

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DETECCIÓN DE microRNAs EN PLASMA HUMANO
POSTERIOR A LA INGESTA DE UNA DIETA CON CARNE
DE RES

Por

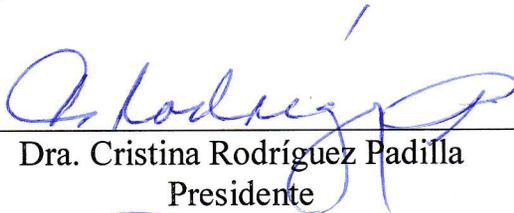
LN. DANIELA ALEJANDRA MATA CARDONA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
INMUNOBIOLOGÍA

Diciembre, 2016.

DETECCIÓN DE microRNAs EN PLASMA HUMANO POSTERIOR A
LA INGESTA DE UNA DIETA CON CARNE DE RES

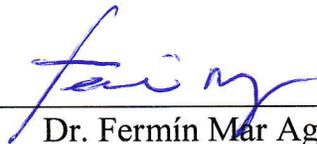
Comité de Tesis



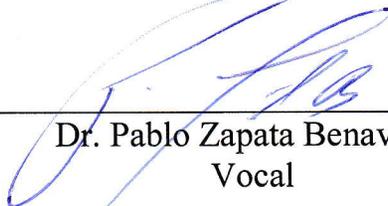
Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Presidente



Dra. Diana Reséndez Pérez
Secretario



Dr. Fermín Mar Aguilar
Vocal



Dr. Pablo Zapata Benavides
Vocal



Dr. Edgar Mendoza Gamboa
Vocal

AGRADECIMIENTO

Este trabajo se llevó a cabo gracias al apoyo económico y de infraestructura del Laboratorio de Inmunología y Virología.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a la Facultad y a la Subdirección de Posgrado por abrirme las puertas, a sus profesores quienes me brindaron la oportunidad de tomar clases de pregrado y poder ingresar con mayor preparación a la Maestría.

A CONACYT por la beca otorgada con la cual pude realizar mis estudios.

A la Dra. Cristina Rodríguez porque desde un inicio me apoyo en realizar el posgrado a pesar de mi formación académica; quién me apoyo también a lo largo del proyecto.

A la Dra. Diana Reséndez y al Dr. Fermín Mar por abrirme las puertas como una integrante más de su laboratorio y por su apoyo constante durante la realización del proyecto.

A mi comité tutorial por su rol dentro de mi formación de Maestría y sus evaluaciones con intención de mejorar la investigación.

A mis compañeros de Maestría y mis compañeros de laboratorio quienes se convirtieron en mis amigos: Martín, Carlos, Zyanya, Leonardo, Fernanda, Luis, Yadira, Marisela, Amaury, Rubén y Paco, quienes fomentaron mi conocimiento, además de proporcionar un ambiente más ameno.

A todos los participantes del estudio quienes de manera voluntaria proporcionaron su tiempo en el proyecto, asistiendo puntualmente a las citas y soportando las tomas de sangre constantes, el hambre y el calor.

Le agradezco a Dios por la vida, la esperanza y la fortaleza que me proporciona día a día.

Mis Padres Aurelia y Jorge, mis abuelos Paz y José, mi hermana Natalia, mi tía Rosy, mi familia en general, a Jaime, por su confianza en mí, su apoyo constante y su amor.

DEDICATORIAS

Le dedico esta tesis a Dios, quien me brinda la fortaleza para seguir adelante, para continuar a pesar de las caídas y quien siempre me acompaña.

A mi madre, quien con su sincero amor me ha apoyado en mis decisiones, al ser mi amiga, mi confidente, juntas siempre juntas superamos las dificultades que nos presenta la vida y formamos un equipo.

A mis abuelos, con todo mi amor, quiénes me brindaron cuidado desde pequeña, protección, atención y sobre todo amor durante toda mi vida; sentaron en mí los cimientos de responsabilidad y deseos de superación, por ellos soy lo que soy actualmente; les brindo este esfuerzo retribuyéndoles un poco de todo lo que me han dado.

A mi Padre, quién desde mi formación profesional me ha apoyado y me alienta a seguir esforzándome.

A mi hermana, una guerrera pequeñita a la cual admiro con todo el cariño de hermana mayor, siempre ha estado junto a mí; esperando ser un ejemplo para ella de superación y que las metas se pueden alcanzar.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	2
DEDICATORIAS	3
LISTA DE TABLAS.....	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	9
RESUMEN.....	11
1. INTRODUCCIÓN	13
2. ANTECEDENTES.....	14
2.1 MicroRNAs.....	14
2.1.1 Biogénesis de los microRNAs.....	14
2.1.2 Mecanismos moleculares de los microRNAs.....	18
2.1.3 Funciones de los microRNAs.....	20
2.1.4 MicroRNAs circulantes.....	21
2.2 Modulación de los miRNAs debido a la dieta.....	23
2.3 MicroRNAs derivados de la dieta	24
2.3.1 Análisis de la transferencia de xenomiRs de la dieta en organismos.....	24
2.4 MicroRNAs en carne.....	30
2.4.1 Consumo de carne y modulación de miRNAs.....	33
3. JUSTIFICACIÓN.....	35
4. HIPÓTESIS	36
5. OBJETIVO GENERAL.....	37
5. 1 Objetivos específicos	37
6. DISEÑO EXPERIMENTAL	38
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	39
7.1 Obtención de muestras de plasma de sujetos omnívoros y establecimiento de un banco de RNA	39
7.1.1 Participantes del estudio.....	39
7.1.2 Intervención de una dieta con carne de res.....	40
7.1.3 Recolección de muestras biológicas	41
7.1.4 Extracción de RNAs pequeños totales en plasma.....	41
7.1.5 Cuantificación de RNAs pequeños totales	42
7.2 Estudio piloto del perfil de expresión de miRNAs basales y postprandiales por Secuenciación de Nueva Generación (NGS)	42

7.3 Cuantificación de la expresión de miRNAs basales y postprandiales mediante qPCR	43
7.3.1 Extracción de RNA en carne de res y células HEK-293	43
7.3.2 Síntesis de DNAC.....	44
7.3.3 Amplificación de los microRNAs por PCR tiempo real	45
7.3.4 Validación del método de cuantificación $\Delta\Delta C_t$ mediante la eficiencia de amplificación y construcción de la curva de rango dinámico	46
7.3.5 Cuantificación de los microRNAs por el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$	48
7.4 Análisis estadístico del nivel de expresión de los microRNAs	49
8. RESULTADOS.....	50
8.1 Reclutamiento, selección de los participantes e intervención del estudio.....	50
8.2 Perfil de expresión de miRNAs posterior a la ingesta de carne de res mediante análisis piloto por NGS.....	52
8.3 Niveles de expresión de miRNAs posteriores a una dieta con carne mediante PCR tiempo real.....	56
8.3.1 Estandarización de síntesis de DNAC y validación del método de cuantificación relativa	57
8.3.2 Detección de miR-1, 10b y 22 en carne de res posterior a un proceso de cocción convencional.	60
8.4 Modulación en los niveles de expresión de microRNAs basales y posteriores a una dieta con carne.....	61
9. DISCUSIÓN	66
10. CONCLUSIONES.....	73
11. PERSPECTIVAS	74
12. REFERENCIAS	75
RESUMEN BIOGRÁFICO.....	80
ANEXO 1: FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO	81
ANEXO 2. CARTA DE APROBACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN POR EL COMITÉ DE BIOÉTICA.....	85
ANEXO 3. FORMATO DE HISTORIA CLÍNICA	86
ANEXO 4. SECUENCIAS DE LOS microRNAs	89

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Resumen de la transferencia de miRNAs de la dieta en diferentes organismos	30
2	Descripción de algunos miRNAs en diversos alimentos incluida la carne.....	31
3	Contenido nutrimental de la dieta.....	41
4	Mezcla de reacción para estandarización de síntesis de DNAc.....	44
5	Programa para la síntesis del DNAc.....	44
6	Mezcla para reacción de PCR tiempo real.....	46
7	Condiciones para el PCR tiempo real.....	46
8	Características generales, antropométricas y bioquímicas de los participantes	51
9	Estandarización de síntesis de DNAc a diferentes volúmenes de RNA.....	58
10	Eficiencia de amplificación y rango dinámico de cada microRNA.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Localización genómica de miRNAs.....	15
2	Biogénesis de miRNAs.....	17
3	Posibles mecanismos de acción por Drosha y Dicer.....	18
4	Papel de las proteínas Argonautas en el silenciamiento génico por RNAs pequeños.....	20
5	Mecanismos de liberación de miRNAs al espacio extracelular.....	22
6	Hipótesis relacionada a los microRNAs como potenciales mediadores de información epigenética.....	26
7	Modelo de la dinámica de los microRNAs de la dieta en el organismo.....	27
8	Perfil de microRNAs en tejido muscular de bovino crudo y después de un procesamiento a base de calor.....	32
9	Curva de regresión para validación del método $\Delta\Delta Ct$	47
10	Diagrama de flujo de los participantes del estudio.....	50
11	Intervención de la dieta correspondiente a un tiempo de comida...	52
12	Calidad de las bibliotecas para la secuenciación por SeqMatic, LLC. Fremont, CA.....	53
13	Niveles de expresión basales de los microRNAs 192, 92, 22 y 1 en el grupo con dieta omnívora con respecto al grupo control mediante NGS.	54
14	Expresión diferencial de miR-1 y 22 en el tiempo postprandial con referencia a los niveles basales mediante NGS.....	55
15	Niveles de expresión postprandiales de miR-1 y 22 en el grupo con dieta omnívora con respecto al grupo control mediante NGS..	56
16	Curva de rango dinámico de miR-1 para validación del método $\Delta\Delta Ct$ de mediante qPCR.....	59
17	Curvas de disociación representativas obtenidas en reacciones por qPCR.....	60

18	Amplificación de miR-1, miR-10b y miR-22 en carne de res cruda y posterior a un proceso de cocción	61
19	Disminución en la expresión diferencial basal de miR-192-5p en plasma del grupo con régimen dietético omnívoro mediante qPCR.....	62
20	Niveles postprandiales de la expresión diferencial de miR-1 en los grupos omnívoro y vegano por qPCR	63
21	Expresión postprandial de miR-22 en plasma de los grupos omnívoro y vegano mediante qPCR.	64
22	Expresión postprandial de miR-10b en plasma de los grupos omnívoro y vegano.....	65

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

miRNA/ miR	microRNA
g	Gramo
μl	Microlitro
rpm	Revoluciones por minuto
dl	Decilitro
ng	Nanogramos
ml	Mililitros
mg	miligramos
h	horas
min	minutos
s	segundos
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
°C	Grados centígrados
RNA	Ácido Ribonucleico (Ribonucleic Acid)
HEK293	Células embrionarias de riñón humano (Human Embryonic Kidney 293)
DNAc	Acido desoxirribonucleico complementario (deoxyribonucleic acid)
RT	Transcripción reversa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
LNA	Ácido Nucleico Bloqueado (Locked Nucleic Acid)
Ct	Ciclo umbral (Cycle threshold)
NGS	Secuenciación de Nueva Generación (Next Generation Sequencing)
XPO5	Exportina 5
Pri-miRNA	microRNA primario
Pre-miRNA	microRNA precursor

RISC	Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA (RNA-induced silencing complex)
IMC	Índice de Masa Corporal
HDL	Lipoproteína de Alta Densidad
LDL	Lipoproteína de Baja Densidad
ncRNAs	RNAs no codificantes
siRNAs	RNAs pequeños interferentes
piRNAs	RNAs interactuantes con Piwi
Ago	Argonautas
eIF4E	Factor de iniciación de la traducción eucariótico 4E
UTR	Región No traducible (Untranslated Region)
Pb	Pares base
PABPs	Proteínas de unión a poli A
GW	Glicina-triptófano (Gly-Trp)
kDa	KiloDalton
CCR4	Receptor de quimiocina tipo 4 (C-C chemokine receptor type 4)
CAF1	Factor 1 de ensamblaje de la cromatina
RNA-PolIII	RNA Polimerasa III
RIIIDs	Dominios de RNAsa tipo III
dsRBD	Dominio de unión a RNA de doble cadena
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region gene 8
dsRNA	RNA de doble cadena
RNA ^t	RNA de transferencia
RNA ^m	RNA mensajero
Loqs	Loquacious
PAZ	Dominios PAZ (Piwi, Argonaute, Zwillie)
TRBP	Proteína de unión a ARN en respuesta a trans-activación (TAR RNA-binding protein)
MVB	Cuerpos multivesiculares

RESUMEN

En años recientes, se ha postulado que la transferencia horizontal de microRNAs entre especies e incluso entre reinos es posible, aunque se ha mostrado que miRNAs ingeridos pueden atravesar la barrera intestinal también existen estudios en dónde no ha sido posible demostrar dicha transferencia. Debido a que los tejidos de bovino contienen perfiles únicos de miRNAs homólogos a humanos y que éstos sobreviven a métodos de preparación basados en calor, en la presente tesis se determinó si el aumento de la expresión de los miRNAs en plasma humano es debido a la transferencia de miRNAs proveniente de un tiempo de alimentación con carne de res. La estrategia experimental consistió en la obtención del plasma en ayuno de un grupo con dieta omnívora y un grupo control vegano a los que se les brindó una dieta con carne y sin carne de res respectivamente y se obtuvo el plasma a las 2, 4 y 6 horas postprandiales. Posteriormente, se realizó la extracción de los RNAs totales, el perfil de expresión de miRNAs por Secuenciación de Nueva Generación (NGS) y finalmente se obtuvo la cuantificación relativa de los miRNAs seleccionados mediante qPCR. Los resultados del panel piloto de miRNAs por NGS mostraron que al comparar el tiempo postprandial del grupo omnívoro con el grupo vegano se observó incrementado 1.24 veces la expresión miR-1 mientras que miR-22 se mostró disminuido 1.29 veces y presentó variabilidad en las dos muestras analizadas. La cuantificación mediante qPCR en el total de las muestras no mostró diferencia significativa en los niveles de expresión basales y postprandiales de los miRNAs 1, 10b, 22 y 92 en el grupo omnívoro comparado con el grupo vegano. Interesantemente, se encontró una disminución significativa no descrita a la fecha de la expresión basal de miR-192 en el grupo omnívoro comparado con el grupo vegano, un miRNA con relevancia en cáncer de colon. En conclusión, un tiempo de comida con carne no promueve la transferencia de los miRNAs analizados a pesar que éstos han sido detectados en carne de res posterior al proceso de cocción. Estos resultados abren la posibilidad para analizar una ingesta con un mayor contenido de carne y de muestras sin la complejidad de una dieta completa, así como validar el hallazgo de la disminución del miR-192 debido a su relevancia en cáncer de colon.

ABSTRACT

Recently, the horizontal delivery of microRNAs between species and kingdoms has been postulated, although studies have shown that ingested miRNAs can be transferred to blood, several attempts to replicate these findings have failed. Edible bovine tissues contain unique profiles of human homologous miRNAs that survive heat-based preparation methods, so the aim of this thesis is determine whether the increase of miRNAs expression in human plasma is due to miRNAs transfer from a meal with beef. The general strategy consisted to obtain fasting plasma from subjects in two groups: omnivore group and vegan group (control), subsequently they were given a meal with beef and without beef respectively, then the plasma was obtained at 2, 4 and 6 hours after meal. Afterwards total RNA extraction was performed, followed by the pilot miRNAs expression profile by Next Generation Sequencing (NGS) and the miRNAs relative quantification by qPCR.

The results from pilot miRNAs panel by NGS shown that the expression of miR-1 increased 1.24 times after the meal in the omnivore group compared with vegan group, while the expression of miR-22 decreased 1.29 times, the analysis shown variability in the 2 samples. The miRNAs relative quantification by qPCR in all samples for fasting and postprandial expression levels of miRNAs 1, 10b, 22 y 92a didn't show meaning difference between omnivore group and vegan group. Interestingly, miR-192 was downregulated in the omnivore group compared with the fasting expression levels in the vegan group; miR-192 is a microRNA with roles in colorectal cancer. In conclusion, a meal with beef don't promote the analyzed miRNAs transfer despite that the same miRNAs have been detected in cooked beef. Thus, future studies need to analyze a major intake of meat without the complexity of other foods, a bigger size sample, as well as validate the downregulation of miR-192 in omnivorous due its relevance in colon cancer.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, sabemos que la dieta juega un papel importante dentro de los factores determinantes de salud y enfermedad. Por esta razón, recientemente se ha comenzado a estudiar la influencia de la dieta sobre la expresión y regulación de los genes. Uno de los mecanismos de regulación génica más estudiados en la actualidad es el que ejercen los microRNAs (miRNAs).

Los miRNAs son secuencias de RNA de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud, los cuales regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional, y tienen influencia en procesos tales como: desarrollo, homeostasis, respuesta inmune, metabolismo y procesos epigenéticos. Se predice que regulan a una tercera parte del genoma.

Recientemente, se ha observado que alimentos derivados de plantas y animales contienen miRNAs, además algunos reportes han detectado miRNAs de plantas circulando en suero de mamíferos. A pesar de esto, aún no queda claro si los miRNAs presentes en los alimentos derivados de plantas y animales pueden ser absorbidos por el tracto gastrointestinal y ser llevados hasta los tejidos para realizar funciones de regulación. Si los miRNAs provenientes de otras especies pueden atravesar la barrera gastrointestinal, podría revolucionar la comprensión de sus mecanismos y la comunicación entre organismos; así mismo, resaltar aún más la relevancia de la dieta en la regulación epigenética. Sin embargo, es necesario asegurar si la respuesta postprandial reflejada en un incremento de los niveles de expresión de los miRNAs proviene de los alimentos, para así dar pauta a estudios de los mecanismos de la transferencia gastrointestinal y la posible funcionalidad en el organismo receptor.

En esta tesis se analizaron los cambios postprandiales en los niveles de expresión de los miRNAs y específicamente de los miR-1, miR-10b y miR-22 después de una dieta con carne de res, esto debido a que permanecen aún después de la cocción. Lo anterior debido a que el consumo de carne forma parte importante de la dieta común en diversas partes del mundo específicamente en la región Noreste de México y su ingesta ha sido asociada como un factor de riesgo potencial para padecer distintas patologías.

2. ANTECEDENTES

2.1 MicroRNAs

En organismos multicelulares, las tres mayores clases de RNAs pequeños no codificantes (ncRNAs) son microRNAs (miRNAs), RNAs pequeños interferentes (siRNAs), y RNAs interactuantes con Piwi (piRNAs), los cuales se unen por complementariedad de bases con su RNA blanco, generalmente para regular de forma negativa la expresión génica. La característica distintiva en cada uno de ellos es principalmente su biogénesis (Finnegan & Pasquinelli, 2013) (Ameres & Zamore, 2013). El primer miRNA denominado *lin-4*, fue identificado en 1993 en mutantes en los cuales se interrumpía la sincronización del desarrollo post-embriónico en *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) (Lee, et al., 1993). *lin-4* reprime la expresión de *lin-14*, el cual codifica para una proteína nuclear que debe reducir sus concentraciones para el progreso de su primera etapa larval al segundo estadio (Olsen & Ambros, 1999).

Para el año 2003 más de 1600 miRNAs habían sido identificados en plantas, animales y virus (Lim, et al., 2003). En mamíferos, se predice que los miRNAs controlan la actividad de ~50% de los genes codificantes de proteína, el genoma humano puede contener hasta más de 2,500 miRNAs, de los cuales una gran parte es específica para primates (miRBase, 2014).

2.1.1 Biogénesis de los microRNAs

Muchos organismos multicelulares codifican para docenas a cientos de genes de miRNAs, en organismos eucariotas complejos conforman ~1% del genoma. En células de mamíferos más del 70% de miRNAs están localizados dentro de un intrón, residiendo mayoritariamente en genes codificantes de proteína. El resto de miRNAs están localizados en unidades de transcripción de ncRNA en la misma proporción de miRNA exónico/ intrónico, pueden generarse, además, durante splicing alternativo de ciertos transcritos (Figura 1). Alternativamente, en *C. elegans* aproximadamente el 15% de los miRNAs están bajo el control del promotor del gen huésped, el resto son regulados por promotores independientes. Muchos de los promotores de los miRNAs contienen

características típicas de promotores para la RNA Polimerasa II, incluyendo caja TATA y elementos de inicio (Ha & Kim, 2014).

Es poco común que múltiples miRNAs sean transcritos como una sola unidad transcripcional llamada “cluster”. En esta estructura genómica son en ocasiones considerados como miembros de una familia. Típicamente, una familia de miRNAs incluye todos aquellos que comparten los nucleótidos 2-7 de su región 5’, independientemente de su localización en el genoma, llamada secuencia semilla, la cual es determinante para el reconocimiento del blanco.

Una extensa mayoría de miRNAs son transcritos por RNA-Pol II, ya sea como parte de la transcripción del gen huésped o como unidades de transcripción independientes. Los transcritos primarios son llamados pri-miRNAs, y tienen caps y cola de poliA, similar a otros productos de RNA-Pol II. La regulación transcripcional de los miRNAs puede estar mediada por retroalimentación en donde factores de transcripción que regulan miRNAs específicos son blanco de estos mismos miRNAs (Finnegan & Pasquinelli, 2013) (Du & Zamore, 2005).

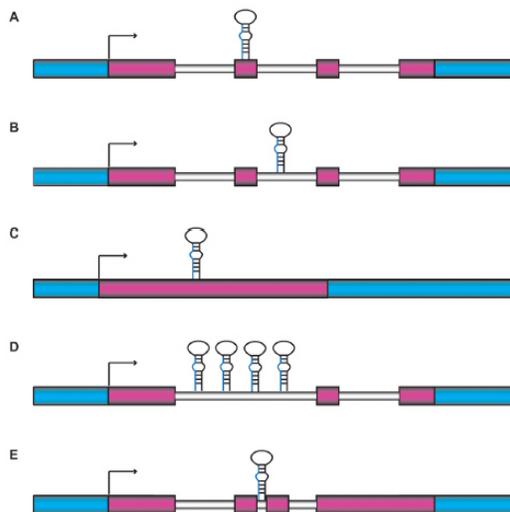


Figura 1. Localización genómica de miRNAs. (A) Los miRNAs pueden ser localizados en exones o (B) en intrones de transcritos no codificantes o (C) intergénicos y no sujetos a splicing (D) Cluster de miRNAs (E) Mirtrons escindidos de intrones por splicing. Tomado de (Finnegan & Pasquinelli, 2013)

Para la maduración de estos pri-miRNAs es necesario un complejo de proteínas llamado Microprocesador, tal maduración consta de dos pasos principales. El primer corte es llevado a cabo por Drosha, la cual es una proteína de ~160 kDa y se encuentra altamente conservada en animales; contiene dos dominios RNasa III (RIIDs) y un dominio de

unión a RNA de doble cadena (dsRBD) que son cruciales para la catálisis. Drosha interactúa con su cofactor DGCR8 (DiGeorge syndrome Critical Region gene 8) en humanos, también conocida como Pasha en *Drosophila melanogaster* y *C. elegans*. DGCR8/ Pasha es una proteína de ~120 kDa que contiene dos dsRBDs. También contiene un dominio WW tentativo, el cual es conocido por interactuar con secuencias específicas ricas en prolina; aunque no está determinado si este dominio interactúa con la región rica en prolina de Drosha. Drosha corta RNA de doble cadena (dsRNA) para crear un precursor de aproximadamente 70 nucleótidos (pre-miRNA) con estructura secundaria de horquilla, un fosfato en el extremo 5' y un extremo protruyente corto ~2 nucleótidos en el extremo 3', la estructura resultante es un motivo señal para la exportina-5 (XPO5), ésta exporta el pre-miRNA del núcleo al citoplasma. Considerando que la afinidad de la XPO5 al pre-miRNA es más alta que al RNAt (RNA de transferencia) y que miRNAs son abundantes (50,000 copias por célula), XPO5 es principalmente acarreadora de los pre-miRNAs. Un tallo de RNA de >16pb y un extremo corto protruyente 3' son requerimientos estructurales significativos para la exportación del pre-miRNA.

En la vía canónica, el pri-miRNA es procesado en dos pasos catalizados por las enzimas RNAsas III principales, sin embargo, algunos pre-miRNAs son productos de intrones muy cortos (mirtrons) como resultado del splicing, sin requerir el procesamiento por Drosha-DGCR8 (Kim, et al., 2009).

El segundo corte es llevado a cabo por Dicer, los homólogos de Dicer son proteínas multidominio de ~200kDa. Además de contener dos dominios RIIIDs y un dsRBD, Dicer contiene un largo segmento N-terminal que contiene un dominio DEAD-BOX RNA Helicasa, un dominio conservado evolutivamente en enzimas que usan hidrólisis de ATP para relajar el dúplex RNA; el dominio después fue nombrado motivo DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp). Contiene también un dominio DUF283 y dominio PAZ, éste dominio de unión a RNA está altamente conservado y se encuentra en miembros de las familias Dicer y Argonauta, que interactúan preferentemente con el extremo 3' terminal sobresaliente de los RNA pequeños. Dicer junto a su proteína cofactor Loquacious (Loqs) en *Drosophila*, o TRBP (TAR RNA-binding protein) en humanos hace un par de cortes que definen al miRNA maduro, para la correcta escisión Dicer requiere al menos

19 nucleótidos en el tallo del miRNA, al final un RNA dúplex de ~21 nucleótidos es liberado (Figuras 2 y 3). Del dúplex miRNA/miRNA* una cadena es incorporada al complejo efector conocido como miRNP (complejo de ribonucleoproteínas contenientes de miRNA), mirgonauta o miRISC (complejo de silenciamiento inducido por RNA), mientras la otra cadena miRNA* es degradada. La elección de la cadena recae en la estabilidad termodinámica local del miRNA/miRNA*, la cadena dónde la terminación 5' es menos estable al aparearse es cargada al RISC. Esta diferencia en la termodinámica es debido a que el miRNA tiende a comenzar con uracilo (Kim, 2005) (Krol, et al., 2010).

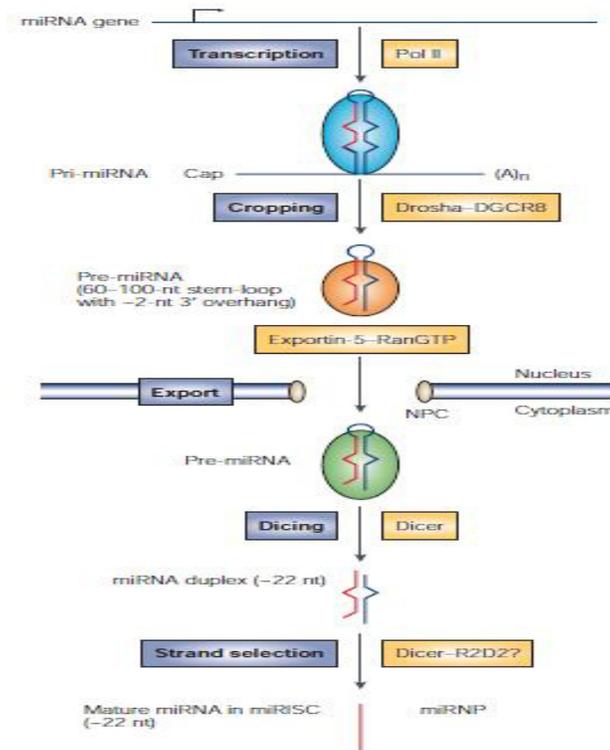


Figura 2. Biogénesis de miRNAs. Los miRNAs son generados de un transcrito primario, el primer corte es llevado por Droscha-DGCR8 localizados en núcleo, el producto es un pre-miRNA de ~70 nucleótidos con un extremo 3'pronunciado de dos nucleótidos. Éste se exporta mediante exportina 5 al citoplasma, donde Dicer realiza el segundo corte. El dúplex es separado y usualmente una cadena es seleccionada como miRNA maduro. Tomado de (Kim, 2005)

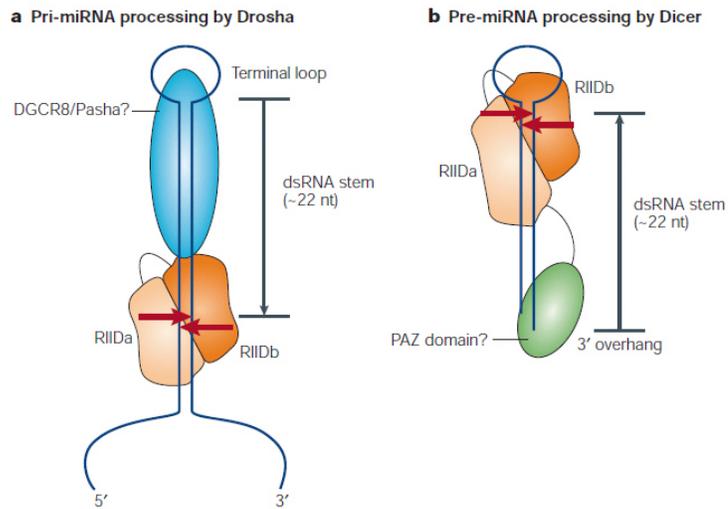


Figura 3. Posibles mecanismos de acción por Drosha y Dicer. (a) Drosha introduce un corte ~22 nucleótidos del bucle terminal. (b) Dicer escinde ~22 nucleótidos a partir del extremo 3' del pre-miRNA. Tomado de (Kim, 2005)

2.1.2 Mecanismos moleculares de los microRNAs

El miRNA cargado en el complejo efector (RISC) se aparea con su RNAm blanco, para así regular estos mensajeros principalmente por medio de dos mecanismos: 1) degradar el RNAm y 2) represión de la traducción. El complejo RISC además de contener el miRNA maduro contiene el componente clave que es una proteína miembro de la familia Argonauta y otros cofactores. Las proteínas Argonautas están conservadas evolutivamente y pueden ser subdivididas filogenéticamente en las subfamilias Ago y Piwi. Ago se expresa de manera ubicua y se une a siRNAs o miRNAs para guiar el silenciamiento post-transcripcional de genes; la expresión de proteínas Piwi esta principalmente restringida a línea germinal y se asocian con piRNAs para facilitar el silenciamiento de elementos genéticos móviles (Ha & Kim, 2014). Todas las proteínas Argonautas comparten dos características principales: un dominio central PAZ y un dominio PIWI carboxilo terminal. Estudios muestran que el dominio PIWI tiene una estructura similar a la RNasa H (Höck & Meister, 2008).

En plantas, la mayoría de los miRNAs tienen perfecta complementariedad con su RNAm blanco, provocando la escisión del RNAm entre los nucleótidos apareados a las bases 10 y 11 del miRNA mediante una proteína Ago (Bartel, 2009). En humanos sólo Ago2 tiene actividad endonucleasa, en Drosophila tanto Ago1 como Ago 2 tienen actividad

endonucleasa, Ago1 puede mediar la escisión de RNA guiada por miRNA, mientras Ago2 tiene la actividad de escisión guiada por siRNAs.

En contraste con las plantas, la complementariedad entre miRNAs animales y sus blancos esta frecuentemente restringida a la región 5´del miRNA (nucleótidos 2-8 o 2-7) a la región 3´UTR del RNAm blanco. Esta región 5´en el miRNA ha sido llamada “región semilla”, la cual se predice que puede regular un gran número de genes; todos los miRNAs en humano pueden regular una tercera parte de los genes codificantes de proteína. El descubrimiento de la región semilla y su importancia substancial para con su RNAm blanco concuerda con los informes sobre la región 5´de los miRNAs es la más conservada en metazoos y estudios bioquímicos indican que la afinidad a la región semilla es más fuerte que a otras regiones del RNA (Bartel, 2009) (Li, et al., 2010).

En ausencia de una extensa complementariedad entre el miRNA y el blanco, la unión de RISC más que catalizar una escisión induce la represión de la traducción del RNAm blanco o la desadenilación y degradación. En células humanas el complejo RISC, proteínas Argonautas, junto a RNAm que son blanco del silenciamiento por miRNAs están concentrados en focos citoplásmicos llamados cuerpos-P, P-bodies (Processing bodies) o GW-bodies (Du & Zamore, 2005). La desadenilación del RNAm esta mediada por proteínas glicina-triptófano de 182 kDa (GW182), componentes del miRISC que interactúan con Ago, mientras el amino terminal de GW182 interactúa (a través de sus repeticiones GW) con Ago, el carboxilo terminal de proteínas GW182 (mamíferos y *D. melanogaster*) interactúa con proteínas de unión a la cola poli-A (PABPs) y recluta las desadenilasas CCR4 y CAF1 (Krol, et al., 2010).

Además, las proteínas Ago contienen motivos altamente conservados similares al motivo de unión a cap (7-metilguanina) del factor de inicio de la traducción 4E (eIF4E). Los residuos aromáticos Phe470 y Phe505 en Ago2 son requeridos para ésta interacción; sugiriendo que proteínas Ago se unen al cap del RNAm previniendo así la unión del eIF4E con la consecuente represión de la traducción (Figura 4) (Höck & Meister, 2008).

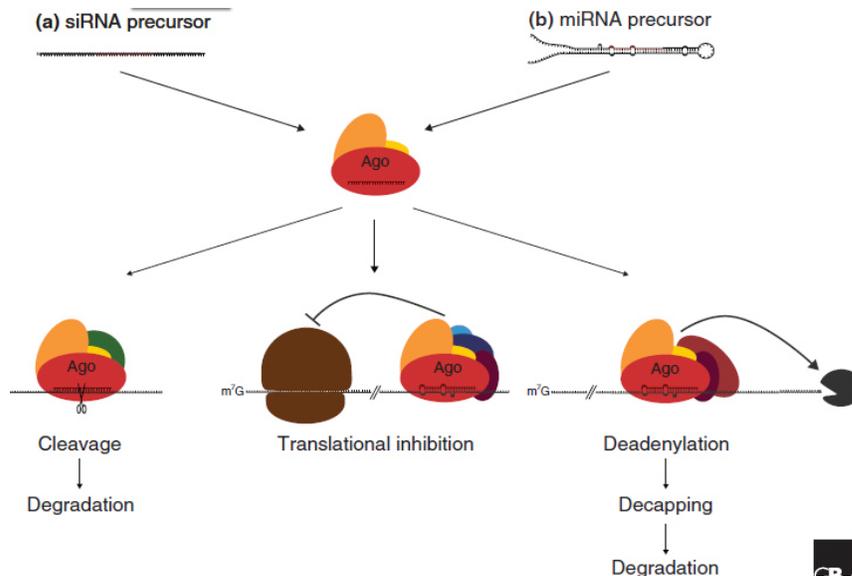


Figura 4. Papel de las proteínas Argonautas en el silenciamiento génico por RNA pequeños. (a) siRNAs derivados de precursor de doble cadena o (b) miRNAs derivados de estructura endógena en horquilla. Pueden unirse a proteínas Ago. En complementariedad perfecta a RNAm blanco induce a la escisión y degradación. Una unión imperfecta a la región 3'UTR del RNAm induce inhibición de la traducción, o desadenilación, eliminación del cap y degradación del RNAm. Tomado de (Höck & Meister, 2008)

2.1.3 Funciones de los microRNAs

Los miRNAs están implicados en un amplio rango de procesos biológicos en plantas y animales como lo son: sincronización en el desarrollo, hematopoyesis, organogénesis, apoptosis, proliferación y diferenciación celular y posiblemente eventos como la carcinogénesis. Su desregulación usualmente está vinculada con enfermedades humanas (Sayed & Abdellatif, 2011) (Finnegan & Pasquinelli, 2013).

El primer descubrimiento fue en *lin-4* y *let-7* que controlan los periodos de desarrollo en *C. elegans*. Mutaciones en estos miRNAs resultan en anomalías en el ciclo celular y diferenciación, impidiendo a las células alcanzar su estado completo de diferenciación (Brennecke, et al., 2003).

Mutantes de la proteína Dicer mostraron diversos defectos en el desarrollo, incluyendo embriogénesis anormal en *Arabidopsis*, retraso en la división de células germinales en *Drosophila*, defectos en la diferenciación en ratones (Du & Zamore, 2005).

P53 se une a promotores de genes de miRNAs específicos como lo son los miembros de la familia miR-34, esto para aumentar su transcripción, además, promueve el procesamiento de miRNAs primarios como miR-16-1, miR-143 y miR-145, los cuales tienen como blanco proteínas involucradas en la proliferación y ciclo celular, lo cual refuerza la función supresora de tumor por p53.

Otra proteína supresora de tumor es BRCA1, la cual es responsable de reparar el daño al DNA promoviendo el mantenimiento de la estabilidad genómica; BRCA1 promueve la maduración de algunos miRNAs con efectos supresores de tumor como lo son: let-7, miR-16 y miR-145 (Huen & Chen, 2010) (Kawai & Amano, 2012).

2.1.4 MicroRNAs circulantes

Los miRNAs están presentes en espacios extracelulares como sangre, orina, saliva y pueden ser secretados vía vesículas extracelulares (EVs) y por complejos proteína-miRNA. Los miRNAs circulantes son sensibles al tratamiento con proteasas en plasma, pero son protegidos de la digestión por RNAsas plasmáticas (Jung, et al., 2010). La resistencia a diferentes condiciones ha sido atribuida a la encapsulación mencionada anteriormente y a la asociación con complejos proteicos (Chen, et al., 2008) (Lin, et al., 2015).

Una fracción de los miRNAs son liberados de células al ambiente extracelular mediante los siguientes mecanismos: dentro de cuerpos multivesiculares (MVB) y secretados vía exosomas, incorporados dentro de microvesículas que son formadas por la membrana plasmática, asociadas con proteínas de unión a RNA como Ago2; la cual forma parte del RISC y libera complejos miRNA-Ago, e incorporándose dentro de lipoproteínas de alta densidad (HDL) o en cuerpos apoptóticos. (Cortez & Calin, 2009) Las vesículas extracelulares, especialmente exosomas, son vesículas de membrana que son liberadas al espacio extracelular después de la fusión de cuerpos multivesiculares (MVB) con la membrana celular. Por otra parte, microvesículas son vesículas cubiertas por la membrana plasmática de células sanas. La diferencia entre estos dos términos está basada en el tamaño de la vesícula: exosomas tienen un rango de 10-100nm y microvesículas están entre 100-1000nm (Fig. 5) (Fujita, et al., 2014). De manera

importante, se sugiere que las EVs son encargadas de la comunicación entre las células, para promover funciones biológicas en sitios distantes.

En 2010, se reportó que miRNAs en EVs son transferidos a células receptoras y suprimen la expresión de genes blanco en ellas. Arroyo y cols. mostraron que la mayoría de los miRNAs en suero están presentes en complejos Ago2-miRNA, pero no dentro de EVs. (Arroyo, et al., 2011) Además, se ha asociado que el RNA presente en plasma es protegido de la degradación probablemente por la inclusión en complejos con lípidos o lipoproteínas (Valadi, et al., 2007) (Lin, et al., 2015).

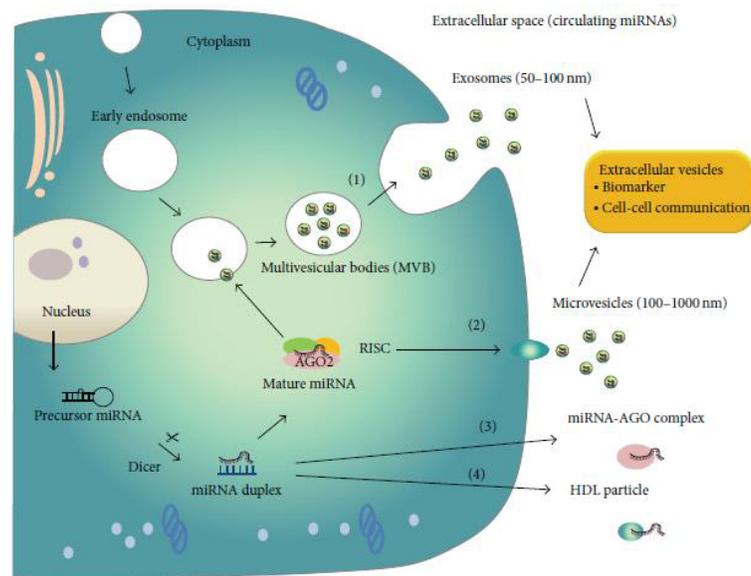


Figura 5. Mecanismos de liberación de miRNAs al espacio extracelular. (1) en cuerpos multivesiculares (MVB) y secreción por exosomas. (2) incorporando en microvesículas formadas por desprendimiento de membrana plasmática. (3) asociados a proteínas de unión a RNA como AGO2 liberándose en complejos. (4) incorporadas en partículas de lipoproteínas de alta densidad (HDL).

Tomado de (Fujita, et al., 2014)

Debido a que los miRNAs circulantes pueden ser fácilmente detectados por métodos no invasivos y los perfiles de expresión son capaces de diferenciar entre individuos sanos y enfermos, se ha postulado que estas moléculas pueden ser utilizadas como potenciales biomarcadores para el diagnóstico y monitoreo de enfermedades humanas, tales como enfermedades autoinmunes, hepáticas, cáncer, diabetes, enfermedad inflamatoria intestinal, etc. (Celikbilek, et al., 2014) (Pescador, et al., 2013) (Zeng, et al., 2014) (Mi, et al., 2013) (Mar-Aguilar, et al., 2013)

2.2 Modulación de los miRNAs debido a la dieta

Cada vez existe mayor evidencia sobre el papel de la dieta como un factor determinante de la salud o la enfermedad, las bases biológicas y moleculares sobre ello están siendo investigadas activamente (Ryu, et al., 2011). Debido a la importancia que han adquirido los miRNAs como moléculas reguladoras de la expresión de genes en muchas enfermedades, en la actualidad se busca determinar cuál es el papel de la dieta en la expresión de estas moléculas. Un estudio realizado en mujeres embarazadas con bajas concentraciones de 25-hidroxivitamina D encontró 11 miRNAs en circulación diferencialmente expresados (Enquobahrie, et al., 2011). Estos resultados sugieren a los miRNAs como un nuevo candidato a biomarcador del estado de nutrientes en investigaciones con intervenciones dietéticas (Ross & Davis, 2014). Modelos preclínicos en animales con obesidad inducida por dieta mostró que miR-21 está desregulado en diferentes tejidos, incluyendo islotes pancreáticos, células ováricas y tejido adiposo; en cambio, la expresión de miR-21 fue modificada en respuesta a ácidos grasos poli-insaturados y omega-3. En otro estudio, la línea celular de cáncer de colon HCT116 fue tratada con butirato, lo que disminuyó la expresión de miR-17, el cual está incrementado en algunos tipos de cáncer; se ha observado que las dietas ricas en fibra incrementan la producción del butirato por fermentación de la fibra (Palmer, et al., 2014).

Con el objetivo de evaluar la expresión diferencial de miRNAs en sujetos con diferentes hábitos dietéticos, se observó que sujetos con dieta vegana tenían altos niveles de miR-92a en comparación con personas vegetarianas y con dieta omnívora. miR-92a forma parte del cluster miR-17-92a localizado en la región 13q22 el cual codifica para 7 miRNAs (Bonauer & Dimmeler, 2009). La alta expresión del cluster ha sido relacionada con procesos de invasión y metástasis en células de cáncer colorectal, por lo que se le ha designado como un oncomir ya que promueve la proliferación y angiogénesis e inhibe la diferenciación, además un blanco descrito de miR-92a es el gen proapoptótico BCL2L1 (Ventura, *et al.*, 2008) (Inomata, *et al.*, 2009) (Yamada, *et al.*, 2013). Éste estudio planteó una posible modulación en la expresión de miRNAs debido a los hábitos dietéticos (Tarallo, et al., 2014).

Una dieta con deficiencia en aminoácidos también podría modificar la expresión de miRNAs, ya que cuando se alimentaron ratones con dieta deficiente en colina y metionina, los animales presentaron esteatosis hepática no alcohólica y daño hepático,

bajo ésta condición la expresión de miR-182, -183, -199a, -705 y -1224 estaba elevada. (García-Segura, et al., 2013) Por otra parte, la hiperglicemia resultó en una expresión incrementada de miR-21 en riñones de ratones con diabetes tipo 1 (Dey, et al., 2011).

2.3 MicroRNAs derivados de la dieta

El descubrimiento de la presencia de miRNAs en fluidos biológicos como sangre, orina, leche, saliva y fluido cerebroespinal, dio paso a un enfoque también nutricional, ya que un estudio mostró que la leche humana contenía miRNAs relacionados a inmunidad de forma abundante en exosomas; además, los miRNAs en exosomas fueron relativamente resistentes a pH ácido como el de estómago en humano, de esta manera se comenzó a especular que miRNAs provenientes de la leche de la madre podrían regular la expresión de genes en el infante a través de comunicación extracelular (Kosaka, et al., 2010).

A partir de esta evidencia, se han realizado estudios que muestran la sobrevivencia de miRNAs en otros alimentos. Philip y cols. determinaron la biodisponibilidad de miRNAs en soya y arroz durante su almacenamiento, procesamiento, cocción y condiciones de digestión humana simulada *in vitro*. Los autores concluyen que a pesar de los tratamientos los miRNAs pueden ser biodisponibles para su absorción. Sin embargo, otros estudios señalan que la concentración de miRNAs en alimentos en específico como la leche de vaca se afecta debido a su procesamiento (Chen, et al., 2010) (Howard, et al., 2015).

2.3.1 Análisis de la transferencia de xenomiRs de la dieta en organismos

La potencial biodisponibilidad de miRNAs en los alimentos abrió paso a la hipótesis que postula que los miRNAs presentes en alimentos son capaces de sobrevivir al procesamiento correspondiente y su posible transferencia a organismos receptores a través del tracto gastrointestinal; dado que estos miRNAs proceden de animales o plantas se les ha denominado xenomicoRNAs (xenomiRs) (Figura 6). Un estudio en 2012, reportó miRNAs procedentes de plantas de fuentes dietéticas en el suero y tejidos de ratones y humanos. En adición se reportó que el miR168a, abundante en el arroz, disminuyó la expresión de la proteína asociada al receptor de la lipoproteína de baja densidad en hígado de ratón. Los resultados apoyaron la idea que el material genético

derivado de la dieta podría sobrevivir al tracto digestivo y entrar a la circulación sanguínea, además de tener una actividad funcional sobre los genes en tejidos de mamífero (Zhang, et al., 2012).

Liang G y cols., evaluaron la sobrevivencia de miRNAs exógenos de origen de plantas en órganos y circulación sanguínea. En este estudio los ratones fueron alimentados con cantidades de 10-50µg de RNAs totales extraídos de *Brassica oleracea* (col) que contiene altos niveles de miR-172. Los resultados de este estudio mostraron que después de la ingesta de los RNAs totales de col, miR-172 fue encontrado en estómago, intestino, suero y heces de los ratones. Este estudio muestra que los miRNAs pueden traspasar el tracto gastrointestinal sin degradarse, sin embargo, persiste la incógnita si la ingesta de col en cantidades razonables es capaz de suministrar la cantidad necesaria de miRNAs para que alcancen concentraciones similares a las mostradas en este estudio (Liang, et al., 2014).

Otro estudio conducido en humanos, tuvo como objetivo valorar si miRNAs provenientes del consumo de leche de vaca pudieran ser detectados en suero, cinco personas adultas sanas después de un periodo de lavado consumieron leche en varias dosis. Debido a que estudios preliminares sugieren que las concentraciones plasmáticas de miRNAs permanecen altas hasta 9 horas después del consumo de leche, se recolectó el plasma al tiempo 0 (previo al consumo de leche) y en intervalos de 1-3, 6, 9 y 24 horas después del consumo de leche. Debido a que las secuencias de estos miRNAs maduros son idénticas en humano y bovino, los autores evaluaron mediante qPCR la expresión de hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-200c-3p y como control fue utilizado miR-1 ya que éste no fue detectado en leche. Los resultados mostraron una elevación de miR-29b en plasma a comparación con miR-1 el cual se mantenía constante tras el consumo de 1 Litro de leche. El tiempo con máximos niveles de miR-29b fue de 3.4 a 4.2 horas después del consumo de leche. Este es el primer estudio que reporta que un miRNA es absorbido nutricionalmente en cantidades significativas por consumo de leche de vaca (Baier, et al., 2014).

Melnik y cols. demostraron que después del consumo de leche el miR-29b bovino alcanzó la circulación sistémica de los sujetos que tomaron leche de vaca e incrementa

los niveles séricos de aminoácidos de cadena ramificada al inhibir la traducción del Complejo de la Deshidrogenasa de alfa-cetoácidos de cadena ramificada. Los aminoácidos de cadena ramificada son estimulantes de la vía mTORC1, una hiperactividad crónica de mTORC1 ha sido asociada al desarrollo de enfermedades como la diabetes tipo 2. Estos autores señalan que la persistente ingesta de miRNAs derivados de la leche de vaca podría transferir un perfil diabetogénico (Melnik, 2015).

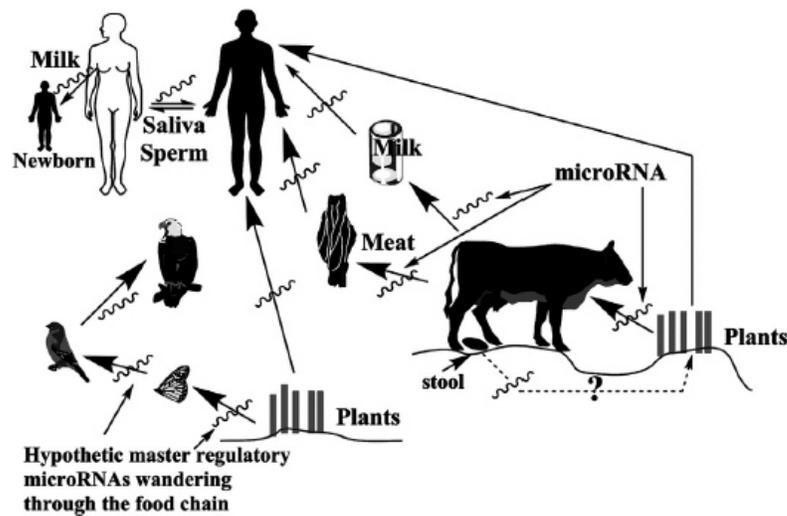


Figura 6. Hipótesis relacionada a los microRNAs como potenciales mediadores de información epigenética. Los microRNAs derivados de plantas han sido encontrados circulando en sangre de humanos u otros organismos vía oral, lo que abre la posibilidad de considerar a los microRNAs como grandes reguladores entre los individuos y entre las especies. Tomado de (Igaz & Igaz, 2015)

Liang H y cols. realizaron un estudio para resolver la controversia de la detección de miRNAs de plantas derivados de la dieta en plasma de humanos; en el estudio se les administró vía oral jugo de frutas y frutas frescas a individuos sanos y se evaluó la cinética de los miRNAs derivados de las frutas en sangre periférica de los individuos después de la ingesta. Los autores concluyen que para la selección de los miRNAs de plantas a analizar no sólo es necesario la concentración de los miRNAs en las plantas, también es un factor determinante el potencial de absorción selectivo de los miRNAs por el tracto gastrointestinal, ya que mostraron algunos miRNAs con concentraciones elevadas en las plantas que no resultaron en altos niveles en el plasma de humano, esto

debido probablemente a su pobre absorción por el tracto gastrointestinal (Liang, et al., 2015).

Los estudios anteriores fueron llevados bajo condiciones fisiológicas, sin embargo, Yang y cols. sugieren que los sujetos con alteraciones en la permeabilidad intestinal tienen un incremento en la capacidad de absorber RNAs pequeños; en su estudio el cisplatino modificó la organización de las células epiteliales del intestino parecido a lo que sucede en enfermedades con cambios en la permeabilidad intestinal, lo anterior resultó en una mejoría de la absorción del RNA procedente de la dieta. Los autores mencionan que la ingesta dietética no necesariamente resulta en las mismas concentraciones de un nutriente específico en sangre o tejido porque depende de la variabilidad en la absorción, distribución, metabolismo y su eliminación (Figura 7) (Yang, et al., 2015).

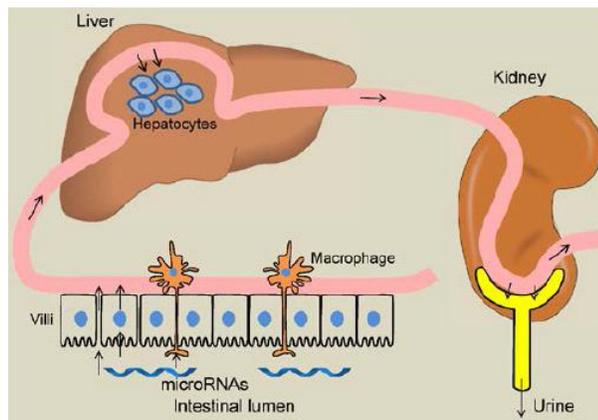


Figura 7. Modelo de la dinámica de los microRNAs de la dieta en el organismo. Los microRNAs de la dieta en caso de resistir a la degradación en intestino deberán atravesar la barrera intestinal mediante diversos mecanismos de transporte, evitar la degradación en circulación, sobrevivir al metabolismo en hígado y resistir la filtración y excreción por el riñón. Tomada de (Yang, et al., 2015)

En contraparte a los resultados anteriores, Snow y cols., realizaron varios experimentos para observar el traspaso de miRNAs de la dieta a la circulación. En un primer estudio, determinaron los niveles en suero de miR-156a, miR-159a, miR-169a presentes en frutas como peras y plátanos. Los sujetos estudiados eran personas sanas que en su dieta normal incluían estas frutas. Los miRNAs altamente expresados en las frutas fueron indetectables en el suero de humano, en comparación con miR-16 (microRNA endógeno). Lo que sugiere la incapacidad de estas moléculas exógenas de pasar y

permanecer en torrente sanguíneo de humanos. En un segundo estudio, se formaron 3 grupos de ratones, dónde uno alimentado con dieta enriquecida en soya, otro grupo alimentado con dieta vegetariana y el último grupo con dieta rica en productos de origen animal. Después de 4 semanas se evaluaron los niveles de miR-156a, miR-159 y miR-169a en suero y tejidos, además de miR-16 en suero y miR-195 en tejido. Los resultados detectaron niveles muy bajos de miR-156 en suero y tejidos, mientras que, miR-159 y miR-169 resultaron indetectables. Por lo cual, no se mostró evidencia significativa de la presencia de los miRNAs analizados después del consumo de una dieta rica en estos miRNAs. Finalmente, en un tercer estudio, utilizaron ratones miR-21 (-/-) y un grupo control, a los cuales se les administró una dieta alta en miR-21 (dieta a base de productos de origen animal) y tras 4 semanas se evaluó la expresión de miR-21, a pesar de la alta cantidad de miR-21 en la dieta. Los ratones miR-21 (-/-) presentaron niveles indetectables en suero y tejidos de éste miRNA a diferencia de los controles. Los resultados obtenidos por los autores muestran que la transferencia de miRNAs derivados de la dieta es ineficaz y es poco probable que puedan provocar una respuesta fisiológica en los organismos (Snow, et al., 2013).

Witwer K y cols., obtuvieron muestras de sangre de dos macacos cola de cerdo (*Macaca nemestrina*) previo al consumo de una bebida comercial a base de soya y frutas, pero libre de algún producto de origen animal; tras el consumo de la bebida se cuantificó la expresión de miRNAs endógenos y de plantas por RT-qPCR, sin embargo, no fue observada una respuesta a la ingesta dietética (Witwer, et al., 2013).

Por otro lado, Laubier J y cols. utilizaron un modelo transgénico el cual expresaba altos niveles de miR-30b en la leche que producía; a los 10 días de lactancia de ratones recién nacidos se estudió la transferencia oral de este miRNA. Estos autores mostraron que a pesar de encontrar altos niveles de miR-30b en leche materna de ratones hembra transgénicas y en estómago de ratones recién nacidos, no se detectó un incremento significativo de miR-30b en tejidos de ratones recién nacidos alimentados por ratones hembras transgénicas comparado con ratones recién nacidos alimentados por hembras wild-type (Laubier, et al., 2015).

Siguiendo la línea de transferencia de miRNAs provenientes de leche materna, Title y cols. diseñaron un estudio en el cual emplearon modelos genéticos con ratones recién nacidos knockout para miR-375 y miR-200c/141, éstos ratones fueron alimentados con leche de madres wild-type. Los resultados mostraron que, en los tejidos como epitelio intestinal, sangre, hígado y bazo no se detectó presencia de los miRNAs analizados. Los niveles de miR-375 en hepatocitos se encontraron en el límite de detección y en una concentración muy baja comparada con la concentración necesaria para realizar la regulación génica. Los autores concluyeron que es poco probable que los miRNAs de la leche puedan provocar un silenciamiento canónico de la expresión génica (Title, et al., 2015).

Auerbach A y cols. diseñaron un estudio para validar los resultados reportados por Baier en el 2014, en el primer estudio que reporta que un miRNA es absorbido nutricionalmente en cantidades significativas por consumo de leche de vaca, dado que los miRNAs de bovino son homólogos a los de humano, los resultados de Baier pudieran ser explicados por transferencia de xenomiRs, por la regulación de miRNAs endógenos o por ambos. La validación incluyó muestras de plasma del tiempo basal y de 3 horas después del consumo de leche y células mononucleares de sangre periférica del tiempo basal y de 6 horas después del consumo de leche provenientes del estudio inicial (Baier, et al., 2014). La validación por Open Array no reveló señales de miRNAs significativas después de la ingestión, lo cual fue confirmado por qPCR. Los datos de la secuenciación en plasma no contenían lecturas para miR-29b o miR-200c; por lo cual su estudio no apoyó la transferencia de xenomiRs de la dieta derivados en específico de la leche de vaca a la circulación de adultos humanos (Auerbach, et al., 2016).

La tabla 1 muestra un resumen de la evidencia sobre la absorción de xenomiRs, algunas investigaciones han tratado de reproducir los resultados de la transferencia de miRNAs procedentes de la dieta hacia mamíferos, sin embargo, han mostrado niveles insignificantes de los miRNAs sugiriendo que el bajo número de copias es insuficiente para lograr una actividad biológica (Dickinson, et al., 2013) (Tosar, et al., 2014).

Tabla 1. Resumen de la transferencia de miRNAs de la dieta en diferentes organismos	
Transferencia de miRNAs de la dieta a organismos	Detección de miR-168a en circulación y tejidos de mamíferos posterior al consumo de arroz (Zhang, et al., 2012).
	Presencia de miR-172 proveniente de col en el suero y tejidos de ratones (Liang, et al., 2014).
	Incremento de miR-29b y miR-200c posterior al consumo de leche de vaca (Baier, et al., 2014).
	Selectividad para absorción de miRNAs de plantas por el tracto gastrointestinal (Liang, et al., 2015).
Falla de transferencia de miRNAs de la dieta en el organismo	Niveles indetectables en suero de miR-156a, miR-159a, miR-169a en sujetos que consumían habitualmente frutas que contienen esos miRNAs (Snow, et al., 2013).
	Incremento no significativo de la expresión de miR-30b en ratones recién nacidos alimentados con leche con altos niveles de éste miRNA (Laubier, et al., 2015).
	Expresión no significativa de los miR-375 y miR-200c/141 en ratones recién nacidos knockout alimentados con leche materna wild-type (Title, et al., 2015).
	Detección no significativa de la expresión de miR-29b y miR-200c posterior al consumo de leche de vaca (Auerbach, et al., 2016)

2.4 MicroRNAs en carne

El término carne se define como el tejido muscular de los animales utilizado como alimento (Lawrie, 1967). El ser humano, desde distintos contextos culturales e históricos tiene una relación bastante especial con la carne como alimento, en casi todas las culturas del mundo la carne forma parte de los imaginarios y mitos culturales sobre alimentación y bienestar. La carne es sinónimo de abundancia y ausencia de hambrunas, y además constituye un ingrediente clave en las tradiciones culinarias que convocan a una comida como un acto no sólo de alimentación, sino del compartir un acto familiar, social y cultural.

No cabe duda que el consumo de carne forma parte de dieta cotidiana de muchas personas en el mundo, sobre todo países en vías de desarrollo (OMS, 2003). La carne de origen vacuno se considera el segundo lugar de consumo después de la carne de pollo (Alvarado, et al., 2012). La carne es una fuente de proteína de alto valor biológico en la dieta, además de vitaminas y minerales con alta biodisponibilidad como es el Hierro y la vitamina B12 (Carvajal, 2001) (Rubio & Braña, 2013).

En cuanto a la determinación de los miRNAs en el tejido muscular bovino se ha realizado la caracterización en diversos estudios a partir de secuenciación y análisis

bioinformático, reportando que miR-1, miR-133a y miR-206 están expresados de manera específica en músculo de bovino, además, miR-193b y miR-378 se encuentran altamente expresados en tejido muscular bovino (Jin, et al., 2009) (Gu, et al., 2007) (Sun, et al., 2013). En la revisión realizada por Wagner y cols. se indican los principales miRNAs en alimentos, dentro de ellos se muestran algunos miRNAs de carne de bovino (Tabla 2) (Wagner, et al., 2015).

Tabla 2. Descripción de algunos miRNAs en diversos alimentos incluida la carne

Food	microRNA expression level															
	High ←							→ Low								
Pork (<i>sus scrofa</i>)	miRNA	1	378	143-3p	133a-3p	30a-5p	206	let-7f	148a	10b	127	140	30d	542-3p	21	let-7a
Poultry (<i>gallus gallus</i>)	miRNA	206	let-7c	let-7j	103	let-7f	130a	107	130b	let-7b	128	16c	15b	221	21	125b
Wheat (<i>triticum aestivum</i>)	miRNA	156a	168a	167a	166a	156c	1869	1074	894	2199	172a	1132	2111-3p	2911	166k	1135
Barley (<i>hordeum vulgare</i>)	miRNA	168-5p	156	166b/c	5048	159a/b	168-3p	1120	5049	171	444b	5052	397	1126	5050	1436
Corn (<i>zea mays</i>)	miRNA	319b	319a	319d	319c	171e	171j	171i	166l	166a	171d	166g	166m	166e	166d	166f
Rape (<i>brassica napus</i>)	miRNA	156	159	166	172	158	171	319	824	160	167	827	165	403	395	390
		microRNA expression levels not known														
Beef (<i>bos taurus</i>)	miRNA	133a	26a	99a	103	150	574-3p	411	107	652	423-5p	122				
Milk (raw) (<i>bos taurus</i>)	miRNA	21	99a	30d	148a	200c	26a	26b								
Broccoli (<i>brassica oleracea</i>)	miRNA	398b	319b	395b	394a	414b	162a	158e								
Rice (<i>oryza sativa</i>)	miRNA	1861e/g/ k/m	1861b/f/ i/l	164e	167d/ f-h/j	397b	519a-j	5337	5338							
Apple (golden delicious) (<i>malus domestica</i>)	miRNA	396	159	858	482	167	399	164	165/166	172	162	171	156	535	168	395
Orange (<i>citrus sinensis</i>)	miRNA	172a	164a	166j	167d	479	156a	167a	162a	159a	473a	164d	156b	399a	482c	171b
Potato (root) (<i>solanum tuberosum</i>)	miRNA	164	165	162	168	171	167	159								
Tomato (<i>solanum lycopersicum</i>)		172	166	396	164	162	157	159	168	403	156	827	167	165	171	390
Grape (<i>vitis vinifera</i>)		166	159	164	167	165	168	827	319	396	172	162	156	403	390	479

Tomado de la revisión de (Wagner, et al., 2015)

Las secuencias nucleotídicas de miRNAs entre bovinos y humanos suelen ser casi 100% idénticas, por lo cual Dever y cols. evaluaron el perfil de expresión y la estabilidad de miRNAs homólogos a humano contenidos en sirloin, corazón y tejido adrenal bovino, después de un proceso de cocción o de secado. En un corte de sirloin cocinado dentro de los miRNAs más abundantes se encontraron a miR-10b-5p, miR-1, miR-378a, miR-206, miR-486-5p, miR-26a-5p, miR-30a-5p y miR-22-3p. Además, encontraron que después del proceso de cocción los miRNAs no disminuyeron de manera importante; únicamente miR-10a aparecía en el perfil de expresión de miRNAs en el sirloin crudo, posterior a la cocción disminuye su concentración y aparece miR-133a dentro del perfil de miRNAs mayormente expresados en la carne cocida. Los tejidos de bovino contienen perfiles únicos de miRNAs homólogos a miRNAs humanos que sobreviven a métodos de preparación basados en calor (Figura 8) (Dever, et al., 2015).

Sirloin		Raw									
		10b-5p	1	378a-3p	206	486-5p	26a-5p	30a-5p	22-3p	143-3p	10a-5p
		61.5%	18.1%	3.4%	1.9%	1.6%	1.6%	1.5%	1.1%	1.1%	0.8%
Sirloin		Cooked									
		10b-5p	1	206	378a-3p	143-3p	30a-5p	26a-5p	486-5p	133a-3p	22-3p
		48.8%	24.1%	4.8%	4.5%	2.0%	1.8%	1.4%	1.4%	1.2%	1.1%

Figura 8. Perfil de microRNAs en tejido muscular de bovino crudo y después de un procesamiento a base de calor. La imagen muestra los 10 miRNAs principalmente expresados en tejidos muscular de bovino en específico sirloin crudo y después de un proceso de cocción convencional.

Tomado de (Dever, et al., 2015).

miR-10b fue el miRNA encontrado en mayor proporción en carne de res cocinada, éste miRNA ha sido implicado como potencial biomarcador en pacientes con cardiomiopatía (Fang, *et al.*, 2015), se ha presentado diferencialmente expresado en diferentes tipos de cáncer y en la enfermedad de Huntington (Mangolini, et al., 2015) (Huang, *et al.*, 2015) (Hoss, *et al.*, 2015); dentro de sus blancos tiene a proteínas participantes en vías de señalización como MAPK y PPAR (Vlachos, *et al.*, 2012).

El segundo miRNA encontrado en mayor proporción en carne cocida fue miR-1, es un miomiR al ser un microRNA específico de músculo, es esencial para el desarrollo y la homeostasis del músculo liso y esquelético (Chen, *et al.*, 2006) (Xie, *et al.*, 2011). Los niveles de miR-1 en sangre son bajos y se ha encontrado elevado en daño muscular (Gomes, *et al.*, 2014); dentro de las proteínas que regula se encuentran aquellas que participan en la vía de las pentosas-fosfato, ritmo circadiano y ciclo celular (Vlachos, *et al.*, 2012). miR-206 es un miRNA específico de músculo esquelético, dentro de sus funciones están vías relacionadas con la promoción de la diferenciación del mioblasto, el desarrollo, función y regeneración del músculo esquelético (Lin, et al., 2013) (Boettger, et al., 2014). miR-22 es considerado un microRNA abundante en tejido hepático, se ha visto diferencialmente expresado en sujetos con resistencia a la insulina debido a que su elevada expresión hepática promueve un daño en la gluconeogénesis (Kaur, *et al.*, 2015), además, ha mostrado tener participación como supresor tumoral (Xiong, *et al.*, 2010).

2.4.1 Consumo de carne y modulación de miRNAs

La carne roja contiene nutrientes con alta biodisponibilidad, sin embargo, existen razones que previenen de una ingesta alta. El consumo elevado de grasa saturada contenida en carne de animales es un factor de riesgo importante para padecer enfermedades metabólicas y cardiovasculares (ECV) (Monroy, 2007) (Córdova-Villalobos, 2009). Además, existe evidencia convincente que el consumo excesivo de carnes rojas incrementa el riesgo de cáncer colorectal y que hay evidencia que incrementa el riesgo de cáncer en el esófago, pulmones, páncreas y endometrio. Por lo cual, el *American Institute for Cancer Research* y el *World Cancer Research Fund* recomienda un consumo menor a 500 gramos de carne roja por semana y evitar el consumo de carne procesada (Norat, 2010).

En cuanto al consumo de carne roja y la modulación de miRNAs endógenos, Humphreys y cols., midieron marcadores de cáncer colorectal en voluntarios sanos los cuales estuvieron bajo intervención con dos variantes: una intervención basada en dieta alta en carne roja y otra intervención con dieta alta en carne roja más un suplemento de fibra, ya que se postula que la ingesta de fibra promueve efectos antitumorales. Los resultados mostraron que la expresión de miRNAs oncogénicos como el cluster miR-17-92 y miR-21 fue más alta en la mucosa rectal con la dieta alta en carne roja, mientras que la intervención con el suplemento de fibra restableció la expresión del “cluster” miR-17-92 a los niveles basales, sin embargo, la expresión de miR-21 se mantuvo elevada (Humphreys, et al., 2014).

Un estudio realizado *in vitro* por Papaioannou y cols. reportó que las aminas heterocíclicas generadas durante la cocción de la carne afectan la expresión de miR-21, miR-16, miR-200c, miR-106b, miR-26a y miR-24; estos miRNAs son normalmente regulados por el estrógeno y han sido implicados en la iniciación y progresión del cáncer de mama (Papaioannou, et al., 2014).

A pesar de que se ha descrito la detección de miRNAs como miR-1, 10b, -206, -378, -143, 30a y -22 después del cocimiento de la carne bovina, hasta la fecha no se ha reportado si los miRNAs detectados pueden ser transferidos a los organismos que la ingieren. Diversos autores sugieren que los miRNAs provenientes de animales posiblemente presentan preferencia en la transferencia probablemente debido a la similitud de las secuencias y a los mecanismos de empaquetamiento (Igaz & Igaz, 2015), sin embargo, a la vez, la similitud de las secuencias complica el análisis comparativo entre los xenomiRs y los miRNAs endógenos (Witwer, 2012).

3. JUSTIFICACIÓN

Recientemente la Organización Mundial de la Salud ha estimado que el 80% de enfermedades prematuras cardiovasculares y diabetes pueden ser prevenidas con un cambio del estilo de vida como lo es llevar una alimentación adecuada. En relación a esto, se ha acumulado evidencia que apoya la idea sobre la dieta y su gran impacto en la salud a lo largo de la vida. Un ejemplo es el consumo de carne, el cual forma parte de la dieta cotidiana de muchas personas en México, no obstante, el consumo excesivo de carnes rojas ha sido asociado con un aumento del riesgo de diversas enfermedades crónico degenerativas; principalmente debido a la producción de aminas heterocíclicas e hidrocarburos aromáticos policíclicos en su proceso de cocción, así como su contenido de grasas saturadas y recientemente con la modulación en la expresión de los miRNAs. Evidentemente los alimentos en la dieta proveen nutrientes y factores dietéticos que pueden influir en los procesos biológicos como lo es regulando la expresión de miRNAs endógenos, sin embargo, de manera reciente se ha mostrado la transferencia de miRNAs de alimentos derivados de plantas y animales a través de su ingestión permitiendo la circulación de éstos en sangre. No obstante, aún existen dudas al respecto y queda poco claro si miRNAs derivados de la alimentación pueden alcanzar la circulación del organismo receptor y llevar a cabo el proceso de regulación génica. Además, no se ha realizado ningún estudio que evalúe el incremento postprandial en los niveles de miRNAs posteriores al consumo de carne de bovino en un tiempo de comida habitual, lo que sucedería bajo condiciones normales. La posibilidad del efecto en los miRNAs después de la ingesta daría pauta a estudios posteriores de mecanismos moleculares en los cuales el consumo de carne pudiera estar involucrado en las enfermedades en las que se le ha sido asociado. Asimismo, resultados positivos de incremento postprandial significativo en los niveles de los miRNAs apoyarían la posibilidad de una transferencia de los miRNAs provenientes de la carne de res desde una perspectiva indirecta.

4. HIPÓTESIS

El aumento de la expresión de los microRNAs en plasma humano es debido a la transferencia de miRNAs proveniente de carne de res.

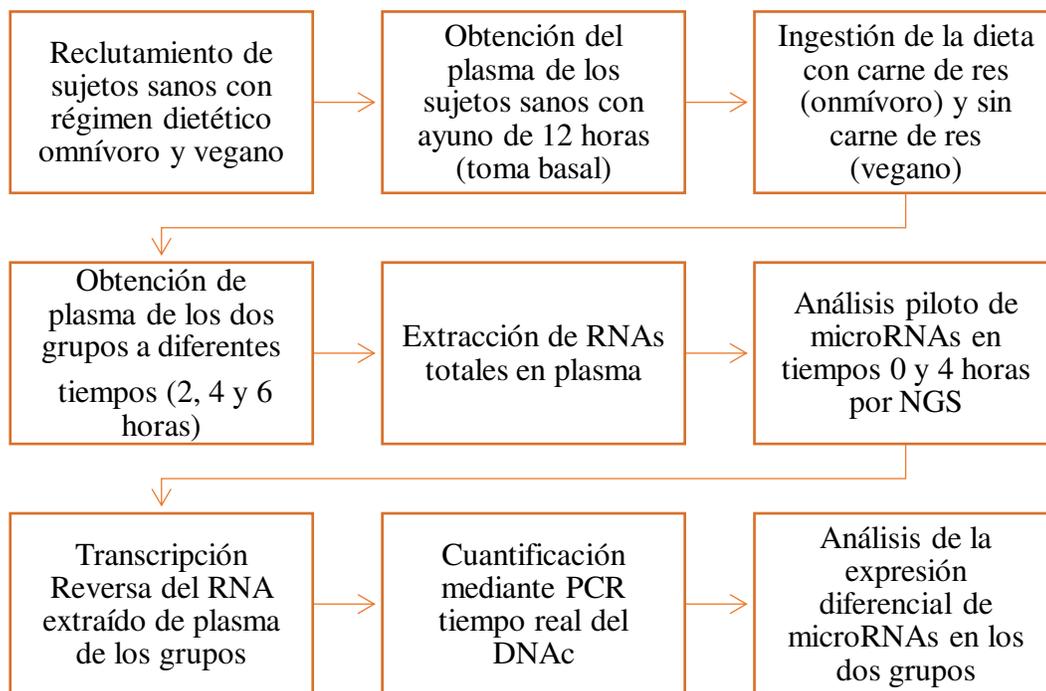
5. OBJETIVO GENERAL

Determinar si el aumento de la expresión de los microRNAs en plasma humano es debido a la transferencia de miRNAs proveniente del consumo de un tiempo de alimentación con carne de res.

5. 1 Objetivos específicos

1. Establecer un banco de RNAs pequeños de plasma de personas que ingieran carne de bovino (grupo omnívoro) y de personas con un régimen dietético vegano (grupo control).
2. Determinar si la dieta con carne de res puede inducir diferencias en la expresión basal y postprandial de los miRNAs en un estudio piloto de muestras de plasma humano.
3. Cuantificar los niveles de expresión basales de los miRNAs seleccionados en plasma y a diferentes tiempos después de la ingesta del grupo omnívoro y del grupo control.
4. Analizar la expresión diferencial de los miRNAs en plasma humano después de la ingesta de carne de res comparados con el control.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL



7. MATERIAL Y MÉTODOS

Lugar de trabajo: Unidad de Biología del Desarrollo. Laboratorio de Inmunología y Virología. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

Área de estudio: Biología molecular aplicada en alimentación, Nutrigenómica.

Diseño del Estudio: Estudio cuasi-experimental, transversal.

7.1 Obtención de muestras de plasma de sujetos omnívoros y establecimiento de un banco de RNA

Para establecer el banco de RNA de personas omnívoras (con consumo de carne frecuente) y de personas bajo una dieta vegana se procedió a reclutar a los participantes del estudio y a la obtención de muestras de plasma en ayunas y postprandiales.

7.1.1 Participantes del estudio

Un total de 29 voluntarios sanos con diferentes hábitos dietéticos: 14 sujetos omnívoros y 15 sujetos veganos y con similares parámetros: edad, distribución de sexo, estilo de vida. Los participantes se reclutaron mediante invitación, recibieron información sobre el estudio, se les aplicó cuestionarios de hábitos dietéticos y estilo de vida e historias clínicas para su selección y firma del consentimiento informado (Anexo 1).

Definición de dieta vegana: hábitos alimentarios dónde excluyen todas las carnes y subproductos de origen animal, incluso la miel de la dieta (Craig, 2010).

Criterios de inclusión:

Sujetos con 18-30 años de edad

Firma de consentimiento informado

Sanos, sin alguna condición médica aguda o crónica

Con consumo similar de alimentos

Índice de Masa Corporal normal según OMS, 2004

Niveles de actividad física similares

Consumo de carne roja al menos tres veces a la semana (*criterio para el grupo de dieta omnívora*)

Dieta vegana con duración mínima de 1 año (*criterio para el grupo de dieta vegana*)

Sin consumo de alcohol o tabaco

Criterios de exclusión:

Aquellos que no aceptaron firma del consentimiento informado

Mujeres en menstruación, embarazo.

Consumo de medicamentos, suplementos que puedan influir en los parámetros

Padecimientos médicos que afecten la dieta o peso, como malabsorción, intolerancia a algún componente de la dieta experimental

Criterios de eliminación:

No consumir la totalidad de la dieta experimental

Llenado incompleto de cuestionarios

Fases del estudio inconclusas

Para la selección de los sujetos además de la aplicación de una historia clínica (anexo 3) y cuestionario de hábitos dietéticos y estilo de vida, se les realizaron tomas de mediciones antropométricas como: el peso, % de grasa, % de músculo y grasa visceral, las cuales fueron determinadas con el uso de una báscula con monitor de composición corporal OMRON HBF-514c. La circunferencia de cintura fue medida con el uso de la cinta métrica Lufkin W606PM recomendada por la Sociedad Internacional para el Avance de la Cineantropometría (International Society for Advancement in Kinanthropometry, ISAK). Cada una de las mediciones fueron realizadas siguiendo los protocolos establecidos por el ISAK. Para complementar la información de su estado de salud se les realizaron estudios de Biometría Hemática, Química Sanguínea y Perfil de lípidos en el Departamento de Laboratorio Clínico de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL.

Para determinar si la alimentación puede inducir diferencias en la expresión basal y postprandial de miRNAs, se procedió a brindar una dieta correspondiente a un tiempo de comida conforme a la siguiente descripción.

7.1.2 Intervención de una dieta con carne de res

Se diseñó una dieta estándar basada en el Sistema Mexicano de Equivalentes que corresponde a un tiempo habitual: 1/3 de taza de verduras mixtas al vapor (zanahoria, calabaza, pimiento rojo y verde), 1 taza de arroz, 150g de carne de res asada, 1/4 de taza

de lentejas y 1 taza de ensalada fresca (lechuga, col morada y tomate). Los sujetos del grupo omnívoro consumieron la ración anteriormente mencionada de carne y los sujetos del grupo vegano consumieron la misma dieta sin la ración de carne; en la tabla 3 se presenta la composición nutrimental de la dieta.

Tabla 3. Contenido nutrimental de la dieta		
Dieta	Intervención con carne	Intervención sin carne
Energía (kcal/ kJ)	579/2422	397/ 1661
Carbohidratos (g) (%)	62.4 (43%)	62.4 (63%)
Proteínas (g) (%)	35.7 (25%)	11.2 (11%)
Lípidos (g) (%)	20.7 (32%)	11.3 (26%)
Fibra (g)	8.2	8.2
Colesterol (g)	74.2	0.0

7.1.3 Recolección de muestras biológicas

Las muestras de sangre fueron colectadas de acuerdo a los procedimientos estándar de flebotomía a las 0 h (en condición de ayuno de 12 h) y a las 2, 4, y 6 h posteriores a la ingesta de la dieta. Es importante mencionar que los participantes no consumieron alimentos adicionales durante el periodo de las tomas postprandiales. La sangre venosa se recolectó en tubos vacutainer de 5 ml con EDTA (ácido etildiaminotetraacético). Posteriormente, para la obtención del plasma la sangre se centrifugó a 2000 x g por 15 min; el plasma se almacenó a -80°C hasta su uso (Bustin, et al., 2009).

7.1.4 Extracción de RNAs pequeños totales en plasma

Para la extracción del RNA total incluyendo RNAs pequeños en plasma se utilizó miRNeasy Kit (QIAGEN®, Valencia, CA, USA) en base al protocolo establecido por la compañía, el cual se describe a continuación:

- 1) Se tomó una muestra de plasma de 100 µl depositándolo en un tubo de 1.5 ml.
- 2) Se añadieron 5 volúmenes de QIAzol Lysis Reagent, se homogenizó y se incubó a temperatura ambiente por 5 min.
- 3) Se añadieron 3.5 µl de miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control (1.6 x 10⁸ copias/µL).
- 4) Se agregaron 100 µl de cloroformo, se mezcló vigorosamente con vórtex por 15 s e incubó por 2-3 min.
- 5) Se centrifugó por 15 min a 12,000 x g a 4° C.

- 6) Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo de 1.5 ml, se añadió 1.5 volúmenes de etanol al 100% y se homogenizó.
- 7) Se añadieron 700 μ l de la muestra en la columna RNeasy MinElute y se centrifugó a $>8000 \times g$ por 15 s a temperatura ambiente descartando el líquido que se deposita en el tubo colector.
- 8) Se añadieron 700 μ l de buffer RWT a la columna RNeasy MinElute y de nuevo se centrifugó por 15 s a $>8000 \times g$ para lavar la columna descartando el líquido acumulado en el tubo colector.
- 9) Se añadieron 500 μ l de Buffer RPE a la columna RNeasy MinElute y se centrifugó por 15 s a $>8000 \times g$ para lavar la columna, se descartó el líquido depositado en el tubo colector.
- 10) Se añadieron 500 μ l de etanol al 80% en la columna, se centrifugó por 2 min a $>8000 \times g$ para lavar la membrana de la columna, se descartó el líquido y el tubo colector.
- 11) Se colocó la columna en un nuevo tubo colector de 2 ml y se centrifugó a máxima velocidad por 5 min con la tapa abierta para secar la membrana.
- 12) Se colocó la columna en un nuevo tubo de 1.5 ml, se añadieron 14 μ l de agua libre de RNasas y se centrifugó a máxima velocidad por 1 minuto para eluir el RNA, el cual se almacenó a -80°C hasta el momento de su uso.

7.1.5 Cuantificación de RNAs pequeños totales

Tanto la cuantificación de los RNAs pequeños totales como del DNAC se realizó midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm en el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000™ (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

7.2 Estudio piloto del perfil de expresión de miRNAs basales y postprandiales por Secuenciación de Nueva Generación (NGS)

La selección de los miRNAs a evaluar en el presente estudio no sólo depende de su concentración en el alimento; también hay que tomar en cuenta la probabilidad de absorción de éste miRNA debido a una posible selectividad por el tracto gastrointestinal (Liang, et al., 2015). Por ello, se realizó un análisis piloto del panel de miRNAs maduros

mediante Secuenciación de Nueva Generación (NGS); el estudio incluyó dos muestras por grupo de estudio seleccionadas de manera aleatoria: las muestras en ayunas de una persona del grupo omnívoro y una persona del grupo vegano y las muestras a las 4 h postprandiales de los mismos sujetos. El tiempo de 4 h postprandial fue seleccionado debido a que los estudios que reportan la presencia de miRNAs procedentes de la dieta observaron a éste tiempo el máximo incremento en circulación (Baier, et al., 2014) (Liang, et al., 2014). Las muestras las cuáles incluían ~300-500ng de RNA y una relación de absorbancias 260/ 280 y 260/230 de ~2.0, fueron enviadas a la compañía SeqMatic LLC., Fremont, CA, USA para la realización de la NGS, la compañía proporcionó el perfil de expresión de todos los miRNAs en base a miRBase v20. Las lecturas de las bibliotecas se realizaron con un equipo Illumina HiSeq 2000.

7.3 Cuantificación de la expresión de miRNAs basales y postprandiales mediante qPCR

7.3.1 Extracción de RNA en carne de res y células HEK-293

Debido a que los niveles de expresión de algunos miRNAs en muestras de plasma son bajos, el llevar a cabo los ensayos de eficiencia de amplificación para la curva de rango dinámico podría dificultarse para validar el método de cuantificación; por lo cual se procedió a utilizar muestras de RNA proveniente de carne de res (tanto cocida como cruda) y de células HEK-293. A continuación, se describe el protocolo del kit miRNeasy de QIAGEN utilizado para la extracción de RNA total en tejidos y en células.

- 1) Se preparó la muestra: 3.2×10^6 células HEK-293 previamente tripsinizadas fueron obtenidas en pellet, se le añadieron 700 μ l de QIAzol Lysis Reagent y se homogenizó por vórtex por 1 minuto.

Fueron pesados 50mg de carne de res sin dejar que descongelará (para evitar la degradación del RNA); se le añadieron 700 μ l de QIAzol Lysis Reagent a la muestra, mediante el homogenizador se llevó a cabo la disrupción y homogenización del tejido durante 40-60 s.

- 2) Se incubó por 5 min a temperatura ambiente y posteriormente se añadieron 140 μ l de cloroformo y se agitó con el uso del vórtex por 15 s.

- 3) Se incubó durante 2-3 min para posteriormente centrifugar 15 min a 12,000 x g a 4°C.
- 4) Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo (350µl) y se añadieron 525µl de etanol al 100%, posteriormente se mezcló por pipeteo.
- 5) Se depositaron 700µl de la muestra en la columna y se centrifugó a $\geq 10,000$ rpm por 15 s a temperatura ambiente.
- 6) Se descarta el líquido depositado en el tubo colector y se repitió el paso 5 con el resto de la muestra.
- 7) Se añadieron 700µl de buffer RWT a la columna y se centrifugó por 15 s a ≥ 8000 x g para lavar la columna, se descartó el líquido depositado.
- 8) Se añadieron 500µl de Buffer RPE a la columna y de nuevo centrifugó por 15 s a ≥ 8000 x g para lavar la columna, se descartó el líquido depositado.
- 9) Se añadieron otros 500µl de Buffer RPE a la columna y se centrifugó por 2 min para secar la columna.
- 10) Se transfirió la columna a un nuevo tubo de 1.5ml, se añadieron 30µl de agua libre de RNAsas a la columna, se incubó 10 min y se centrifugó por 1 minuto a ≥ 8000 x g para eluir el RNA.
- 11) El RNA obtenido fue cuantificado y almacenado a -80°C hasta el momento de su uso.

7.3.2 Síntesis de DNAc

Para la transcripción reversa se utilizó el kit Universal cDNA synthesis kit de EXIQON Inc. (Woburn, MA, USA). Debido a que la cantidad de RNA en muestras como suero y plasma no puede ser determinada con exactitud en un espectrofotómetro, además que éste tipo de muestras pueden contener inhibidores para la síntesis de DNAc y para la qPCR; se realizó una prueba de estandarización que consistió en realizar la reacción de síntesis de DNAc con diferentes volúmenes de RNA: 2 µl, 4 µl y 6 µl, en base al siguiente protocolo:

1. Los reactivos fueron descongelados previamente en hielo.
2. Se realizaron las mezclas de reacción como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Mezcla de reacción para estandarización de síntesis de DNAC			
	Para 2 µl de RNA	Para 4 µl de RNA	Para 6 µl de RNA
Reactivo	Volumen (µl)	Volumen (µl)	Volumen (µl)
Buffer de reacción 5X	2	2	2
Agua libre de nucleasas	4.5	2.5	0.5
Mezcla de enzimas	1	1	1
RNA sintético spike in UniSp6	0.5	0.5	0.5
Templado RNA total	2	4	6
Volumen total	10	10	10

3. Se homogenizó cada una de las reacciones mediante vórtex y se centrifugó para llevar toda la mezcla al fondo.
4. Se incubó siguiendo el programa descrito en la tabla 5 para la síntesis del DNAC:

Tabla 5. Programa para la síntesis de DNAC	
Tiempo (min)	Temperatura (°C)
60	42
5	95
Enfriar a 4°C inmediatamente	

5. Se almacenaron a -20°C hasta el momento de su uso.

El volumen de 4µl de templado de RNA para la síntesis de DNAC fue el indicado para las reacciones posteriores.

7.3.3 Amplificación de los microRNAs por PCR tiempo real

La amplificación de los miRNAs se llevó a cabo mediante el kit ExiLENT SYBR Green master mix y los LNA PCR primer set correspondientes en base al sistema miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR de EXIQON Inc. (Woburn, MA, USA), el sistema utiliza la molécula intercalante SYBR Green para la detección siguiendo los pasos que a continuación se señalan:

1. Se descongelaron los reactivos en hielo por 15-20 min, se mezclaron todos los reactivos por vórtex y se centrifugaron, el master mix sólo se mezcló por pipeteo.

2. Se realizó la correspondiente dilución del DNAC para llevarlo a la concentración de 10ng requerida para la reacción.
3. Se preparó la mezcla de los reactivos para el microRNA y para la muestra a amplificar como se indica en la tabla 6.

Tabla 6. Mezcla para reacción de PCR tiempo real	
Reactivo	Volumen (µl)
ExiLENT SYBR Green Master mix PCR	5
PCR primer LNA (1X)	1
Templado DNAC (10ng)	4
Volumen total	10

4. Se mezcló la reacción por vórtex y se centrifugó (1500g por 1 minuto).
5. El programa de PCR y el análisis con curva de disociación se llevó a cabo en un termociclador LightCycler Nano de Roche (Basilea, Suiza) bajo las condiciones descritas en la tabla 7.

Tabla 7. Condiciones para el PCR tiempo real	
Paso del proceso	Condiciones
Activación de la polimerasa/ Desnaturalización	95° C por 10 min
Amplificación	40 ciclos de 95°C por 10 s 60°C por 1 min (1.6°C/s)
Análisis Curva de disociación	

6. Se realizó el análisis de los datos.

7.3.4 Validación del método de cuantificación $\Delta\Delta C_t$ mediante la eficiencia de amplificación y construcción de la curva de rango dinámico

Se construyó una curva de regresión para cada uno de los miRNAs analizados y del control Spike In UniSp6 para obtener la eficiencia de amplificación siguiendo el procedimiento descrito a continuación:

1. Se calcularon los volúmenes para todas las reacciones de amplificación requeridas con diferentes diluciones seriadas del DNAC: 10ng, 1ng, 0.1ng, 0.01ng; cada reacción se realizó por triplicado.
2. Se mezclaron mediante vórtex y centrifugaron.
3. Las condiciones de amplificación se especificaron anteriormente en la tabla 6.
4. Una vez terminada la reacción con ayuda de LightCycler Nano Software 1.0 se obtuvo una gráfica de la eficiencia de la amplificación para cada uno de los miRNAs analizados (Figura 9).

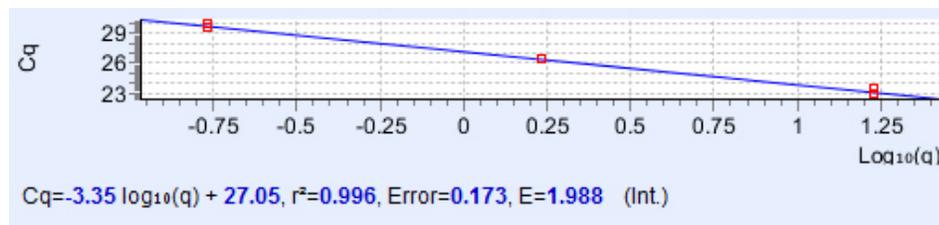


Figura 9. Curva de regresión para validación del método $\Delta\Delta C_t$. C_t contra concentración inicial de DNAC utilizado en cada reacción de PCR para evaluar la eficiencia de la amplificación. R^2 (r^2): El cuadrado del coeficiente de regresión nos indica cómo se ajustan nuestros datos a la línea. El análisis de regresión lineal de la curva estándar debe mostrar una alta correlación (un coeficiente >0.98). El intercepto (b): da una idea de que tan sensible es el ensayo. Sugiere el número de ciclos necesarios para que el blanco ya no esté presente en la reacción de PCR tiempo real.

El programa calcula automáticamente la eficiencia de amplificación para cada curva de regresión a partir de la pendiente:

Fórmula 1:

$$\text{Eficiencia} = [10^{(-1/\text{pendiente})}] - 1$$

Una vez que se comprobó la eficiencia de amplificación para cada uno de los miRNAs y el normalizador UniSp6 (eficiencia de 90% - 110%), los datos de C_t fueron sustituidos en la siguiente ecuación para realizar el cálculo de ΔC_t :

Fórmula 2:

$$\Delta C_t = C_t \text{ miRNA} - C_t \text{ Spike UniSp6}$$

Se graficó el valor de ΔC_t contra el logaritmo de la concentración y la pendiente de la recta obtenida mediante esta gráfica fue ≤ 0.1 para cada uno de los miRNAs a analizar,

lo cual indicó que la eficiencia de amplificación de ambas reacciones es la misma y le da validez al método de cuantificación relativa. (Schmittgen Thomas D, 2008)

7.3.5 Cuantificación de los microRNAs por el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$

Una vez que se validó el método de cuantificación relativa, se procedió a realizar el cálculo para cada una de las muestras. La media de los Cts del miRNA en cierta muestra se normalizó con la media de los Cts del Spike UniSp6 en esa misma muestra, aplicando la siguiente fórmula: con la fórmula:

Fórmula 3:

$$\Delta C_t = C_t \text{ miRNA} - C_t \text{ SpikeUniSp6}$$

Ya normalizados los datos, se procedió a comparar con los participantes del estudio de la manera siguiente:

Fórmula 4:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ miRNA omnívoro} - \Delta C_t \text{ miRNA veganos}$$

Fórmula 5:

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

Se obtuvieron los valores $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de todos los participantes del estudio en el grupo que consumió carne de cada tiempo postprandial (2, 4 y 6 h) teniendo como calibrador el valor ΔC_t promedio del grupo control vegano de las muestras en cada tiempo. Cada muestra se analizó por triplicado incluyendo el Spike In UniSp6, además de contar con controles negativos sin templado. Se utilizó el Spike In UniSp6 para la normalización debido a la falta de controles endógenos establecidos para normalización en muestras de suero y plasma. (Kroh, et al., 2010) (Schmittgen Thomas D, 2008)

De esta manera, se obtuvo el resultado de cuántas veces se expresa cada microRNA en el plasma de los participantes del estudio tras la ingesta de la dieta con carne comparado con el grupo control de ingesta sin carne.

7.4 Análisis estadístico del nivel de expresión de los microRNAs

Se determinó la distribución normal de los niveles de expresión para todos los miRNAs analizados en todas las muestras mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Además, se realizó la estadística descriptiva con los valores $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de ambos grupos de estudio de cada uno de los tiempos (0, 2, 4 y 6 h).

Se evaluó la expresión diferencial entre sujetos con ingesta de carne y el grupo control mediante la prueba t-student y la expresión diferencial a diferentes tiempos postprandiales comparado con la expresión en ayunas, utilizando la prueba ANOVA.

Se realizaron correlaciones de Pearson para asociar los niveles de expresión de los miRNAs con la ingesta o no de carne y con parámetros antropométricos y bioquímicos.

Valores de $p < 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos. El análisis de los datos se realizó con el uso de IBM SPSS Statistics 20 (IBM SPSS Inc.).

8. RESULTADOS

8.1 Reclutamiento, selección de los participantes e intervención del estudio

El proyecto de investigación y el consentimiento informado fue presentado y aprobado por el Comité de Bioética y Bioseguridad en investigación del grupo Christus Muguerza el día 13 de mayo del 2015 (Anexo 2). Después de la aprobación del trabajo de investigación se procedió al reclutamiento y selección de los participantes del estudio mediante invitación y sesiones de información durante el periodo 15 de mayo al 27 de junio del 2015.

De los sujetos evaluados 35 fueron potencialmente elegibles para participar en base a los criterios de inclusión, sin embargo 5 sujetos declinaron previo a la realización de los estudios de laboratorio y 1 sujeto se retiró antes de recibir la intervención correspondiente a la dieta, obteniendo una muestra de 29 sujetos, 14 en el grupo con intervención con carne de res y 15 en el grupo control (vegano) con intervención sin carne de res (Figura 10).

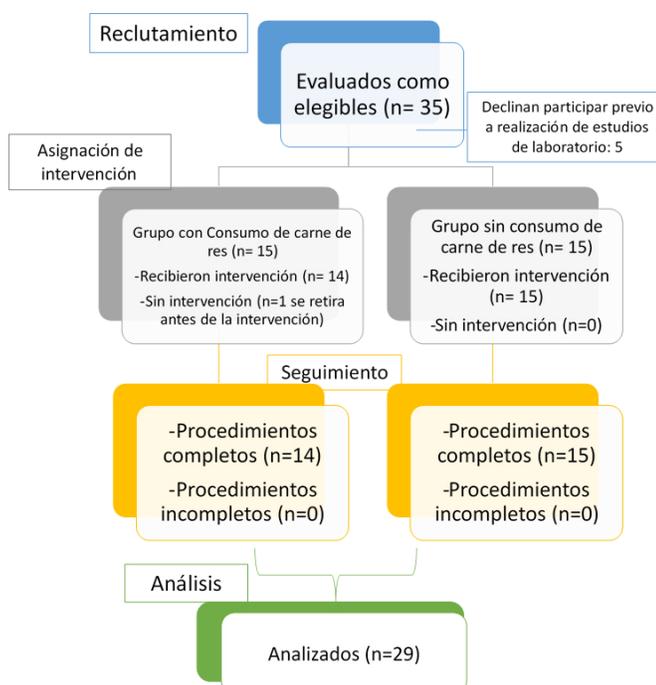


Figura 10. Diagrama de flujo de los participantes del estudio. 35 sujetos resultaron potencialmente elegibles, retirándose 6 durante las etapas del proyecto. 29 sujetos completaron los procedimientos, por lo cual se obtuvieron un total de 116 muestras de plasma debido a los tiempos de toma de muestra (0, 2, 4 y 6 horas).

Los participantes del estudio se sometieron a cuestionarios de hábitos de alimentación, llenado de historias clínicas (anexo 3), valoraciones antropométricas y bioquímicas para corroborar su inclusión en el estudio. En la tabla 8 se muestran parte de las características generales de los participantes del estudio.

Tabla 8. Características generales, antropométricas y bioquímicas de los participantes				
Característica		General (n=29)	Grupo omnívoro (n=14)	Grupo control vegano (n=15)
Edad (años)	X ± DE	24.14 ±3.56	22.79 ±3.06	25.40 ±3.62
Sexo	Hombre	14 (48.3%)	6 (42.8%)	8 (53.3%)
	Mujer	15 (51.7%)	8 (57.1%)	7 (46.7%)
IMC	X ± DE	22.61 ±2.54	22.16 ± 2.68	23.05 ±2.42
% de grasa corporal X ± DE	Hombre	21.15 ±5.10	22.60 ±3.99	20.25 ±5.75
	Mujer	31.66 ±4.79	30.38 ±5.44	33.31 ±3.51
% de masa muscular X ± DE	Hombre	39.06 ±3.19	38.38 ±2.70	39.48 ±3.57
	Mujer	27.61 ±1.88	27.66 ±2.35	27.53 ±1.05
Hemoglobina (g/dL)	X ± DE	13.88 ±1.41	13.53 ±1.37	14.21 ±1.42
Glucosa (mg/dL)	X± DE	83.17 ±9.85	83.64 ±10.61	82.73 ±9.44
Colesterol sérico (mg/dL)	X ± DE	153.66 ±28.31	162.14 ±26.13	145.7 ±28.8
HDL sérico (mg/dL)	X ± DE	50.76 ±14.1	50.57 ±12.44	50.93 ±15.94
LDL (mg/dL)	X ± DE	87.03 ±22.93	95.00 ±21.92	79.60 ±21.98
Triglicéridos (mg/dL)	X ± DE	77.31 ±42.33	78.50 ±35.49	76.20 ±49.1

Los sujetos se encontraron dentro de los valores normales en cada uno de los parámetros y no se encontraron diferencias significativas entre el grupo de estudio y el grupo control; por lo cual se procedió a citarlos para la intervención que incluía la toma de

muestras y la dieta. Los participantes acudieron a la intervención con 12 h de ayuno y se realizó la toma de muestra correspondiente al tiempo 0, posterior a ello recibieron la dieta con carne de res y para el grupo control sin carne de res, en la Figura 11 se muestra el tiempo de alimentación brindado.

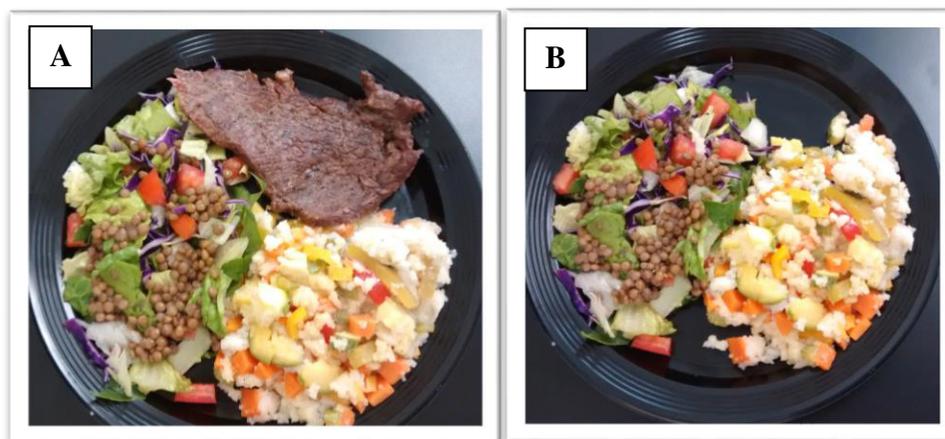


Figura 11. Intervención de la dieta correspondiente a un tiempo de comida. (A) dieta para el grupo con consumo de carne de res. (B) dieta para el grupo control (vegano).

Posterior a la dieta se realizaron las tomas de muestras de sangre a las 2, 4 y 6 h postprandiales para obtener el plasma de ambos grupos de estudio.

8.2 Perfil de expresión de miRNAs posterior a la ingesta de carne de res mediante análisis piloto por NGS

El análisis piloto por NGS fue realizado con cuatro muestras: dos provenían del tiempo 0 y 4 h del grupo con consumo de carne de res y las otras dos del tiempo 0 y 4 h del grupo control. Las muestras fueron enviadas a la compañía SeqMatic LLC, Fremont, CA. Se recibieron las cuentas totales de los miRNAs en cada una de las muestras, un reporte de calidad de las bibliotecas para la secuenciación y la expresión diferencial de los miRNAs en el tiempo basal y postprandial con cuatro análisis:

- 1) los niveles en ayuno de miRNAs en el grupo omnívoro comparado con los niveles del grupo control
- 2) los niveles de miRNAs a las 4 h postprandiales comparado con los niveles en ayuno en el grupo omnívoro
- 3) los niveles de miRNAs a las 4 h postprandiales con referencia a los niveles en ayuno en el grupo control

- 4) los niveles de miRNAs a las 4 h postprandiales en el grupo omnívoro con referencia al grupo control.

La lectura final con secuencias de 50pb de las bibliotecas de miRNAs se realizaron con el instrumento Illumina HiSeq 2000. Las lecturas se trasladaron a formato FASTQ para su análisis y sólo lecturas mayores a los 16 nucleótidos fueron mantenidas para el análisis posterior. La figura 12 muestra la calidad de las bibliotecas en base a valores Q dónde se observan valores de 40 que corresponden a una buena calidad de las bibliotecas para la secuenciación. Las lecturas de RNAs pequeños fueron asignadas al genoma de referencia humano hg38 mediante Bowtie y las secuencias de miRNAs identificadas se contabilizaron mediante HTSeq-count utilizando la referencia proporcionada por miRBase v20. (miRBase, 2014)

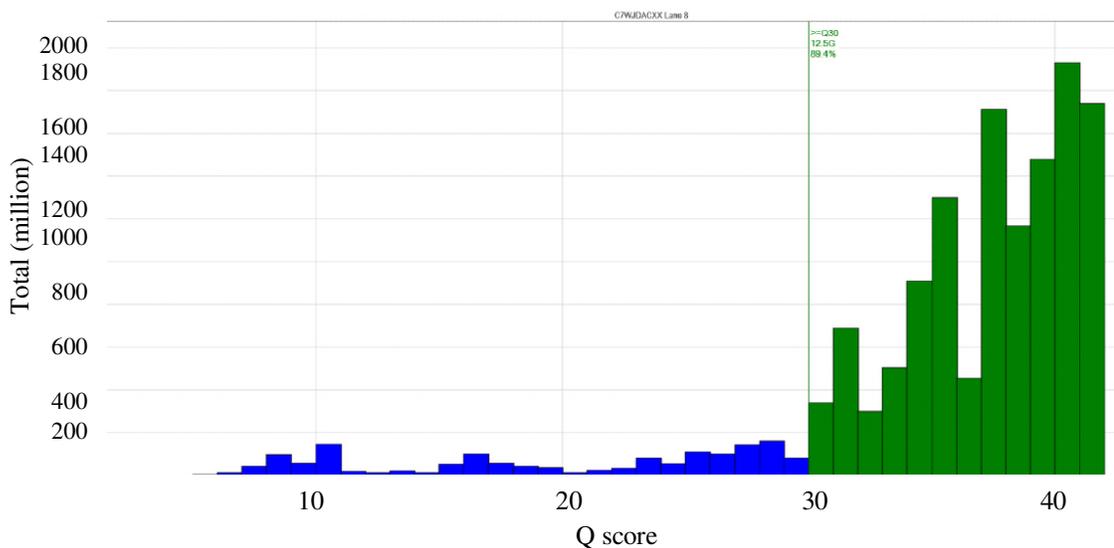


Figura 12. Calidad de las bibliotecas para la secuenciación por SeqMatic LLC, Fremont, CA.

La corrida de las bibliotecas de miRNAs fue desarrollada usando Illumina HiSeq 2000. La gráfica muestra los valores Q los cuales indican la probabilidad para que una base dada sea incorrecta por el secuenciador, valores Q de 30 tienen una exactitud de 99.9%. Las barras azules muestran las lecturas con valores Q menores a 30 y las barras verdes las lecturas con valores Q mayores a 30 representando el 89.4% de las lecturas totales.

El análisis de expresión diferencial de los miRNAs se desarrolló con los recuentos de miRNAs utilizando DESeq2. Obtuvimos el panel de los miRNAs que se encontraban diferencialmente expresados a nivel basal en el grupo con dieta omnívora comparado con la expresión en el grupo control vegano. En el análisis de éstos resultados nos

enfocamos en los miRNAs que se encuentran mayormente expresados en el tejido muscular de bovino y aquellos miRNAs reportados que se modifican de manera endógena debido a un consumo incrementado de carne de res o en respuesta a patrones dietéticos (Gu, et al., 2007) (Humphreys, et al., 2014) (Tarallo, et al., 2014) (Dever, et al., 2015). En base a esto se encontró que hsa-miR-192-5p se encuentra incrementado 7.67 veces en el grupo con un régimen dietético omnívoro con respecto al grupo control vegano y hsa-miR-22-3p se vio disminuido 6.8 veces en el grupo omnívoro en comparación con el grupo vegano (Figura 13). Los demás miRNAs no mostraron diferencias importantes en su expresión basal por tener algún régimen dietético particular (hsa-miR-1-3p: 1.73 veces, hsa-miR-92a-3p: -0.27 veces en el grupo con dieta omnívora con respecto al grupo control vegano).

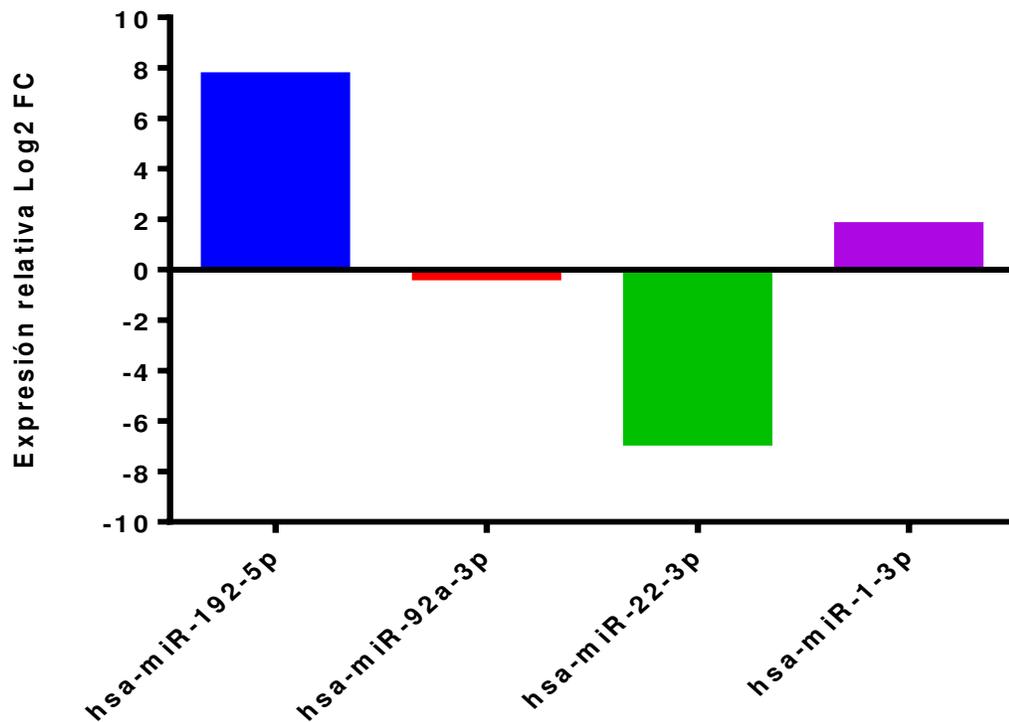


Figura 13. Niveles de expresión basales de los microRNAs 192, 92, 22 y 1 en el grupo con dieta omnívora con respecto al grupo control mediante NGS. El tiempo basal de un panel de microRNAs se analizó por NGS en la muestra del sujeto omnívoro tomando como referencia la expresión del sujeto con dieta vegana (control). La barra azul y morada muestran un incremento en la expresión de miR-192 y miR-1 en cambio la barra roja y la barra verde muestran una disminución en la expresión de miR-92a y miR-22 respectivamente.

En cuanto a los cambios en los niveles de expresión de los miRNAs de interés posterior al consumo de la dieta, el grupo omnívoro a las 4 h después de la dieta con carne mostró 5.57 veces incrementada la expresión de hsa-miR-22-3p comparado con los niveles de expresión en el tiempo basal (0 h), hsa-miR-1-3p se mostró sin cambios relevantes con un incremento de 0.17 veces posterior a la dieta con respecto a su nivel basal. Sin embargo, es importante mencionar que en el grupo control vegano que consumió una dieta sin carne también se mostraron pequeños cambios en los niveles de expresión de los miRNAs a las 4 h postprandiales: hsa-miR-1-3p se incrementó 1.67 veces, hsa-miR-22-3p incrementó 0.99 veces (Figura 14) y hsa-miR-26a-5p se incrementó 1.17 veces con respecto al tiempo antes de la ingesta (resultados no mostrados).

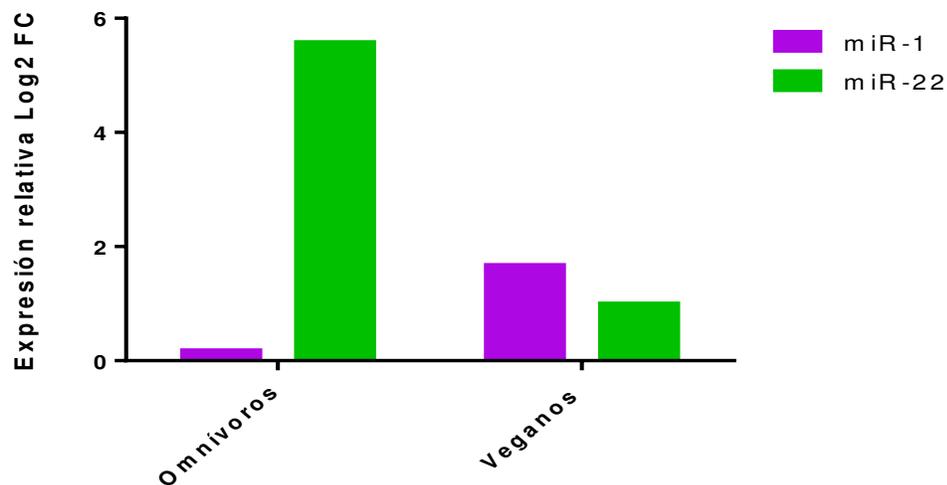


Figura 14. Expresión diferencial de miR-1 y 22 en el tiempo postprandial con referencia a los niveles basales mediante NGS. Los microRNAs 1 y 22 se analizaron por NGS en dos muestras de omnívoros y veganos tomando como referencia su expresión basal respectiva. La gráfica muestra los niveles de expresión diferencial de miR-1 (barras moradas) y miR-22 (barras verdes) del sujeto omnívoro y del control a las 4 horas postprandiales comparado con sus respectivos niveles en ayuno.

En la figura 15 se muestran los cambios en los niveles de expresión de los miRNAs de interés a las 4 h postprandiales en el grupo que recibió intervención de la dieta con carne de res con respecto a los niveles de expresión a las 4 h postprandiales en el grupo control. Los resultados mostraron un incremento de 1.24 veces de hsa-miR-1-3p y disminución de 1.29 veces de hsa-miR-22-3p posteriores a la ingesta de carne.

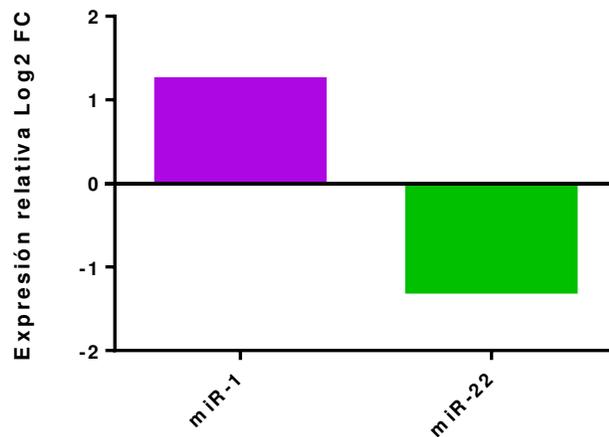


Figura 15. Niveles de expresión postprandiales de miR-1 y 22 en el grupo con dieta omnívora con respecto al grupo control mediante NGS. El tiempo 4 horas postprandial de un panel de microRNAs se analizó por NGS en el grupo omnívoro tomando como referencia la expresión en el grupo vegano (control). La barra morada muestra una expresión incrementada de miR-1 mientras que la barra verde muestra una disminución en la expresión de miR-22 en el omnívoro comparada con la expresión del control.

En resumen, los resultados de NGS mostraron que al comparar el tiempo postprandial del grupo omnívoro con el grupo vegano se observó incrementado 1.24 veces la expresión miR-1 mientras que miR-22 se mostró disminuido 1.29 veces. También se encontró a las 4 h un incremento de la expresión diferencial de miR-22 y miR-1 (5.57 y 0.17 veces respectivamente) en el grupo omnívoro y en el vegano se incrementaron miR-1 y miR-22 (1.67 y 0.99 veces respectivamente). Además, los niveles de expresión en ayuno del sujeto omnívoro mostraron un incremento de miR-192 y una disminución de miR-22 y comparado con la expresión del sujeto vegano.

Lo anterior fue analizado en la siguiente sección en todas las muestras mediante PCR tiempo real, ya que el análisis piloto al ser realizado comparando sólo una muestra de cada grupo representa una alta variación individual.

8.3 Niveles de expresión de miRNAs posteriores a una dieta con carne mediante PCR tiempo real

En base a los resultados obtenidos en el análisis piloto se determinó realizar la cuantificación de los siguientes miRNAs:

- 1) hsa-miR-1-3p debido a los cambios encontrados en el análisis por NGS, es un microRNA específico de músculo y se encuentra en carne de res cocida.
- 2) hsa-miR-22-3p ya que se encuentra en carne de res, aunque en menores proporciones, sin embargo, el análisis por NGS mostró cambios en su expresión posterior a la dieta.
- 3) hsa-miR-192-5p, se analizó sólo en tiempo basal debido a los resultados del análisis por NGS, en los cuáles se encontró diferencialmente expresado en el grupo omnívoro comparado con el vegano en ayuno.
- 4) hsa-miR-10b-5p debido a que Dever et al., en el 2015 muestra que es el mayormente expresado en carne de res posterior a un proceso de cocción.
- 5) hsa-miR-92a-3p, se analizó sólo en tiempo basal como control positivo, debido a que Tarallo *et al* (2014) lo encontraron incrementado en personas veganas en comparación con un grupo omnívoro.

8.3.1 Estandarización de síntesis de DNAc y validación del método de cuantificación relativa

Previo a la realización de los ensayos por qPCR en la totalidad de las muestras, se procedió a la estandarización de las reacciones de síntesis de DNAc y a la validación del método de cuantificación relativa. La estandarización de la síntesis de DNAc se realizó en base a la recomendación del proveedor el cual menciona desarrollar reacciones de retro transcripción con diferentes volúmenes de RNA, esto debido a que los biofluidos como el plasma contienen bajos niveles de miRNAs, la cantidad de RNA en éste tipo de muestras usualmente no puede ser determinada con exactitud mediante un espectrofotómetro como el nanodrop, además, la presencia de inhibidores en éstas muestras suele ser en altos niveles; el protocolo menciona que en lugar de realizar las reacciones de síntesis de DNAc en base a una concentración de RNA se utilizan diferentes volúmenes de RNA de 2 µl, 4 µl y 6 µl para cada reacción de retro transcripción. Posteriormente se realizó la reacción de PCR amplificando el Spike In UniSp6 obteniendo los Cts. Los resultados de la tabla 9 muestran que al incrementar el volumen de RNA los valores Cts se reducen, esto proporciona una idea de la presencia de inhibidores en la muestra de plasma. Los valores Cts obtenidos con 4 µl fueron

adecuados y se decidió realizar la totalidad de las reacciones de síntesis de DNAc con éste volumen.

Tabla 9. Estandarización de síntesis de DNAc con diferentes volúmenes RNA		
Muestra	Volumen RNA (µl)	Ct
O-t0	2	19.85
O-t0	4	18.60
O-t0	6	20.36
O-t4	2	23.26
O-t4	4	19.45
O-t4	6	19.41
Negativo	0	--

Para la validación del método de cuantificación relativa ΔC_t se calculó la eficiencia de amplificación y se construyeron las curvas de rango dinámico para miR-1, miR-10b, miR-22, miR-192, miR-92a, miR-16 y del Spike In UniSp6. Las concentraciones de DNAc utilizadas para el cálculo de cada curva de rango dinámico fueron de 10 ng, 1 ng 0.1 ng y 0.01 ng. Los valores de eficiencia de amplificación de cada miRNA y del Spike In UniSp6 se muestran en la Tabla 10, todos presentaron valores de eficiencia de amplificación entre 90 y 110% lo cual es adecuado para la realización del análisis de expresión génica.

Tabla 10. Eficiencia de amplificación y rango dinámico de cada microRNA		
Primer / microRNA	Eficiencia	Rango dinámico
UniSp6	92%	--
hsa-miR-16-5p	92%	0.022
hsa-miR-1-3p	93%	0.0284
hsa-miR-10b-5p	98.5%	0.0842
hsa-miR-22-3p	92.4%	-0.001
hsa-miR-92a-3p	92.3%	0.0076

hsa-miR-192-5p	98.8%	0.0557
----------------	-------	--------

Posteriormente, se obtuvo el rango dinámico, la tabla 10 muestra los valores de la pendiente obtenidos; en la figura 16 se muestra la gráfica para miR-1 donde la pendiente obtenida (0.0284) se encuentra dentro del rango indicado para la validación del método de cuantificación (≤ 0.1), esto indica que la diferencia en la expresión entre el Spike In y el miRNA no presenta variaciones significativas en las diferentes concentraciones probadas. El análisis de validación del método $\Delta\Delta C_t$ se realizó para cada miRNA, en el cual se obtuvieron los valores de rango dinámico adecuados para la cuantificación relativa.

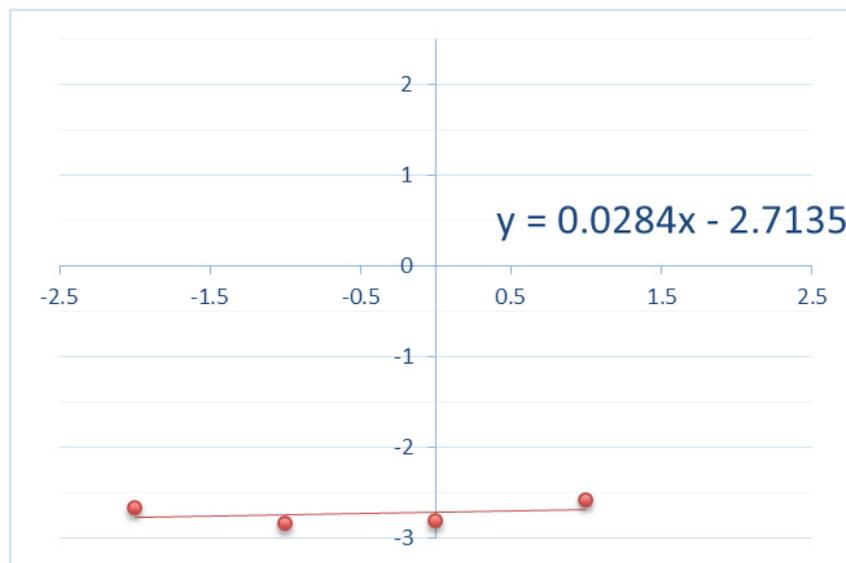


Figura 16. Curva de rango dinámico de miR-1 para la validación del método $\Delta\Delta C_t$ mediante qPCR. La gráfica muestra la curva de regresión de los valores de ΔC_t contra el logaritmo de las concentraciones de DNAc utilizadas, la pendiente de la recta (0.0284) se encuentra dentro del rango establecido ($p \leq 0.1$) para la validación del método de cuantificación relativa.

En cada una de las reacciones de amplificación mediante PCR se realizó el análisis de la curva de disociación para mostrar la amplificación específica del producto esperado. La Figura 17 muestra una representación de las curvas de disociación obtenidas en las que se observó la ausencia de amplificaciones inespecíficas.

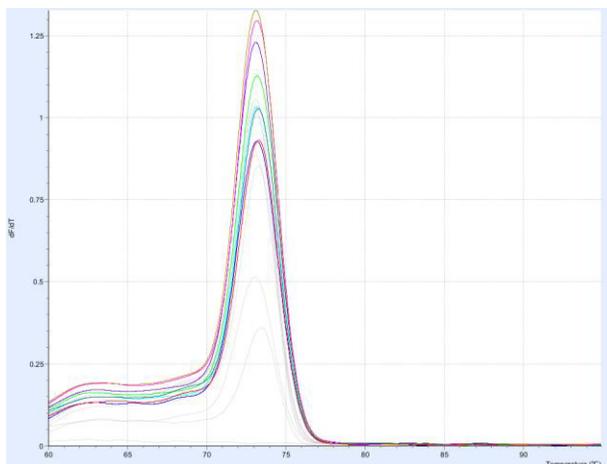


Figura 17. Curvas de disociación representativas obtenidas en las reacciones de amplificación por qPCR. La figura muestra la representación de las curvas de disociación obtenidas en cada una de las reacciones por PCR tiempo real, los diferentes colores representan las curvas de reacciones diferentes observando la amplificación específica del microRNA analizado.

8.3.2 Detección de miR-1, 10b y 22 en carne de res posterior a un proceso de cocción convencional.

Previo a los ensayos de qPCR en la totalidad de las muestras y a la cuantificación relativa de los miRNAs, se procedió a verificar la presencia y estabilidad de los miRNAs de bovino homólogos a miRNAs humanos en carne de res posterior a un procesamiento basado en calor como lo es la cocción convencional. Dever y cols. en 2015 mostraron la sobrevivencia de miRNAs en tejidos de bovino después de métodos de preparación basados en calor, por lo que se corroboró con nuestro alimento proporcionado en la intervención. En la figura 18, se muestran los valores Cts en los cuales amplificaron los miRNAs de interés en nuestro estudio en la carne de res cruda y cocida utilizada en la intervención. Los resultados muestran que miR-1-3p fue el microRNA que amplificó primero teniendo un valor Ct promedio de 17.07 ± 0.036 en la carne cruda mientras que en la carne cocida tuvo un valor Ct de 20.42 ± 0.009 , miR-10b-5p fue el segundo que amplificó con Ct promedio de 19.43 ± 0.028 y 22.87 ± 0.172 en la carne de res cruda y cocida respectivamente, mientras que miR-22-3p fue el último en amplificar con valores Ct promedio de 21.81 ± 0.052 en la carne cruda y 25.41 ± 0.067 en la carne cocida. La amplificación a ciclos tempranos refleja que los miRNAs están en mayor concentración en la muestra comparado con la amplificación a ciclos más tardíos. Los resultados

muestran que miR-1, miR-10b y miR-22 permanecen en la carne de res aún después de una preparación basada en calor convencional.

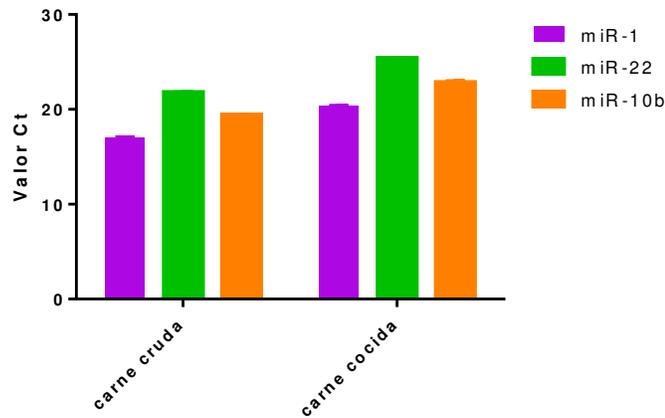


Figura 18. Amplificación de miR-1, miR-10b y miR-22 en carne de res cruda y posterior a un proceso de cocción. La gráfica muestra los valores Ct promedio con desviación estándar para miR-1-3p, miR-10b-5p y miR-22-3p en carne de res cruda y posterior a un método de preparación basado en calor.

8.4 Modulación en los niveles de expresión de microRNAs basales y posteriores a una dieta con carne

Una vez realizada la estandarización de las reacciones de transcripción reversa y validado el método de cuantificación relativa, se llevaron a cabo los ensayos por qPCR en la totalidad de las muestras (basales, tiempos 2, 4 y 6 h postprandiales) para cada uno de los miRNAs incluido el Spike In UniSp6, cada reacción se realizó por triplicado y con controles negativos dónde no se incluyó templado. El DNAc de cada una de las muestras fue llevado a una concentración de 10ng/ μ l.

Se determinó si un régimen dietético podría inducir diferencias en la expresión de miRNAs endógenos evaluando los niveles de expresión basales (en ayuno) de los miRNAs establecidos previamente en el grupo con régimen dietético omnívoro comparado con los niveles de expresión basales del grupo con régimen dietético vegano. La figura 19 muestra que todos los miRNAs evaluados presentan una disminución en su expresión en el grupo omnívoro comparado con el grupo vegano. hsa-miR-1-3p se presenta disminuido 0.86 ± 3.64 veces, hsa-miR-10b-5p -0.90 ± 2.44 veces, hsa-miR-22-3p -1.18 ± 3.59 veces y hsa-miR-92a-3p disminuido 1.36 ± 2.19 veces en el grupo con régimen dietético omnívoro comparado con el grupo control con dieta vegana. Sin

embargo, ninguno de éstos se mostró diferencialmente expresados de manera significativa, únicamente hsa-miR-192-5p obtuvo niveles de expresión basales de -2.32 ± 3.022 veces, fue diferencialmente expresado en el grupo omnívoro comparado con el grupo con dieta vegana ($p: 0.013$).

Además, para verificar si la expresión de miR-192 estaba relacionada al consumo de carne se realizó una correlación de Pearson, miR-192 se correlacionó de manera positiva en los individuos veganos (correlación de Pearson: 0.466, $p= 0.011$); es decir la expresión de éste miRNA es mayor en individuos que no consumen carne.

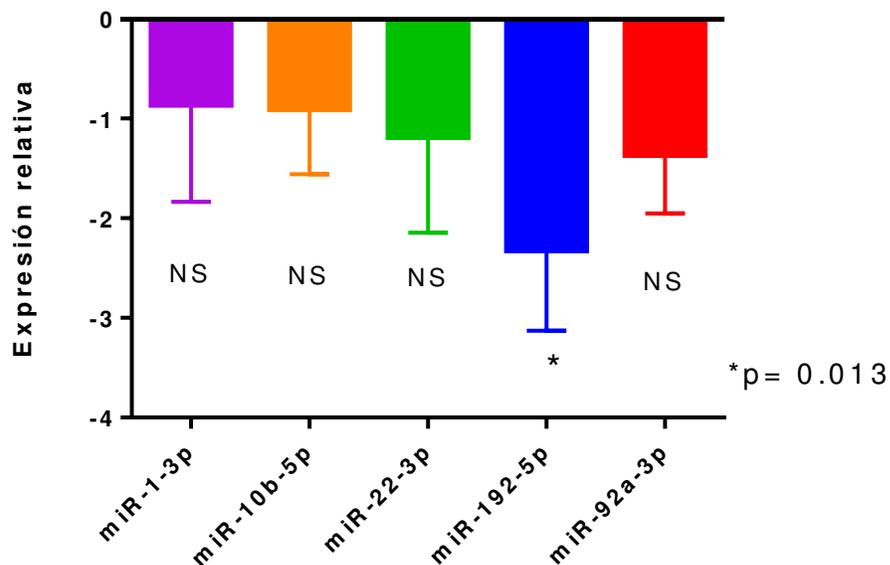


Figura 19. Disminución en la expresión diferencial basal de miR-192-5p en plasma del grupo con régimen dietético omnívoro mediante qPCR. La gráfica muestra los niveles de expresión basales (ayuno) de miR-1, 10b, 22, 192 y 92a analizados mediante qPCR en el grupo omnívoro comparado con el grupo con dieta vegana (control). Cada reacción de qPCR se realizó por triplicado normalizando con el Spike In UniSp6. $n=29$ (Grupo dieta omnívora: 14, Grupo dieta vegana: 15). Se presentan las medias con su \pm SEM, $*p<0.05$. NS: no significativo.

Además, se realizaron pruebas de correlación con los parámetros antropométricos y bioquímicos de los participantes del estudio y los niveles basales de expresión para observar si éstos factores tenían impacto en los niveles de los miRNAs. Los resultados mostraron que miR-10b se relacionó de manera negativa con el Índice de Masa Corporal

(correlación de Pearson: -0.395 $p= 0.034$), con los niveles de colesterol total sérico (correlación de Pearson: -0.435 $p= 0.018$) y con los niveles de la lipoproteína de baja densidad (correlación de Pearson: -0.406 $p= 0.029$).

En referente a los cambios en los niveles de expresión de miR-1, miR-10b y miR-22 en plasma posteriores a la ingesta de una dieta con carne de res y sin carne de res (control) se analizaron los valores de la expresión de éstos miRNAs basales y de los tiempos postprandiales teniendo como calibrador al grupo control vegano, esto para determinar si existía diferencia significativa en la expresión de los miRNAs después de la ingesta de carne comparado con la expresión después de la ingesta sin carne. La figura 20 muestra los resultados obtenidos de los niveles de expresión diferencial para miR-1 a los diferentes tiempos posteriores a la dieta. A las 2 h posteriores a la dieta se incrementó la expresión 1.59 ± 3.29 veces en el grupo omnívoro comparado con el grupo control, sin embargo, a las 4 y 6 h posteriores al consumo de carne de res se observaron valores de expresión semejantes al grupo control (4 h: -0.52 ± 6.81 y 6 h: -0.013 ± 4.21). En ninguno de los tiempos posteriores al consumo de carne se determinó un incremento significativo en la expresión de miR-1 comparado con los niveles de expresión posteriores a la intervención control.

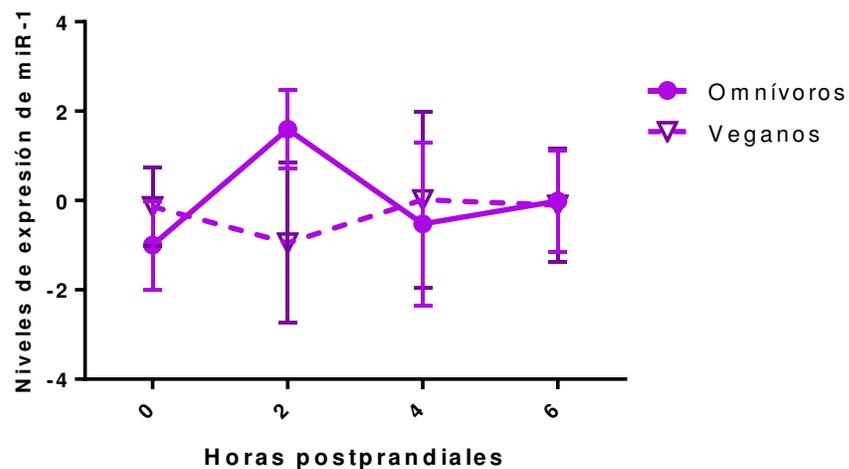


Figura 20. Niveles postprandiales de la expresión diferencial de miR-1 en los grupos omnívoro y vegano por qPCR Se muestran los niveles de expresión en plasma del grupo omnívoro y vegano posteriores a la ingesta de la dieta brindada tomando como calibrador el grupo control. En ninguno de los tiempos postprandiales se mostraron incrementos significativos posteriores al consumo de carne. Cada reacción de qPCR se realizó por triplicado normalizando con Spike In UniSp6. $n=29$ (Grupo dieta omnívora: 14, Grupo dieta vegana: 15). Se presentan las medias con su \pm SEM.

Otro de los miRNAs evaluados fue miR-22 debido a que se encuentra presente en la carne de res cocida, aunque en menores proporciones que miR-1 y miR-10b, además, en el análisis por NGS se observó un incremento en su expresión a las 4 h posteriores a la dieta con carne de res. La figura 21 muestra que miR-22 a las 2 h postprandiales se presentó disminuido en su expresión 2.32 ± 5.77 veces en el grupo con carne de res comparado con su expresión a las 2 h postprandiales en el grupo control. Posteriormente, a las 4 y 6 h postprandiales se observó un incremento en los valores de expresión en el grupo omnívoro (4 h: -0.07 ± 3.44 y 6 h: -1.45 ± 4.17) pero no fueron mayores a los niveles observados en el grupo control. Debido a lo anterior, no se detectó una expresión diferencial significativa de miR-22 en ninguno de los tiempos posteriores al consumo de carne comparada con los niveles de expresión posteriores a la intervención control.

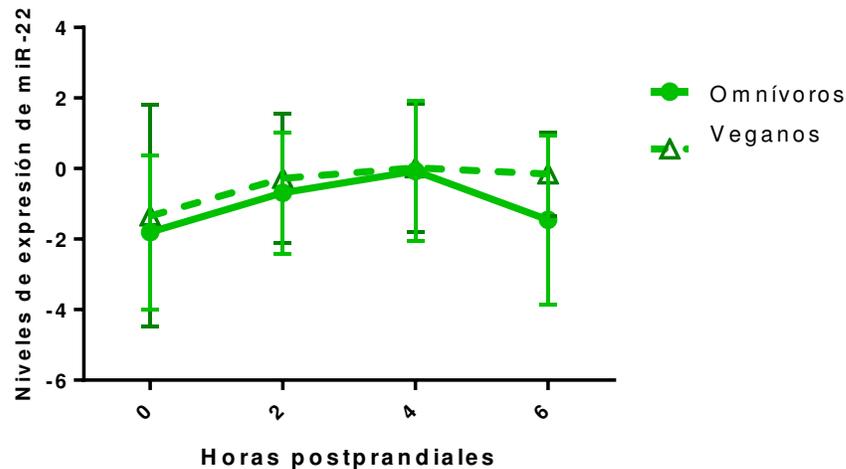


Figura 21. Expresión postprandial de miR-22 en plasma de los grupos omnívoro y vegano mediante qPCR. La gráfica muestra los niveles de expresión en ambos grupos posteriores a la ingesta de la dieta tomando como calibrador la expresión en el grupo con dieta vegana (control). En ninguno de los tiempos postprandiales se mostró un cambio significativo en la expresión de miR-22 posterior al consumo de carne. Cada reacción de qPCR se realizó por triplicado normalizando con el Spike In UniSp6. n=29 (Grupo dieta omnívora: 14, Grupo dieta vegana: 15). Se presentan las medias con su \pm SEM.

Se evaluaron también los cambios en los niveles de expresión de miR-10b posteriores a la intervención en ambos grupos. La figura 22 muestra que a las 2 h postprandiales los niveles de expresión son semejantes en ambos grupos, -0.13 ± 2.18 veces en el grupo omnívoro con consumo de carne de res comparado con el grupo vegano. Sin embargo, a las 4 y 6 h posteriores al consumo de carne de res se observó un decremento en los valores de expresión en el grupo omnívoro comparado con el grupo control (4 h: -1.26

± 1.50 y 6 h: -1.13 ± 2.88). Es decir, en ninguno de los tiempos posteriores al consumo de carne se determinó un incremento en la expresión diferencial de miR-10b comparada con los niveles de expresión posteriores a la intervención control.

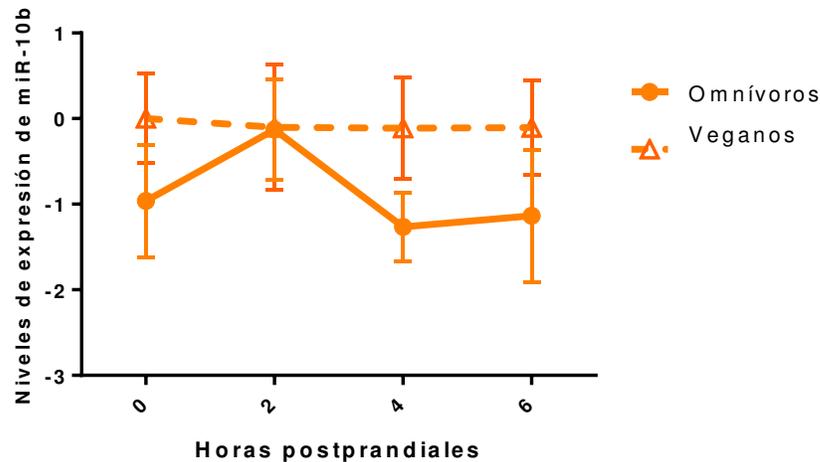


Figura 22. Expresión postprandial de miR-10b en plasma de los grupos omnívoro y vegano. La gráfica muestra los niveles de expresión en ambos grupos posteriores a la ingesta de la dieta tomando como calibrador la expresión en el grupo con dieta vegana (control). En todos los tiempos postprandiales se mostró un decremento, aunque no significativo de miR-10b posterior al consumo de carne. Cada reacción de qPCR se realizó por triplicado normalizando con Spike In UniSp6. n=29 (Grupo dieta omnívora: 14, Grupo dieta vegana: 15). Se presentan las medias con su \pm SEM.

En resumen, los niveles de expresión diferencial de miR-1, -22 y -10b no presentaron incrementos significativos posteriores a la dieta correspondiente a un tiempo de comida con carne de res comparados con los niveles de expresión en el grupo vegano. Los resultados contrastaron con lo presentado mediante NGS, dónde miR-22 se mostró incrementado a las 4 h posteriores al consumo de carne en el grupo omnívoro, mientras que miR-1 se incrementó en el grupo vegano a las 4 h postprandiales comparado con sus niveles basales. El análisis por qPCR de la expresión basal de los microRNAs de muestras en ayuno de sujetos omnívoros mostró disminuidos a miR-1, 22, 10b, 92a y 192 en comparación con los niveles de expresión de sujetos veganos, sin embargo, sólo miR-192 fue estadísticamente significativo, además se correlacionó su expresión positivamente en sujetos veganos, lo cual contrasta con lo obtenido mediante NGS en dónde se mostró un incremento en la expresión basal de miR-192 en el sujeto omnívoro comparado con la expresión basal del sujeto vegano.

9. DISCUSIÓN

La transferencia horizontal de miRNAs entre especies e incluso entre reinos y a través de la barrera intestinal es un tema que presenta perspectivas en la regulación génica por lo que continua aún el debate de la transferencia de miRNAs en diferentes organismos y alimentos (Zhang, et al., 2012) (Baier, et al., 2014) (Dickinson, et al., 2013) (Snow, et al., 2013). Además, el estudio del efecto de la dieta en la modulación de los miRNAs endógenos continúa creciendo dada la importancia de los factores ambientales como reguladores en la expresión génica y su asociación con el desarrollo de diversas enfermedades. Un ejemplo de cómo la alimentación puede prevenir o promover el riesgo a patologías es el alto consumo de carne roja, el cual ha sido implicado como un factor potencial de riesgo para el desarrollo de cáncer colorrectal (World Cancer Research Fund, 2007). Por lo cual, el objetivo de la presente tesis consistió en determinar si el aumento de la expresión de los microRNAs en plasma humano es debido a la transferencia de miRNAs proveniente del consumo de un tiempo de alimentación con carne de res.

La estrategia experimental consistió en obtener muestras de plasma de personas con régimen dietético omnívoro para la dieta con carne de res y de un grupo control de personas con régimen vegano. El control se incluyó debido a que la similitud de las secuencias complica realizar el análisis separativo de miRNAs endógenos y los miRNAs provenientes de la carne (Witwer, 2012) (Igaz & Igaz, 2015). Por lo que la inclusión del grupo vegano permitió determinar si los cambios en la expresión de los miRNAs son un efecto del consumo de carne o un efecto del proceso de alimentación. Posteriormente, se utilizó un panel de miRNAs en cuatro muestras por NGS basado en el análisis enfocado en los miRNAs encontrados por Dever y cols. en tejido muscular de bovino resistentes a un proceso de cocción. Además, se analizó todo el panel para determinar si un régimen dietético omnívoro o vegano puede inducir diferencias en la expresión basal de miRNAs tomando como control positivo miR-92a debido a lo reportado por Tarallo y cols. (Tarallo, et al., 2014). Finalmente, se cuantificó la expresión de los miRNAs mediante

qPCR en la totalidad de las muestras basales y postprandiales de los dos grupos del estudio.

Los resultados del análisis de los niveles basales (tiempo 0) mediante NGS mostraron un incremento de miR-192 (7.67 veces) y miR-1 (1.73 veces) y una disminución de miR-22 (6.8 veces) y miR-92a (0.27 veces) del sujeto omnívoro comparado con la expresión basal del sujeto vegano; en contraste por qPCR se mostró disminuida la expresión basal de miR-192 (2.32 veces) de forma significativa avalado por una correlación de Pearson y una disminución no significativa de los niveles de los miRNAs 1, 10b, 92a y 22 en el grupo omnívoro comparado con el grupo vegano.

Los resultados obtenidos por qPCR difieren con los resultados mostrados mediante NGS; las posibles explicaciones a las diferencias recaen en que el panel de miRNAs mediante NGS fue un análisis piloto de sólo dos muestras basales: una del grupo omnívoro en comparación con una del grupo vegano, lo que permite el incremento de sesgo y variabilidad. Normalmente se recomienda un mínimo de tres réplicas con el fin de realizar una buena comparación de expresión. Una comparación de expresión de uno a uno es inexacta, debido a la gran cantidad de falsos positivos por las variaciones individuales. El análisis por NGS no puede ser considerado representativo, sin embargo, se tuvo que realizar bajo esa circunstancia debido a la disponibilidad de recursos, para posteriormente validar el análisis mediante qPCR. La cuantificación por qPCR tiene mayor significancia estadística debido a que fueron analizadas la totalidad de las muestras y cada ensayo fue realizado por triplicado.

Otra explicación es la diferencia basada en las técnicas, el análisis por NGS brinda el panel de miRNAs mientras que los ensayos por qPCR están diseñados para una secuencia específica de miRNA. Adicionalmente, la técnica de qPCR ofrece una más alta sensibilidad comparada con NGS (Blondal, et al., 2013).

Respecto al resultado de la disminución en la expresión de miR-192 en el grupo omnívoro comparado con el grupo vegano, aún no existen estudios que evalúen la expresión del miRNA en sujetos omnívoros con consumo frecuente de carne comparado con sujetos veganos o bajo un régimen dietético en específico. Dentro de las funciones de miR-192 se encuentra que es un regulador positivo de p53 una proteína supresora de

tumor, además, la expresión de éste miRNA se ha visto severamente reducida en algunos tipos de cáncer de colon (Feng, et al., 2011).

La disminución de la expresión de miR-92a basal obtenida en el grupo omnívoro por qPCR, aunque no es significativa apoya los resultados obtenidos por Tarallo y cols. ya que estos autores encontraron niveles de expresión incrementados de miR-92a en plasma de individuos veganos en comparación de individuos con dieta omnívora también mediante qPCR. Estos autores también correlacionaron que miR-92a en plasma fue menormente expresado en personas que comen carne roja (Tarallo, et al., 2014).

Posiblemente se requiera un mayor número de muestras para alcanzar la significancia estadística en la disminución de la expresión de miR-92a obtenida en la presente tesis. Sin embargo, existen algunas otras diferencias entre los estudios que contribuyen a que no se haya replicado la significancia estadística, en ambos estudios la muestra fue pequeña lo que incrementa el sesgo y dificulta la reproducibilidad, además, las muestras provienen de diferente población, lo que conlleva a diferencias genéticas además de las variaciones fisiológicas individuales (Lohmueller, 2014).

La importancia de evaluar la expresión de miR-192 y miR-92a recae en que han sido asociados con cáncer colorrectal debido a que su expresión se ha relacionado con procesos de invasión y metástasis (Vlachos, et al., 2012) (Ventura, et al., 2008) (Inomata, et al., 2009). Es sabido que dentro de los factores de riesgo ambientales para el cáncer colorrectal está la dieta y en específico el consumo alto de carne roja y carne procesada., dentro de la presente tesis la expresión de miR-192 se encontró disminuida en el grupo omnívoro, éste miRNA es un regulador positivo de p53 y su expresión se ha visto reducida en diversos tipos de cáncer de colon, lo que probablemente explique la relación entre el consumo de carne roja y el riesgo incrementado a cáncer colorrectal (Schee, et al., 2013) (Scarpati, et al., 2014). Por otra parte, miR-92a pertenece al clúster miR-17-92 el cual ha sido nombrado como oncogénico, además, en tejidos de cáncer colorrectal se ha visto altamente expresado (Yamada, et al., 2013). Tanto en nuestro estudio como en el realizado por Tarallo y cols. miR-92a al contrario de presentar un incremento en su expresión en los sujetos con consumo de carne, se presentó incrementado en sujetos bajo una dieta vegana. Esto puede deberse a que la expresión de

un miRNA puede cambiar dependiendo si se realiza la determinación en plasma o en tejido, además que un solo miRNA puede tener varios blancos.

Con lo anterior se concluye que la expresión basal (tiempo 0) de miR-192 se encuentra disminuida significativamente en sujetos omnívoros comparado con la expresión en sujetos veganos, mientras que los miR-92a, miR-1, miR-10b y miR-22 no se encuentran diferencialmente expresados en sujetos omnívoros comparados con sujetos veganos.

En cuanto a los resultados del análisis de los niveles de miRNAs en tiempos postprandiales se analizó el panel de miRNAs por NGS, el panel sólo se realizó en las muestras de plasma del tiempo 0 y 4 h, una muestra de cada grupo de estudio. El análisis piloto por NGS permitió visualizar todo el panel de miRNAs y los posibles cambios a las 4 h posteriores a la dieta; aunque la utilización de sólo dos muestras por grupo incrementa la variabilidad y el sesgo. Se propuso el estudio piloto del panel debido a que Witwer en el 2012, señaló que no todos los xenomiRs ingresan a la circulación en cantidades potencialmente funcionales (Witwer, 2012), además, Liang y cols. sugieren con su estudio que la absorción de los miRNAs derivados de la dieta por el tracto gastrointestinal puede ser potencialmente selectiva (Liang, et al., 2015).

El tiempo de 4 horas postprandiales fue seleccionado en el análisis piloto por NGS debido a que los estudios con resultados positivos para la detección de xenomiRs en circulación y en diferentes órganos muestran la máxima expresión del xenomiR dentro de las 4-6 horas posteriores al consumo del alimento (Zhang, et al., 2012) (Baier, et al., 2014) (Liang, et al., 2014). Además, también fueron considerados los tiempos que toman la digestión, vaciamiento gástrico y la absorción de los nutrientes fisiológicamente (Hall & Guyton, 2011).

Los resultados por NGS mostraron un incremento postprandial a las 4 h de 1.24 veces la expresión miR-1 y una disminución de 1.29 veces de miR-22 al comparar el grupo omnívoro con el grupo vegano. Lo anterior debía ser validado ya que el análisis piloto podría presentar sesgo debido a la variabilidad individual ocasionada por la falta de 3 réplicas para que el estudio por NGS sea considerado con validez estadística.

Para el análisis mediante qPCR en la totalidad de los tiempos postprandiales se seleccionaron a miR-1 y a miR-22, además miR-10b fue considerado debido a que

Dever y cols. reportaron que el miRNA es el más abundante en carne de res después del proceso de cocción (Dever, et al., 2015) .

Previo a la cuantificación de los niveles de los microRNAs en las muestras postprandiales se procedió a verificar la presencia y estabilidad de miR-1, -22 y -10b en carne de res posterior a un procesamiento basado en calor. Dever y cols. en 2015 mostraron la sobrevivencia de miRNAs en tejido muscular de bovino después de métodos convencionales de cocción. Los resultados en la presente tesis mostraron la detección de miR-1, 22 y 10b después del proceso de cocción, sin embargo, a diferencia de Dever y cols. en nuestros resultados se mostró que miR-1 estaba presente en mayor concentración que miR-10b en la carne de res posterior al proceso de cocción convencional; esta diferencia probablemente se deba al tipo de corte de carne utilizado en nuestra intervención. (Dever, Kemp, Thompson, Keller, Waksmonski, & Scholl, 2015). Lo anterior apoya a los estudios que mencionan que los miRNAs son estables bajo condiciones de alto calor o acidez y almacenamiento prolongado (Jung, Schaefer, Steiner, Kempkensteffen, Stephan, & Erbersdobler, 2010) (Snow, Hale, Isaacs, Baggish, & SY, 2013) (Philip, Ferro, & Tate, 2015); lo que permite concluir que los microRNAs 1, 10b y 22 en carne de res sobreviven a un proceso de cocción.

El análisis de cuantificación relativa por PCR tiempo real para la expresión de los miRNAs en plasma humano posterior a la ingesta de carne no mostró un incremento significativo de los niveles de expresión de miR-1, -22 y -10b en el grupo omnívoro comparado con los niveles de expresión en el grupo vegano.

Los resultados obtenidos mediante qPCR presentaron diferencias comparado con lo obtenido de las muestras individuales analizadas mediante NGS en dónde se obtuvo un incremento en la expresión de miR-1 a las 4 h postprandiales del grupo omnívoro. Las diferencias en los resultados están basadas en que el realizar el panel piloto mediante NGS en sólo una muestra de cada grupo incrementa la variabilidad y disminuye las posibilidades de reproducibilidad, además, existen diferencias propias entre las técnicas utilizadas.

Los resultados mediante qPCR para la expresión de miR-1, miR-10b y miR-22 no mostraron un patrón de incremento en los niveles de expresión en los diferentes tiempos postprandiales en el grupo omnívoro comparado con el grupo vegano.

Dentro de los resultados individuales se observó que en algunos participantes los niveles de los miRNAs se incrementaban en los tiempos postprandiales, sin embargo, en otros participantes se mostraba una disminución en la expresión posterior al consumo de la dieta, esta variabilidad se presentó en ambos grupos de estudio; una posible estrategia para disminuir la variabilidad sería incrementar el número de muestra.

La variabilidad presentada concuerda con el estudio por Auerbach y cols. dónde sujetos que consumieron leche de vaca presentaron un incremento en la expresión de miR-29b comparado con la expresión basal (ayuno), sin embargo, en otros sujetos la expresión se vio disminuida a pesar del consumo de leche (Auerbach, et al., 2016).

Debido que en algunos individuos tanto omnívoros como veganos se presentaban incrementos en los niveles de miRNAs después del consumo del tiempo de alimentación se sugiere que lo presentado en los resultados sea debido a los factores como variación diurna y postprandio; Kroh y cols. en el 2010 y Moldovan y cols. en el 2014 mencionan que aún se desconoce el impacto que tiene la variación diurna y el estado de ayuno contra la ingesta de alimentos en los niveles de los miRNAs circulantes, lo cual podría explicar lo observado en ambos grupos (Kroh, et al., 2010) (Moldovan, et al., 2014).

Respecto a la inferencia del posible traspaso a plasma de miRNAs provenientes de la carne, los resultados concuerdan con lo descrito previamente (Dickinson, et al., 2013) (Snow, et al., 2013) (Title, et al., 2015) (Laubier, et al., 2015), en dónde no se mostró evidencia de niveles biológicamente relevantes de los miRNAs posteriores a la ingesta del alimento en estudio correspondiente. Los estudios con resultados similares a los obtenidos en la presente tesis señalan que la absorción de lo que se ingiere en condiciones fisiológicas puede que no sea eficiente para promover cambios importantes en los niveles de expresión de miRNAs en circulación y posteriormente llevar a cabo el proceso de regulación postranscripcional. Probablemente, la cantidad de alimento brindado en el presente estudio no sea suficiente para impactar en los niveles de expresión de miRNAs en circulación, además, la complejidad de un tiempo de

alimentación completo que incluye una variedad de alimentos, incrementa el riesgo de sesgo y una posible competencia entre miRNAs provenientes de la dieta.

Lo obtenido en la presente tesis contrasta con lo señalado por (Zhang, et al., 2012), (Baier, et al., 2014), (Liang, et al., 2015), (Yang, et al., 2015), quienes muestran que miRNAs provenientes de alimentos son absorbidos y detectados de manera efectiva en circulación de los organismos sanos. En el presente estudio, para observar una posible transferencia de los miRNAs provenientes de la ingesta de carne de res se buscaba encontrar un incremento significativo de los miRNAs analizados después de la dieta brindada con carne comparado con el grupo control, sin embargo, esto no sucedió.

Existen planteamientos para determinar que a pesar que los miRNAs en los alimentos se encuentran presentes de manera considerable y resisten a diferentes procesamientos, hay limitantes que dificultan la absorción por el tracto gastrointestinal y su llegada a circulación, como lo son: las RNAsas del aparato digestivo, la condición ácida del estómago, las sales biliares y enzimas pancreáticas, la pobre transcitosis y el reconocimiento por parte del sistema inmune mediante los receptores tipo Toll (Petrick, et al., 2013) (Witwer & Hirschi, 2014).

A pesar de esto, las postulaciones a favor en el debate de los xenomiRs derivados de la dieta continúan; Baier y cols. mencionan que la ausencia de un incremento postprandial de cualquier componente dietético en circulación no debe ser confundido con cero de biodisponibilidad, porque estos compuestos pueden ser degradados o almacenados en la mucosa intestinal o hígado e incluso interactuar con el microbioma humano (Wang, et al., 2012) (Baier, et al., 2014).

En la presente tesis, se pretendió aportar al debate de los xenomiRs, dentro de los resultados se mostró que el consumo de carne de res no promueve un incremento significativo en los niveles de miR-1, miR-10b y miR-22, aportando a la postura que señala que la transferencia de los miRNAs procedentes de la alimentación es poco probable.

10. CONCLUSIONES

- Los microRNAs 1, 10b y 22 en carne de res sobreviven a un proceso de cocción.
- El análisis piloto por NGS mostró un incremento postprandial de 1.24 veces la expresión miR-1 y una disminución de 1.29 veces de miR-22 al comparar el grupo omnívoro con el grupo vegano y presentó variabilidad en las dos muestras analizadas.
- Los miR-92a, miR-1, miR-10b y miR-22 analizados mediante qPCR al tiempo cero no se encuentran expresados significativamente en sujetos omnívoros comparados con sujetos veganos.
- El consumo de carne de res no promueve la transferencia de los miR-1, miR-10b y miR-22 provenientes de la carne a pesar que éstos han sido detectados en carne de res posterior al proceso de cocción.
- La expresión de miR-192 al tiempo cero presenta una disminución significativa no descrita a la fecha en el grupo omnívoro comparado con el grupo vegano, un miRNA con relevancia en cáncer de colon.

11. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en la presente tesis abren la posibilidad para analizar:

- La expresión de miR-192 y verificar la disminución en tiempos postprandiales, así como incrementar el número de muestras para asegurar que el hallazgo de disminución del miR-192 en sujetos omnívoros comparado con la expresión en sujetos veganos, es representativo de la población debido a su relevancia en cáncer de colon.
- La transferencia de microRNAs provenientes de la carne de res con una ingesta de un mayor contenido de carne basado en los reportes del promedio de consumo de carne de res en Nuevo León, así como analizar un mayor número de muestras para disminuir el sesgo ocasionado por la variabilidad metabólica entre sujetos. Además, analizar el consumo de carne sin la complejidad de una dieta completa debido a la posibilidad de competencia entre otros miRNAs derivados de otros alimentos.

12. REFERENCIAS

- Alvarado, L., Luyando, C. & DR, T., 2012. Caracterización del consumidor de la carne de pollo en el área metropolitana de Monterrey. *Región y Sociedad*, pp. 1870-3925.
- Ameres, S. & Zamore, P., 2013. Diversifying microRNA sequence and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, pp. 475-88.
- Arroyo, J. y otros, 2011. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci*, pp. 5003-8.
- Auerbach, A. y otros, 2016. Uptake of dietary milk miRNAs by adult humans: a validation study. *F1000Research*, 5(721).
- Baier, S. y otros, 2014. MicroRNAs are absorbed in biologically meaningful amounts from nutritionally relevant doses of cow milk and affect gene expression in peripheral blood mononuclear cells, HEK-293 kidney cell cultures, and mouse livers. *J Nutr*, pp. 1495-500.
- Baier, S., Xie, F. & Zemleni, J., 2014. Reply to Witwer. *J Nutr*, 144(11), p. 1882.
- Bartel, D. P., 2009. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*, pp. 215-33.
- Belinova, L. y otros, 2014. Differential Acute Postprandial Effects of Processed Meat and Isocaloric Vegan Meals on the Gastrointestinal Hormone Response in Subjects Suffering from Type 2 Diabetes and Healthy Controls: A Randomized Crossover Study. *PLoS ONE*, 9(9), p. e107561.
- Blondal, T. y otros, 2013. Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods*, 59(1).
- Boettger, T., Wüst, S., Nolte, H. & Braun, T., 2014. The miR-206/133b cluster is dispensable for development, survival and regeneration of skeletal muscle. *Skelet Muscle*, 1(23).
- Bonauer, A. & Dimmeler, S., 2009. The microRNA-17-92 cluster: still a miRacle?. *Cell Cycle*, 8(23), pp. 3866-73.
- Brennecke, J. y otros, 2003. Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in drosophila. *Cell*, pp. 25-36.
- Bustin, S. y otros, 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, pp. 611-22.
- Carvajal, S., 2001. *Valor nutricional de la carne de: res, cerdo y pollo*, San José Costa Rica: Corporación de Fomento Ganadero.
- Casanueva, E., Kaufer-Horwitz, M. & Pérez-Lizaur, A. B., 2008. *Nutriología Médica*. México: Editorial Médica Panamericana.
- Celikbilek, M. y otros, 2014. Circulating microRNAs in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol*, pp. 613-20.
- Chen, J. y otros, 2006. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet*, 38(2), pp. 228-33.
- Chen, X. y otros, 2008. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*, pp. 997-1006.
- Chen, X. y otros, 2010. Identification and characterization of microRNAs in raw milk during different periods of lactation, commercial fluid, and powdered milk products. *Cell Res*, Oct;20(10), pp. 1128-37.
- Córdova-Villalobos, J., 2009. Sobrepeso y obesidad, problemas de salud pública en México. *Cir Ciruj*, pp. 421-422.
- Cortez, M. & Calin, G., 2009. MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases. *Expert Opin Biol Ther*, pp. 703-711.
- Craig, W., 2010. Nutrition Concerns and Health Effects of Vegetarian Diets. *Nutr Clin Pract*, pp. 613-20.
- Cuk, K. y otros, 2013. Circulating microRNAs in plasma as early detection markers for breast cancer. *Int J Cancer*, pp. 1602-12.
- Dever, J. y otros, 2015. Survival and Diversity of Human Homologous Dietary MicroRNAs in Conventionally Cooked Top Sirloin and Dried Bovine Tissue Extracts. *Plos One*, p. 10(9).
- Dey, N. y otros, 2011. MicroRNA-21 orchestrates high glucose-induced signals to TOR complex 1, resulting in renal cell pathology in diabetes. *J Biol Chem*, p. 25586-25603.
- Dickinson, B. y otros, 2013. Lack of detectable oral bioavailability of plant microRNAs after feeding in mice. *Nat Biotechnol*, pp. 965-7.

Drummond, M. y otros, 2009. Essential amino acids increase microRNA-499, -208b, and -23a and downregulate myostatin and myocyte enhancer factor 2C mRNA expression in human skeletal muscle. *J Nutr*, Volumen 139, p. 2279–2284.

Du, T. & Zamore, P., 2005. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development*, pp. 4645-52.

Enquobahrie, D. y otros, 2011. Global maternal early pregnancy peripheral blood mRNA and miRNA expression profiles according to plasma 25-hydroxyvitamin D concentrations. *J. Matern. Fetal Neonatal Med*, pp. 1002-12.

Fang, L. y otros, 2015. Circulating microRNAs as biomarkers for diffuse myocardial fibrosis in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Transl Med*, 13(314).

Feng, Z., Zhang, C., Wu, R. & Hu, W., 2011. Tumor suppressor p53 meets microRNAs. *J Mol Cell Biol*, 3(1), pp. 44-50.

Finnegan, E. & Pasquinelli, A., 2013. MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, pp. 51-68.

Fujita, Y., Kuwano, K., Ochiya, T. & Takeshita, F., 2014. The impact of extracellular vesicle-encapsulated circulating microRNAs in lung cancer research. *Biomed Res Int*, p. 486413.

Fundación Heinrich Böll en Santiago de Chile, México y Brasil, 2014. *Atlas de la Carne*, Santiago: MAVAL Ltda.

Gamarra, S., 2001. *CAMBIOS FISIOLÓGICOS DEL ENVEJECIMIENTO*, Perú: Boletín de la Sociedad Peruana de Medicina Interna.

Gantier, M. y otros, 2011. Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation. *Nucleic Acids Res*, pp. 5692-703.

García-Segura, L., Pérez-Andrade, M. & Miranda-Ríos, J., 2013. The emerging role of MicroRNAs in the regulation of gene expression by nutrients. *J Nutrigenet Nutrigenomics*, pp. 16-31.

Ge, Q. y otros, 2014. miRNA in plasma exosome is stable under different storage conditions. *Molecules*, pp. 1568-75..

Gomes, C. y otros, 2014. Circulating miR-1, miR-133a, and miR-206 levels are increased after a half-marathon run. *Biomarkers*, 19(7), pp. 585-9.

Gu, Z., Eleswarapu, S. & Jiang, H., 2007. Identification and characterization of microRNAs from the bovine adipose tissue and mammary gland. *FEBS Lett*, pp. 981-8.

Hall, J. E. & Guyton, A. C., 2011. *Guyton and Hall textbook of medical physiology*. 12 ed. Philadelphia: PA: Saunders Elsevier.

Ha, M. & Kim, V., 2014. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, pp. 509-24.

Höck, J. & Meister, G., 2008. The Argonaute protein family. *Genome Biol*, p. 210.

Hoss, A. y otros, 2015 . Study of plasma-derived miRNAs mimic differences in Huntington's disease brain. *Mov Disord*, 20(14), pp. 1961-4.

Howard, K. M., Kusuma, R. J. & Baier, S. R., 2015. Loss of miRNAs during Processing and Storage of Cow's (Bos taurus). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Volumen 63, p. 588–592.

Huang, J. y otros, 2015. microRNA miR-10b inhibition reduces cell proliferation and promotes apoptosis in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. *Mol Biosyst*, 11(7), pp. 2051-9.

Huen, M. & Chen, J., 2010. BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nature reviews Molecular cell biology*, p. 138–48.

Humphreys, K. y otros, 2014. Dietary manipulation of oncogenic microRNA expression in human rectal mucosa: a randomized trial. *Cancer Prev Res (Phila)*, pp. 786-95.

Igaz, I. & Igaz, P., 2015. Possible role for microRNAs as inter-species mediators of epigenetic information in disease pathogenesis: Is the non-coding dark matter of the genome responsible for epigenetic interindividual or interspecies communication?. *Medical Hypotheses*, Volumen 84, pp. 150-154.

INEGI, 2011. *Consulta interactiva de datos-Estadísticas de mortalidad*. [En línea] Available at: <http://cuentame.inegi.org.mx/poblacion/defunciones.aspx?tema=P>

Inomata, M. y otros, 2009. MicroRNA-17-92 down-regulates expression of distinct targets in different B-cell lymphoma subtypes. *Blood*, Volumen 113, p. 396–402.

Jin, W. y otros, 2009. Characterization of bovine miRNAs by sequencing and bioinformatics analysis. *BMC Mol Biol*.

Jorde, R., Svartberg, J., Joakimsen, R. & Coucheron, D., 2012. Plasma profile of microRNA after supplementation with high doses of vitamin D3 for 12 months. *BMC Res Notes*, 5(245).

Jung, M. y otros, 2010. Robust microRNA stability in degraded RNA preparations from human tissue and cell samples. *Clin Chem*, Jun;56(6), pp. 998-1006.

Kaur, K. y otros, 2015. Elevated Hepatic miR-22-3p Expression Impairs Gluconeogenesis by Silencing the Wnt-Responsive Transcription Factor Tcf7. *Diabetes*, 64(11), pp. 3659-69.

Kawai, S. & Amano, A., 2012. BRCA1 regulates microRNA biogenesis via the DROSHA microprocessor complex. *The Journal of cell biology*, p. 201-8.

Kim, V., 2005. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, pp. 376-85.

Kim, V., Han, J. & Siomi, M., 2009. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell*.

Kosaka, N., Izumi, H., Sekine, K. & Ochiya, T., 2010. microRNA as a new immune regulatory agent in breast milk. *Silence*, p. (1):7.

Kroh, E., Parkin, R., Mitchell, P. & Tewari, M., 2010. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods*, 50(4), pp. 298-301.

Krol, J., Loedige, I. & Filipowicz, W., 2010. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*, pp. 597-610.

Kuwabara, Y. y otros, 2011. Increased microRNA-1 and microRNA-133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage. *Circ Cardiovasc Genet*, pp. 446-54.

Laubier, J., Castille, J., Guillou, S. & Provost, F. L., 2015. No effect of an elevated miR-30b level in mouse milk on its level in pup tissues. *RNA Biol*, 12(1), pp. 26-9.

Lawrie CH, G. S. D. H., 2008. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*, p. 672-5.

Lawrie, R., 1967. *Ciencia de la Carne*. Zaragoza España: Acribia.

Lee, R., Feinbaum, R. & Ambros, V., 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, pp. 843-854.

Liang, G. y otros, 2014. Assessing the survival of exogenous plant microRNA in mice. *Food Sci Nutr*, pp. 380-8.

Liang, H. y otros, 2015. Effective detection and quantification of dietetically absorbed plant microRNAs in human plasma. *Journal of Nutritional Biochemistry*.

Li, L. y otros, 2010. Computational approaches for microRNA studies: a review. *Mamm Genome*, pp. 1-12.

Lim, L. y otros, 2003. Vertebrate microRNA genes. *Science*, pp. 299, 1540.

Lin, C. y otros, 2013. MiR-1 and miR-206 target different genes to have opposing roles during angiogenesis in zebrafish embryos. *Nat Commun*, 4(2829).

Lin, J. y otros, 2015. Exosomes: Novel Biomarkers for Clinical Diagnosis. *The Scientific World Journal*.

Lohmueller, K., 2014. The impact of population demography and selection on the genetic architecture of complex traits. *PLoS Genet*, 10(5).

Mangolini, A. y otros, 2015. Diagnostic and prognostic microRNAs in the serum of breast cancer patients measured by droplet digital PCR. *Biomark Res*, 3(12).

Mar-Aguilar, F. y otros, 2013. Serum circulating microRNA profiling for identification of potential breast cancer biomarkers. *Dis Markers*, pp. 163-9.

Melnik, B., 2015. The Pathogenic Role of Persistent Milk Signaling in mTORC1- and Milk- MicroRNA-Driven Type 2 Diabetes Mellitus. *Curr Diabetes Rev*, pp. 46-62.

Micó, V. y otros, 2016. Unsuccessful Detection of Plant MicroRNAs in Beer, Extra Virgin Olive Oil and Human Plasma After an Acute Ingestion of Extra Virgin Olive Oil. *Plant Foods Hum Nutr*, Mar;71(1), pp. 102-8.

miRBase, 2014. *the microRNA database*. [En línea] Available at: <http://www.mirbase.org>

- Mi, S., Zhang, J., Zhang, W. & Huang, R., 2013. Circulating microRNAs as biomarkers for inflammatory diseases. *Microna*, pp. 63-71.
- Moldovan, L. y otros, 2014. Methodological challenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers. *J Cell Mol Med*, 18(3), pp. 371-90.
- Monroy, O. V., 2007. Morbilidad y mortalidad de la enfermedad isquémica del corazón y cerebrovascular en México. *Arch. Cardiol. Méx*, pp. 31-39.
- Norat, T., 2010. *The Associations between Food, Nutrition and Physical Activity and the Risk of Colorectal Cancer. Systematic Literature Review Continuous Update Project Report*, s.l.: WCRF/AICR.
- Olsen, P. & Ambros, V., 1999. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev. Biol*, pp. 671-680.
- OMS, 2003. *Serie de Informes Técnicos Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas: informe de una Consulta Mixta de Expertos OMS/FAO en Régimen Alimentario, Nutrición y Prevención de Enfermedades Crónicas*, Ginebra: Organización Mundial de la Salud.
- Palmer, J. y otros, 2014. MicroRNA expression altered by diet: Can food be medicinal?. *Ageing Research Reviews*, pp. 16-24.
- Papaiouannou, M., Koufaris, C. & Gooderham, N., 2014. The cooked meat-derived mammary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) elicits estrogenic-like microRNA responses in breast cancer cells. *Toxicol Lett*, pp. 9-16.
- Pescador, N. y otros, 2013. Serum circulating microRNA profiling for identification of potential type 2 diabetes and obesity biomarkers. *PLoS One*.
- Petrick, J., Brower-Toland, B., Jackson, A. & Kier, L., 2013 . Safety assessment of food and feed from biotechnology-derived crops employing RNA-mediated gene regulation to achieve desired traits: a scientific review. *Regul Toxicol Pharmacol*, 66(2), pp. 167-76.
- Philip, A., Ferro, V. & Tate, R., 2015 . Determination of the potential bioavailability of plant microRNAs using a simulated human digestion process. *Mol Nutr Food Res*, Oct;59(10), pp. 962-72.
- Research, A. I. f. C., 2007. *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective*. Washington DC, AICR.
- Rome, S., 2015. Use of miRNAs in biofluids as biomarkers in dietary and lifestyle intervention studies. *Genes Nutr*, 10(5).
- Ross, S. & Davis, C., 2014. The emerging role of microRNAs and nutrition in modulating health and disease. *Annu Rev Nutr*, pp. 305-36.
- Rubio, L. & Braña, V., 2013. *Composición de la Carne Mexicana*, ISBN: 978-607-37-0094-8: Folleto Técnico No. 27 Primera Edición.
- Ryu, M. y otros, 2011. Genomic analysis, cytokine expression, and microRNA profiling reveal biomarkers of human dietary zinc depletion and homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci*, p. 20970–75.
- Sayed, D. & Abdellatif, M., 2011. MicroRNAs in development and disease. *Physiol. Rev*, p. 827–87.
- Scarpati, G. D. V. y otros, 2014. Analysis of differential miRNA expression in primary tumor and stroma of colorectal cancer patients. *BioMed Research International*, Volumen 2014.
- Schee, K. y otros, 2013 . Deep Sequencing the MicroRNA Transcriptome in Colorectal Cancer. *PLoS One*, 8(6).
- Schmittgen Thomas D, K. J. L., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, pp. 1101-1108.
- Siri-Tarino PW, S. Q. H. F. K. R., 2010 . Saturated fatty acids and risk of coronary heart disease: modulation by replacement nutrients. *Curr Atheroscler Rep*, pp. 384-90.
- Snow, J. y otros, 2013. Ineffective delivery of diet-derived microRNAs to recipient animal organisms. *RNA Biol*, pp. 1107-16.
- Stefani G, S. F., 2006. MicroRNAs in search of a target. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol*, p. 129–34.
- Sun, J. y otros, 2013. Identification and profiling of conserved and novel microRNAs from Chinese Qinchuan bovine longissimus thoracis. *BMC Genomics*.
- Tarallo, S. y otros, 2014. MicroRNA expression in relation to different dietary habits: a comparison in stool and plasma samples. *Mutagenesis*, pp. 385-91.

- Title, A., Denzler, R. & Stoffel, M., 2015 . Uptake and Function Studies of Maternal Milk-derived MicroRNAs. *J Biol Chem*, 290(30), pp. 23680-91.
- Tosar, J., Rovira, C., Naya, H. & Cayota, A., 2014. Mining of public sequencing databases supports a non-dietary origin for putative foreign miRNAs: underestimated effects of contamination in NGS. *RNA*, pp. 754-7.
- Valadi, H. y otros, 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, pp. 654-9.
- Ventura, A. y otros, 2008. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell* , Volumen 132, p. 875–86.
- Vlachos, I. y otros, 2012. *DIANA miRPath v.2.0: investigating the combinatorial effect of microRNAs in pathways* *Nucleic Acids Research* 2012. [En línea] Available at: <http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=mirpath#mirnas=hsa-miR-192-5p&methods=Tarbase&selection=0> [Último acceso: Junio 2016].
- Wagner, A. y otros, 2015. Food derived microRNAs. *Food Funct*.
- Wang, K. y otros, 2012. The complex exogenous RNA spectra in human plasma: an interface with human gut biota?. *PLoS One*, Volumen 12, p. 7.
- WHO, 2004. *World Health Organization*. [En línea] Available at: <http://www.assessmentpsychology.com/icbmi.htm>
- WHO, 2011. *Global status report on noncommunicable diseases 2010*, Geneva: World Health Organization.
- WHO, 2015. *World Health Organization Noncommunicable diseases (NCD)*. [En línea] Available at: <http://www.who.int/gho/ncd/en/>
- Witwer, K. & Hirschi, K., 2014. Transfer and functional consequences of dietary microRNAs in vertebrates: concepts in search of corroboration. *Bioessays*, Volumen 36, p. 394–406.
- Witwer, K., McAlexander, M., Queen, S. & Adams, R., 2013. Real-time quantitative PCR and droplet digital PCR for plant miRNAs in mammalian blood provide little evidence for general uptake of dietary miRNAs: limited evidence for general uptake of dietary plant xenomiRs. *RNA Biol*, pp. 1080-6.
- Witwer, K. W., 2012. XenomiRs and miRNA homeostasis in health and disease. *RNA Biology, Landes Bioscience*, 9(9), p. 1147–1154.
- Xie, C. y otros, 2011. MicroRNA-1 regulates smooth muscle cell differentiation by repressing Kruppel-like factor 4. *Stem Cells Dev*, 20(2), pp. 205-10.
- Xiong, J., Du, Q. & Liang, Z., 2010. Tumor-suppressive microRNA-22 inhibits the transcription of E-box-containing c-Myc target genes by silencing c-Myc binding protein. *Oncogene*, Volumen 29, p. 4980–4988.
- Yamada, N. y otros, 2013. Role of intracellular and extracellular microRNA-92a in colorectal cancer. *Transl. Oncol*, Volumen 6, p. 482–492.
- Yang, J. y otros, 2015. Detection of an Abundant Plant-Based Small RNA in Healthy Consumers. *PLoS One*, 10(9), p. e0137516.
- Yang, J., Farmer, L., Agyekum, A. & Hirschi, K., 2015. Detection of dietary plant-based small RNAs in animals. *Cell Res*, 25(4), pp. 517-20.
- Yang, J., Hirschi, K. & Farmer, L., 2015. Dietary RNAs: New Stories Regarding Oral Delivery. *Nutrients*, Volumen 7, pp. 3184-3199.
- Zeng, L., Cui, J., Wu, H. & Lu, Q., 2014. The emerging role of circulating microRNAs as biomarkers in autoimmune diseases. *Autoimmunity*, pp. 419-29.
- Zhang Z, Q. Y. B. G. J. Q., 2012. MicroRNA degradation and turnover: regulating the regulators. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, pp. 593-600.
- Zhang, L. y otros, 2012. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Res*, Volumen 22, pp. 107-26.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Daniela Alejandra Mata Cardona

Candidato para el grado de

Maestro en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

Tesis: ANALISIS DE LA EXPRESIÓN DE microRNAs EN PLASMA HUMANO POSTERIOR A LA INGESTA DE UNA DIETA ESTÁNDAR CON CARNE DE RES

Campo de Estudio: Biología molecular aplicada en alimentación, Nutrigenómica.

Datos personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 11 de septiembre de 1990, hija de Jorge Alberto Mata López y Aurelia Cardona Juárez.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Licenciado en Nutrición en 2012, con mención honorífica, primer lugar de generación.

Experiencia profesional: Tesista en la Unidad de Biología del Desarrollo, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL desde 2014. Práctica privada en consulta de Nutrición Clínica desde 2013, Coordinadora de estudios en investigación clínica 2012-2014.

ANEXO 1: FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO



Laboratorio de Inmunología y Virología
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Autónoma de Nuevo León



CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Estudio:	<i>“Análisis de microRNAs de origen bovino en plasma humano después de la ingesta de una dieta estándar con carne de res”.</i>
Nombre del Investigador Principal:	LN. Daniela Alejandra Mata Cardona
Institución:	Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León
Teléfono de contacto:	044 818 68 11190
Persona de contacto:	LN. Daniela Alejandra Mata Cardona

Se le está invitando a participar en un estudio de investigación, por lo cual este formato de consentimiento tiene información para ayudarlo a decidir si desea participar.

Lea este formato cuidadosamente y por favor pídale al personal o responsable del estudio que le explique cualquier duda o pregunta que tenga. No debe firmar este formato hasta que comprenda toda la información presentada en las siguientes páginas y hasta que todas sus preguntas sobre la investigación hayan sido respondidas satisfactoriamente. Su participación en este estudio es voluntaria.

Acerca de este estudio

Propósito del estudio:

Determinar si los miRNAs de origen bovino son transferidos a plasma humano después de la ingestión de una dieta con carne de res.

El enfoque molecular que describe cómo la dieta influye en la salud y enfermedad en la actualidad está siendo activamente investigado. Un ejemplo de esto involucra la regulación génica, incluyendo el rol de la dieta en la modulación de RNA no codificante, regulatorios, como los microRNAs (miRNAs) involucrados en diversos procesos incluidos: hematopoyesis, organogénesis, apoptosis, proliferación celular, etc. Sin embargo, recientemente ha sido reportada la transferencia de miRNAs de plantas a organismos mamíferos a través de la ingestión vía oral, permitiendo la circulación de éstos en sangre y llevados hasta los tejidos donde se ha observado la consecuente regulación post-transcripcional de la expresión de genes mamíferos. Si es que los miRNAs provenientes de otras especies pueden atravesar la barrera gastrointestinal, podría revolucionar la comprensión de éstos mecanismos y las consecuencias moleculares derivadas de la dieta.

Por lo cual, en el presente estudio se determinará si miRNAs de origen bovino son transferidos al plasma humano después del consumo de una dieta estándar con contenido de carne de res.

Se evaluará la expresión de los miRNAs bovinos en plasma mediante RT-PCR tiempo real tanto previo como después del consumo del tiempo de comida con contenido de carne, de una manera



indirecta con un aumento de éstos miRNAs en comparación con los niveles basales se podría proponer el posible paso de los miRNAs en carne hacia el torrente sanguíneo de humanos.

Criterios de inclusión y exclusión

El responsable del estudio verificará que Usted cumpla con los siguientes requisitos antes de considerar su ingreso al estudio de investigación.

Criterios de inclusión:	Criterios de exclusión:
Sujetos con 18-30 años de edad	No aceptar firma del consentimiento informado
Firma de consentimiento informado	Mujeres en menstruación el día de la toma de muestra, embarazo.
Sanos, sin alguna condición médica aguda o crónica	Consumo de medicamentos, suplementos
Índice de Masa Corporal de 18.5-24.9	Padecimientos médicos
Niveles de actividad física de leve a moderada	Intolerancia a algún componente de la dieta
Consumo de carne roja al menos tres veces a la semana (<i>sólo para el grupo con dieta omnívora</i>)	
Dieta vegana con duración mínima de 1 año (<i>sólo para el grupo con dieta vegana</i>)	
Preferente sin consumo de alcohol o tabaco	

Procedimientos del estudio:

- Extracción de sangre de una vena del brazo con sistema vacutainer (5ml en tubo con anticoagulante) por 4 ocasiones: tiempo 0: antes del consumo de la dieta en condiciones de ayuno. Tiempos 2, 4 y 6: a las dos, cuatro y seis horas después del consumo de la dieta.
- Ingesta de una dieta estándar **con o sin contenido de carne.** (con contenido de carne para el grupo con dieta omnívora, sin contenido de carne para el grupo con dieta vegana)

Si usted participa en el estudio se le pedirá hacer lo siguiente:

-Usted será asignado a uno de los dos grupos del estudio:

Dieta omnívora y dieta vegana.

-Asistir en condiciones de ayuno, es decir no consumir alimentos, medicamentos, ni bebidas (excepto agua) 16 horas antes de la toma de la primera muestra.

-Permanecer en las instalaciones del laboratorio de Inmunología y Virología durante 6 horas, dónde se le brindará una comida completa con o sin contenido de carne de res para su consumo y se recolectarán las muestras.

-Consumir la totalidad de la dieta

-Concluir con las tomas de muestra de sangre

-Estar disponible por un medio de comunicación para recordar las indicaciones previas al día de la toma de muestra.



Riesgos y molestias

En el estudio no se le administrará ninguna droga o medicamento.

La extracción de sangre puede causar dolor, hematomas (moretones), mareos o lesión del endotelio de la vena.

Ayunar puede causar mareos, dolores de cabeza y malestar estomacal.

Previo a la entrada del estudio se cuestionará si sufre de alergia o intolerancia a algún componente de la dieta por lo cual no correría algún riesgo, además la dieta contiene alimentos de consumo habitual.

Posibles beneficios

Usted pudiera verse beneficiado por su participación en este estudio:

- Estudios de laboratorio gratuitos
- Valoración nutricional mediante IMC y registro dietético
- Orientación alimentaria
- Consumo de un tiempo de comida completo

Retiro y terminación

Su participación es estrictamente voluntaria. Si desea suspender su participación, puede hacerlo con libertad en cualquier momento.



Declaración

Acepto los procedimientos del estudio y declaro de forma libre sin existir presión física o moral sobre mi persona que he comprendido totalmente el propósito, el riesgo de dicho procedimiento y aclarado las dudas que he planteado, leído y comprendido totalmente este consentimiento. Al firmar este consentimiento reconozco que mi participación es voluntaria y que puedo negarme a participar en cualquier momento sin sanciones.

Firmas

_____	_____	_____
Nombre del Sujeto en letra molde	Firma del Sujeto	Fecha
_____	_____	_____
Nombre del Primer testigo en letra molde	Firma del testigo	Fecha
_____	_____	_____
Nombre del Segundo testigo en letra molde	Firma del testigo	Fecha

Aseguramiento del Investigador o del miembro del equipo

He discutido lo anterior con esta persona. A mi más leal saber y entender, el sujeto está proporcionando su consentimiento tanto voluntariamente como de una manera informada, y él/ella posee el derecho legal y la capacidad mental suficiente para otorgar este consentimiento.

_____	_____	_____
Nombre en letra molde de la persona que obtuvo el consentimiento	Firma	Fecha

ANEXO 2. CARTA DE APROBACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN POR EL COMITÉ DE BIOÉTICA



Todo por tu Salud

Monterrey, Nuevo León a 13 de Mayo de 2015

Daniela Alejandra Mata Cardona

Licenciada en Nutrición

UANL Facultad de Ciencias Biológicas

Subdirección de Estudios de Posgrado

Por medio de la presente me permito notificarle que el proyecto de investigación titulado:

“Análisis de microRNAs de origen bovino en plasma humano después de la ingesta de una dieta estándar con carne de res.”.

Ha quedado registrado y aprobado en el Centro de Investigación del Grupo CHRISTUS MUGUERZA, con la clave CMHAE-009-14

Le solicito nos mantenga informados sobre los avances y términos de este estudio de investigación.

Sin más por el momento quedo a sus órdenes

Atentamente.-

Dr. Raúl Garza Garza .

Presidente Comité de Bioética y Bioseguridad en Investigación

Grupo CHRISTUS MUGUERZA

ANEXO 3. FORMATO DE HISTORIA CLÍNICA

FCB_UANL

Historia Médico Nutricia

Fecha: _____

Folio: _____

Datos Generales

Nombre: _____ Género: _____ Edad: _____
 Estado Civil: _____ Correo electrónico: _____ Tel. _____ /
 Cel.: _____ Dieta vegana: SI _____ NO _____ Duración: _____

Datos Socioeconómicos

Ocupación: _____ Horario: _____

Datos y Antecedentes Fisiopatológicos

Personales: _____
 Familiares: _____
 Padecimiento Actual: _____
 Prescripción Médica: _____
 Alergias a algún medicamento: _____

Datos clínicos

Digestivos			
Diarrea: _____	Diverticulosis: _____	Poliuria: _____	Insomnio: _____
Náuseas: _____	Gastritis: _____	Polidipsia: _____	Depresión: _____
Agruras: _____	Colitis: _____	Polifagia: _____	Angustia: _____
Distensión: _____		Edema: _____	Ingesta emocional: _____
Flatulencias: _____		Mareo: _____	Ansiedad: _____
Vómito: _____		Visión Borrosa: _____	Acantosis Nigricans: _____
Estreñimiento: _____		Zumbido de oídos: _____	Otro: _____
Malabsorción: _____		Cefalea: _____	Menstruación el día de la toma de muestras/ Embarazo: _____
Intolerancia alimentaria: _____		Disfagia: _____	

Estilo de Vida/ Factores de Riesgo

Actividad física: _____ Tipo: _____ Frecuencia: _____
 Horas sueño: _____ Horas trabajo y / o escuela: _____
 ¿Consume alcohol? _____ Cantidad: _____ Frecuencia: _____
 ¿Fuma? _____ Cantidad: _____ Frecuencia: _____
 Cambio peso 6 meses: _____ Suplementos: _____
 Último mes, Ingesta ha sido: Incrementada: _____ Igual: _____
 Disminuida: _____ Limitada en algún alimento: _____

Recordatorio de 24 horas

Desayuno: Lugar: _____ Hora: _____

Preparación	Alimento	Med. Casera	Met. Cocción

Comida: Lugar: _____ Hora: _____

Preparación	Alimento	Med. Casera	Met. Cocción

Cena: Lugar: _____ Hora: _____

Preparación	Alimento	Med. Casera	Met. Cocción

Entre Comidas: Lugar: _____ Hora: _____

Preparación	Alimento	Med. Casera	Met. Cocción

Agua natural: _____ vasos al día

FRECUENCIA ALIMENTARIA

Alimento	Frec. Seman al 0 - 7	Cant. g.	Cant. en medida casera	Alimento	Frec. Semana l 0 - 7	Cant. g.	Cant. en medida casera
LECHE Y LACTEOS				CEREALES:			
Leche _____				Tortilla de Maíz			
Yogurt				Tortilla de Harina			
Queso _____				Pan de Barra			
CARNES				Arroz			
Huevo				Papa			
Res				Pasta			
Barbacoa				Cereal de desayuno			
Pollo				Cereal Endulzado			
Puerco				Avena			

Pescado				FRUTAS			
Mariscos				Plátano			
Visceras				Naranja			
Carnes Frías				Manzana			
GRASAS				Mango			
Aceite				Papaya			
Margarina				Melón			
Mantequilla				Sandía			
Crema				Jicama			
Mayonesa				Otra: _____			
Tocino				VERDURAS			
Chorizo				Jitomate			
Aguacate				Zanahoria			
Aderezo				Calabacita			
AZUCARES				Lechuga			
Azúcar				Brócoli			
Miel				Otra			
Mermelada				OTROS ALIMENTOS			
Pasteles				Café			
Pan de Dulce				Alimentos Enlatados			
Galletas Dulces				Botanas			
Refresco embotellado				Galletas saladas			
Cerveza				Consomé			
LEGUMINOSAS				Condimentos			
Frijol				Picantes			
Leguminosas				Hamburguesas			
Garbanzo				Pizza			
Habas				Otro			

Datos Bioquímicos

Dato Bioquímico	Resultado	Valor de Referencia*
Hemoglobina		11.0 – 16.0g/dl
Hematocrito		34 – 44%
Glucosa		60-120 mg/dl
Colesterol		Hombre 113 – 197mg/dl Mujer 119 – 200mg/dl
Triglicéridos		150-199 mg/dl
Ácido Úrico		Hombre 4.0 – 8.5 mg/dl Mujer 2.7 – 7.3mg/dl

Datos Antropométricos

Peso actual: _____ Kg. Estatura: _____ cm IMC: _____ Dx: _____ % grasa: _____
 Dx: _____ Circunferencia Muñeca: _____ cm. Compleción: _____
 Peso Deseable: _____ Kg. Circunf. Cintura: _____ cm. Dx: _____
 % músculo: _____ Dx: _____ Grasa Visceral: _____

ANEXO 4. SECUENCIAS DE LOS microRNAs

- mir-10b-5p

HSA (humano): uaccuguagaaccgaauuugug

BTA (bovino): uaccuguagaaccgaauuugug

- mi-1-3p

HSA (humano): uggaauguaaagaaguauguau

BTA (bovino): uggaauguaaagaaguauguau

- mir-22-3p

HSA (humano): aagcugccaguugaagaacugu

BTA (bovino): aagcugccaguugaagaacug

- mir-16-5p

HSA (humano): uagcagcacguaaaauuuggcg

BTA (bovino): uagcagcacguaaaauuuggc

- mi-192-5p

HSA (humano): cugaccuaugaauugacagcc

BTA (bovino): cugaccuaugaauugacagccag

- mir-92a-3p

HSA (humano): uauugcacuugucccgccugu

BTA (bovino): uauugcacuugucccgccugu