos biológicos que son más significativamente perturbados en el conjunto de datos deseado. Posteriormente se utilizó la función de MicroRNA Target Filter para cada condición, la cual permite combinar los datos de microRNAs con los de mRNA para proveer una percepción de los efectos biológicos de los microRNAs.

Posterior a ellos, se realizaron IPA Core Analysis de los datos de mRNA-microRNA obtenidos en el paso previo. En este paso, se obtiene el “score” de las funciones de redes asociadas, este valor viene derivado del p-value, y se refiere a que se encuentran n genes en las redes y nos dice la probabilidad de encontrar estos genes en la red. Este se calcula mediante un prueba exacta de Fischer.

6.8.2 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN EN EL PROGRAMA PARTEK PATHWAY.

Los CEL files obtenidos del microarreglo de expresión GeneChip® miRNA 3.0 Array y del microarreglo de expresión GeneChip® Human Gene 1.0 ST Array, los cuales fueron obtenidos en el laboratorio previamente, se importaron en el software Partek Genomics Suite 6.6 (Partek Inc). Este software es una suite comprensiva de estadística avanzada y de visualización interactiva de los datos; además de permitir realizar genómica integrativa y realizar su integración biológica. Los CEL files fueron cargados agrupados para el caso de los pertenecientes al mRNA en 2 grupos: Los CEL file pertenecientes a los controles con los de las muestras nativas y los CEL files de los controles con los de las muestras oxidadas. Por otra parte, los CEL file de los microRNAs se cargaron en una corrida. Posteriormente se asignaron los atributos de los CEL files; una vez realizado esto se obtuvieron los parámetros de calidad. Luego se procedió a realizar el análisis multivariado ANOVA de los mismos, contrastando las condiciones que para el caso de mRNA se compararon las condiciones experimentales contra el control, debido al análisis previo, y para los microRNAs fue control contra condiciones experimentales, para tener compatibilidad con el análisis realizado con la plataforma de Affymetrix. Después se obtuvieron las listas de genes y de los microRNAs que tuvieran un fold change ≥ 2 o ≤ -2 y un valor de p ≥ 0.05 . Después se integró la información del mRNA con la de los microRNAs mediante la rutina que tiene el software y se obtuvieron las listas que genera.

Las listas tienen la opción de correr el software de Partek Pathway, este software ayuda a buscar en la base de datos de Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), y ocupando modelos estadísticos avanzados calcular el enriquecimiento de las vías, detectar vías influenciadas o alteradas, buscar en vías

específicas o genes de interés. En este programa se obtuvieron las vías de señalización de cada condición de la información en conjunto de los microRNAs con los mRNAs.

Este programa calcula el pathway enrichment, este valor puede identificar los genes que son estadísticamente significativos y que son representados en las funciones, procesos o mecanismos celulares.

6.8.3 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN EN EL PROGRAMA CYTOSCAPE.

Los datos obtenidos en Partek Genomics Suite que resultaron de la integración de los microRNAs con los mRNAs, fueron importados a Excel para realizar listas donde únicamente se encuentre el nombre de los genes/microRNAs, el fold change de cada condición de ese gen/microRNA y el valor de p de cada una.

Posteriormente, estas listas editadas fueron importadas al programa Cytoscape en su versión 3.1.1 (NRNB), Cytoscape es un programa de libre acceso para visualizar la interacción de las redes genéticas de las vías biológicas e integra estas redes con las anotaciones, perfiles de expresión y otros conjuntos de datos. Dado que este programa trabaja por medio de “plugins”, el que se utilizó para este análisis fue el CyTargetLinker.

6.9 VALIDACIÓN DEL MICROARREGLO DE EXPRESIÓN

6.9.1 RETROTRANSCRIPCIÓN DE LOS MICRORNAs

La reacción de retrotranscripción (RT) de los microRNAs fue realizada utilizando el kit TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit de Applied Biosystems (Part. 4366596). La RT de microRNAs en el sistema TaqMan®, el DNA complementario (cDNA) es reversotranscrito de las muestras de RNA total usando un RNA pequeño específico, el “primer” de la RT se encuentra en forma de tallo con asa en el sistema TaqMan® Small RNA Assay, además de los reactivos de kit mencionado anteriormente (Applied Biosystems).

La reacción de RT se realizó a partir de 50 ng de cada una de las muestras de RNA total. Las condiciones y los reactivos utilizados son los recomendados por el fabricante. Por cada reacción de RT, del kit TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit se adicionaron 4.16 μL de agua libre de nucleasas, 0.19 μL de inhibidor de RNasa 20 U/ μL , 1.50 μL de Buffer de reversotranscripción a una concentración de 10X, 1.00 μL de transcriptasa reversa MultiScribe™ (50 U/ μL) y 0.15 μL de dNTPs(con dTTP) 100 mM; para un volumen total de 7.00 μL . Además, se adicionaron 3 μL del “primer” de RT 5X, suministrado en el sistema TaqMan® Small RNA Assay, específico para cada microRNA.

La reacción de RT se realizó en el termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), bajo los siguientes parámetros: Un ciclo por 30 minutos a 16°C, otro ciclo por 30 minutos a 42 °C y un último ciclo de 5 minutos a 85 °C.

6.9.2 PCR EN TIEMPO REAL

Las muestras de cDNA de cada microRNA obtenidas en el paso previo, se amplificaron por PCR en tiempo real. Las sondas TaqMan® de unión al surco menor (MGB) contienen un reportero marcado con FAM™ unido en la región terminal 5' de la sonda; un MGB en la región terminal 3', y esta modificación incrementa la temperatura de fusión sin el incremento de la extensión de la sonda; y “quencher” no fluorescente en la región terminal 3'.

El proceso que toma lugar durante la amplificación de PCR es el ensayo de la nucleasa 5'. Este proceso ocurre en todos los ciclos y no interfiere con la acumulación exponencial del producto. Durante la PCR, las sondas TaqMan® MGB reconoce específicamente a la secuencia complementaria entre los sitios del “primer” hacia adelante y del “primer” reverso. Cuando la sonda se encuentra intacta, la proximidad del reportero marcado con el “quencher” marcado resulta en la supresión de fluorescencia del reportero. La DNA polimerasa une únicamente a sondas que son hibridadas con la secuencia blanco. La escisión separa al reportero del “quencher”, esta separación resulta en el incremento de la fluorescencia por el reportero. El incremento en la señal de la fluorescencia ocurre

únicamente si la secuencia blanco es complementaria con la sonda y es amplificada durante la reacción de PCR, durante la polimerización de la cadena continua, pero la región 3' terminal de la sonda es bloqueada y por tanto no existe aumento de la sonda durante la reacción de PCR (Applied Biosystems).

Para cada reacción de PCR en tiempo real, se preparó la mezcla de reacción de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Para una reacción se adicionaron 7.67 μL de agua libre de nucleasas, 10.00 μL de TaqMan® Universal PCR Master Mix sin UNG (1X) (Applied Biosystems Part. 4304437), 1.33 μL del producto de la reacción de RT y 1.00 μL de TaqMan® Small RNA Assay (20X) de cada microRNA, dando un volumen final de 20.00 μL . Las reacciones se hicieron por triplicado para tener réplicas técnicas. Cada reacción fue colocada en un pozo de las placas de 96 pozos ABIPRISM 96-Well Optical Reaction Plate with Barcode (Applied Biosystems Part 4306737). Las reacciones de PCR en tiempo real fueron realizadas en el equipo ViiA™7 Real-Time PCR System (Life Technologies Cat. 4453534) usando los siguientes parámetros: Modo de corrida estándar, volumen de la muestra de 20 μL , bajo las condiciones térmicas de ciclado iniciales de 2 minutos a 50 °C, seguido de 10 minutos a 95 °C para la activación de la enzima, para continuar con la reacción de PCR por 50 ciclos de 95 °C por 15 segundos para desnaturalizar y de 60 °C por 60 segundos para alinear/extender la cadena.

Las sondas del sistema TaqMan® utilizadas, que se mencionan a continuación, fueron seccionadas por estar entre los 3 valores de fold change más alto al alza y 3 valores de fold change más bajo a la baja: hsa-miR-1972 (Assay ID 245466_mat), hsa-miR-217 (Assay ID 002337), hsa-miR-27a (Assay ID 002445), hsa-miR-30e (Assay ID 002223), hsa-miR-1290 (Assay ID 002863) y hsa-miR-155 (Assay ID 002287). Se utilizaron 2 sondas como controles endógenos, las cuales fueron: hsa-miR-16 (Assay ID 000391) y U47 (Assay ID 001223).

Para encontrar diferencias en la expresión, se utilizó el método comparativo $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Véase Apéndice, sección 11.5).

7.1 INTEGRIDAD DEL RNA DE LAS MUESTRAS.

Las muestras posteriormente a ser tratadas con las LDLs nativas y oxidadas, y de realizar la extracción del RNA, se determinó el RIN para cada muestra. Las muestras tuvieron un valor promedio de 8.82 ± 0.236 , con la mayoría de todos los valores por encima de 9.00 y con ninguno por debajo de 8.00. A continuación se muestran ejemplos de los resultados obtenidos:

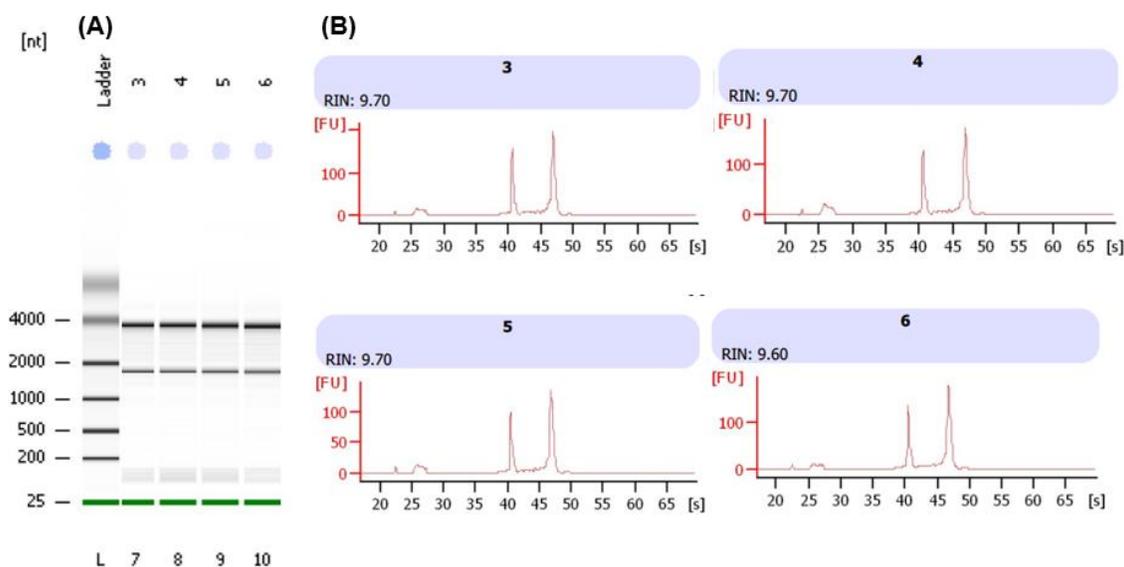


Figura 8. Ejemplos de los resultados obtenidos en el bioanalizador. **A.** En la figura se muestra el ejemplo de electroforesis que se obtuvo corriendo un gel de agarosa, el cual corresponde con las muestras que se presentan en el electroferograma presentados en B. **B.** Se muestran ejemplos de los electroferogramas obtenidos y su valor respectivo de RIN obtenido.

Es conocido que la precisión en la evaluación de la expresión de los genes se ve influenciada por la cantidad y la calidad del RNA inicial. La pureza y la integridad del RNA son elementos críticos (Imbeaud, S.; 2005). La plataforma determina la calidad del RNA usando la razón del RNA ribosomal 28S/18S, donde el valor más degradado de RNA es 1 y el más intacto es el 10 (Riedmaier, I.; 2010).

Para el caso del estudio de microRNAs mediante la metodología de microarreglos de expresión y PCR en tiempo real, Ibberson propone que solamente se deben utilizar muestras de RNA total con valores de RIN mayores a 7.00 (Ibberson, D.; 2009).

7.2 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LOS DATOS OBTENIDOS EN EL MICROARREGLO DE EXPRESIÓN.

Los microRNAs que superaron el umbral en las condiciones nativas fueron 3 al tiempo de 1h, 46 a las 5h y 6 a las 24h. El número de ensayos por tiempo fue de 3, presentando el programa un valor promedio. En la figura 9 se muestra la relación de los microRNAs en los diferentes tiempos.

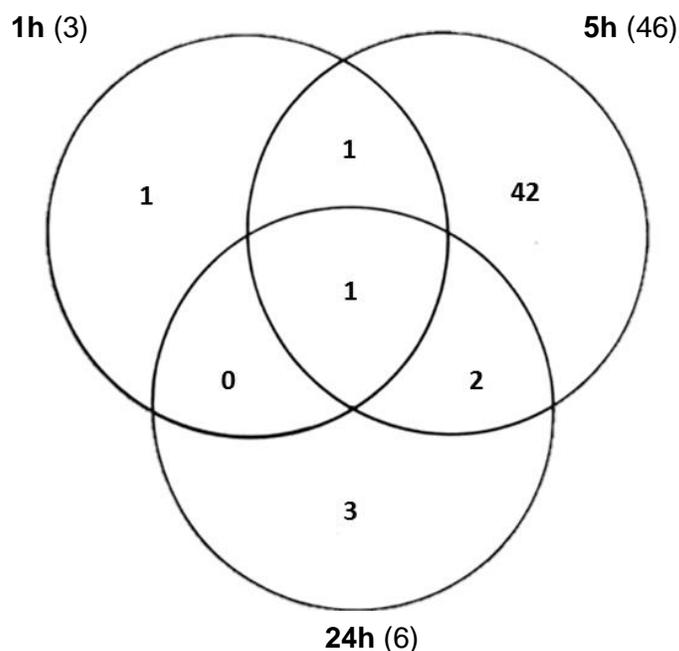


Figura 9. Diagrama de Venn-Euler de las condiciones nativas de los microRNAs presentes. En el diagrama se muestra el número de microRNAs que superaron el umbral en las diferentes condiciones.

Por otro lado, en las diferentes condiciones con los tratamientos con LDLs oxidadas, los microRNAs que superaron el umbral fueron 37 al tiempo de 1h, 44 a las 5h y 23 a las 24h. En la figura 10 se muestra la relación de los microRNAs en los diferentes tiempos.

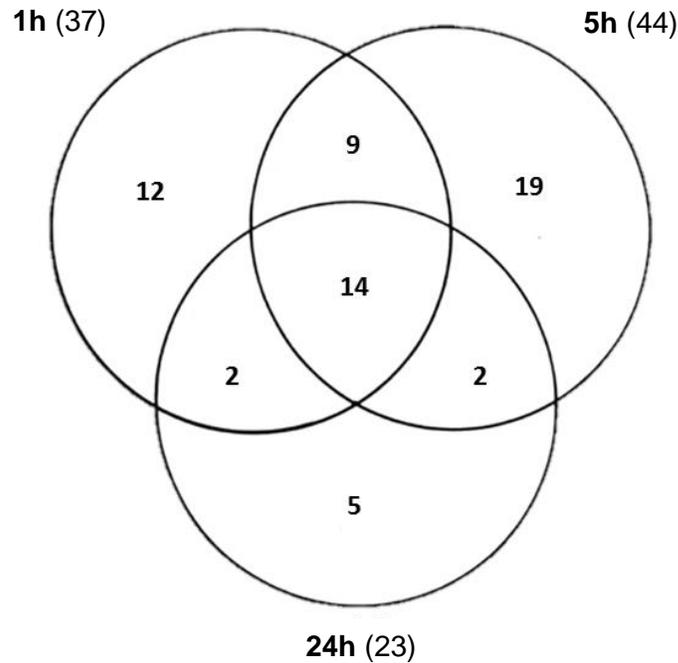


Figura 10. Diagrama de Venn-Euler de las condiciones oxidadas de los *microRNAs* presentes. En el diagrama se muestra el número de *microRNAs* que superaron el umbral en las diferentes condiciones.

Por otro lado, los *microRNAs* que superaron el umbral tanto en las condiciones nativas como en oxidadas, fueron 1 *microRNA* al tiempo de 1h, 4 *microRNAs* a las 5 h y 3 *microRNAs* al tiempo de 24h. Los *microRNAs* que solamente se encontraron a las 5h fueron el miR-23a y el miR-671-3p, únicamente a las 24h se encontró al miR-217. El miR-27a fue encontrado tanto a las 5h como a las 24h y a los 3 tiempos se encontró al miR-4669. En la figura 11 se muestra de manera gráfica dicho comportamiento.

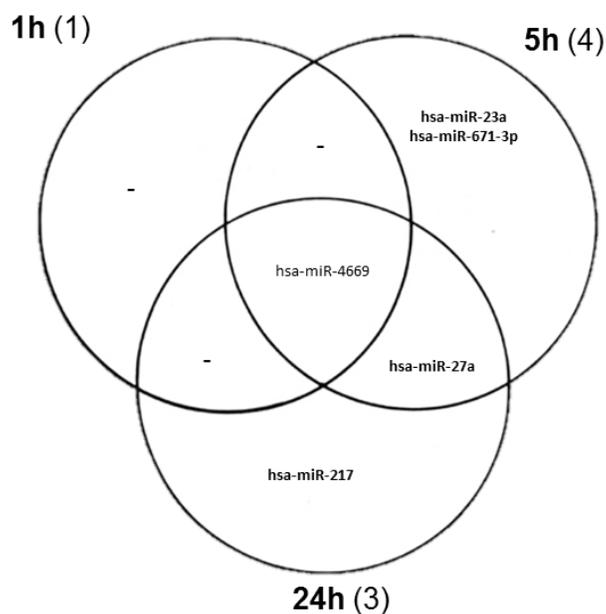


Figura 11. Diagrama de Venn-Euler de los microRNAs compartidos tanto en las condiciones nativas como oxidadas. En el diagrama se muestran los microRNAs que cruzaron el umbral tanto en las condiciones nativas como en las oxidadas.

En una revisión bibliográfica de estos microRNAs, se encontró que el **miR-27a** regula la diferenciación endotelial en el cáncer de mama (Tang, W.; 2014), promueve la activación de la vía de señalización EGFR vía la supresión de la expresión de **miR-27a** (Wang, W.; 2013) y se encontró que suprime la acumulación de triaglicéridos y afecta la expresión de los genes asociados con el metabolismo de lípidos (Lin, X.Z.; 2013).

Por otro lado, se ha encontrado que el **miR-23a** tiene como blanco el factor transcripcional HOXB4, el cual no solo interviene en la nefrogénesis, sino que además muestra características oncogénicas en diversas neoplasias (Koller, K.; 2013). Así como, inhibe el factor regulador de interferón 1, el cual promueve la apoptosis vía la inducción de paclitaxel y además, modula la proliferación celular (Liu, X.; 2013).

El **miR-217** promueve la acumulación de grasas vía la desregulación de sirtuina hepática 1 (Yin, H.; 2012) y se encuentra asociada su desregulación con una baja tasa de supervivencia, y suprime la proliferación y migración celular (Li, H.; 2013).

El miR-4669 se encontró que juega un rol dual en el gen ERBB2/Her2 en cáncer de mama (Persson, H.; 2011).

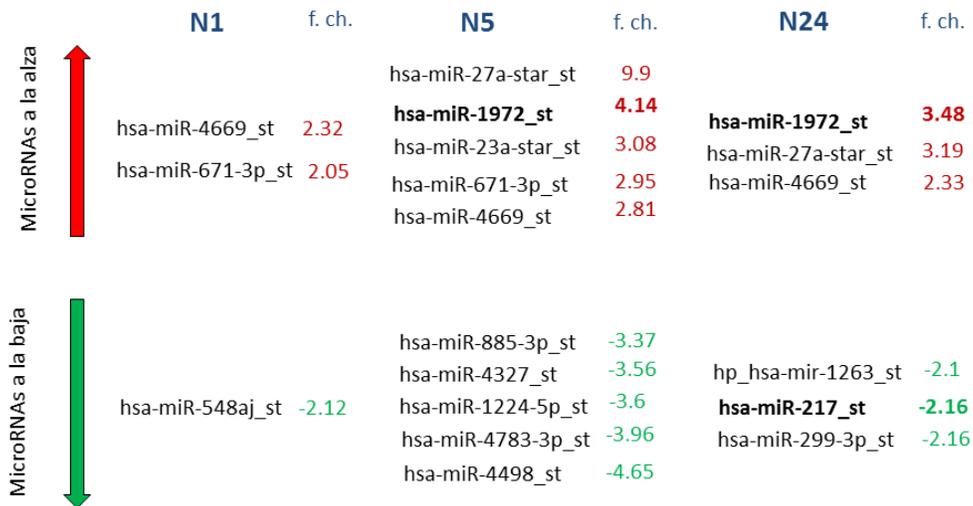


Figura 12. Diagrama con los microRNAs a la alza o a la baja en las condiciones nativas. En el diagrama se muestran de color rojo el fold change de los microRNAs a la alza y en verde los que se encuentran a la baja en las condiciones nativas a los tratamientos de 1h (N1), de 5 h (N5) y 24 h (N24).

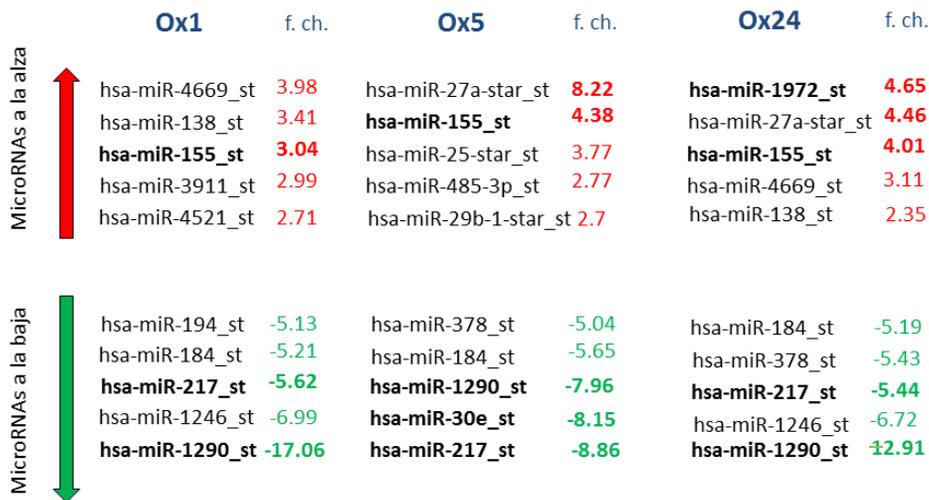


Figura 13. Diagrama con los microRNAs a la alza o a la baja en las condiciones oxidadas. En el diagrama se muestran de color rojo el fold change de los microRNAs a la alza y en verde los que se encuentran a la baja en las condiciones oxidadas a los tratamientos de 1h (Ox1), de 5 h (Ox5) y 24 h (Ox24).

En la figura 12 se muestran los microRNAs que superaron el umbral del fold change en algunas condiciones, destacando a la alza la presencia del miR-27a con un fold change de 9.9 en el tratamiento con LDL nativa al tiempo de las 5h y del miR-1972 con presencia en la condición de las 5h y 24h, este microRNA está asociado en la leucemia linfoblástica aguda (Schotte, D.; 2009). Por otra parte, los microRNAs a la baja con mayor relevancia son el miR-217 con un fold change de -2.16 debido a que se presenta en los 3 tiempos con los tratamientos con LDL oxidada, como se muestra en la figura 13. En esta misma figura, del miR-30e con un fold change de -8.15 a las 5h y del miR-1290 con un fold change de -12.91 a las 24h. Asimismo, los microRNAs con tendencia a la alza con mayor relevancia en los tratamientos con LDL oxidadas fueron el miR-1972 a las 24h de tratamiento, el miR-27a a las 5h de tratamiento y el miR-155 en las tres condiciones, este último es el miRNA con mayor número de reportes para la patogénesis de la aterosclerosis (Ma, X.; 2013) y además, Zhu muestra una relación con este microRNA y la inhibición de la apoptosis inducida por LDL oxidadas en células RAW 264.7 (Zhu, G.F.; 2013), además de estar asociado con la vía de señalización Jak/Stat (Persson, J.L.; 2013) y con la regulación de la polarización de las células mieloides en la esclerosis múltiple (Moore, C.S.; 2013).

En la figura 14 se muestra el clúster jerárquico de los 98 microRNAs que superaron el umbral en alguna de las condiciones. Un clúster jerárquico puede ser interpretado usando los árboles binarios estándar. El tronco representa todo el conjunto de datos y es el nivel cero. Las entradas subsecuentes (o nodos) corresponden a los subconjuntos de datos (Aggarwal, C. C.; 2014). En un ejemplo se muestra el clúster jerárquico con respecto a los tratamientos, en el que se muestra que tanto en las condiciones nativas como oxidadas las condiciones más parecidas son las de los tratamientos a las 5h y 24h. Por otro lado, con respecto a los microRNAs, la mayoría muestra una tendencia a permanecer al alza en las condiciones oxidadas.

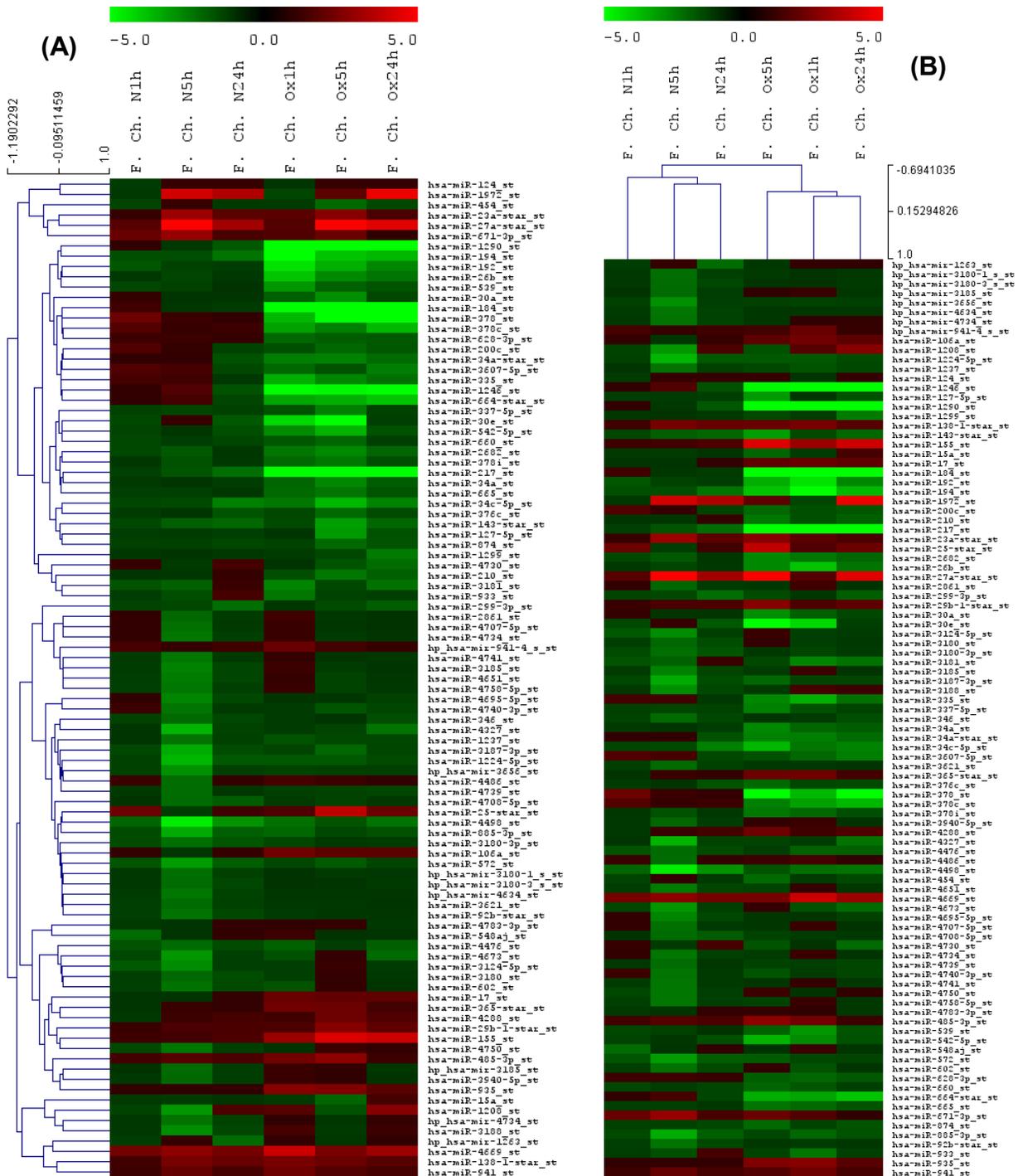


Figura 14. Clúster jerárquico de los microRNA a la alza o a la baja. **A.** Se muestra el clúster jerárquico con base en la relación que guarda el comportamiento de los microRNAs entre sí, en las diferentes condiciones. **B.** Se muestra el clúster jerárquico con base en la relación que guarda los tratamientos con base en el comportamiento de los microRNAs.

7.3 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LOS MICRORNAs ASOCIADOS A LOS DATOS DE EXPRESIÓN DE MRNA OBTENIDOS EN EL MICROARREGLO DE EXPRESIÓN.

El análisis para correlacionar los resultados obtenidos del mRNA con los resultados obtenidos de los microRNAs, fueron realizados por 3 programas. Para la determinación de la relación se determinó mediante IPA. A continuación se muestran las relaciones altamente probables o probadas experimentalmente, éstas relaciones son asignadas al realizar la rutina de comparar los valores de expresión de los mRNA con los microRNAs para cada tiempo.

Comenzando con los tratamientos con LDL nativas, al tiempo de 1h de tratamiento, únicamente se encontró la siguiente relación:

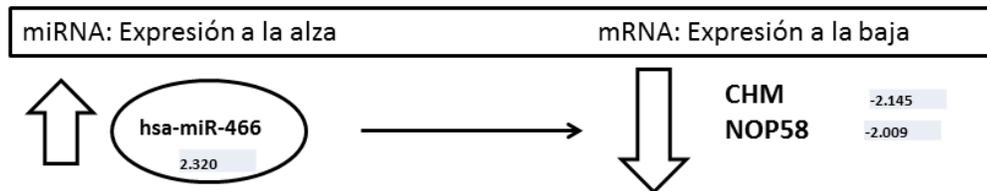


Figura 15. Diagrama de la relación de los microRNAs con el mRNA en las condiciones nativas con 1h de tratamiento. En diagrama se muestra la asociación del miR-466 y 2 mRNA. Además, se muestra el fold change tanto del microRNA como de los mRNA.

Los genes asociados al miR-466 cuando tiene tendencia al alza, fueron 2 mRNA con tendencia a la baja: la proteína chaperona de RAP 1 (CHM) la cual está relacionada con el complejo Rab geraniltransferasa y con la riboproteína NOP58, el cual ha sido encontrado como sitio de unión de snoRNA.

En la tabla 1 se muestran las funciones de redes asociadas, donde se puede observar que en este tiempo, las funciones primordiales de las VSMC en respuesta a las LDL nativas, es la de crecimiento y proliferación celular, replicación de DNA y expresión génica.

Funciones de redes asociadas	score
Desordenes de tejido conectivo, desordenes en el desarrollo, expresión génica	2
Crecimiento y proliferación celular, función y desarrollo del sistema reproductivo, modificaciones post-traduccionales	2
Crecimiento y proliferación celular, ciclo celular, replicación de DNA, recombinación y reparación	2

Tabla 1. Valor de score de las funciones de redes asociadas en las condiciones nativas con 1h de tratamiento. Se tuvieron 3 valores de 2, lo cual es poco comparado con otras condiciones, para las funciones de redes mostradas en la tabla, especialmente con la de crecimiento y proliferación celular, replicación de DNA y expresión génica.

El valor de score de las funciones de redes asociadas fue determinada con los genes asociados al alza y a la baja con los microRNAs, que tuvieron un fold change mayor a 2 o menor a -2 en el microarreglo y además, no importaba que tuviera una relación baja o media estadísticamente con el microRNA, incluyendo los reportados en la figura 15 que presentan los genes con una relación estadística alta o que están probados experimentalmente. Este análisis se obtiene a partir de la asociación del programa Ingenuity Pathway Analysis, donde se obtienen las listas de los genes asociados, los cuales se someten a un core analysis para la obtención de estas funciones de redes asociadas, dando importancia a éstas por su score value, que a mayor valor es mayor la relación entre los genes.

Por otro lado, a las 5h de tratamiento con LDL nativas se encontró la siguiente relación:

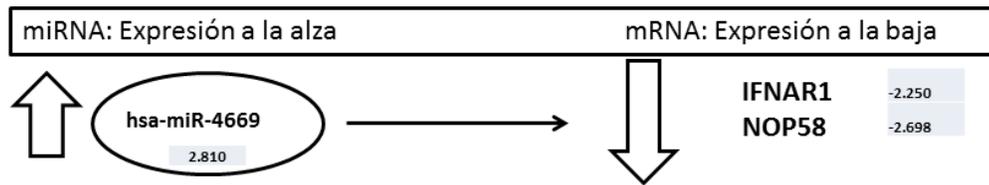


Figura 16. Diagrama de la relación de los microRNAs con el mRNA en las condiciones nativas con 5h de tratamiento. En diagrama se muestra la asociación del miR-4669 y 2 mRNA. Además, se muestra el fold change tanto del microRNA como de los mRNA.

Los genes asociados al miR-4669 cuando tiene tendencia al alza, fueron 2 mRNA con tendencia a la baja: El receptor de interferón 1 (IFNAR1) y el NOP58.

En la tabla 2 se muestran las funciones de redes asociadas, donde se puede observar que en este tiempo, las funciones primordiales de las VSMC en respuesta a las LDL nativas, son las funciones de supervivencia celular, el ciclo celular y el metabolismo de lípidos, debido al tratamiento.

Funciones de redes asociadas	score
Muerte y supervivencia celular, morfología tumoral, movimiento celular	10
Organización y formación celular, mantenimiento y función celular, ciclo celular	8
Desordenes hereditarios, enfermedades neurológicas, cáncer	8
Expresión génica, desarrollo celular, función y desarrollo del sistema hematológico	7
Metabolismo de fármacos, transporte molecular, metabolismo de lípidos	4

Tabla 2. Valor de score de las funciones de redes asociadas en las condiciones nativas con 5h de tratamiento. Se tuvieron 5 valores donde los mayores fueron de 10 y 8, para las funciones de redes mostradas en la tabla, especialmente con las funciones de supervivencia celular, el ciclo celular y el metabolismo de lípidos.

Por otra parte, las vías que muestran un enrichment score mayor, que se muestran en la tabla 3, son donde se encuentra una desregulación transcripcional del cáncer, la cual puede estar asociada con lo encontrado en donde se implica las funciones de supervivencia y el ciclo celular en la tabla 2.

No se presentan las funciones de redes asociadas, como en las 2 condiciones anteriores, debido a que se tenían más genes relacionados con el microRNA, siguiendo los mismos criterios que para realizar las funciones de redes asociadas. Además, que el análisis para la obtención de las vías en el programa Partek Pathway ofrece un análisis estadístico más robusto que el que ofrece las funciones de redes asociadas del programa Ingenuity Pathway Analysis.

Nombre de la vía	Base de datos	Enrichment score	% genes en la vía
Desregulación transcripcional en cáncer	KEEG	6.26429	0.505051
Metabolismo de arginina y prolina	KEEG	4.79771	4.785990
Vía de señalización Hippo	KEEG	4.78941	3.146100

Tabla 3. Vías metabólicas con mayor enrichment score en las condiciones nativas con 5h de tratamiento. En la tabla se presentan las 3 vías con mayor enrichment score al tiempo de 5h de tratamiento con LDL nativas.

Asimismo, a las 24h de tratamiento con LDL nativas se encontró la siguiente relación:

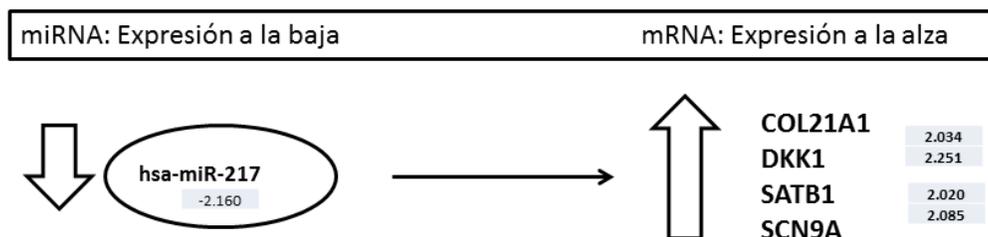


Figura 17. Diagrama de la relación de los microRNAs con el mRNA en las condiciones nativas con 24h de tratamiento. En diagrama se muestra la asociación del miR-217 y 4 mRNA. Además, se muestra el fold change tanto del microRNA como de los mRNA.

Los genes asociados al miR-217 cuando tiene tendencia a la baja, fueron 4 mRNA al alza: Colágeno tipo XXI alfa 1 (COL21A1), inhibidor de la vía de señalización WNT dickkopf (DKK1), homeobox SATB 1 (SATB1) y subunidad alfa del canal de sodio dependiente de voltaje tipo IX (SCN9A).

En la tabla 4 se presentan las funciones de redes asociados, donde las que resaltan son las funciones de interacción célula-célula, desarrollo celular y metabolismo de aminoácidos.

Funciones de redes asociadas	score
Interacción y señalización célula-célula, respuesta inmune mediada por células, movimiento celular	2
Metabolismo de aminoácidos, cáncer, enfermedades cardiovasculares	2
Desarrollo celular, desarrollo y función del sistema digestivo, desarrollo embriológico	2

Tabla 4. *Valor de score de las funciones de redes asociadas en las condiciones nativas con 24h de tratamiento.* Se tuvieron 3 valores iguales de 2, para las funciones de redes mostradas en la tabla, especialmente con las funciones de interacción célula-célula, desarrollo celular y metabolismo de aminoácidos.

Los resultados obtenidos en los tratamientos con LDL oxidadas al tiempo de 1 h muestran que el miR-155, el cual fue relacionado en el proceso patológico de la aterosclerosis, al igual que el miR-106a comienzan a inhibir la expresión de algunos mRNAs, caso contrario a lo que se observa con el comportamiento del miR-30e y el miR-217 en este tiempo.

A continuación se muestra un diagrama con dichas observaciones:

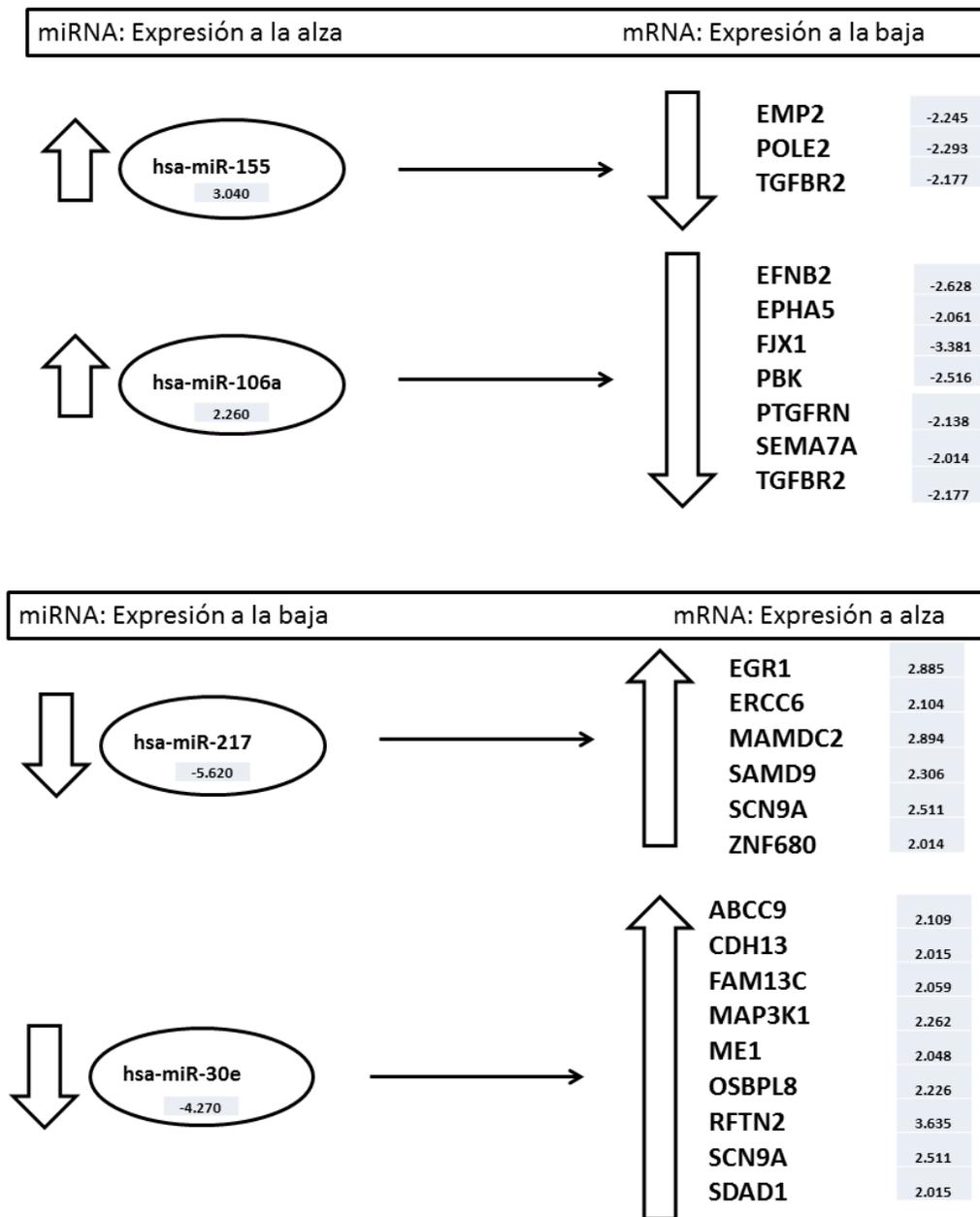


Figura 18. Diagrama de la relación de los microRNAs con el mRNA en las condiciones oxidadas con 1h de tratamiento. En diagrama se muestra la asociación del miR-155 con 3 mRNA, miR-106a con 7 mRNA, miR-217 con 6 mRNA y miR-30e con 9 mRNA. Además, se muestra el fold change tanto del microRNA como de los mRNA.

Los genes asociados al miR-155 cuando tiene tendencia al alza, fueron 3 mRNA con tendencia a la baja: proteína de membrana epitelial 2 (EMP2), subunidad accesoria DNA polimerasa épsilon 2 (POLE2) y del receptor II beta del factor transformante de crecimiento (TGFB2). Por otro lado, los genes asociados al miR-106a cuando tiene tendencia al alza, fueron 7 mRNA con tendencia a la baja: efrina B2 (EFNB2), receptor EPH A5 (EPHA5), caja ensamblada en cuatro 1 (FJX1), cinasa unida a PDZ (PBK), inhibidor del receptor de prostaglandina F2 (PTGFRN), semaforina 7A anclada a membrana (SEMA7A) y del receptor II beta del factor transformante de crecimiento (TGFB2).

En las vías con mayor score de enriquecimiento, que se presentan en la tabla 5 se encuentra el TGFB2, la vía de señalización TGF-beta. Esta vía se encuentra involucrada en la regulación de la proliferación, diferenciación y en la apoptosis de muchas células (Sinobiological; 2014).

Nombre de la vía	Base de datos	Enrichment score	% genes en la vía
Infección HTLV-I	KEEG	5.32202	0.441696
Vía de señalización TGF-beta	KEEG	5.21055	0.835655
Guía de axones	KEEG	4.01640	0.537634

Tabla 5. Vías metabólicas con mayor enrichment score en las condiciones oxidadas con 1h de tratamiento. En la tabla se presentan las 3 vías con mayor enrichment score al tiempo de 1h de tratamiento con LDL oxidadas.

Los genes asociados al miR-217 cuando su expresión se encuentra a la baja son un total de 6 mRNA con expresión al alza, los cuales son: respuesta al crecimiento temprano 1 (EGR1), grupo 6 de complementación cruzada de reparación de escisión (ERCC6), dominio que contiene a MAM (MAMDC2), dominio que contiene al motivo alfa estéril (SAMD9), subunidad alfa del canal de sodio dependiente de

voltaje tipo IX (SCN9A) y proteína dedos de zinc 680 (ZNF680). A su vez, cuando el miR.30e tiene expresión a la baja, tiene 9 mRNA asociados los cuales son: subfamilia C del casete de unión a ATP (ABCC9), caderina 13 (CDH13), miembro C de la familia con secuencia similar 13 (FAM13C), protein-cinasa 1 activada por mitógenos, ligasa E3 de proteína ubiquitina (MAP3K1), enzima citosólica málica 1 dependiente de NADPH (ME1), proteína de unión a oxisterol tipo 8 (OSBPL8), miembro 2 de la familia raftlina (RFTN2), SCN9A y contenedor 1 del dominio SDA1 (SDAD1). Cabe destacar, que tanto el miR-30e como el miR-217 están regulando al alza la expresión de SCN9A.

Por otro lado las funciones de redes celulares, que se muestran en la tabla 6, con mayor score son las implicadas en el crecimiento y proliferación celular; además de la organización y formación celular. La primera relacionada con la implicación de la vía de señalización TGF-beta.

Funciones de redes asociadas	score
Crecimiento y proliferación celular, cáncer, enfermedades gastrointestinales	4
Organización y formación celular, desarrollo celular, crecimiento y proliferación celular	4
Metabolismo de ácidos nucleicos, bioquímica de moléculas pequeñas, cáncer	2
Expresión génica, Modificaciones post-transcripcionales, desordenes en tejido conectivo	2
Interacción y señalización célula-célula, función y desarrollo del sistema hematológico, tráfico de células inmunes.	2

Tabla 6. Valor de score de las funciones de redes asociadas en las condiciones oxidadas con 1h de tratamiento. Se tuvieron 2 valores iguales de 4 y 3 valores iguales de 2, para las funciones de redes mostradas en la tabla, especialmente crecimiento y proliferación celular; además de la organización y formación celular.

A las 5 horas de tratamiento con LDL oxidadas, los microRNAs implicados se muestran en las figuras 19 y 21.

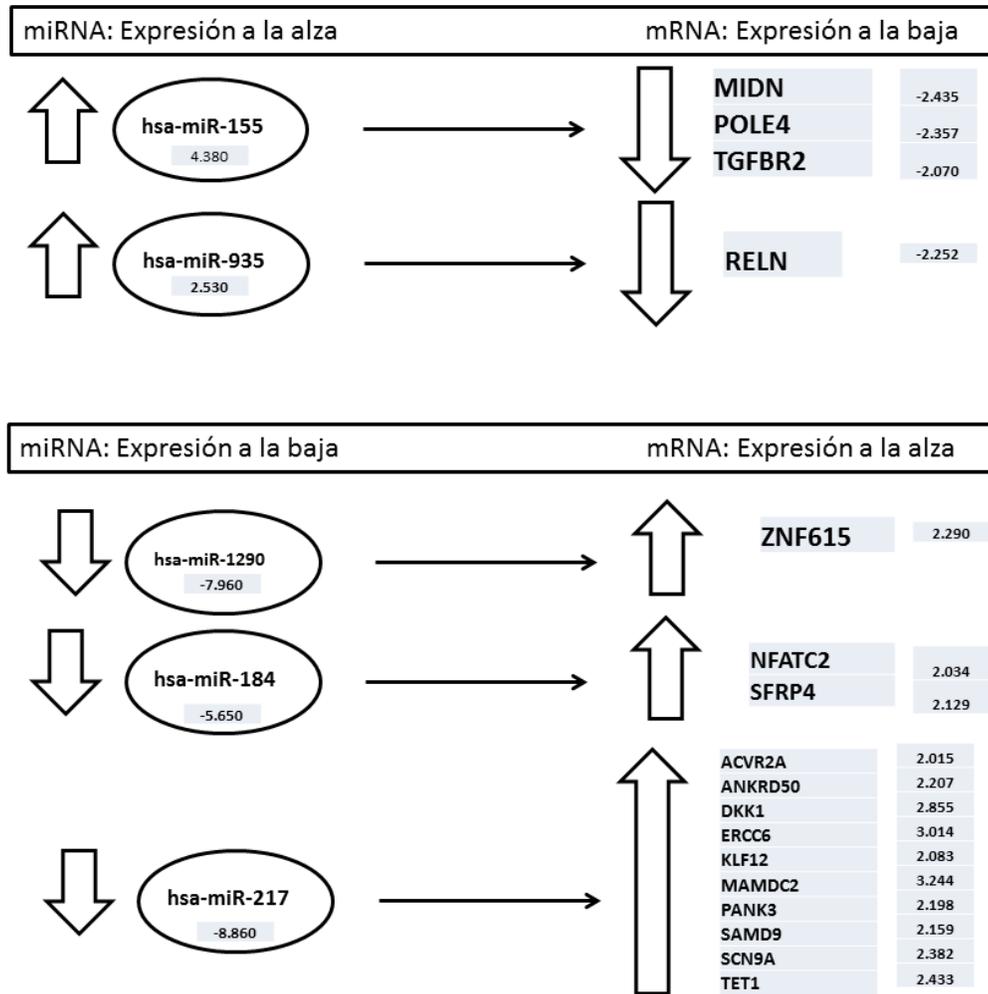


Figura 19. Diagrama de la relación de los microRNAs con el mRNA en las condiciones oxidadas con 5h de tratamiento. En diagrama se muestra la asociación del miR-155 con 3 mRNA, miR-935 con 1 mRNA, miR-217 con 10 mRNA, miR-1290 con 1 mRNA y miR-184 con 1 mRNA. Además, se muestra el fold change tanto del microRNA como de los mRNA.

Los genes asociados al miR-155 cuando tiene tendencia al alza, fueron 3 mRNA con tendencia a la baja: midnolina (MIDN), subunidad accesoria DNA polimerasa épsilon 2 (POLE2) y del receptor II beta del factor transformante de crecimiento

(TGFBR2). Por otro lado, el gen asociado con tendencia a la baja al miR-935 cuando tiene tendencia al alza fue reelina (RELN).

Cabe resaltar, que sigue teniendo la misma implicación la vía de señalización de TGF-beta con el miR-155 que a la condición de 1h, como se muestra en las vías con mayor enrichment score en la tabla 7.

	Base de datos	Enrichment score	% genes en la vía
Vía de señalización TGF-beta	KEEG	8.69562	1.67131
Vía de señalización WNT	KEEG	7.18720	1.25786
Carcinoma en células renales	KEEG	7.01129	1.52905

Tabla 7. *Vías metabólicas con mayor enrichment score en las condiciones oxidadas con 5h de tratamiento.* En la tabla se presentan las 3 vías con mayor enrichment score, el cual representa las vías con mayor representación de genes que cruzaron el umbral, al tiempo de 5h de tratamiento con LDL oxidadas.

Asimismo, los genes asociados al miR-217 cuando su expresión se encuentra a la baja son un total de 10 mRNA: grupo 6 de complementación cruzada de reparación de escisión (ERCC6), dominio que contiene a MAM (MAMDC2), dominio que contiene al motivo alfa estéril (SAMD9), subunidad alfa del canal de sodio dependiente de voltaje tipo IX (SCN9A), inhibidor de la vía de señalización WNT dickkopf (DKK1), receptor tipo IIA de activina A (ACVR2A), ankirina repetida del dominio 50 (ANKRD50), factor 12 tipo Kruppel (KLF12), ankirina 3 (ANK3) y dioxigenasa metilcitosina tet 1 (TET1). El gen asociado con tendencia al alza al miR-1290 cuando tiene tendencia a la baja fue la proteína dedos de zinc 615 (ZNF615). Por otro lado, los genes asociados al miR-184 cuando su expresión se encuentra a la baja, son un total de 2 mRNA: factor nuclear activador de células T (NFATC2) y la proteína 4 relacionada con la secreción frizzled (SFRP4).

Sale a relucir que el miR.217 puede tener influencia en la vía de señalización WNT, mediante la regulación de DKK1, y por ello su presencia entre las principales vías con enrichment score elevado. La vía de señalización WNT es una vía conservada evolutivamente que regula aspectos cruciales de la determinación del destino de la célula, la polaridad, migración y organogénesis durante el desarrollo embrionario (Komiya, Y.; 2008). La vía de señalización se presenta a a continuación, junto con los genes implicados.

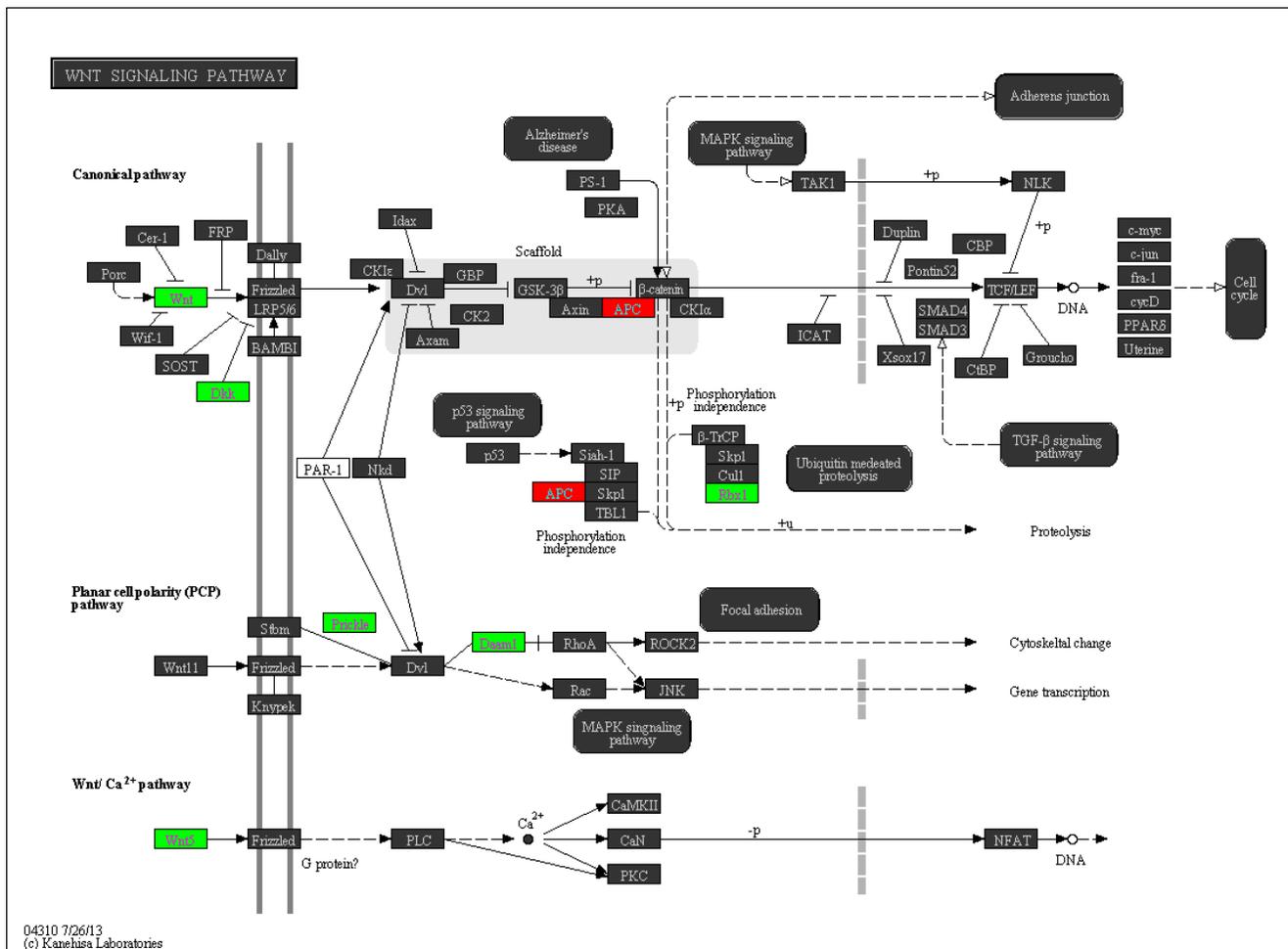


Figura 20. Vía de señalización Wnt con los mRNA al alza o a la baja en las condiciones con tratamiento con LDL oxidada a las 5h. En la figura se presenta la vía de señalización Wnt, presentando los genes a la alza en rojo y los genes a la baja en verde.

Se seleccionó esta vía sobre TGF-beta, debido a que se encuentra presente únicamente en esta condición, y dada la plasticidad de las células para cambiar su fenotipo y que la vía de Wnt está relacionada con el destino de la célula, lo que puede explicar más el aumento en el número de genes en comparación con las condiciones a las 24h y a la 1 h.

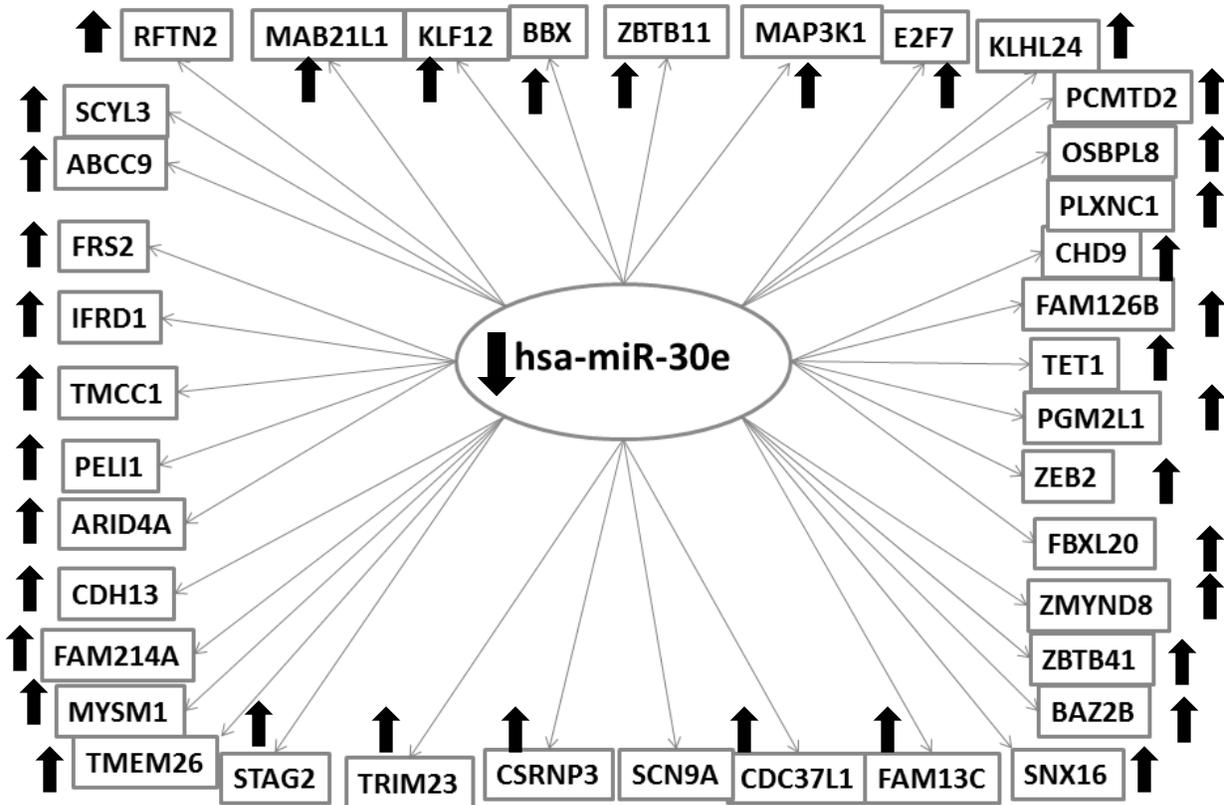


Figura 21. Diagrama de la relación del miR-30e con los mRNA en las condiciones oxidadas con 5h de tratamiento. En diagrama se muestra la asociación del miR-30e con 38 mRNA. En verde se muestran la tendencia a la baja del miR-30e y en rojo la tendencia al alza de los mRNA.

A su vez, cuando el miR-30e tiene expresión a la baja, tiene 38 mRNA asociados los cuales son: subfamilia C del casete de unión a ATP (ABCC9), caderina 13 (CDH13), miembro C de la familia con secuencia similar 13 (FAM13C), proteína- cinasa 1 activada por mitógenos, ligasa E3 de proteína ubiquitina (MAP3K1), enzima citosólica málca 1 dependiente de NADPH (ME1), proteína de unión a

oxisterol tipo 8 (OSBPL8), miembro 2 de la familia raftlina (RFTN2), SCN9A y contenedor 1 del dominio SDA1 (SDAD1), dioxigenasa metilcitosina tet 1 (TET1), miembro de la familia tipo kelch 24 (KLHL24), dedos de zinc y dominio contenedor de BTB 11 (ZBTB11), factor tipo Kruppel 12 (KLF12), mab 21 tipo 1 (MAB21L1), regulador relacionado con el desarrollo de interferón 1 (IFRD1), sustrato 2 del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FRS2), fosfoglucomutasa 2 tipo 1 (PGM2L1), dominio en espiral de bobina de la familia 1 y transmembranal (TMCC1), ubiquitin-protein-ligasa 1 de pellino E3 (PELI1), SCY1 tipo 3 (SCYL3), dedos de zinc tipo MYND 8 (ZMYND8), homeobox 2 unido a caja E de dedos de zinc (ZEB2), plexina C1 (PLXNC1), dominio 4A de interacción rico en AT (ARID4A), miembro A de la familia con la secuencia similar a la 214 (FAM214A), miembro C de la familia con secuencia similar a la 13 (FAM13C), dedos de zinc y dominio contenedor de BTB 41 (ZBTB41), proteína 9 de unión al cromodominio de DNA helicasa (CHD9), dominio 2 que contiene protein-L-isoaspartato (D-aspartato) O-metiltransferasa (PCTMD2), miembro 2 de la familia raftlina (RFTN2), proteína 13 de unión al cromodominio de DNA helicasa (CHD13), miembro B de la familia con la secuencia similar a la 126 (FAM126B), factor de transcripción 7 de E2F (E2F7), proteína 37 tipo 1 de unión al cromodominio de DNA helicasa (CHD37L1), clasificación de nexina 16 (SNX16), proteína 20 con caja F y secuencia rica en leucina (FBXL20), homólogo de Bobby sox (BBX), dominio 1 de MPN y SWIRM tipo Myb (MYSM1), motivo contenedor de tripartita 23 (TRIM23), proteína nuclear 3 rica en cisteína y serina (CSRNP3), bromodominio adyacente al dominio 2B de dedos de zinc (BAZ2B), proteína transmembranal 26 (TMEM26) y antígeno estromal 2 (STAG2).

En este listado, destacan los genes implicados tanto en la vía de señalización Wnt y los genes implicados en la vía de TGF-beta.

En este listado, se muestran los genes implicados con el miR-30e, ya que el aumento en el número de genes se ve relacionado con varios implicados en las vías con mayor enrichment score de Partek Pathway.

A las 24 horas de tratamiento con LDL oxidadas, los microRNAs implicados se muestran en las figuras 22 y 23.

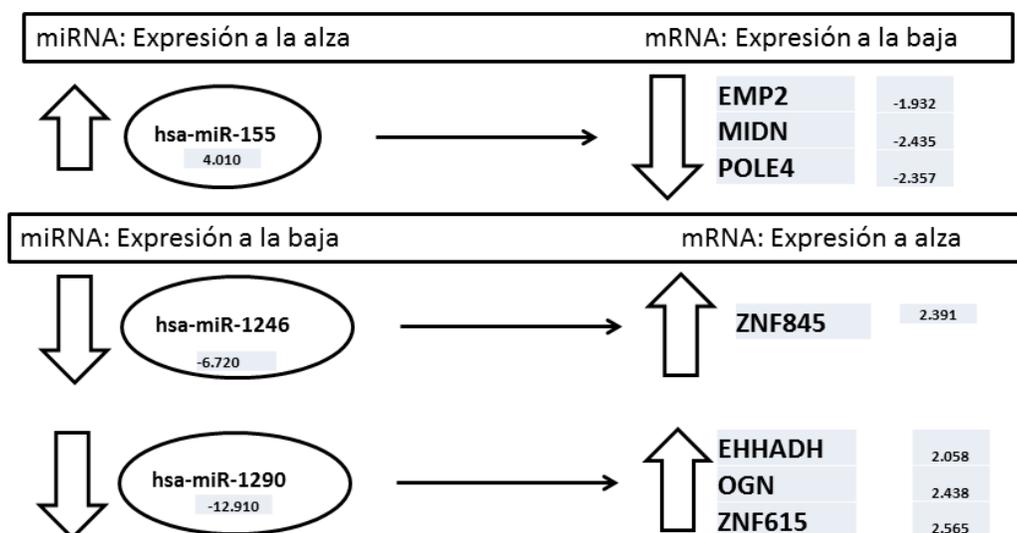


Figura 22. Diagrama de la relación de los microRNAs con el mRNA en las condiciones oxidadas con 24h de tratamiento. En diagrama se muestra la asociación del miR-155 con 3 mRNA, miR-1246 con 1 mRNA, miR-1290 con 3 mRNA. Además, se muestra el fold change tanto del microRNA como de los mRNA.

Los genes asociados al miR-155 cuando tiene tendencia al alza, fueron 3 mRNA con tendencia a la baja: midnolina (MIDN), subunidad accesoria DNA polimerasa épsilon 2 (POLE2) y la proteína de membrana epitelial 2 (EMP2). Por otro lado, el gen asociado con tendencia a la alza al miR-1246 cuando tiene tendencia a la baja fue la proteína de dedos de zinc 845 (ZNF845). Además, los genes asociados al miR-1290 cuando tiene tendencia al alza, fueron 3 mRNA con tendencia a la baja: hidratasa 3-hidroxiacil coenzima A deshidrogenasa (EHHADH), osteoglicina (OGN) y la proteína de dedos de zinc 615 (ZNF615).

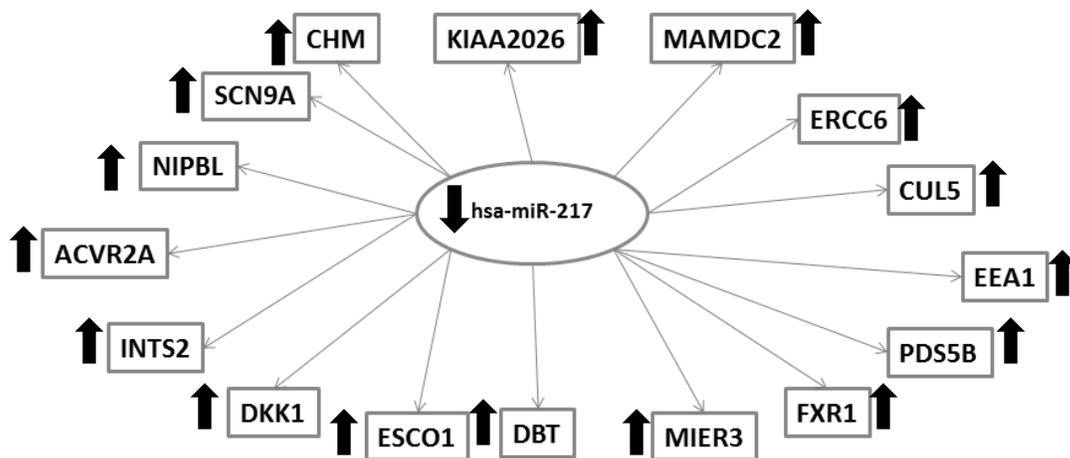


Figura 23. Diagrama de la relación del miR-217 con los mRNA en las condiciones oxidadas con 24h de tratamiento. En diagrama se muestra la asociación del miR-217 con 16 mRNA. En verde se muestran la tendencia a la baja del miR-217 y en rojo la tendencia al alza de los mRNA.

Los genes asociados al miR-217 cuando su expresión se encuentra a la baja son un total de 16 mRNA: grupo 6 de complementación cruzada de reparación de escisión (ERCC6), dominio que contiene a MAM (MAMDC2), subunidad alfa del canal de sodio dependiente de voltaje tipo IX (SCN9A), inhibidor de la vía de señalización WNT dickkopf (DKK1), receptor tipo IIA de activina A (ACVR2A), ankirina repetida del dominio 50 (ANKRD50), factor 12 tipo Kruppel (KLF12), ankirina 3 (ANK3), KIAA2026, culina 5 (CUL5), regulador homólogo B de cohesión de mantenimiento de PDS5 (PDS5B), miembro de la familia 3 de inducción de respuesta temprana del mesodermo 1 (MIER3), establecimiento de la cohesión de N-acetiltransferasa 1 de la cromátida hermana (ESCO1), subunidad 2 del complejo integrador (INTS2), homólogo de Nipped B (NIPBL), proteína chaperona de Rab 1 (CHM) y transciclase E2 unida a la ramificación de dihidrolipoamida (DBT).

Nombre de la vía	Base de datos	Enrichment score	% genes en la vía
Vía de señalización TGF-beta	KEEG	7.74539	1.392760
Infección HTLV-I	KEEG	5.61244	0.618375
Endocitosis	KEEG	5.59540	0.709220

Tabla 8. Vías metabólicas con mayor enrichment score en las condiciones oxidadas con 24h de tratamiento. En la tabla se presentan las 3 vías con mayor enrichment score al tiempo de 24h de tratamiento con LDL oxidadas.

EEA1, que se encuentra regulado por miR-217, se encuentra implicado en las vías de endocitosis tanto la dependiente como la independiente de clatrina, y esta vía se encuentra entre las 3 con mayor enrichment score a las 24 h de tratamiento con LDL oxidadas como se muestra en la tabla 8. La endocitosis mediada por clatrina es el portal endocítico en las células a través del cual la carga se empaqueta en vesículas con la ayuda de una capa de clatrina (McMahon, H. T.; 2011). En años recientes, se encontró que en la vía de endocitosis no dependiente de clatrina, las lisozimas son el primer compartimento catabólico de las células eucariotas (Donaldson, J. G.; 2011).

Esta vía de endocitosis tiene relevancia, debido a que la internalización de la LDL tanto nativa como oxidada comienza a tener relevancia hasta este tiempo. Lo que implica, que encontrando la vía principal de endocitosis, ya sea la dependiente o no dependiente de clatrin, se puede comprender mejor la fisiopatología de la aterosclerosis en las células de músculo liso vascular.

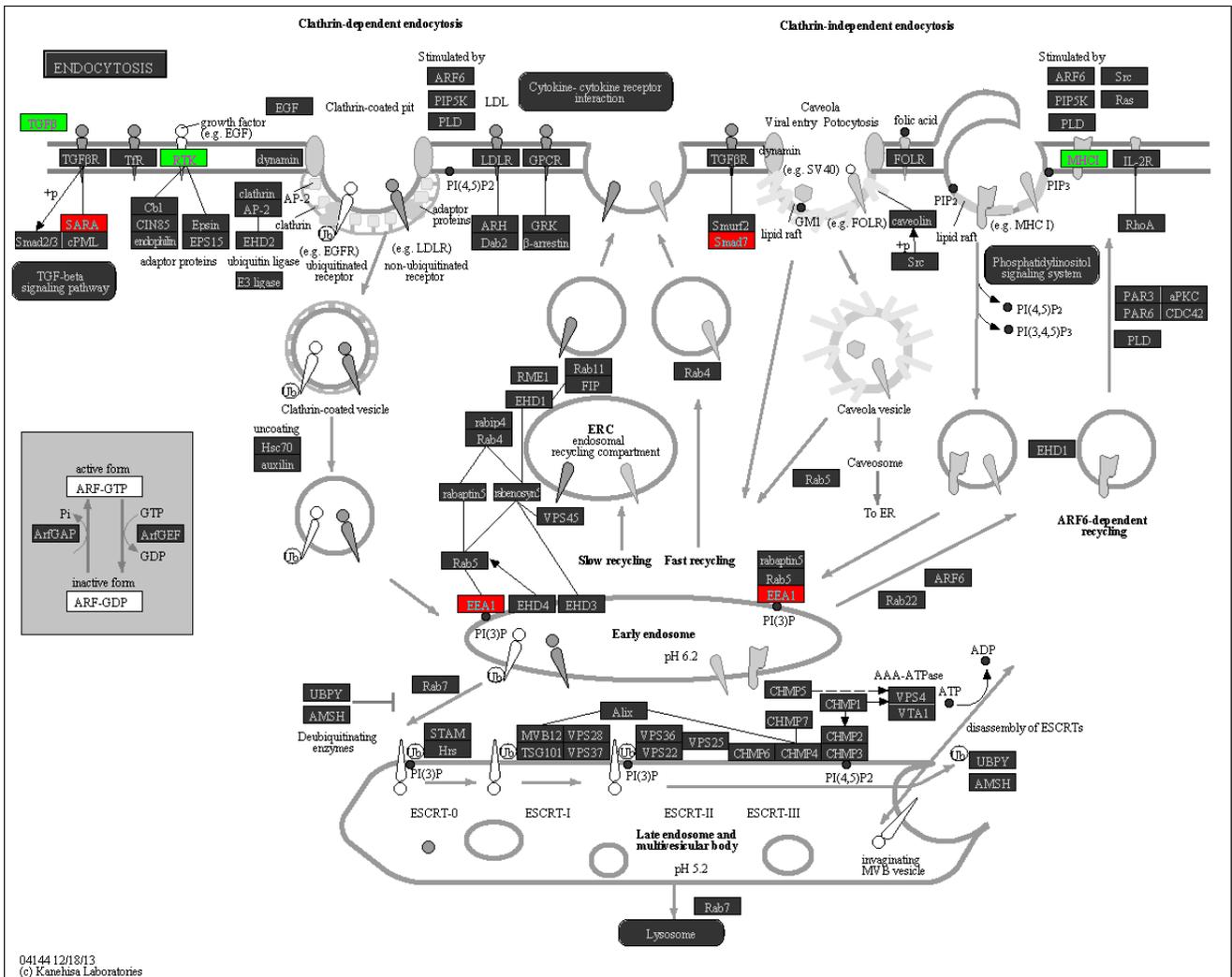


Figura 24. Vías de endocitosis con los mRNA al alza o a la baja en las condiciones con tratamiento con LDL oxidada a las 24h. En la figura se presentan las vías de endocitosis, tanto la dependiente como independiente de clatrina, presentando los genes al alza en rojo y los genes a la baja en verde.

En la figura 25 se observa un panorama global de los microRNAs y su interacción con diversos mRNA. Donde también se observa que un mRNA puede estar regulado por más de un microRNA.

Esta figura tiene relevancia porque resume la importancia de pocos microRNAs asociados con la internalización de LDLs nativas y oxidadas, están relacionados con una gran cantidad de genes, lo que proveería un patrón para predecir tempranamente el desarrollo de los cambios fenotípicos en estas células.

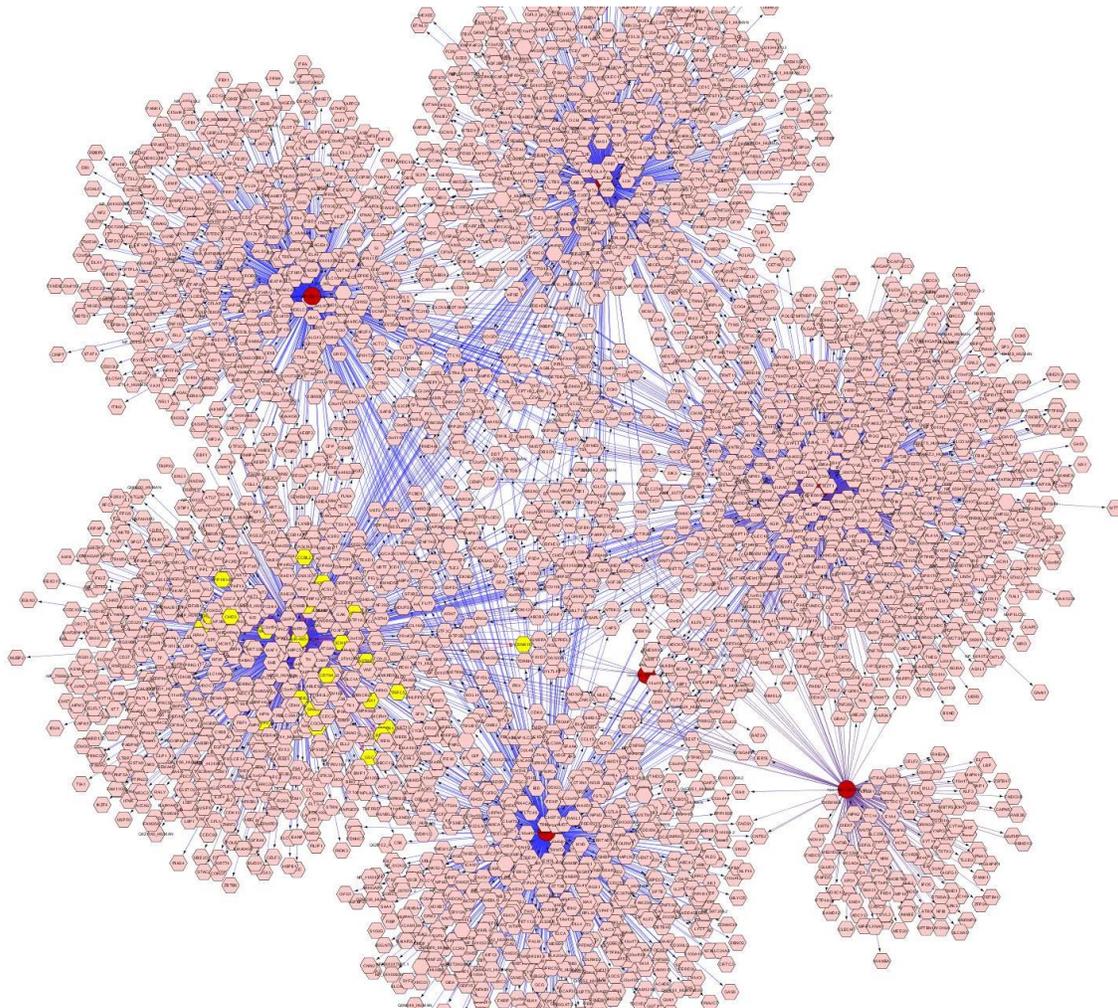


Figura 25. Red de genes asociados a los microRNAs para las condiciones tanto nativas como oxidadas. En el diagrama de la red celular, se muestran como nodos centrales los microRNA que son significativos y alrededor se presentan los genes asociados, encontrados en las bases de datos utilizadas por el plugin CyTargetLynker.

En un panorama más general, los microRNAs encontrados con mayor relevancia, según esté análisis de asociación entre los valores de expresión de los microRNAs con los mRNA, fueron el miR-155 y el miR-217 debido a su relación con diferentes vías relacionadas con el proceso de diferenciación que sufren las células durante los procesos de internalización de lipoproteínas de baja densidad. El miR-217 en

especial, tiene cierta relevancia ya que tiene relación con la vía de endocitosis de las LDLs y además con otras vías importantes.

7.4 VALIDACIÓN DEL MICROARREGLO DE EXPRESIÓN.

La realización de PCR en tiempo real es el método de validación más común utilizado para confirmar los resultados de expresión obtenidos a través de un microarreglo de expresión (Morey, J. S.; 2006). Para la validación del microarreglo de expresión GeneChip® miRNA 3.0 Array de la marca Affymetrix, se utilizaron los ensayos TaqMan® de 3 microRNAs con tendencia de expresión al alza (miR-155, miR-1972 y miR-27a) y 3 microRNAs con tendencia a la baja (miR-30e, miR-217 y miR-1290).

A continuación se muestran las gráficas de los niveles de expresión relativa de los microRNAs con tendencia al alza, validados por PCR en tiempo real:

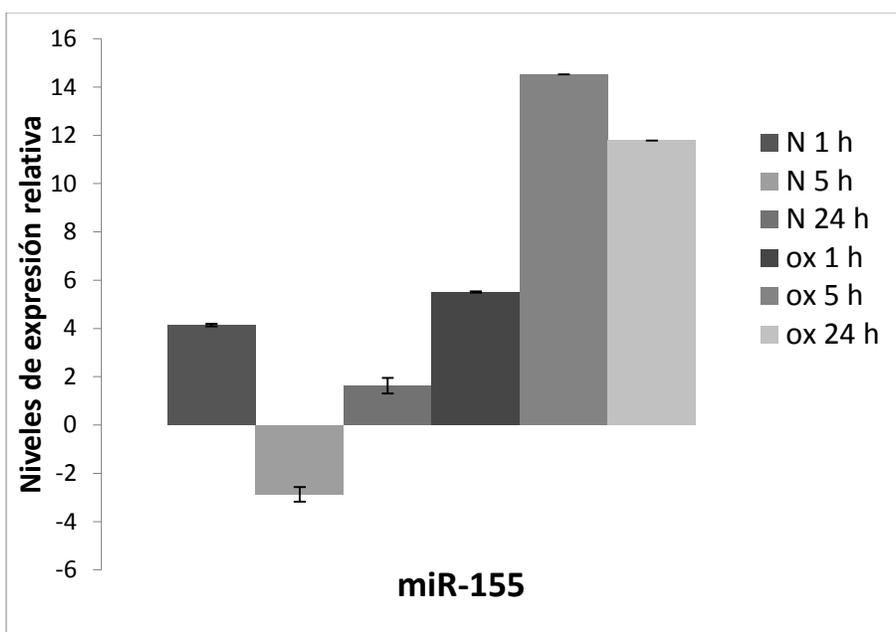


Figura 26. Validación por PCR en tiempo real del miR-155. Gráfica donde se muestra la expresión relativa de las condiciones nativas y oxidadas. En ella se muestra la tendencia al alza en las condiciones oxidadas observada en la plataforma del microarreglo de expresión.

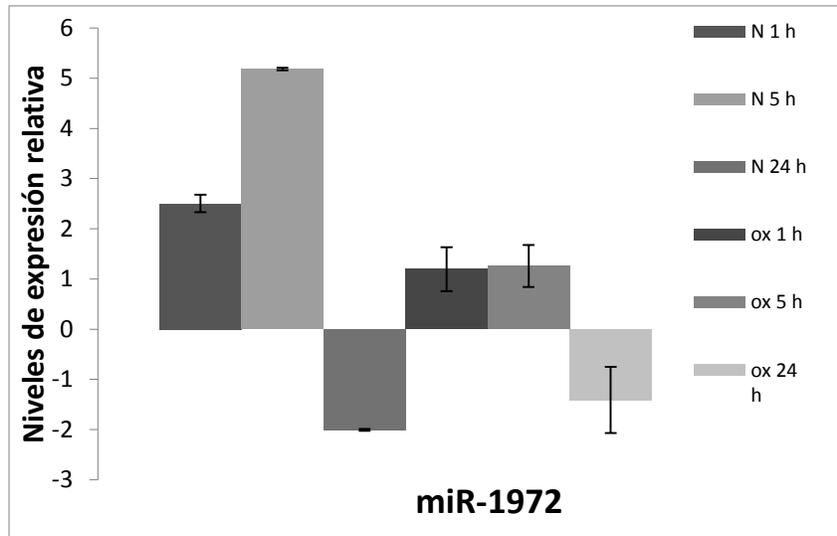


Figura 27. Validación por PCR en tiempo real del miR-1972. Gráfica donde se muestra la expresión relativa de las condiciones nativas y oxidadas. En ella se muestra la tendencia al alza observada en la plataforma del microarreglo de expresión.

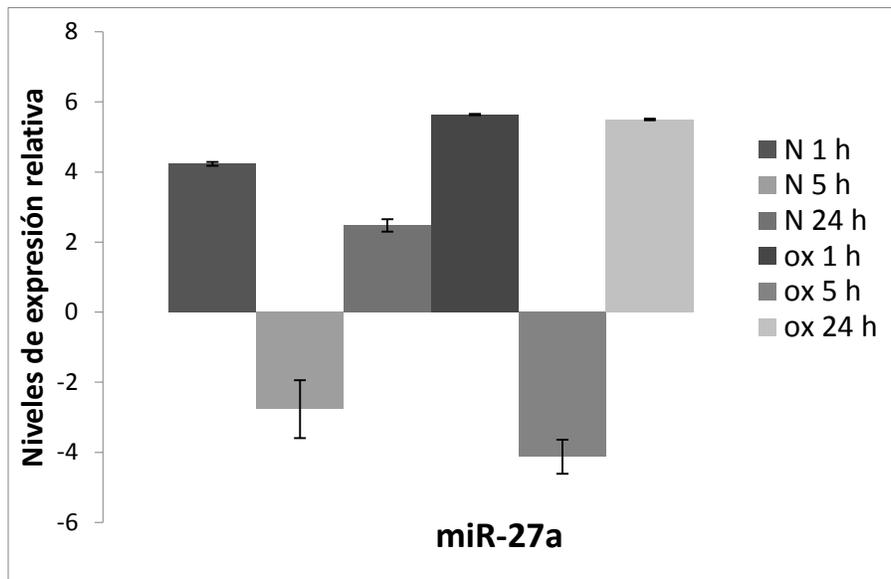


Figura 28. Validación por PCR en tiempo real del miR-27a. Gráfica donde se muestra la expresión relativa de las condiciones nativas y oxidadas. En ella se muestra la tendencia al alza observada en la plataforma del microarreglo de expresión.

Por otro lado, en seguida se muestran las gráficas de los niveles de expresión relativa de los microRNAs con tendencia a la baja, validados por PCR en tiempo real:

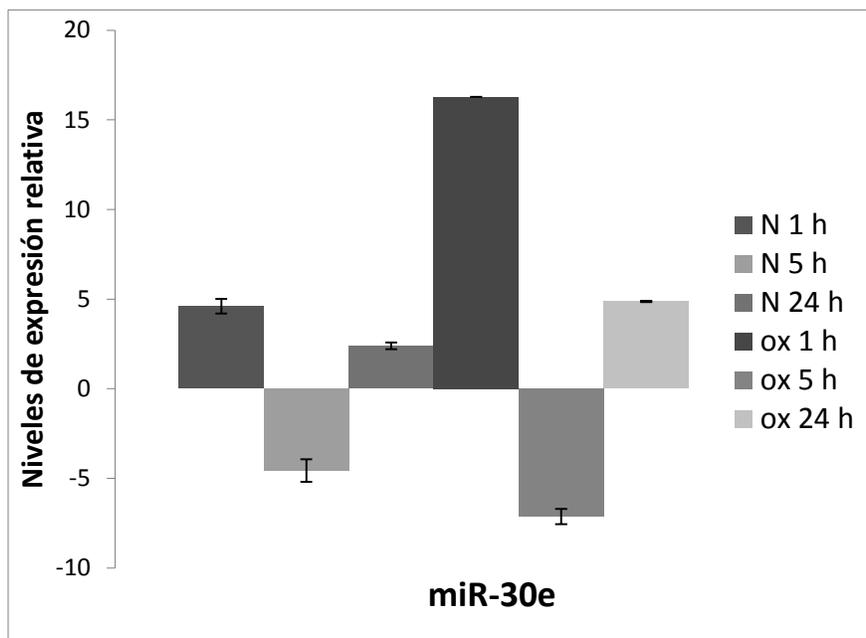


Figura 29. Validación por PCR en tiempo real del miR-30e. Gráfica donde se muestra la expresión relativa de las condiciones nativas y oxidadas. En ella se muestra la tendencia a la baja observada en la plataforma del microarreglo de expresión.

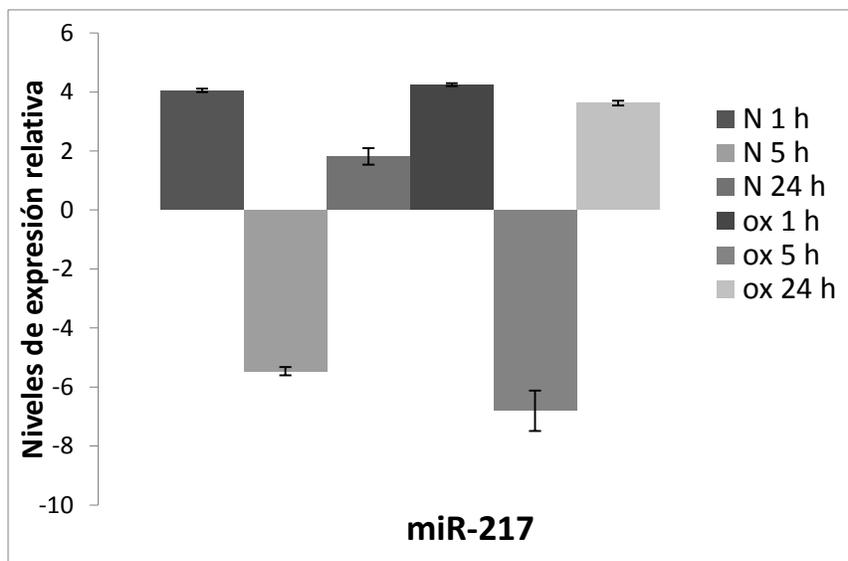


Figura 30. Validación por PCR en tiempo real del miR-217. Gráfica donde se muestra la expresión relativa de las condiciones nativas y oxidadas. En ella se muestra la tendencia a la baja observada en la plataforma del microarreglo de expresión.

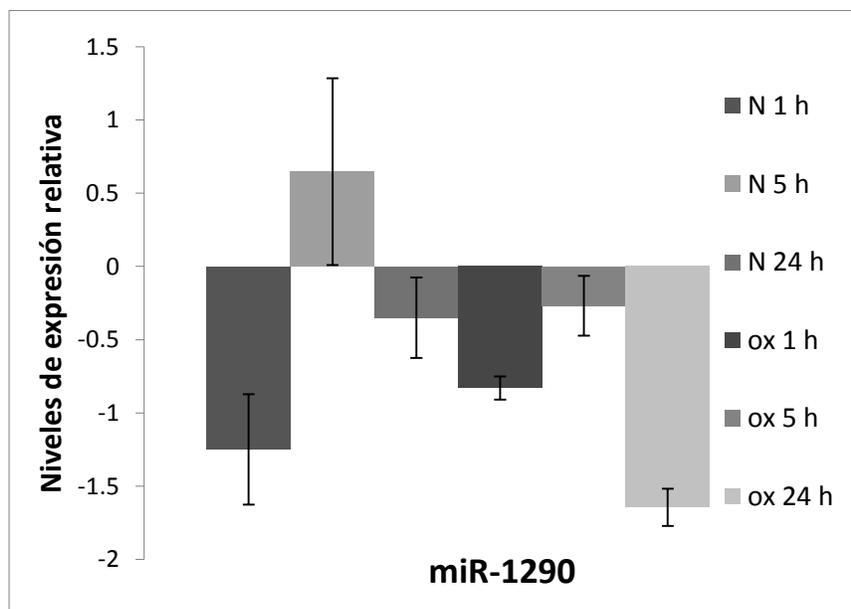


Figura 31. Validación por PCR en tiempo real del miR-1290. Gráfica donde se muestra la expresión relativa de las condiciones nativas y oxidadas. En ella se muestra la tendencia a la baja observada en la plataforma del microarreglo de expresión.

En los 6 microRNAs, se puede observar que la tendencia se mantiene conforme a lo obtenido en el microarreglo de expresión. La variabilidad tanto biológica como de procedimientos de ambas técnicas no puede ser controlada (Morey, J. S.; 2006); por lo que esta variabilidad no permite tener resultados idénticos, pero puede demostrar la tendencia observada en la técnica de microarreglos.

Las variaciones en ciertas condiciones de la validación de los microRNA se puede deber a que fueron 2 extracciones diferentes de RNA total, lo que implica una variabilidad biológica entre las muestras, principalmente en la capacidad de internalizar las LDLs tanto nativas como oxidadas de las células.

8.0 CONCLUSIONES

- Los microRNAs al alza con más alto fold change, fue el miR-27a en los tratamientos con LDL nativas y en las condiciones oxidadas fue el miR-155; mientras que el miR-1972 fue en ambas condiciones.
- Los microRNAs a la baja con más bajo fold change fueron el miR-30e y el miR-1290 en las condiciones oxidadas, mientras que el miR-217 fue en ambas condiciones.
- El miR-155 se encontró asociado a la vía de señalización TGR-beta por la regulación TGFBR2.
- El miR-217 y el miR-30e se encontraron asociados con la vía de señalización de WNT mediante la regulación de DKK1.
- El miR-217 se encuentra asociado con las vías de endocitosis dependientes e independientes de clatrina mediante la regulación de EEA1.
- La validación de los 3 microRNAs al alza (miR-27a, miR-155 y miR-1972) y los 3 microRNAs a la baja (miR-30e, miR-217 y miR-1290), en el PCR en tiempo real tuvieron la misma tendencia a la mostrada en el microarreglo de expresión.
- Se encontró que pocos microRNAs están relacionados con muchos mRNA, tal y como se describe en la literatura, pero a nivel global se logra destacar el papel del miR-217 y el miR-155 en la regulación de diferentes genes relacionados en vías importantes en el cambio fenotípico de las VSMC.

9.0 PERSPECTIVAS

- Realizar un ensayo funcional, mediante la acción de un RNA de interferencia (siRNA), para inhibir la acción de los microRNAs miR-155, miR-217 y miR-30e para comprobar los cambios fenotípicos en la línea celular de VSMC.
- Volver a determinar los niveles de expresión del microRNA dado, para poder atribuir el efecto fenotípico a la disminución de la expresión del microRNA.

10.0 REFERENCIAS

- 1) “Para la prevención, tratamiento y control de las dislipidemias” Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA2-2012. Diario Oficial de la Federación. 13 de julio de 2012.
- 2) Aggarwal, C.C. & Reddy, C. K. (2014) Data clustering. Algorithms and applications. CRC Press. USA. 101.
- 3) Ambros, V.; et al (2003) A uniform system for microRNA annotation. *RNA*. **9**. 277-279.
- 4) Ambros, V.; et al (2003) MicroRNA and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr. Biol.* **13**. 807-818.
- 5) Arredondo, A.; et al (2000) Financial consequences of changes in health care demands related to tobacco consumption in Mexico: Information for policy makers. *Health Policy*. **61**(1). 43-45.
- 6) ATCC. *CRL-1999* Recuperado el 15-octubre.2014, de <http://www.atcc.org/~media/304556297A964992AE400BBB921F1E8B.ashx>
- 7) Babiarz, J. E.; et al. (2008) Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes Dev.* **22**. 2773-2785.
- 8) Berezikov, E.; et al (2007) Mammalian mirtron genes. *Mol. Cell.* **28**. 328-336.
- 9) Berk, B. C. (2001) Vascular smooth muscle growth: Autocrine growth mechanisms. *Physiological Reviews*. **81**(3). 999-1030

- 10)Boettger, T.; et al (2009) Acquisition of the contractile phenotype by murine arterial smooth muscle cells depends on the miR 143/145 gene cluster. *J Clin Invest.* **119**. 2634-2647.
- 11)Cecchetti, A.; et. al. (2011) Vascular smooth-muscle-cell activation: Proteomics point of view. *International Review of Cell and Molecular Biology.* **288**. 43-99.
- 12)Cheng, Y.; et al (2009) MicroRNA-145, a novel smooth muscle cells phenotypic marker and modulator, controls vascular neointimal lesion formation. *Cir Res.* **105**. 158-166.
- 13)Chiang, H. R.; et al. (2010) Mammalian microRNAs: Experimental evaluation of novel and previously annotated genes. *Genes Dev.* **24**. 992-1009.
- 14)Cordes, K. R.; et al (2009) miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature.* **460**. 705-710
- 15)Czech, B.; et al. (2011) Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nat Rev Genet.* **12**. 19-31.
- 16)Davis, B. N.; et al (2008) Induction of microRNA-221 by platelet-derived growth factor signalling is critical for modulation of vascular smooth muscle cell phenotype. *J Biol Chem.* **284**. 3728-3738.
- 17)Davis, B. N.; et al (2008) SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature.* **454**. 56-61.
- 18)Dessi, M.; et. al. (2013) Atherosclerosis, dislipidemias and inflammation: The significant role of polyunsaturated fatty acids. *ISRN Inflammation.* **2013** (12). 13.
- 19)Doevendans, P. A.; et. al. (2001) Molecular genetics and gene expression in atherosclerosis. *International Journal of Cardiology,* **80**, 161-172.
- 20)Donaldson, J. G.; et al (2011) ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nature Rev.* **12**. 362-375.
- 21)Dzau, V. J.; et al (2002) Vascular proliferation and atherosclerosis: New perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med.* **8**. 1249-1256.

- 22) Elia, L.; et al (2009) The knockout of miR-143 and -145 alters smooth muscle cell maintenance and vascular homeostasis in mice: Correlates with human disease. *Cell Death Differ.* **16**. 1590-1598.
- 23) Fabian, M. R.; et al (2010) Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem.* **79**. 351- 379.
- 24) Filipowicz, W.; et al (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet.* **9**. 102-114.
- 25) Flynt, A. S.; et al (2010) MicroRNA biogenesis via splicing and exosome-mediated trimming in *Drosophila*. *Mol. Cell.* **38**. 900-907.
- 26) Fuster, V.; et al (2008) Diabetes y enfermedad cardiovascular. *Rev Esp Cardio Sup.* **8**. 35C-44C.
- 27) Gerdes, N., et. al. (2013). Atherosclerosis: cell biology and lipoproteins-focus on anti-inflammatory mechanisms as therapeutic options. *Current opinion in lipidology*, **24**(2), 187-189.
- 28) Ghidiyal, M.; Zamore, P. D. (2009) Small silencing RNAs: An expanding universe. *Nat. Rev. Genet.* **10**. 94-108.
- 29) Ha, M.; et al. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature rev.* **15**. 509-524.
- 30) Han, J.; et al. (2006) Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell.* **125**. 887-901.
- 31) Heo, I.; et al (2012) Mono-uridylation of pre-miRNA as a key step in the biogenesis of group II let-7 microRNAs. *Cell.* **151**. 521-532.
- 32) Huang, H.; et al (2010) miR-10a contributes to retinoid acid-induced smooth muscle cell differentiation. *J Biol Chem.* **285**. 9383-9389.
- 33) Ibberson, D.; et al (2009) RNA degradation compromises the reliability of microRNA expression profiling. *BMC biotechnol.* **9**(102). 1-9.
- 34) Imbeaud, S.; et al (2005) Toward standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acid Res.* **33**(6). e56.

- 35) Johnson, S. M.; et al (2003) The time of appearance of the *C. elegans* let-7 microRNA is transcriptionally controlled utilizing a temporal regulatory element in its promoter. *Dev. Biol.* **259**. 364-379.
- 36) Karginov, F. V.; et al (2010) Diverse endonucleolytic cleavage sites in the mammalian transcriptome depend upon microRNAs, Drosha and additional nucleases. *Mol Cell.* **38**. 781-788.
- 37) Kedde, M.; et al (2008) Interplay between microRNAs and RNA-binding proteins determines developmental processes. *Cell Cycle.* **7**. 899-903.
- 38) Kim, V.N. (2005) MicroRNA biogenesis: Coordinated cropping and dicing. *Nature reviews.* **6**. 376-385.
- 39) Koller, K.; et al (2013) Identification of the transcription factor HOXB4 as a novel target of miR-23a. *Genes Chromosomes Cancer.* **52(8)**. 709-715.
- 40) Komiyama, Y.; et al (2008) Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis.* **4(2)**. 68-75.
- 41) Kozomara, A.; Griffiths-Jones, S. (2014) miRBase: Annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* **42**. D68-D73.
- 42) Krol, J.; et al (2010) The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet.* **11**. 597-610.
- 43) Kumar, V.; et al. (2008). Patología humana de Robbins. Ed. Elsevier Health Science. España. 351-393.
- 44) Lagna, G.; et al (2007) Control of phenotypic plasticity of smooth muscle cells by bone morphogenetic protein signalling through the myocardin-related transcription factors. *J Biol Chem.* **282**. 37244-37255.
- 45) Lagos-Quintana, M.; et al. (2002) Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr. Biol.* **12**. 735-739.
- 46) Li, H.; et al (2013) MicroRNA-217, down-regulated in clear cell renal cell carcinoma and associated with lower survival, suppresses cell proliferation and migration. *Neoplasia.* **60(5)**. 511-515.
- 47) Libby, P.; et al. (2002) Stabilization of atherosclerotic plaques: New mechanisms and clinical targets. *Nature.* **8(11)**. 1257-1262.

- 48) Lin, X.Z.; et al (2013) MiR-27a suppresses triglyceride accumulation and affects gene mRNA expression associated with fat metabolism in dairy goat mammary gland epithelial cells. *Gene*. **521**(1). 15-23.
- 49) Lin, Y.; et al (2009) Involvements of microRNAs in hydrogen peroxide-mediated gene regulation and cellular injury response in vascular smooth muscle cells. *J Bio Chem*. **284**. 7903-7913.
- 50) Liu, J.; et al (2005) A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol*. **7**. 1261-1266.
- 51) Liu, X.; et al (2013) miR-23a Targets Interferon Regulatory Factor 1 and Modulates Cellular Proliferation and Paclitaxel-Induced Apoptosis in Gastric Adenocarcinoma Cells. *PLoS One*. **8**(6). E64707.
- 52) Livak, F. J.; et al (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time PCR and the 2^{(-Delta Delta C (T))} Method. *Methods*. **25**(4). 402-408.
- 53) Longo, D. L.; et al. (2012) Harrison. Principios de medicina interna. 18^a edición. Volumen 2. *Editorial McGraw-Hill*. USA. 1365-1370.
- 54) Lusis, A. J. (2000) Atherosclerosis. *Nature*, **407**, 233-241.
- 55) Ma, X.; et al (2013) MicroRNA-155 in the Pathogenesis of Atherosclerosis: A Conflicting Role? *Heart Lung Circ*. **22**(10). 811-818.
- 56) McMahon, H.T.; et al (2011) Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nature Rev*. **12**. 517-533.
- 57) Mesah, G. A.; et al (2007) An overview of cardiovascular disease burden in the United States. *Health Affairs*. **26**. 38-48.
- 58) Moore, C.S.; et al (2013) Mir-155 as a multiple sclerosis-relevant regulator of myeloid cell polarization. *Ann Neurol*. **74**(5). 709-720.
- 59) Morey, J. S.; et al (2006) Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biol Proced*. **8**(1). 175-193.
- 60) Owens, G, K.; et al (1995) Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physio Rev*. **107**. 771-780.

- 61)Owens, G. K .; et. al. (2004) Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physio. Rev.* **84**. 767-801.
- 62)Ozsolak, F.; et al (2008) Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev.* **22**. 3172-3183.
- 63)Persson, H.; et al (2011) Identification of new microRNAs in paired normal and tumor breast tissue suggests a dual role for the ERBB2/Her2 gene. *Cancer Res.* **71**(1). 76-86.
- 64)Persson, J.L. (2013) miR-155 meets the JAK/STAT pathway. *Cell Cycle.* **12**(14). 2170.
- 65)Petersen, C. P.; et al (2006) Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Moll Cell.* **21**. 533-542.
- 66)Poole-Wilson, P.A (2007) Global differences in atherosclerosis. *Cardiovascular medicine.* USA. 653-654.
- 67)Riedmaier, I.; et al (2010) Comparison of two available platforms for determination of RNA quality. *Biotechnol. & Biotechnol EQ.* **24**(4). 2154-2159.
- 68)Romero-Martínez, M.; et al (2012) Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012: diseño y cobertura. *Salud Pública Mex.* En prensa.
- 69)Ross, R. (1999) Atherosclerosis: An inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine.* **340**(2). 115-126.
- 70) Schotte, D.; et al (2009) Identification of new microRNA genes and aberrant microRNA profiles in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* **23**(2). 313-322.
- 71)Sethupathy, P.; et al (2008) MicroRNA target site polymorphisms and human disease. *Trends Genet.* **24**. 489-497.
- 72)Sinobiological Inc. *TGF beta signalling pathway*. Recuperado el 15-octubre-2014, de <http://www.sinobiological.com/TGF-beta-signaling-a-1394.html>
- 73)Soonhag,K.; et al(2009) A study of microRNAs *in silico* and *in vivo*: bioimaging of microRNA biogenesis and regulation. *FEBS Journal.* **276**. 2165-2174.

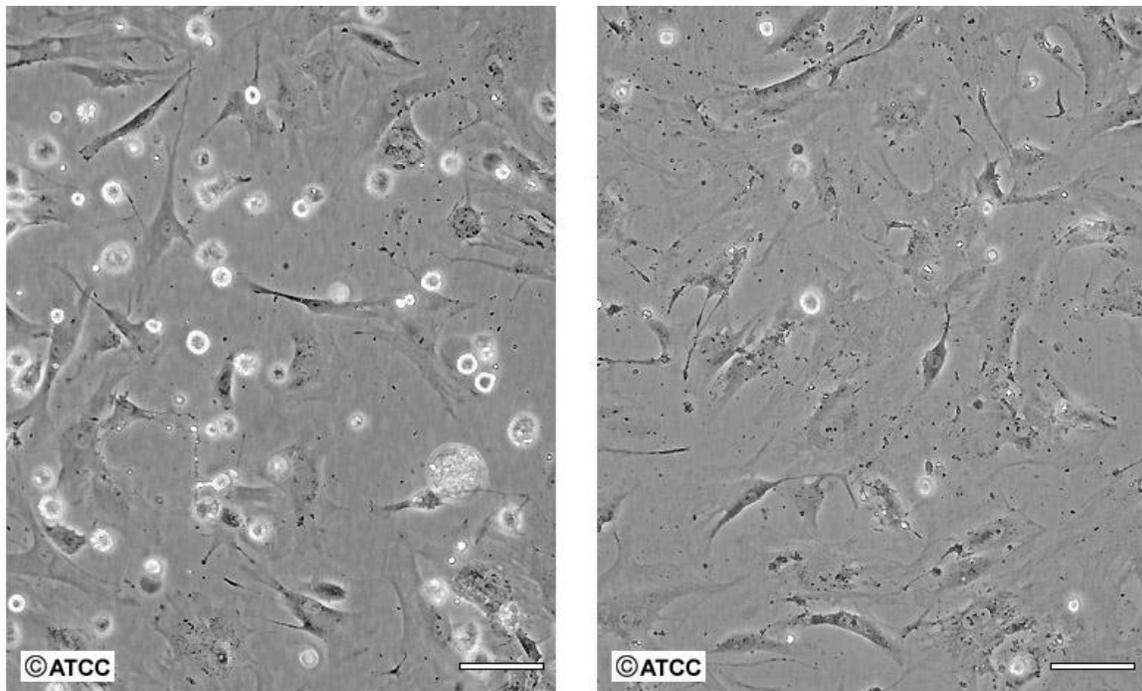
- 74) Tang, W.; et al (2014) miR-27a regulates endothelial differentiation of breast cancer stem like cells. *Oncogene*. **33**(20). 2629-2638.
- 75) Vasudevan, S.; et al (2007) Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*. **318**. 1931-1934.
- 76) Wang, W.; et al (2013) Mutant p53-R273H gains new function in sustained activation of EGFR signaling via suppressing miR-27a expression. *Cell Death Dis*. **4**. E574.
- 77) Winter, J.; et al. (2009) Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biol*. **11**(3). 228-234.
- 78) Xie, C.; et al (2011) MicroRNA and vascular smooth muscle cells. *Vitamins and hormones*. **87**. 321-339.
- 79) Xie, C.; et al (2011) microRNA-1 regulates smooth muscle cell differentiation by repressing Kruppel-like factor 4. *Stem Cells Dev*. **20**. 205-210.
- 80) Xie, M.; et al (2013) Mammalian 5'-capped microRNA precursors that generate a single microRNA. *Cell*. **155**. 1568-1580.
- 81) Yang, J. S.; et al. (2011) Alternative microRNA biogenesis pathways and the interpretation of core microRNA pathways mutants. *Mol Cell*. **43**. 892-903.
- 82) Yates, L.A.; et al. (2013) The long and short of microRNA. *Cell*. **153**. 516-519.
- 83) Yekta, S.; et al (2004) MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*. **304**. 594-596.
- 84) Yin, H.; et al (2012) MicroRNA-217 promotes ethanol-induced fat accumulation in hepatocytes by down-regulating SIRT1. *J Biol Chem*. **287**(13). 9817-9826.
- 85) Zhang, C. (2009) MicroRNA and vascular smooth muscle cell phenotype: new therapy for atherosclerosis? *Genome Medicine*. **85**(1). 85:1-85:3.
- 86) Zhu, G.F.; et al (2013) miR-155 inhibits oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis of RAW264.7 cells. *Mol Cell Biochem*. **382**(1-2). 253-261.

11.1 LÍNEA CELULAR T/G HA-VSMC (ATCC® CRL-1999™)

Está es una línea humana de células normales con un cariotipo 46, XX. El número de cromosoma modal fue 46, encontrándose en el 90% de las células. La tasa de células poliploides fue de 0.8%. No presentan cromosomas alterados que fueran detectados en 15 metafases cariotipadas. Ambos cromosomas X tienen apariencia normal.

Número de ATCC: CRL-1999

Designación: T/G HA-VSMC



Baja densidad

Escala: 100 μ m

Alta densidad

Escala: 100 μ m

Figura 32. Imagen al microscopio de las VSMC. Se presentan las características que se exhiben cuando tienen una alta y baja densidad. (Imagen modificada de ATCC; 2014).

La línea celular fue extraída del músculo liso de la aorta de una paciente femenina caucásica con 11 meses de edad, con marcadores de HeLa negativos. Tiene propiedades adherentes de crecimiento y cuenta con el siguiente perfil de DNA:

- Amelogenina: X

- CSF1PO: 10, 11
- D13S317: 11,12
- D16S539: 12
- D5S818: 12, 13
- D7S820: 9,10
- THO1: 7,8
- TPOX: 8
- vWA: 16

La línea celular crece con el medio F-12K.

12.2 MEDIO F-12K NUTRIENT MIXTURE (KAIGHN'S MODIFICATION) (GIBCO® 21127-022)

El medio F-12K nutrient mixture (Kaighn's modification) está formulado con Glicina 0.2 mM, L-alanina 18 mg/L, L-arginina 2 mM, L-asparagina 0.2 mM- L- ácido aspártico 0.2 mM, L- cisteína 70 mg/L, L- ácido glutámico 29 mg/L, L glutamina 2 mM, L-histidina 45.8 mg/L, L-isoleucina 0.2 mM, L- lisina73 mg/L, L-metionina 8.96 mg/L, L-fenilalanina 9.92 mg/L, L-prolina 0.6 mM, L-serina 0.2 mM, L-treonina23 mg/L, L-triptofano 4.1 mg/L, L-tirosina13.5 mg/L, L-valina 23 mg/L, biotina 0.07 mg/L, colina 0.1 mM, D-pentonatato de calico 0.5 mg/L, ácido fólico 1.3 mg/L, niacinamida 0.037 mg/L, piroxidona 0.06 mg/L, riboflavina 0.04 mg/L, tiamida 0.3 mg/L, vitamina B12 1.4 mg/L, i-inositol 0.1 mM, cloruro de calcio 102 mg/L, sulfato cúprico 0.0020 mg/L, sulfato férrico 0.8 mg/L, cloruro de magnesio 49.7 mg/L, sulfato de magnesio 1.6 mM, cloruro de potasio 3.8 mM, bicarbonato de sodio 2.6 g/L, cloruro de sodio 7.53 g/L, fosfato sódico dibásico 115.5 mg/L, fosfato sódico monobásico 59 mg/L, sulfato de zinc 0.144 mg/L, D- glucose 7 mM, hipoxantina sódica 4 mg/L, ácido lipoico 0.21 mg/L, rojo de fenol 3 mg/L, putrescina 0.32 mg/L, piruvato de sodio 2 mM y timidina 0.7 mg/L.

11.3 GENECHIP® MIRNA 3.0 ARRAY (AFFYMETRIX)

Este microarreglo tiene una reproducibilidad inter e intralote >0.95 , detecta transcritos a una concentración de 1.0 amol en un 85%, con un rango dinámico >4 logs y trabaja en concentraciones de muestra de RNA total de 130 a 500 ng.

Este contiene la versión de miRBase 17, trabaja cuenta con información de 153 organismos, tiene un total de 19,724 sondas fijas de microRNAs maduros totales y 9 sondas fijas para microRNAs maduros. Tiene 1,733 sondas para microRNAs maduros humanos, 1,111 sondas para microRNAs maduros de ratón, 680 sondas de microRNAs maduros de rata, 2,216 sondas para RNAs pequeños no codificantes (snoRNAs), RNAs pequeños nucleares (CDBox RNAs), H/ACA RNA y RNAs pequeño específicos de Cajal (scaRNAs); 1,658 sondas de pre-miRNAs humanos, 855 sondas de pre-miRNAs de ratón y 486 sondas de pre-miRNAs de rata.

11.4 GENECHIP® HUMAN GENE 1.0 ST ARRAY (AFFYMETRIX)

Las bases de datos con las que se diseñó este microarreglo fueron RefSeq en su versión 36, Ensembl en su versión 41, GeneBank en su versión 2006 y UCSC en su versión HG18.

La cobertura de transcritos del microarreglo corresponde a 36,079 de sondas totales de RefSeq, 32,020 sondas cuentan con anotaciones bien establecidas, 2,967 sondas para transcritos no codificantes con anotaciones bien establecidas, 579 sondas de transcritos codificantes con anotaciones provisionales, 513 de sondas de transcritos no codificantes con anotaciones provisionales, 466 sondas para transcritos de RNAs largos no codificantes (lncRNA) y 21,014 genes de RefSeq (Entrez) se encuentran contados.

11.5 CÁLCULO DE LA EXPRESIÓN RELATIVA POR EL MÉTODO $2^{-\Delta\Delta CT}$

Es el método más comúnmente usado para analizar datos de PCR en tiempo real. Este método es conveniente para analizar los cambios relativos en la expresión de genes.

La elección del control endógeno para el método depende del tipo de experimento de expresión que se tenga planeado. Usando el método, los datos son presentados con el fold change en la expresión génica normalizada con un control endógeno, esta normalización provee un método de corrección de los resultados de acuerdo a la cantidad de RNA.

Los datos son analizados utilizando la siguiente ecuación:

$$\Delta\Delta C_t = (C_{t(Interés)} - C_{t(Control)})_{Tiempo X} - (C_{t(Interés)} - C_{t(Control)})_{Tiempo 0}$$

Dónde:

$C_{t(Interés)}$ = Ct de la expresión génica del gen de interés

$C_{t(Control)}$ = Ct de la expresión génica del blanco

El Ct es el ciclo en el que la fluorescencia generada dentro de la reacción sobrepasa el umbral y es detectada por el equipo (Livak, K.J.; 2001).