



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA

IZTAPALAPA

“EFECTO DE LA EPIGALOCATEQUINA-3-GALATO
DEL TÉ VERDE (*Camellia sinensis*)
SOBRE LA EXPRESIÓN DE miRNAs”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A:

RUIZ LEYJA ESTELA D'ABRIL

CODIRECTORES: DRA. MARÍA ELIZABETH TEJERO BARRERA Y

DR. FRANCISCO JOSÉ FERNÁNDEZ PERRINO

ASESOR: DR. FAUSTO SÁNCHEZ MUÑOZ

IZTAPALAPA, CIUDAD DE MÉXICO, 28 DE FEBRERO 2018.

“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

MIEMBROS DEL JURADO:



Dr. Benjamín Pérez Aguilar
Departamento de Ciencias de la Salud,
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa
(Presidente)



Dr. Fausto Sánchez Muñoz
(Secretario)
Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chavez



Dra. Leonor Jacobo Albavera
(Vocal)
Instituto Nacional de Medicina Genómica



Dra. Amada Torres Salazar
(Vocal)
Instituto Nacional de Medicina Genómica

Esta tesis fue realizada través de la colaboración entre el laboratorio de Nutrigenética y Nutrigenómica del Instituto Nacional de Medicina Genómica y el laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma Metropolitana.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL:

Codirectora: Dra. María Elizabeth Tejero Barrera (Instituto Nacional de Medicina Genómica).

Codirector: Dr. Francisco José Fernández Perrino (Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa)

Asesor: Dr. Fausto Sánchez Muñoz (Instituto Nacional de Cardiología).

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Fundación Mexicana para la Salud, A. C., por el apoyo otorgado.

Agradezco a mis tutores:

Dra. María Elizabeth Tejero Barrera, Dr. Francisco José Fernández Perrino
y Dr. Fausto Sánchez Muñoz por su apoyo, enseñanza y amistad.

y sinodales:

Dr. Benjamín Pérez Aguilar
Dr. Fausto Sánchez Muñoz
Dra. Leonor Jacobo Albavera
Dra. Amada Torres Salazar

A mi padre:

LIC. ROMEO RUÍZ Y VELÁZQUEZ

*Que vive en mí
y cuyo amor sigue guiándome.*

Somos almas gemelas...

*Este 22 de enero fue la última vez que sentí
tu mano sosteniendo la mía... Ahora estás
en compañía de mamá Titi, mamá Queta y
Don Paulino.*

*Tu cuerpo descansa, pero tu esencia y amor
se quedaron conmigo.*

*Somos almas gemelas que viajan juntas en
este universo.*

¡Te amo papá!

A mi madre:

MARÍA TRINIDAD LEYJA MONTES

Por su cariño

y

apoyo incondicional durante toda mi vida.

*A mis hermanos: Alejandro,
Celeste y Alethia por los
años vividos.*

*A Juan Pablo Fernández por
tanto amor y felicidad.*

*A mi sobrino favorito,
Servando.*

*A Claudia y Marcela por
su apoyo y amistad.*

*A mi primo Fernando Ruíz
por su cariño.*

RESUMEN

La epigallocatequina-3-galato (EGCG) es el tipo de polifenol más abundante en *Camellia sinensis* (Té verde) y se sabe que induce apoptosis en células cancerígenas, disminuye las concentraciones de glucosa y triglicéridos en sangre periférica, al igual que disminuye la presión arterial, por lo que, su consumo ha sido considerado benéfico para enfermedades como cáncer, diabetes, obesidad e hipertensión. Hay evidencia de la regulación génica mediada por microRNAs (miRNAs) en respuesta al consumo de los polifenoles. El presente estudio investigó el efecto de la EGCG sobre la expresión de miRNAs, entre ellos los descritos como antiinflamatorios (miR10a, miR98, miR146a y miR181b) en cultivos primarios de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVECs), aportando evidencias de su participación potencial con dosis cercanas a las encontradas en el torrente sanguíneo posterior a la ingestión del té verde, lo cual no había sido descrito hasta el momento. La determinación de los cambios en la expresión de los miRNAs se realizó mediante un abordaje con microarreglos para miRNAs, cuyo resultado fue validado por qPCR.

Se encontró que la EGCG tuvo un efecto en el perfil de expresión de miRNAs en HUVECs a una dosis única de 0.1 μM por 2 horas. El hsa-miR-10a-5p, presentó un incremento estadísticamente significativo ($P= 0.02$) en su nivel de expresión. Los análisis de los genes blanco de los miRNAs diferencialmente expresados mostraron la participación de la EGCG sobre la regulación de biofunciones como el desarrollo y función del sistema cardiovascular y del sistema hematológico, la enfermedad inflamatoria, el crecimiento y la proliferación celular, y en procesos como la vasculogénesis, la activación de células endoteliales microvasculares, la proliferación y migración de células endoteliales. Uno de los reguladores más importantes de la estabilidad de células endoteliales vasculares es el gen FoxO1, el cual puede modular la expresión de genes involucrados con la desestabilización de vasos sanguíneos, la remodelación de la matriz en la vasculatura, la migración en células endoteliales y la formación del tubo vascular. Hasta el momento, este es el primer

trabajo que ha reportado los cambios en la expresión de miRNAs en HUVECs, en respuesta a la estimulación con dosis (0.1 μ M) de EGCG y tiempos de exposición (de 1-2 horas) reportados en plasma humano posterior al consumo de té verde.

ABSTRACT

Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) is the most abundant type of polyphenol in *Camellia sinensis* (Green Tea) and is known to induce apoptosis in cancer cells, decreases glucose and triglyceride concentrations in peripheral blood, as well as decreases blood pressure arterial, so, its consumption has been considered beneficial for diseases such as cancer, diabetes, obesity and hypertension. There is evidence of gene regulation mediated by microRNAs (miRNAs) in response to the consumption of polyphenols. The present study investigated the effect of EGCG on the expression of miRNAs, including those described as anti-inflammatory (miR10a, miR98, miR146a and miR181b) in primary cultures of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), providing evidence of their potential participation with doses physiologically achievable after the ingestion of green tea, which had not been described so far. The study of the changes in the expression of the miRNAs was carried out by means of a microarray approach for miRNAs, the result of which was validated by qPCR.

We found that EGCG had an effect on the expression profile of miRNAs in HUVECs at a single dose of 0.1 μ M for 2 hours. The hsa-miR-10a-5p showed a statistically significant increase ($P= 0.02$) in its level of expression. The analysis of the target genes of the differentially expressed miRNAs showed the participation of EGCG in the regulation of biofunctions such as the development and function of the cardiovascular system and the hematological system, inflammatory disease, cell growth and proliferation; and in processes such as vasculogenesis, the activation of microvascular endothelial cells, the proliferation and migration of endothelial cells. One of the most important regulators of vascular endothelial cell stability is the FoxO1 gene, which can modulate the expression of genes involved with the destabilization of

blood vessels, the remodeling of the matrix in the vasculature, the migration in endothelial cells and the formation of the vascular tube. So far, this is the first work that has reported changes in the expression of miRNAs in HUVECs, in response to stimulation with doses (0.1 μ M) of EGCG and exposure times (of 1-2 hours) reported in human plasma after the consumption of green tea.

	Pág.
RESÚMEN	VIII
ABSTRACT	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
ÍNDICE DE TABLAS	XIV
ABREVIATURAS	XV
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 MARCO TEÓRICO	1
1.1.1 Polifenoles	2
1.1.1.1 Flavanoles	3
1.1.1.2 Química de la EGCG	5
1.1.1.3 Parámetros farmacocinéticos de los polifenoles del té verde	6
1.1.2 MicroRNAs	7
1.1.3 Endotelio	8
1.1.3.1 Origen y plasticidad de células endoteliales	8
1.1.3.2 Función de las células endoteliales	9
1.2 ANTECEDENTES	13
1.2.1 miRNAs regulados por EGCG	13
1.2.2 miRNAs anti-inflamatorios	15
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
2.1 JUSTIFICACIÓN	17
2.2 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	18

III. HIPÓTESIS	18
IV. OBJETIVOS	19
4.1 OBJETIVO GENERAL	19
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	19
V. MATERIAL Y MÉTODO	20
5.1 CULTIVO PRIMARIO DE HUVECs	20
5.2 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL	22
5.3 TRANSCRIPCIÓN REVERSA DE miRNAs A PARTIR DE RNA TOTAL	23
5.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL	23
5.4.1 Análisis de expresión de miRNAs por qPCR	24
5.5 MICROARREGLOS	25
VI. RESULTADOS	26
6.1 ANÁLISIS DE LOS MICROARREGLOS PARA miRNA 4.0	26
6.1.1 Preprocesamiento	31
6.1.2 Inferencia de genes diferencialmente expresados	32
6.1.3 Análisis de las redes de genes blanco de miRNAs diferencialmente expresados en respuesta a 0.1 μ M EGCG por 2 horas en HUVECs	39
VII. DISCUSIÓN	42
VIII. CONCLUSIONES	47
IX. PERSPECTIVAS	48
X. BIBLIOGRAFÍA	49

NÚMERO	NOMBRE DE LA FIGURA	PÁGINA
Figura 1	Estructura de las catequinas del té verde.	5
Figura 2	Impacto de la EGCG sobre la expresión de miRNA.	16
Figura 3	Distribución de las intensidades de las sondas sin normalizar.	27
Figura 4	Mapa de Calor de la correlación entre los arreglos de datos sin normalizar.	28
Figura 5	Gráfica MA de datos sin normalizar y normalizados.	29
Figura 6	Distribución de las intensidades de las sondas normalizadas.	31
Figura 7	Gráfica de volcán.	33
Figura 8	Mapa de calor de la expresión de miRNAs.	34
Figura 9	Expresión relativa de hsa-miR-7152 en HUVECs.	35
Figura 10	Expresión relativa de hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-98-5p y hsa-miR-146a-5p en HUVECs.	36
Figura 11	Interacción de genes blanco de miRNAs diferencialmente expresados en respuesta a 0.1 μ M de EGCG por 2 horas en HUVECs.	40
Figura 12	Vías funcionales asociadas a las interacciones de genes blanco de miRNAs diferencialmente expresados en respuesta a 0.1 μ M de EGCG por 2 horas en HUVECs.	41

TABLAS

NÚMERO	NOMBRE DE LA TABLA	PÁGINA
Tabla 1	Prueba de t para dos muestras relacionadas (control vs. tratado con 0.1 μ M de EGCG por 2 horas).	37
Tabla 2	Análisis de la expresión de miRNAs por qPCR.	38
Tabla 3	Enfermedades y/o biofunciones de genes blanco de los miRNAs diferencialmente expresados.	39
Tabla 4	Principales redes de genes blanco de los miRNAs diferencialmente expresados.	39

SIGLAS	SIGNIFICADO
3'UTR	Región no traducida 3'
ADP	Adenosín-difosfato
AMP	Adenosín-monofosfato
CHUK	Cinasa ubicua hélice-asa-hélice conservada
dsRNA	RNA de doble cadena
EC	Epicatequina
EGC	Epigalocatequina
EGCG	Epigalocatequina-3-galato
eNOS	Sintasa del óxido nítrico endotelial
FDR	False discovery rate
FoxO1	Factor de transcripción de la subfamilia O de forkhead 1
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HUVECs	Células endoteliales de vena umbilical humana
ICAM-1 y 2	Moléculas de adhesión celular intramolecular 1 y 2
IKK- γ	Inhibidor de la subunidad gamma de la cinasa del factor nuclear kappa-E
IL-6R	Receptor de interleucina 6
IPA	Software Ingenuity Pathway Analysis
IRAK	Cinasa asociada al receptor de interleucina 1
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LFA-1	Antígeno 1 asociado a función de leucocitos
LPS	Lipopolisacáridos
miRNAs	microRNAs
MK2	Proteína cinasa 2 activada por la proteína cinasa activada por mitógeno
NF- κ B	Factor Nuclear Kappa B

NOS	Sintasa del óxido nítrico
PAF	Factor activador de plaquetas
PAI-I	Inhibidor del activador del plasminógeno tipo I
pPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
Pre-miRNA	microRNA precursor
Pri-miRNA	microRNA primario
RNA	Ácido desoxirribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SFB	Suero fetal bovino
sSMCs	Células endoteliales co-cultivadas con células de músculo liso
TNF	Factor de necrosis tumoral
t-PA	Activador tisular del plasminógeno
VCAM	Moléculas de adhesión celular vascular
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VEGFR-2	Receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular
VLA-4	Antígeno 4 muy tardío
vWF	Factor von Willebrand

EFEECTO DE LA EPIGALOCATEQUINA-3-GALATO DEL TÉ VERDE (*Camellia sinensis*) SOBRE LA EXPRESIÓN DE miRNAs”

I. INTRODUCCIÓN

1.1 MARCO TEÓRICO

Camellia sinensis es una planta originaria del Norte de la India y Sudoeste de China; sus hojas son utilizadas para preparar té. La mayoría de los tés comúnmente consumidos en el mundo son: el té blanco, el té verde, el té oolong y el té negro, que se preparan con hojas de té inmaduras, no oxidadas, semi-oxidadas y totalmente oxidadas, respectivamente (<http://noarfoundation.org/tea.cfm>). Se sabe que los componentes polifenólicos característicos en el té verde son las catequinas, las cuales incluyen a: Epigallocatequina (EGC), Epigallocatequina-3-galato (EGCG), Epicatequina (EC) y Epicatequina-3-galato (ECG) (Yang *et al.*, 2018).

El té verde es una de bebidas terapéuticas más popularmente consumidas en el mundo. Existe un creciente número de reportes que sugieren que el consumo moderado del té verde puede ser auxiliar para evitar algunas formas de cáncer, infecciones bacterianas y enfermedades cardiovasculares, por ejemplo, la aterosclerosis. Los efectos positivos para la salud humana han sido atribuidos a la presencia de flavanoles dentro de los cuales se encuentra la EGCG (Nagle *et al.*, 2006).

La disfunción endotelial y la inflamación son esenciales para la iniciación y progresión de aterosclerosis (Libby *et al.*, 2002). El endotelio es una monocapa celular conformada por células endoteliales que recubre el interior de los vasos sanguíneos y permite el intercambio gaseoso, de nutrientes y de desechos. La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica de la pared arterial. Las

lesiones ateroscleróticas son más abundantes y severas en regiones de bajo estrés por roce “shear stress”, un factor de riesgo importante para la aterosclerosis (Vander Laan *et al.*, 2004). Se han identificado varios miRNAs como reguladores de las células endoteliales, células de músculo liso vascular, y funciones de macrófagos, estando así involucrados en el desarrollo y la progresión de aterosclerosis (Sun *et al.*, 2013). Además, los miRNAs han emergido como potentes agentes terapéuticos contra la aterosclerosis. En células endoteliales, miR-146a y miR-181b producen efectos antiinflamatorios suprimiendo la vía del Factor Nuclear Kappa-B (NF-kB) (Sun *et al.*, 2012; 2014; Li, K., *et al.*, 2015).

Estudios epidemiológicos sustentan el potencial papel de algunos flavonoides en la reducción del riesgo cardiovascular. Los flavonoides tienen propiedades preventivas contra la disfunción endotelial al evitar la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Warnakulasuriya *et al.*, 2014), la adhesión y agregación de plaquetas (Wu *et al.*, 2014) y la migración y proliferación de células de músculo liso. (Ahmad *et al.*, 2013). Además, de acuerdo a datos recientes que evaluaron la asociación entre el consumo de flavonoides incluidos en la dieta y el riesgo cardiovascular por medio de análisis de estudios prospectivos de cohorte, se ha reportado que la ingesta de EGCG fue inversamente asociado con el riesgo de enfermedad cardiovascular (riesgo relativo: 0.87; 95% intervalo de confianza: 0.80, 0.95), (Wang *et al.*, 2014).

1.1.1 Polifenoles

Los polifenoles representan un grupo importante de fitoquímicos encontrados en las plantas de los cuales, se han descrito más de 8000 componentes polifenólicos. Los polifenoles se clasifican de acuerdo con el número de anillos fenólicos, adicionalmente, también se agrupan en cuatro categorías: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos. Los flavonoides representan el 60% de los polifenoles de la dieta y a su vez se subdividen en siete grupos: flavones, flavanones,

isoflavones, flavanoles, antocianinas, calcones y flavonoles (Pandey, K.B., *et al.*, 2009).

1.1.1.1 Flavanoles

Los flavanoles son una clase de flavonoides que incluyen monómeros y oligómeros, conocidos como proantocianidinas, una forma de catequinas, comúnmente presentes en el té verde, cacao y diferentes frutas. Las principales catequinas encontradas en el té verde (*Camellia sinensis*) son (-)-Epigalocatequina-3-galato, (-)-Epicatequina-3-galato, (-)-Epigalocatequina, y (-)-Epicatequina (**Figura 1**). Las catequinas son flavalones polifenólicos ampliamente encontrados en las plantas vasculares y potencialmente benéficos para la salud humana. Su estructura básica es un esqueleto de difenilpropano, con un anillo de benceno (A) similar a una fracción de resorcinol, un anillo aromático (B) en relación con un residuo de catecol y un anillo que es una unidad heterocíclica dihidropirano con un grupo hidroxilo en el carbono 3. Las catequinas contienen dos átomos de carbono asimétricos, el C-2 y el C-3, generando cuatro diastereoisómeros. Dos de los isómeros están en una configuración *trans* y son llamados catequinas y los otros dos están en la configuración *cis* y son llamados Epicatequinas. (+)-Catequina y la (-)-Epicatequina se encuentran en las frutas, sin embargo, el chocolate oscuro contiene los más altos niveles de catequina (459,8 a 610,0 mg / kg) (Arts. *et al.*, 2000). Las catequinas, también están presentes como conjugados con ácido gálico, y son llamadas, (+)-Galocatequina, (-)-Epigalocatequina, (-)-Epicatequina galato, y (-)-Epigalocatequina-3-galato. Estos compuestos son limitados a unos pocos productos.

La EGCG es un polifenol que representa el 50-80% de estas moléculas por taza de té verde preparado, lo que equivale a 200-300 mg de EGCG (Khanet *et al.*, 2006). Diversos autores sugieren que la EGCG confiere efectos benéficos para la salud, debido a que se ha visto que podría contribuir a aminorar las manifestaciones de enfermedades como la diabetes, por disminuir los niveles de glucosa en sangre;

hipertensión, al disminuir la presión arterial; obesidad, al disminuir los niveles de triglicéridos en sangre y se ha reportado su actividad antioxidante (Khan *et al.*, 2006; Higdon y Frei, B. 2003; Shankar *et al.*, 2008). También, se ha propuesto que la EGCG suprime los procesos inflamatorios que conducen a la transformación, la hiperproliferación, y el inicio de carcinogénesis (Wu *et al.*, 2014).

El análisis de diferentes catequinas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), confirmó que el té verde es una fuente más rica en polifenoles que el té blanco. Las concentraciones de todas las catequinas investigadas (EGC, EGCG, GCG, ECG) fueron significativamente más altas en las hojas de té verde que en las de té blanco, (Rusak *et al.*, 2008).

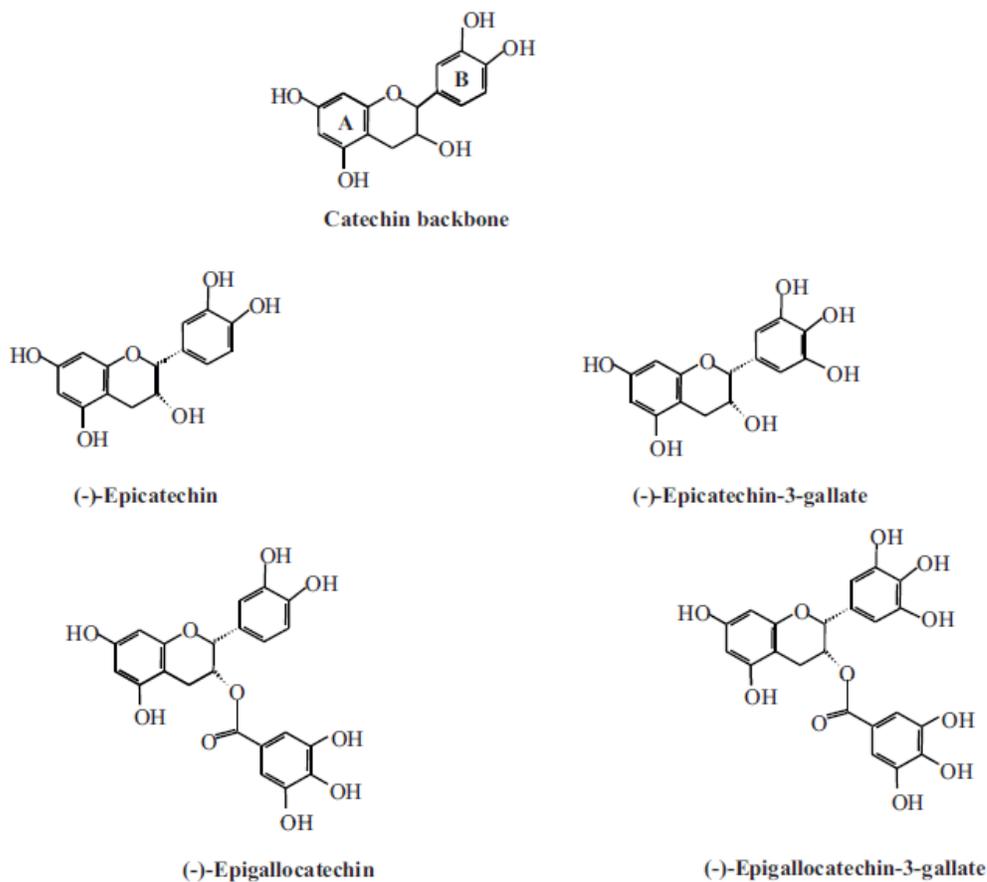


Figura 1. Estructura de las catequinas del té verde. (Tomada de Singh, *et al.*, 2011).

1.1.1.2 Química de la EGCG

La EGCG, es la catequina mayoritaria en el té verde, encontrándose en concentraciones en el rango de 9 a 13% (Marchese *et al.*, 2014). Muchas investigaciones sugieren que la EGCG es la responsable de la mayoría de los potenciales beneficios a la salud atribuidos al consume de té verde, entre los cuales se incluyen los efectos antioxidantes, quimio-prevención al cáncer, mejora en la salud cardiovascular, potencia la pérdida de (Nagle *et al.*, 2006). La presencia de grupos fenólicos que son sensibles a la oxidación y que pueden generar quinona en

la estructura de EGCG son responsables de sus propiedades antioxidantes y los potenciales de barrido de radicales libres. La actividad antioxidante se incrementa aún más por la presencia de la estructura tri-hidroxilo en el anillo D; en varios estudios *in vitro* se ha encontrado que la EGCG que tiene la mayor actividad antioxidante en comparación con otras catequinas (Higdon *et al.* 2003).

1.1.1.3 Parámetros farmacocinéticos de los polifenoles del té verde

Los parámetros farmacocinéticos de los polifenoles del té verde, como la EGCG en particular, han sido bien estudiados en roedores (Lee *et al.*, 2002). La transformación metabólica de las catequinas en el ser humano es bien conocida, sin embargo, se sabe poco sobre los efectos biológicos de los metabolitos de las catequinas. Varios estudios concluyen que existen posibles propiedades antioxidantes tanto de EGCG y sus metabolitos. Por ejemplo, se ha encontrado que los derivados de O-metilado de (-)-Epicatequina son capaces de inhibir la formación de nitrotirosina mediada por peroxinitrito (Natsume *et al.*, 2008). Adicionalmente, en fibroblastos de piel humana, se ha demostrado que la 31-O-metil-epicatequina previene el daño oxidativo inducido por UVA a través de un aumento de la actividad HO-1 (Basu-Modak *et al.*, 2003). También, se ha encontrado que las células endoteliales de vena umbilical tienen la capacidad de convertir (-)-Epicatequina en derivados de metilo, que inhibe la actividad de NADPH oxidasa (Steffen *et al.*, 2008).

Estudios farmacocinéticos en humanos, mostraron que el pico de concentración plasmática de EGCG se presenta en las primeras dos horas posteriores a la ingestión, reduciendo su concentración a niveles no detectables en las siguientes 24 horas. El pico de la concentración en plasma de EGCG fue de 77.9 ± 22.2 ng/mL tras la administración vía oral de 20 mg de té sólido por Kg del sujeto de estudio que corresponden aproximadamente a: 195 mg de EGCG, 154 mg de EGC y 45 mg de EC para un individuo de 70 Kg. La concentración de EGCG en plasma, fue obtenida por HPLC acoplado a un detector electroquímico. Cuando la EGCG fue administrada

pura, sólo el 0.1% de la dosis ingerida aparece en la sangre. Además, después de tomar lo equivalente a 2 tazas con té, el pico promedio de la concentración de EGCG en plasma fue de 0.17 μM , (Lee, *et al.*, 2002). Estos valores pueden servir como un punto de referencia para el diseño de experimentos *in vitro* que permitan conocer los mecanismos de acción de la EGCG. La mayoría de los estudios en cultivos celulares utilizan entre 10-100 μM de EGCG (Yang, *et al.*, 2002). Es necesario considerar la baja biodisponibilidad de las catequinas del té cuando se realizan experimentos *in vitro* (cultivo celular) para explorar situaciones *in vivo* dado que la mayor parte del EGCG ingerida aparentemente no entra en la sangre, y la EGCG absorbida es preferentemente excretada a través de la bilis hasta el colon (Chen, *et al.*, 1997).

1.1.2 MicroRNAs

Los microRNAs (miRNAs) son un grupo de RNAs pequeños que pertenecen a la familia de los RNAs no codificantes (Slavin *et al.*, 2012). Los miRNAs maduros, tienen un tamaño aproximado de 21-25 nt de longitud, se derivan a partir de un precursor más grande de aproximadamente ~60-70 nt de longitud, que se doblan en una estructura de tallo-bucle imperfecta. En animales, estos miRNAs precursores (pre-miRNAs) pueden generarse de la escisión del miRNA primario (pri-miRNA) transcrito por un complejo multiproteico compuesto por la RNasa III Drosha (Pérez-Jiménez *et al.*, 2011) y Pasha, una proteína de unión a RNA de doble cadena (dsRNA), (Cassidy, *et al.*, 2011; Clifford, *et al.*, 2006).

Después de la escisión, los genes de los miRNAs precursores son transportados al citoplasma por una proteína transportadora llamada exportina 5 (Manach *et al.*, 2005; Peterson *et al.*, 2012). Posteriormente, los precursores del miRNA se escinden en una dsRNA dúplex imperfecta por otra endonucleasa RNasa III, Dicer (Pérez-Jiménez *et al.*, 2011; Mink *et al.*, 2007). Este dúplex se compone de la hebra de miRNA maduro y una cadena complementaria.

El modo de acción de los genes miRNAs maduros en los sistemas de mamíferos es dependiente del apareamiento de bases complementarias a la región 3' no traducida (3'-UTR) del mRNA blanco, causando posteriormente la inhibición de la traducción y/o la degradación del mRNA.

Se sabe que los miRNAs se expresan de manera tejido-específico y controlan un amplio espectro de procesos biológicos que incluyen la proliferación, la apoptosis y la diferenciación celular. Los miRNAs son vitales para la fisiología de la célula, la expresión aberrante de éstos RNAs pequeños no codificantes ha sido relacionada con la carcinogénesis (Croce, *et al.*, 2005), entre otras enfermedades.

1.1.3 Endotelio

1.1.3.1 Origen y plasticidad de células endoteliales

El endotelio es una monocapa celular, conformada por células endoteliales, que recubre el interior de los vasos sanguíneos y permite el intercambio gaseoso, de nutrientes y desechos. La disfunción endotelial y la inflamación son esenciales para la iniciación y progresión de aterosclerosis (Libby *et al.*, 2002). Las lesiones ateroscleróticas son más abundantes y severas en regiones de bajo estrés por roce “shear stress”, un factor de riesgo importante para la aterosclerosis (Vander Laan *et al.*, 2004).

El endotelio tiene un papel crucial en la regulación de la homeostasis, el mantenimiento de las propiedades fisiológicas de vasodilatación, antiinflamatorias, antitrombóticas y antiproliferativas: las cuales pueden reducir el riesgo cardiovascular (Vita, *et al.*, 2002 y Widlansky, *et al.*, 2003). La mayoría de los estudios epidemiológicos demuestran un beneficio con respecto al riesgo cardiovascular con la ingesta de té y otras bebidas que contienen flavonoides (Hertog, *et al.*, 1993; Higdon, *et al.*, 2003; Peters, *et al.*, 2001 y Vita, *et al.*, 2003).

Las células endoteliales y las células hematopoyéticas surgen de la misma célula precursora, el hemangioblasto (Choi, *et al.*, 1998). Se piensa que el desarrollo de células precursoras surge de la planta ventral de la aorta dorsal dentro de la región aorto-gónada-mesonefros (Marshall, *et al.*, 1999). El esplacnopleurimesodermo se transforma en células mesenquimales que se diferencian en el hemangioblasto. El hemangioblasto se transforma en una célula pre-endotelial que a continuación se diferencia ya sea una línea celular de células hematopoyéticas o en una célula endotelial. Se ha demostrado que las células endoteliales también se transdiferencian en células mesenquimales y células de la íntima del músculo liso (Arciniegas, *et al.*, 2000). Es importante destacar que también hay variación fenotípica entre las células endoteliales en diferentes porciones del árbol vascular y entre células arteriales y venosas, de tal forma que las células de diferentes lugares dentro de un individuo no sólo expresan diferentes marcadores, sino también pueden generar respuestas diferentes a un mismo estímulo (Gallagher, *et al.*, 1997).

1.1.3.2 Función de las células endoteliales

La estructura de la célula endotelial y la integridad funcional son importantes en el mantenimiento de la pared del vaso y la función circulatoria. Como barrera, el endotelio es semi-permeable y controla la transferencia de moléculas pequeñas y grandes. Sin embargo, las células endoteliales son dinámicas y son capaces de llevar a cabo una variedad de funciones metabólicas y sintéticas. Estas células ejercen importantes acciones paracrinas y endocrinas a través de su influencia sobre las células de músculo liso subyacentes o en elementos de la sangre, tales como plaquetas y células blancas.

En condiciones basales, las células endoteliales están íntimamente involucradas en el mantenimiento de la interfase no trombogénica sangre-tejido mediante la regulación de la trombosis, la trombolisis, la adhesión de las plaquetas, el tono vascular y el flujo sanguíneo. Las células endoteliales producen y liberan una

variedad de sustancias vasoactivas, como la prostaciclina y el óxido nítrico, los cuales inhiben la agregación plaquetaria y causan la vasodilatación. Estos mediadores se liberan en respuesta a una serie de estímulos químicos, tales como trombina, bradicinina, o adenosín difosfato (ADP), así como cambios en las fuerzas hemodinámicas, tales como alteraciones en la presión o flujo sanguíneo (Sumpio, *et al.*, 1993). Las células endoteliales también pueden activarse por diversos estímulos, tales como, trombina o histamina, marcada por un interruptor en su perfil biosintético a partir de condiciones basales hacia un estado activado que es pro-trombótico, pro-proliferativa y vasoconstrictor. Las células endoteliales activadas sintetizan el factor activador de plaquetas (PAF), que actúa con P-selectina en la adhesión de las plaquetas y los neutrófilos al endotelio. El mecanismo implica la interacción de la glicoproteína de plaqueta IIb/IIIa con fibrinógeno y receptores de vitronectina endotelial (Barry, *et al.*, 1997). Una vez adheridas, las plaquetas potencian la adherencia de los neutrófilos al endotelio mediante la expresión de CD154 en las plaquetas activadas, que se une a CD40 en las células endoteliales. Esto induce la expresión de moléculas de adhesión de leucocitos y el factor de tejido en la superficie endotelial (Thienel, *et al.*, 2000). El factor tisular o tromboplastina es el receptor para el factor VII y es procoagulante. El factor tisular es inhibido por el factor tisular inhibidor de la vía, que es predominantemente sintetizado por las células endoteliales en condiciones basales, y constitutivamente unido a la superficie de las células endoteliales. Las células endoteliales también producen ectonucleotidasas, que son enzimas que desfosforilan ADP a AMP y luego a la adenosina, inhibiendo la agregación de plaquetas en condiciones basales (Marcus, *et al.*, 1997).

La superficie de la célula endotelial contiene heparina similar a receptores de glicosaminoglicanos, los sitios más importantes para la inactivación de la trombina por la unión de antitrombina, y trombomodulina. La trombomodulina se une a la trombina y preferentemente potencia su capacidad de escindir la proteína C circulante y no de fibrinógeno. La proteína C activada, inactiva los factores Va, VIII e inhibidor del activador plasminógeno tipo I (PAI-I). Las células endoteliales también

participan en la fibrinólisis mediante la producción del activador plasminógeno tisular (t-PA) (Chang, *et al.*, 1997).

Las células endoteliales son importantes en las reacciones inmunes e inflamatorias por regular el movimiento de linfocitos y leucocitos en los tejidos. Los linfocitos, a diferencia de plaquetas y leucocitos, pueden interactuar con las células endoteliales (principalmente en tejidos linfoides) bajo condiciones normales a través del receptor de L-selectina. Los linfocitos activados expresan las integrinas, tales como el antígeno 1 asociado a la función de leucocitos (LFA-1) o antígeno-4 muy tardío (VLA-4), que interactúan con las moléculas de adhesión de células endoteliales, con las moléculas de adhesión celular intramoleculares 1 y 2 (ICAM-1 y ICAM-2), y con las moléculas de adhesión celular vascular (VCAM). La ICAM-2 se expresa constitutivamente en las células endoteliales en reposo. Mientras que ICAM-1 y VCAM se expresan mínimamente en las células endoteliales en reposo, pero su expresión puede ser aumentada por citoquinas y la activación de lipopolisacáridos.

Los leucocitos polimorfonucleares se adhieren y atraviesan la pared del vaso sanguíneo en regiones de invasión bacteriana o daños en los tejidos. Las moléculas de adhesión de la L-selectina e integrina clase $\beta 2$, tales como LFA-1 y Mac-1, están involucradas en la adherencia transitoria de los leucocitos a las células endoteliales (Huo, *et al.*, 2000). Las células endoteliales activadas secretan PAF que sobre regulan a LFA-1 y Mac-1 en los leucocitos y expresan P-selectina y E-selectina. La trombina o la estimulación de la histamina induce selectivamente las células endoteliales P-selectina, mientras citoquinas y el lipopolisacárido (LPS) conduce a la expresión de E-selectina.

La inflamación es el resultado de los cambios hemodinámicos en el sitio de la lesión. Los vasos se dilatan, aumenta el flujo sanguíneo y los mediadores que actúan sobre el endotelio se liberan provocando la contracción de las células endoteliales y la fuga de suero y líquido intersticial en el sitio de la lesión. La adhesión de leucocitos se

promueve en el sitio de la lesión, inicialmente por la interacción con P-selectina. Los cuerpos de Weibel-Palade se fusionan con la membrana plasmática y se libera el factor von Willebrand (vWF) altamente polimerizado. Esto, junto con PAF, promueve la adhesión máxima de leucocitos a células endoteliales activas a trombina e histamina. Las células endoteliales activadas sintetizan interleucina-8, que estimula la quimiotaxis y la desgranulación de neutrófilos. La interleucina-8 también desregula la adhesión de neutrófilos y promueve la extravasación. Con el tiempo, la respuesta de leucocitos disminuye mientras que predomina la respuesta de los linfocitos.

Las células endoteliales también son importantes en la angiogénesis y vasculogénesis (Griedling, *et al.*, 1998). La vasculogénesis se produce exclusivamente en el embrión cuando los angioblastos se diferencian en islas de sangre y luego se fusionan para formar una red capilar primitiva. Cuando el corazón comienza a latir, se inicia la morfogénesis que da lugar a la diferenciación de ciertos segmentos en las arterias y las venas, vénulas post-capilares. Se cree que las fuerzas hemodinámicas y factores de crecimiento juegan un papel en el destino final del vaso. Múltiples investigadores han demostrado que las primeras fases de la vasculogénesis requieren del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y sus receptores específicos de células endoteliales, VEGFR2. Los estudios de genes *knock-out* muestran que este es letal para el embrión, ya que estos embriones presentan defectos en el proceso de vasculogénesis, lo cual es inviable para la vida.

Las angiopoyetinas no son esenciales para la vasculogénesis, pero actúan en la segunda fase del desarrollo embrionario, la angiogénesis. La angiogénesis, es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de endotelio preexistente, y también se ve afectada por VEGF.

La alteración de la función endotelial o disfunción endotelial puede jugar un papel importante en las enfermedades cardiovasculares. En la aterogénesis, las primeras alteraciones en la pared del vaso son la formación de estrías grasas y la adhesión de

los monocitos. Se requiere la participación activa del endotelio para la adhesión de monocitos y la migración al subendotelio. El endotelio oxida la LDL nativa y la acumulación de monocitos podría representar un intento de eliminar el LDL oxidado subendotelial. El avance de la lesión aterosclerótica puede ser el resultado del fracaso de los monocitos para limpiar de manera suficiente el LDL oxidado (Gerrity, *et al.*, 1981).

1.2 ANTECEDENTES

1.2.1 miRNAs regulados por EGCG

La expresión de miRNAs en condiciones patológicas esta frecuentemente desregulada, en cáncer, se ha descrito un nuevo repertorio de factores moleculares río arriba de la expresión génica, lo que garantiza una amplia investigación para aclarar aún más su papel exacto en la malignidad. Aunque todavía hay pocas pruebas, se ha postulado que la dieta también puede alterar la expresión génica mediante blancos a diversos oncogenes o miRNAs supresores de tumores. Una de las características interesantes de miRNAs es que, similar a la regulación de genes, su propia expresión puede ser regulada por metilación del DNA. La influencia de los miRNAs sobre la maquinaria epigenética y la regulación epigenética recíproca de la expresión de miRNAs sugiere que su expresión aberrante durante la carcinogénesis tiene una implicación importante para la regulación global del cáncer. Además, la interacción entre varios componentes de la maquinaria epigenética re-enfatiza la integración de mecanismos epigenéticos involucrados en el mantenimiento de los patrones de expresión génica global en mamíferos (Singh, *et al.*, 2011).

Interesantemente, el uso de microarreglos, los cuales contienen cebadores de todos los miRNAs conocidos, ha demostrado que el EGCG en 100 μ M puede modular la expresión de 61 miRNAs simultáneamente en células de carcinoma hepatocelular humanas (células HepG2) (Tsang *et al.*, 2010). El tratamiento de células HepG2 con

EGCG ha inhibido la expresión de miRNAs oncogénicos e induce el nivel de miRNAs supresores de tumores (**Figura2**, Singh, *et al.*, 2011).

En las líneas celulares de neuroblastoma maligno humano SK-N-BE2 y IMR-32, se ha demostrado que la exposición de las células a una concentración de 50 mM de EGCG durante 24 h, disminuye de la expresión de miRNAs oncogénicos (miR-92, miR-93 y miR-106b) y al mismo tiempo el aumento de expresión de miRNAs supresores de tumores (miR-7-1, miR-34a y miR-99a). (Chakrabarti *et al.*, 2012). En la línea celular de adenocarcinoma de pulmón de ratón CL13, la EGCG en 40 mM, aumentó de la expresión de miR-210 y disminuyó la proliferación celular, lo que sugiere que la modulación de la expresión de este miRNA podría contribuir a la actividad de este flavonoide contra el cáncer (Wang *et al.*, 2011).

De manera interesante, se ha observado la capacidad de EGCG para modular la expresión de miRNA en ratones. Los análisis de la expresión por PCR en tiempo real en ratones tratados por 6 semanas con EGCG mostraron que miR-21 decreció y que miR-330 fue sobre expresado (Siddiqui, *et al.*, 2011). No ha sido identificado aún, cómo son modulados los miRNAs por EGCG en estudios *in vitro*.

Por otro lado, la discrepancia de los resultados *in vitro* e *in vivo* podría explicarse por diferencias en las concentraciones usadas *in vivo* (en el rango de nano molar o micro molar) y en estudios *in vitro*, por otro lado, la EGCG puede ser metabolizada por las células epiteliales y hepáticas que dan lugar a moléculas conjugadas con efectos biológicos potencialmente diferentes, tales como el impacto sobre la expresión de los miRNAs. Los mecanismos por los cuales los polifenoles pueden estar regulando la transcripción, aún son desconocidos. Se ha descrito que los polifenoles como la curcumina, el resveratrol, el ácido elágico y los polifenoles del té negro, pueden regular la actividad de la proteína p53 y la expresión de c-myc (González-Sarrias *et al.*, 2009; George *et al.*, 2011; Shehzad *et al.*, 2013). Tomando esto en consideración, se podría sugerir que los polifenoles pueden modular la transcripción

de los miRNAs por afectar tanto estas proteínas de señalización celular, como otras que aún se desconocen. Recientemente se ha mostrado que la biogénesis de miRNA (desde pri-miRNA, maduración de miRNA y el decaimiento de miRNA) es regulada dentro de las células (Breving *et al.*, 2010); sin embargo, se desconoce el impacto de los polifenoles en esos procesos.

1.2.2 miRNAs antiinflamatorios

Recientemente se han identificado a los miRNAs: miR-146a, miR-181b, miR-98, miR-708 y miR-451 como nuevos miRNAs anti-inflamatorios en células endoteliales co-cultivadas con células de músculo liso (sSMCs); éstos miRNAs tienen acciones anti-inflamatorias por tener como blanco directo a los genes: cinasa asociada al receptor de interleucina-1 (IRAK), inhibidor de la subunidad gamma de la cinasa de Factor Nuclear Kappa-B (IKK- γ), receptor de interleucina 6 (IL-6R) y cinasa ubicua hélice-asa-hélice conservada (CHUK), respectivamente, para inhibir la señalización de NF-KB, el cual ejerce un control de retroalimentación sobre la biogénesis de éstos cuatro miRNAs, por lo que pueden servir como valiosos blancos moduladores para la intervención contra desórdenes vasculares que resultan de la aterosclerosis (Chen *et al.*, 2015). Y también, el miR-10a, miR-19a y miR-23b han sido identificados como atero-protectores (Kumar, *et al.*, 2014).

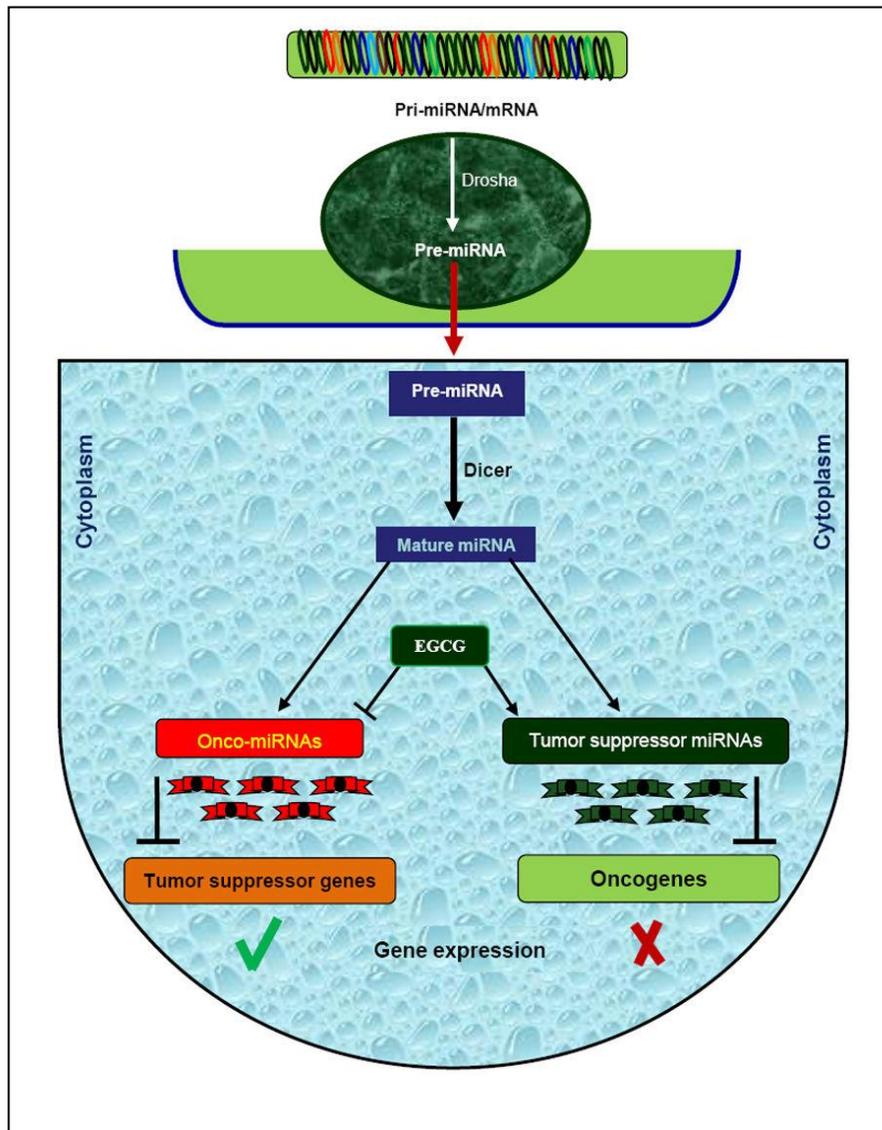


Figura 2. Impacto de la EGCG sobre la expresión de miRNA (Tomada de Singh, *et al.*, 2011). El pri-miRNA es procesado por Drosha, generando un pre-miRNA, el cual es transportado del núcleo celular al citoplasma por la Exportina 5. En el citoplasma, este pre-miRNA es procesado por Dicer, generando un miRNA maduro. El miRNA maduro es un onco-miRNA, va a reprimir a genes supresores de tumores y si es un miRNA supresor de tumor, va a regular negativamente a oncogenes. La EGCG puede mediar la expresión génica a nivel de la inhibición o activación de distintos miRNAs.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1 JUSTIFICACIÓN

La mayoría de los estudios epidemiológicos demuestran que la ingestión de té verde y otras bebidas que contienen flavonoides produce un beneficio con respecto al riesgo cardiovascular (Hertog, *et al.*, 1993; Higdon, *et al.*, 2003; Peters, *et al.*, 2001 y Vita, *et al.*, 2003). Conocer el efecto de la EGCG sobre la expresión de los miRNAs relevantes para la salud endotelial como son los miRNAs antiinflamatorios en células endoteliales, podría dilucidar su posible papel como blancos terapéuticos para la intervención contra desórdenes vasculares (Chen, *et al.*, 2015). En ese sentido, una de las vías de señalización más significativas es la de Akt la cual es activada por muchos factores de crecimiento angiogénicos (como el factor de crecimiento endotelial vascular), por estímulos mecánicos como son el estrés por fricción generada por el flujo sanguíneo (fluid shear stress) (Shiojima, *et al.*, 2002).

La vía de PI3K/Akt media diversas vías de señalización para la activación de la sintasa del óxido nítrico (NOS) (Fulton, *et al.*, 1999 y Dimmeler, *et al.*, 1999). Se ha visto que los efectos cardioprotectores de la EGCG, son parcialmente debidos a la activación de la sintasa del óxido nítrico endotelial (eNOS) por la acción de la fosforilación dependiente de PI3K/Akt en el endotelio vascular (Kim, *et al.*, 2007). También se ha visto que EGCG inhibe NFκB y la expresión del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF-α) (Shankar, *et al.*, 2008). TNF-α es una citoquina inducida por promotores tumorales que estimula la producción de moléculas de adhesión celular y la respuesta del proceso inflamatorio (Shankar, *et al.*, 2007). La aterosclerosis es una enfermedad altamente asociada a riesgo cardiovascular (Rosas-Peralta *et al.*, 2005).

La mayoría de los estudios *in vitro*, se han realizado en líneas celulares de cáncer, por lo cual, para estudiar el impacto de los polifenoles de la dieta sobre la expresión de los miRNAs, es recomendable el uso de cultivos primarios en lugar de líneas

celulares, metabolitos de polifenoles en circulación, y las concentraciones adecuadas fisiológicamente relevantes de estos compuestos (Milenkovic *et al.*, 2013). El conocimiento de estos mecanismos permitirá comprender el posible papel preventivo del consumo de EGCG en las enfermedades cardiovasculares.

2.2 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto de la exposición a una sola dosis de EGCG sobre la expresión de miRNAs en cultivo primario de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVECs)?

III. HIPÓTESIS

Si, en modelos *in vitro* la EGCG regula la expresión de algunos miRNAs asociados a la protección del endotelio vascular, entonces la exposición de células endoteliales a esta substancia en tiempos cortos y concentraciones cercanas a las reportadas en plasma (concentraciones fisiológicamente alcanzables) inducirá cambios en la expresión de miRNAs asociados a procesos antiinflamatorios.

IV. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto de la exposición a una dosis de EGCG del té verde sobre la expresión de miRNAs en cultivos primarios de HUVECs.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar la dosis de EGCG que genera una respuesta potencial en HUVECs mediante una curva dosis-respuesta.
- Determinar el efecto de la estimulación con 0.1 μ M de EGCG por 2 horas sobre la expresión global de miRNAs en HUVECs, mediante el uso de microarreglos de amplia cobertura.
- Validar la expresión de miRNAs que resultaron diferencialmente expresados en los microarreglos en respuesta a la estimulación con 0.1 μ M de EGCG por 2 horas, utilizando RT-PCR en tiempo real.
- Investigar el efecto de la exposición por dos horas a tres dosis de EGCG sobre la expresión de los miRNAs reportados como antiinflamatorios (hsa-miR-10a, hsa-miR-98, hsa-miR-181b y hsa-miR-146a-5p) en HUVECs mediante RT-PCR en tiempo real.

V. MATERIAL Y MÉTODO

5.1 CULTIVO PRIMARIO DE HUVECs

Con la finalidad de establecer en el laboratorio el cultivo primario de HUVECs, las células endoteliales fueron obtenidas de cordón umbilical humano de recién nacidos, de madres aparentemente sanas y con consentimiento informado firmado por las mismas.

El cordón fue colectado y transportado en medio M199 a temperatura ambiente hasta el laboratorio. El medio 199 en polvo (Gibco, Ref. 31100-027, lote 1814879) fue reconstituido con H₂O mili Q, agregando 2.2 g/L de NaHCO₃, 25 mM de HEPES, antibiótico y antimicótico 1X (Gibco 100X, penicilina/estreptomicina 100 µg/mL, Ref. 15240-062, Lote 1764223), ajustando el pH a 7.35. Posteriormente, en condiciones de esterilidad, el cordón fue lavado con PBS 1X para eliminar exceso de sangre, se colocó un adaptador en uno de los extremos del cordón, se pasó PBS 1X precalentado a 37°C a través del cordón para verificar que no estaba tapado con coágulos, luego se colocó el segundo adaptador en el extremo faltante y se pasó colagenasa 0.02% (Gibco Ref. 17101-015) preparada en PBS 1X (Gibco, PBS 10X, pH 7.2, sin Ca y sin Mg, Ref. 70013-032, Lote 1139904), llevando a 1X con H₂O destilada ultrapura, (Invitrogen, Ref. 10977-015, Lote 1584231, ajustando pH a 7.35), precalentada a 37°C (aproximadamente 1 mL/cm de longitud del cordón o hasta que estuviera completamente lleno) y se incubó por 20 min a 37 °C. Pasado el tiempo de incubación, se colectó la solución con colagenasa en un tubo de plástico cónico de 15 o 50 mL y las células endoteliales fueron recuperadas mediante centrifugación a temperatura ambiente (7 min a 400 g); posteriormente el pellet se resuspendió en 1 mL de medio 199 enriquecido que contiene: antibiótico/antimicótico 1X, suero fetal bovino (SFB) 20% inactivado por calor, suplemento de crecimiento de celular endotelial de pituitaria bovina 30 µg/MI (Sigma, E0760) y fueron sembradas en cajas *Petri* de 35 mm de diámetro con 4 mL totales de medio enriquecido. Se dejaron toda

la noche en la incubadora mantenidas a 37 °C en atmósfera húmeda y 5% CO₂. Al otro día se les cambió el medio para eliminar eritrocitos y dejar sólo a las HUVECs. Cuando llegaron a un 70% de confluencia, las células fueron despegadas incubando con tripsina 1X (Gibco 1X, 0.05% de EDTA, Ref. 25300-062, lote 1772640) precalentada a 37°C, durante 1.5 minutos a 37°C e inactivada con un volumen y medio, del usado de tripsina, de medio con antibiótico 1X y 10% SFB, posteriormente fueron sembradas en cajas *Petri* de 100 mm de diámetro, en medio de cultivo enriquecido. Las células fueron crecidas a confluencia en medio enriquecido, mantenidas a 37 °C en atmósfera húmeda y 5% CO₂). Se usaron de 3-6 pases en todos los experimentos, como sugiere Zhao *et al.*, 2011.

Posteriormente, para la obtención de la dosis de EGCG que genera una respuesta potencial en las HUVECs se realizaron curvas dosis-respuesta. Del cultivo primario obtenido, se sembraron entre 200 000 y 250 000 células/pozo en placas de 6 pozos en 2 mL de medio enriquecido, donde se mantuvieron hasta llegar a un 80% de confluencia. Llegado a este punto, se les cambió el medio enriquecido por 2 mL de medio de estimulación (medio 199 sin suplemento de crecimiento endotelial, con antibiótico y 10% de SFB), al día siguiente fueron estimuladas con diferentes dosis de EGCG (1.0, 0.32, 0.1, 0.032 y 0.01 µM de EGCG por 2 hrs).

La EGCG fue resuspendida un día antes de su uso, manteniéndola a 4°C cubierta de la luz, en medio 199 con antibiótico 1X, se realizaron diluciones seriadas a partir de un stock inicial: C1 (10 mM= 10,000µM), C2 (3200µM), C3 (1000µM), C4 (320µM), C5 (100µM), C6 (32µM), C7 (10 µM), C8 (3.2µM), C9 (1µM), C10 (0.32µM), C11 (0.1µM).

Se agregaron 200µL de las distintas diluciones, desde 10 µM (C7) hasta 0.1 µM (C11) disueltas en un volumen final de 2 mL de medio de estimulación por pozo, respectivamente.

Pasado el tiempo de estimulación, se retiró medio de estimulación a todos los pozos y se lavaron una vez con PBS 1X precalentado a 37°C; se usaron 500 µL de Trizol

por pozo, generando un homogenizado de las células que fue colectado en tubos de 1.5 mL y congelado a -80°C hasta el momento de la extracción de RNA total.

Las células que no fueron utilizadas para los experimentos de estimulación con EGCG sobrantes de los cultivos de expansión fueron congeladas en 1 mL de medio de congelación que contiene 50% SFB, 40% M199 con antibiótico 1X y 10% de DMSO. Con una densidad de 750,000-1, 250,000 células por criovial, y almacenados a -80°C .

5.2 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

Para determinar el efecto de la estimulación con $0.1\ \mu\text{M}$ de EGCG por 2 horas sobre la expresión global de miRNAs en células endoteliales humanas en cultivo, mediante el uso de microarreglos de amplia cobertura, se aisló el RNA total de las HUVECs usando $500\ \mu\text{L}$ de Trizol por cada pozo con células, las cuales fueron congeladas a -80°C . Se descongelaron en hielo y se agitaron por unos segundos con vórtex. Se agregaron $200\ \mu\text{L}$ de cloroformo frío por cada 1 mL de Trizol utilizado. Se agitó suavemente por inversión por 15 segundos. Se incubó 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 4°C por 15 minutos a 13,000 rpm. Una vez obtenida la separación de las fases, se recuperó en otro tubo la fase acuosa que es la que contiene al RNA y se le agregaron $500\ \mu\text{L}$ de isopropanol frío por cada 1 mL de Trizol utilizado inicialmente. Se incubó toda la noche a -20°C y al día siguiente se centrifugó a 4°C por 15 minutos a 13,000 rpm. Se removió el sobrenadante y se agregó 1 mL de etanol frío al 75% por cada 1 mL de Trizol utilizado, se agitó con vórtex para lavar el pellet y se volvió a centrifugar a 4°C por 10 minutos a 13,000 rpm. Se repitió el paso del lavado y centrifugado. Se retiró el sobrenadante y se dejó secar el pellet por 10 minutos. Se resuspendió el pellet en $20\ \mu\text{L}$ de agua libre de nucleasas. Finalmente, se cuantificó y se verificó la pureza de la extracción de cada RNA con el nanodrop. Se realizaron alícuotas de cada RNA y fueron almacenados a -80°C hasta su uso.

5.3 TRANSCRIPCIÓN REVERSA DE miRNAs A PARTIR DE RNA TOTAL

Una vez obtenido el RNA total, se realizó una transcripción reversa, específica para cada miRNA de interés, utilizando 50 ng de RNA total, 7 μ L RT-Mater Mix (0.15 μ L de mix dNTPs 100 mM con dTTP, 1 μ L de MultiScribe Reverse Transcriptase 50 U/ μ L, 1.5 μ L de Reverse Transcription Buffer 10X, 0.19 μ L de RNase Inhibitor 20 U/ μ L), 3 μ L de RT primer 5X (correspondiente al miRNA de interés) y se completó el volumen final a 15 μ L totales con H₂O libre de nucleasas. Las muestras fueron incubadas a 16 °C por 30 min, 42°C por 30 min, 85°C por 5 minutos y 4°C infinito (cuando la PCR no se realizó enseguida, las muestras fueron guardadas a -20°C hasta su uso). Posteriormente, el cDNA formado sirvió de templado para la cuantificación por qPCR en tiempo real que es llevada a cabo con una sonda TaqMan específica.

5.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL

Para determinar si la expresión de los miRNAs reportados como anti-inflamatorios (hsa-miR-10a-5p (Assay ID 000387), hsa-miR-98-5p (Assay ID 000577), hsa-miR-181b-5p (Assay ID 001098) y hsa-miR-146a-5p (Assay ID 000468)) responden al tratamiento de las HUVECs con 1.0, 0.1 y 0.01 μ M de EGCG expuestas por 2 horas y validar la expresión diferencial de miRNAs que resultaron diferencialmente expresados en los microarreglos en respuesta a la estimulación con 0.1 μ M de EGCG por 2 horas, se realizó el análisis de expresión de miRNAs por qPCR utilizando ensayos TaqMan marca Applied Biosystems para miRNAs. Cabe mencionar, que la transcripción reversa del sistema de TaqMan utiliza cebadores específicos con estructura de tallo y bucle complementarios a la secuencia del extremo 3' del miRNA; el bucle contiene una secuencia universal para unión al cebador. Este tipo de cebadores disminuyen la hibridación con los pri y pre-miRNAs, por lo tanto, incrementan la especificidad del ensayo.

La reacción de qPCR se realizó en un volumen final de 10 μ L totales, utilizando 0.5 μ L de sonda (TaqMan small RNA Assay 20X), 2.0 μ L de producto de la transcripción reversa (RT), 5 μ L de TaqMan Universal PCR master mix II 2X (no UNG) y 2.5 μ L de H₂O libre de nucleasas.

Las muestras fueron incubadas 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 60 segundos.

5.4.1 Análisis de expresión de miRNAs por qPCR

El método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ fue utilizado para el análisis de expresión relativa por qPCR, la fórmula para obtener el $\Delta\Delta Ct$ es la siguiente:

$$\Delta\Delta Ct = (CT \text{ miRNA} - CT \text{ RNU44})_{\text{grupo EGCG 2h}} - (CT \text{ miRNA} - CT \text{ RNU44})_{\text{grupo CONTROL}}$$

Una vez obtenido el valor de $\Delta\Delta Ct$, se realiza la potencia $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para obtener las veces de cambio (FC, por sus siglas en inglés Fold Change).

Posteriormente, para determinar la diferencia estadística entre las medias del grupo tratado vs. grupo control, se realizó una prueba T para muestras relacionadas utilizando el paquete estadístico SPSS v. 20.0 (**Tabla 1**).

5.5 MICROARREGLOS

El microarreglo de expresión GeneChip® miRNA 4.0 Array de la plataforma de Affymetrix tiene una cobertura total de las bases de datos miRBase versión 20 y snoRNA versión 3, mirTabase Release 4.5, MicroCosm Targets 11/2013; evalúa 203 organismos (incluyendo virus), 30,424 grupos de sondas para miRNA maduros totales, 9 grupos de sondas para miRNA maduros, 2,578 grupos de sondas para miRNAs maduros humanos y 1,908 grupos de sondas para miRNA maduros de ratón. Este microarreglo permite evaluar en humano: 1733 miRNA, 1658 pre-miRNA, 1674 small nucleolar RNA (snoRNA), 32 small cajal body-specific RNA (scaRNA) y 10 ribosomal RNA (rRNA). Este microarreglo fue utilizado para evaluar los cambios en la expresión de miRNAs de humano en HUVECs en respuesta al tratamiento con 0.1 uM de EGCG por 2 horas.

El análisis bioinformático de la expresión diferencial de miRNAs clasificó a los miRNAs por las veces de cambio (FC, por sus siglas en inglés); por consenso se considera significativo a partir de un FC= 2 con respecto al grupo control, sin embargo, dado que nuestros datos presentaron veces de cambio menores a 2, se decidió elegir los miRNAs con respecto al valor de *P*, considerando para el análisis todos aquellos con un valor de *P* menor o igual a 0.05, y se utilizó la información obtenida de la base de datos miRBASE 21 (<http://www.mirbase.org/>).

Los genes blanco-potenciales de los miRNAs de interés fueron identificados utilizando el software IPA® (Ingenuity® Pathway Analysis <https://www.qiagenbioinformatics.com/products/ingenuity-pathway-analysis/> y TargetScan 7.1 http://www.targetscan.org/vert_71/).

Los miRNAs diferencialmente expresados en el microarreglo (candidatos) son ingresados al software IPA, el cual busca los identificadores (IDs) de dichos miRNAs y elimina aquellos de los cuales no encontró el ID. El siguiente paso de astringencia,

es filtrar los mRNAs blanco, eliminando los blancos predichos y quedándose solamente con los blancos validados experimentalmente. Con el listado de blancos validados, se identificaron las interacciones directas de cada uno de ellos con otras moléculas para buscar en primera instancia las vías metabólicas y/o de señalización en las que estén directamente involucrados. Una vez hecho esto, busca cuáles son los reguladores río arriba de los principales genes de las rutas metabólicas encontradas. Finalmente, IPA emite un listado de las principales enfermedades donde están involucradas estas vías, de las primordiales funciones a nivel celular y molecular y, por último, de las redes de interacción génica dónde se encuentren involucrados los mRNAs blancos.

El análisis sistemático e integrativo del significado biológico del listado de genes blanco de los miRNAs que tuvieron una respuesta al tratamiento con ECGC se realizó utilizando los recursos bioinformáticos de DAVID (Huang DW, *et al.*, 2009. Nature Protocols 2009; 4(1):44 & Nucleic Acids Res. 2009;37 (1):1) e IPA.

VI. RESULTADOS

6.1 ANÁLISIS DE LOS MICROARREGLOS PARA miRNA 4.0

Los archivos .CEL de cada microarreglo fueron leídos con la librería Affy disponible en R bioconductor. Así mismo fue necesario construir la librería con la anotación de las sondas del microarreglo usando el archivo “miRNA-4_0-st-v1.cdf” disponible en el sitio en línea de Affymetrix.

6.1.1 Preprocesamiento

Las distribuciones de los valores de intensidad de las sondas sin normalizar fueron analizadas con los gráficos de cajas y las gráficas de densidad (**Figura 3 A y 3 B**, respectivamente).

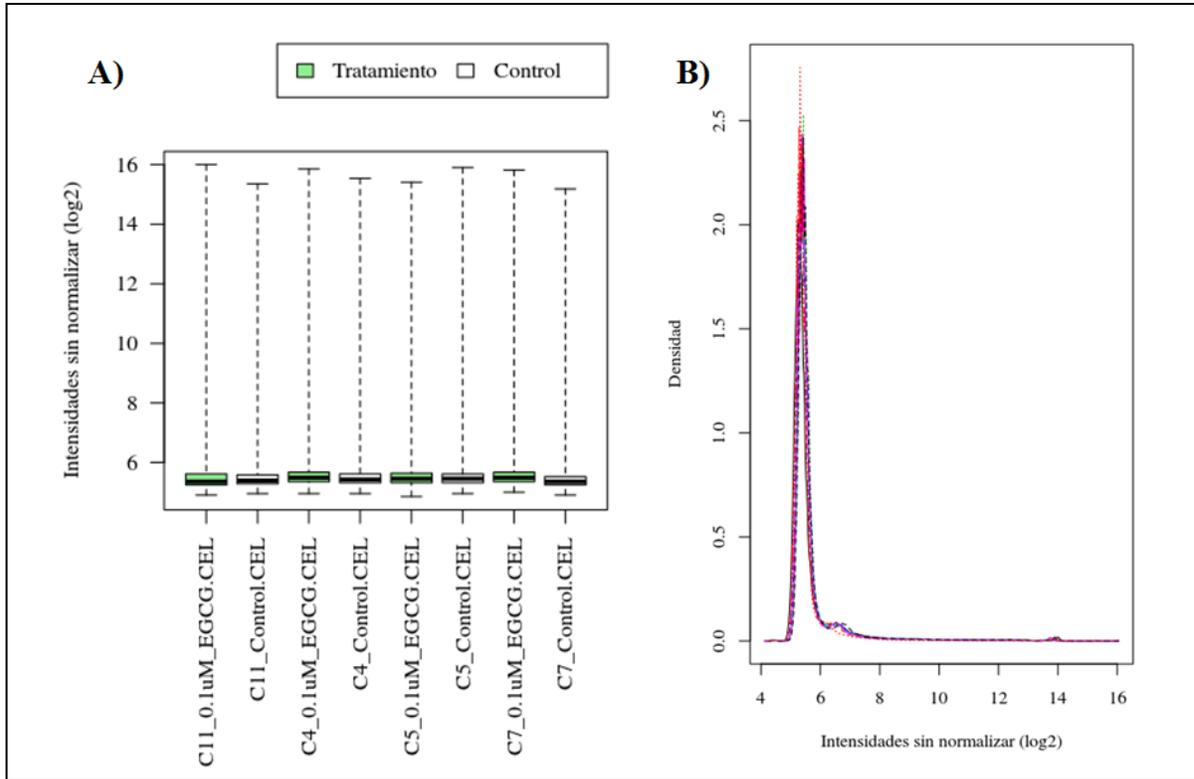


Figura 3. Distribución de las intensidades de las sondas sin normalizar. Los gráficos de cajas (**A**) y de densidad (**B**), representan la distribución de las intensidades en log2 de las sondas sin normalizar, para HUVECs tratadas con 0.1 μ M de EGCG por 2 horas (cajas verdes) y controles (cajas blancas).

Posteriormente se calculó la matriz de correlación entre todos los microarreglos con el método de Pearson. Con esta matriz se calculó la distancia euclidiana entre los arreglos y luego se agruparon con el algoritmo de agrupamiento jerárquico. Los resultados se visualizan en el mapa de calor (**Figura 4**). El microarreglo del cordón 7 en la condición control muestra los valores de correlación más bajos al compararse con los otros arreglos (rango de correlación: 0.84-0.91) y se agrupa de forma independiente en el dendograma obtenido (**Figura 4**).

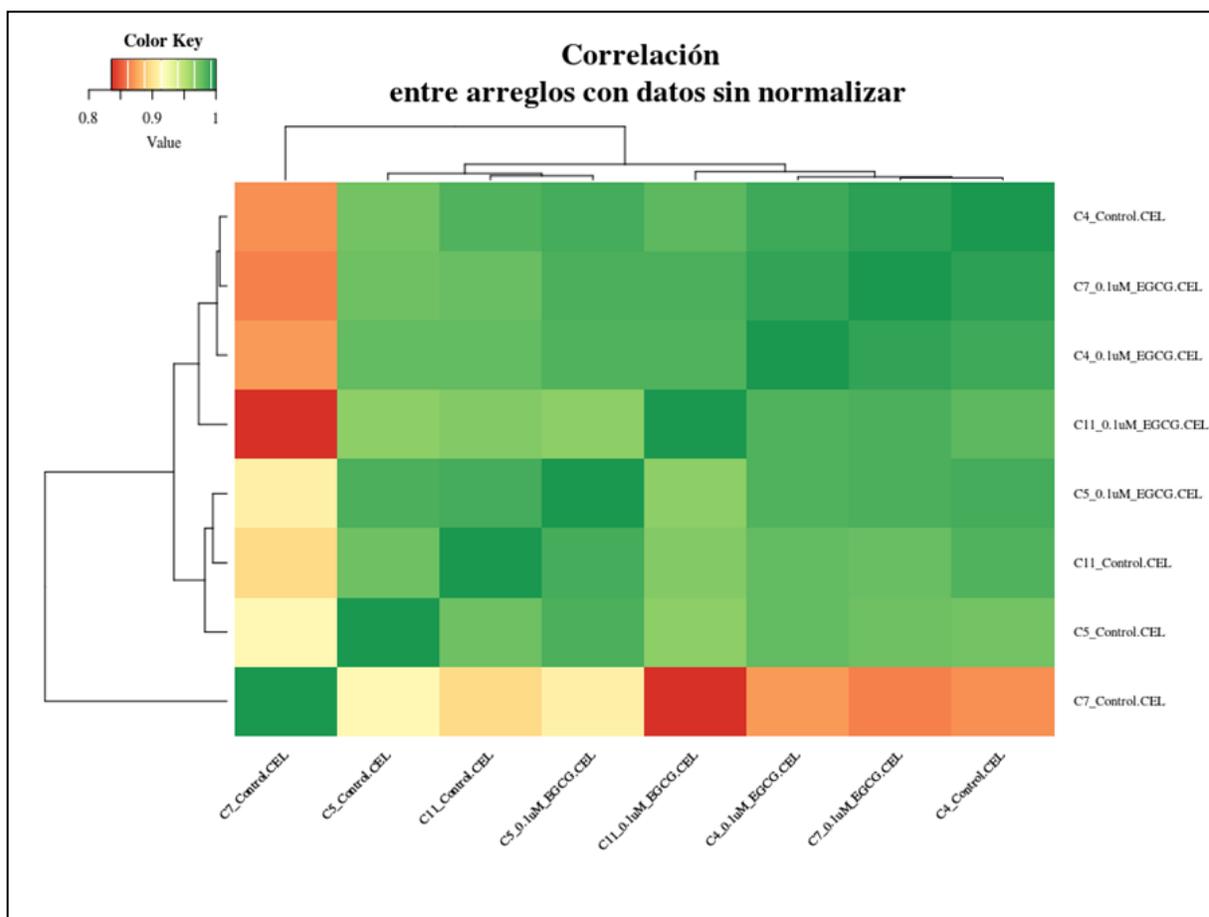


Figura 4. Mapa de Calor de la correlación entre los arreglos de datos sin normalizar. El color rojo se asocia con una baja correlación entre los pares de muestras comparadas con valores cercanos a 0.8, mientras que, el color verde se asocia con una elevada correlación con valores cercanos a 1.

Luego, se realizaron gráficos MA para comparar la intensidad de los arreglos por parejas y determinar si hay sesgos atípicos dependientes de la intensidad (**Figura 5**).

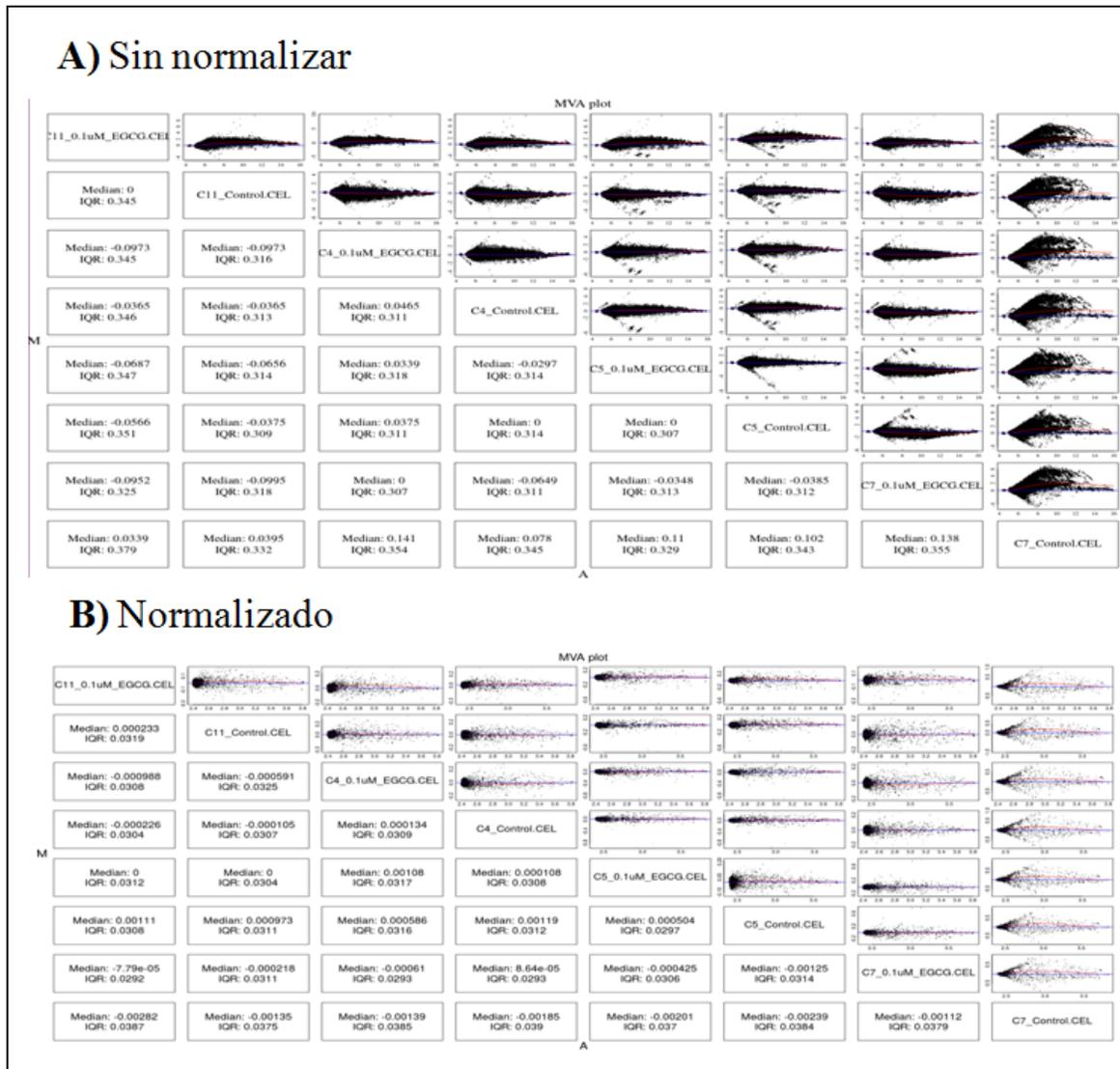


Figura 5. Gráfica MA de datos sin normalizar y normalizados. Este gráfico representa la comparación de la diferencia de las intensidades entre dos arreglos (eje Y= M) contra el promedio de las intensidades de dichos arreglos (eje X= A) sin normalizar (**A**) y normalizados (**B**). Puede observarse que el arreglo C7_Control presenta una relación no lineal aún después de la normalización (línea roja) al ser comparado con los otros arreglos.

Se espera que la normalización corrija los sesgos dependientes de la intensidad, por lo que realizar estos gráficos antes y después de la normalización permite verificar la eficacia de esta corrección. Los gráficos MA y las cajas de bigotes mostraron un comportamiento atípico del arreglo del cordón 7 en la condición control, por lo que se decidió correr el análisis con y sin esta muestra, siendo el análisis final sin dicha muestra.

El arreglo del cordón 7 correspondiente al grupo control fue eliminado debido a que el rango de intensidad era menor (**Figura 3A**) al del resto de los arreglos, presentando una baja correlación (**Figura 4**); por lo que al final nos quedamos con 7 muestras totales normalizadas (**Figura 6**), que corresponden a 4 muestras tratadas con 0.1 μM de EGCG por 2 horas y 3 muestras sin tratamiento (controles).

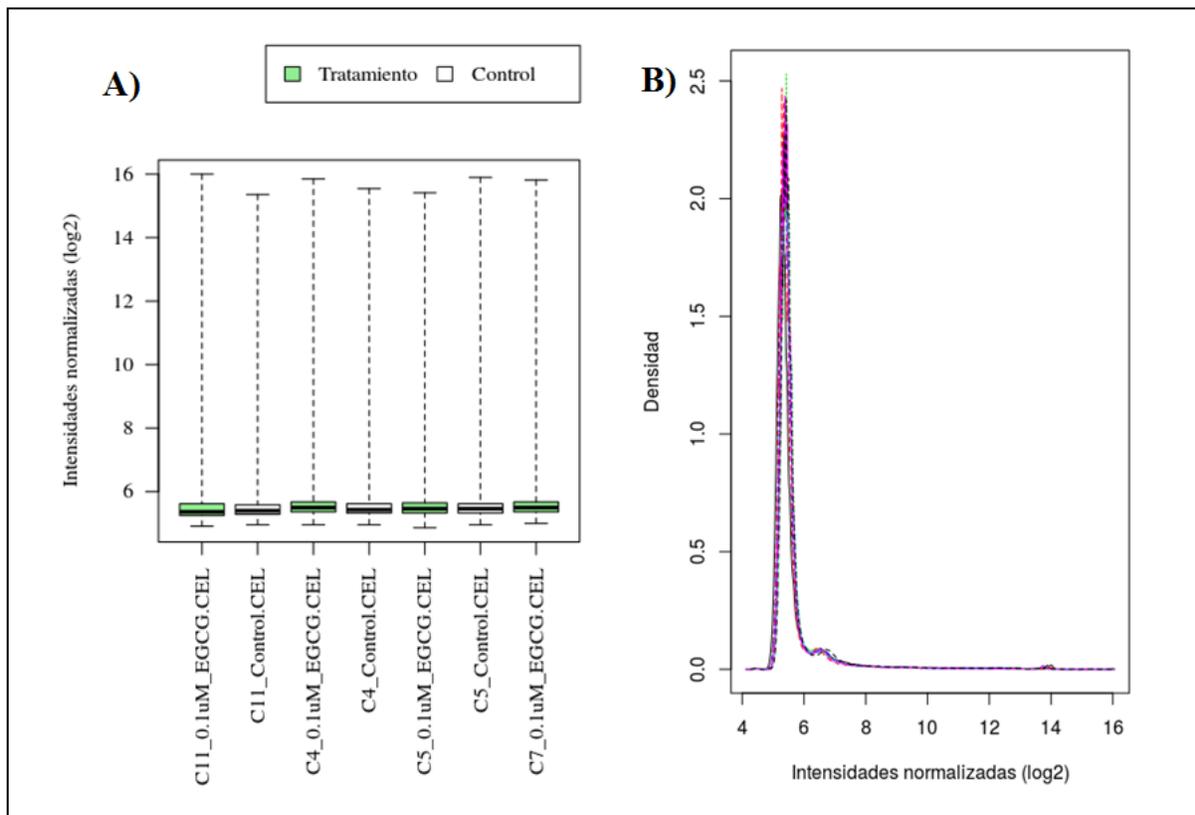


Figura 6. Distribución de las intensidades de las sondas normalizadas. Gráfico de cajas **(A)** y de densidad **(B)**, que representan la distribución de las intensidades en log₂ de las sondas normalizadas, para HUVECs tratadas con 0.1 μ M de EGCG por 2 horas (cajas verdes en A) y controles (cajas blancas en A).

La siguiente fase del procesamiento de los datos fue seleccionar las sondas con hibridación perfecta (PM por sus siglas en inglés), esto se hizo con el método pmonly ([Irizarry et al. 2003](#)) disponible en la función *expresso* de la librería Affy. Las distribuciones de intensidad de las sondas se normalizaron con el método de cuantiles para remover la variabilidad experimental entre microarreglos. Finalmente, las intensidades de las sondas correspondientes a cada gen fueron agrupadas y promediadas para obtener un valor de expresión único, utilizando el algoritmo median polish.

6.1.2 Inferencia de genes diferencialmente expresados

Para determinar si los niveles de expresión génica tienen cambios entre el grupo tratado *versus* el grupo control se calcularon los promedios de la intensidad de señal de cada gen para cada grupo en escala logarítmica base 2, y posteriormente se calcularon las veces de cambio de la expresión (FC) que resulta de la diferencia del promedio del grupo tratado menos el promedio del grupo control. La estimación de la significancia de la diferencia entre promedios se calculó con una prueba de T y la corrección por múltiples comparaciones se hizo con el método FDR (False Discovery Rate), con la finalidad de reducir la proporción de falsos positivos. Todas estas funciones están implementadas en la librería LIMMA ([Ritchie et al. 2015](#)). La representación de los miRNAs diferencialmente expresados se observa en la gráfica de volcán (**Figura 7**) y el mapa de calor (**Figura 8**).

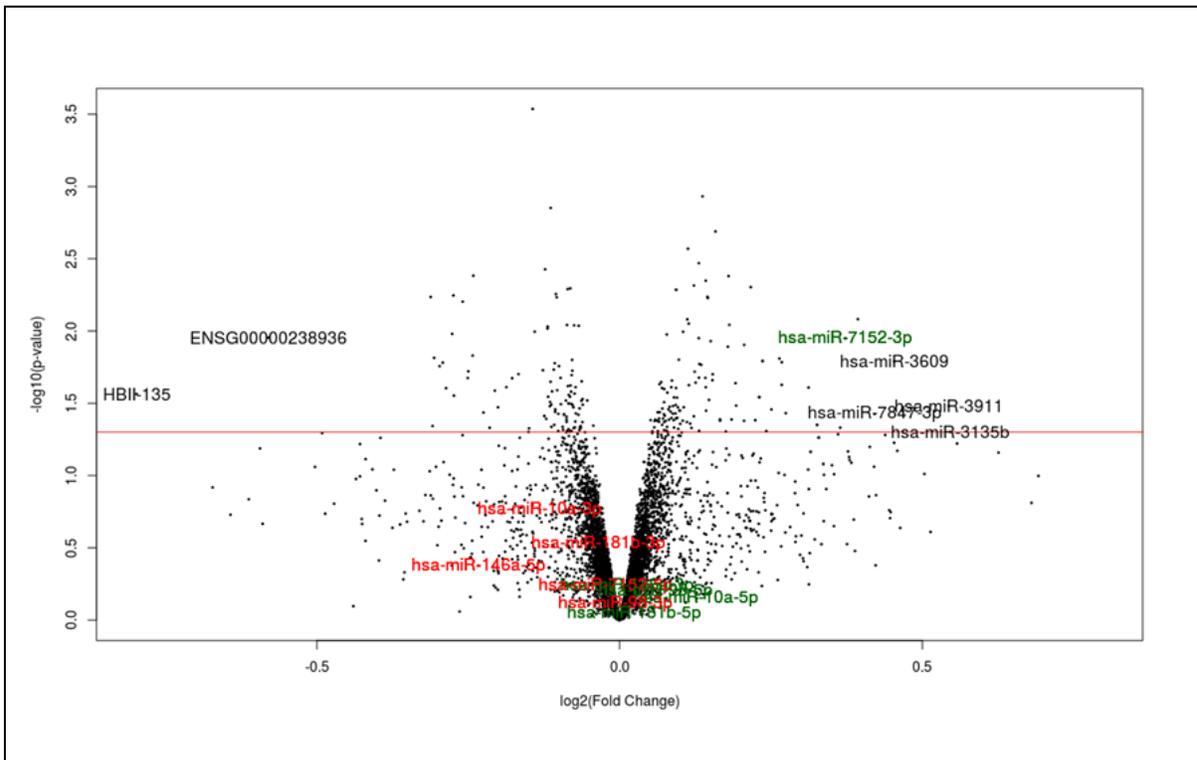


Figura 7. Gráfica de volcán. Esta gráfica muestra el log 2 de las veces de cambio (Fold Change) en la expresión de miRNA entre el grupo control (HUVECs sin tratamiento) y el grupo problema (HUVECs tratadas por 2 horas con 0.1 μ M de EGCG) *versus* su $-\log_{10}$ de valor de P de la prueba de t (t-test). En rojo y verde se muestran los miRNAs que fueron validados y/o explorados por qPCR. El valor absoluto del \log_2FC considerado para el análisis fue > 0.4 (eje X) y el valor de $P < 0.05$ (eje Y, línea roja), los miRNAs en negro corresponden a los obtenidos en el microarreglo con un valor de $P < 0.05$, ($n= 4$).

Hay en total 4 miRNAs (**Figura 7**) que mostraron una diferencia significativa en sus niveles de expresión ($P \leq 0.05$), entre el grupo control y el problema, cuya tendencia de expresión es ligeramente incrementada. De esos 4 se eligió el hsa-miR-7152-3p, el cual tuvo mayor significancia estadística ($P= 0.01$) y $\log_2FC= 0.372$ (**Tabla 2**) para ser validado por qPCR. Los resultados del análisis de la expresión relativa mostraron un patrón de expresión contrario al visto en el microarreglo, ya que el análisis por PCR del hsa-miR-7152-3p mostró un FC significativamente disminuido respecto al grupo control, con un $P= 0.048$ (**Figura 9**).

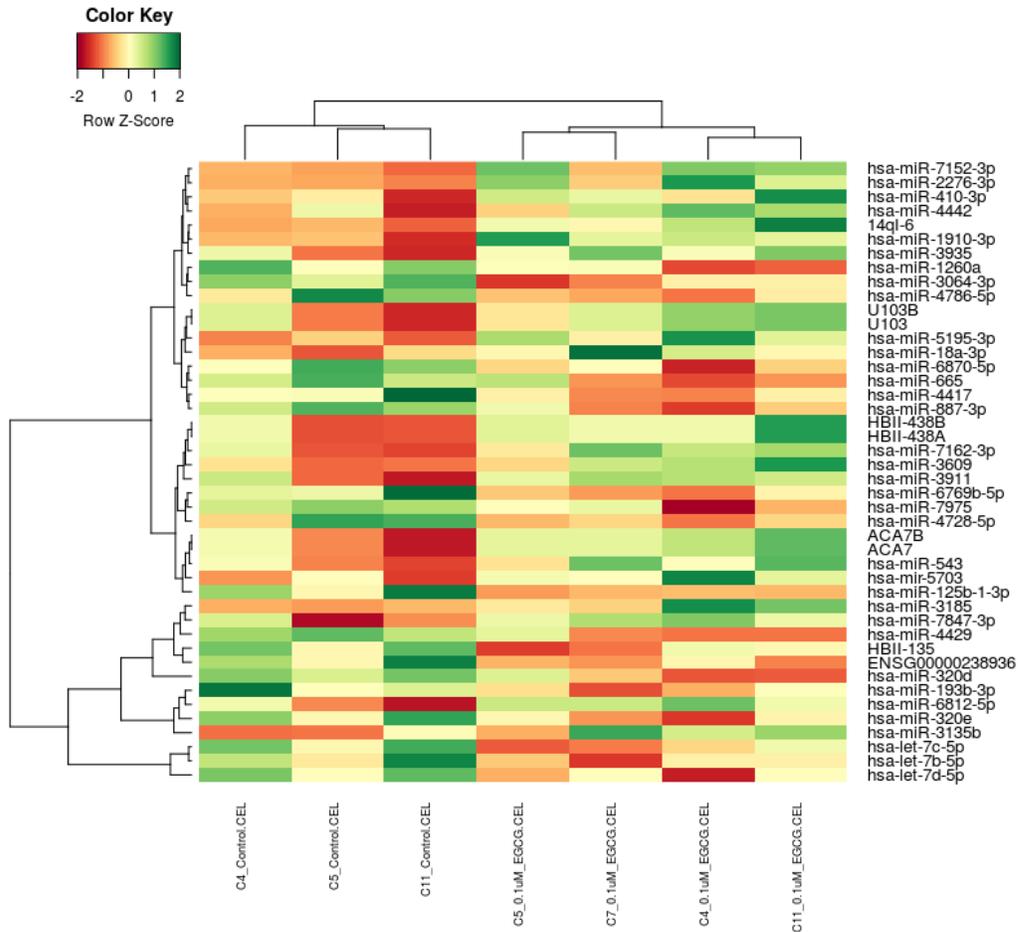


Figura 8. Mapa de calor de la expresión de miRNAs. El dendograma representa a los miRNAs diferencialmente expresados de HUVECs estimuladas por 2 horas con 0.1 μ M de EGCG vs. células no estimuladas (control). Se observan grupos de miRNAs sobre-expresados (color verde), los miRNAs con expresión disminuida (color rojo) y miRNAs sin cambio en sus niveles de expresión (color arena), valor de $P < 0.05$ y valor absoluto (\log_2FC) >0.2 , ($n = 4$).

6.2 Resultados del análisis de la expresión de miRNAs por qPCR

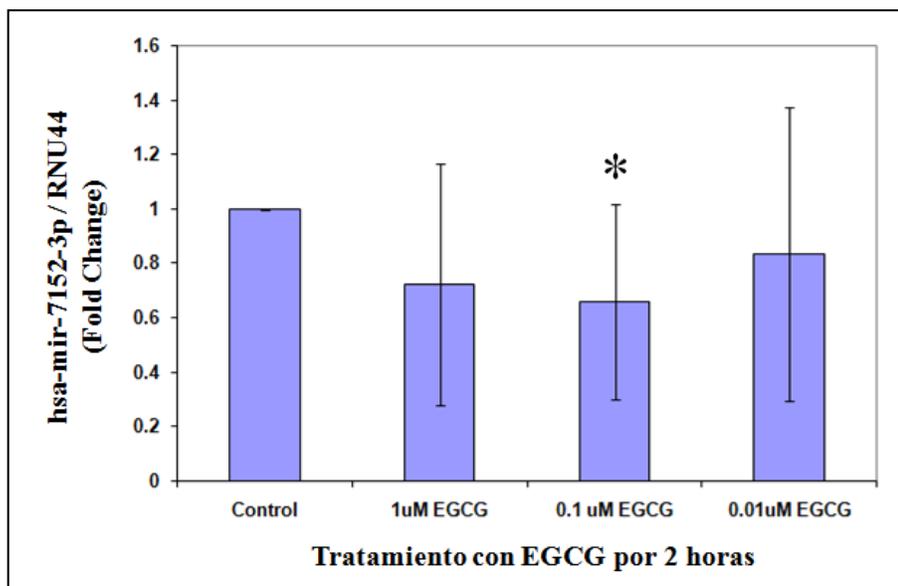


Figura 9. Expresión relativa de hsa-miR-7152 en HUVECs. La expresión de hsa-miR-7152 en HUVECs tratadas con 1, 0.1 y 0.01 μ M de EGCG por 2 horas. Datos fueron normalizados utilizando RNU44 como gen endógeno. * $P < 0.05$ vs. el grupo control, (n=3).

Se realizó la evaluación de la expresión relativa mediante qPCR de hsa-miR-7152-3p para validar el efecto encontrado en el microarreglo (0.1 μ M por 2 horas) y para explorar su comportamiento con otras dosis de EGCG (1 y 0.01 μ M por 2 horas). Los experimentos se realizaron con HUVECs obtenidas de 3 muestras biológicas (n=3) con sus respectivos triplicados técnicos. Pese a que los criterios de inclusión aceptan sólo cordones umbilicales de mujeres sanas, la variación de la expresión génica entre individuos produjo una dispersión elevada de los datos, por lo que la desviación estándar encontrada es grande. Cuando analizamos los datos para cada cordón por separado, el efecto de la dosis 0.1 μ M EGCG por 2 horas se mantiene y la desviación disminuye, cabe mencionar que los datos del cordón C7 también presentaron un comportamiento atípico respecto a los otros dos cordones, lo cual ya se había observado con los datos obtenidos del microarreglo (**Figura 5**). Para poder corregir el efecto provocado por la variación de la expresión génica entre un individuo

y otro, estos resultados sugieren que es recomendable incrementar el tamaño de la muestra (n).

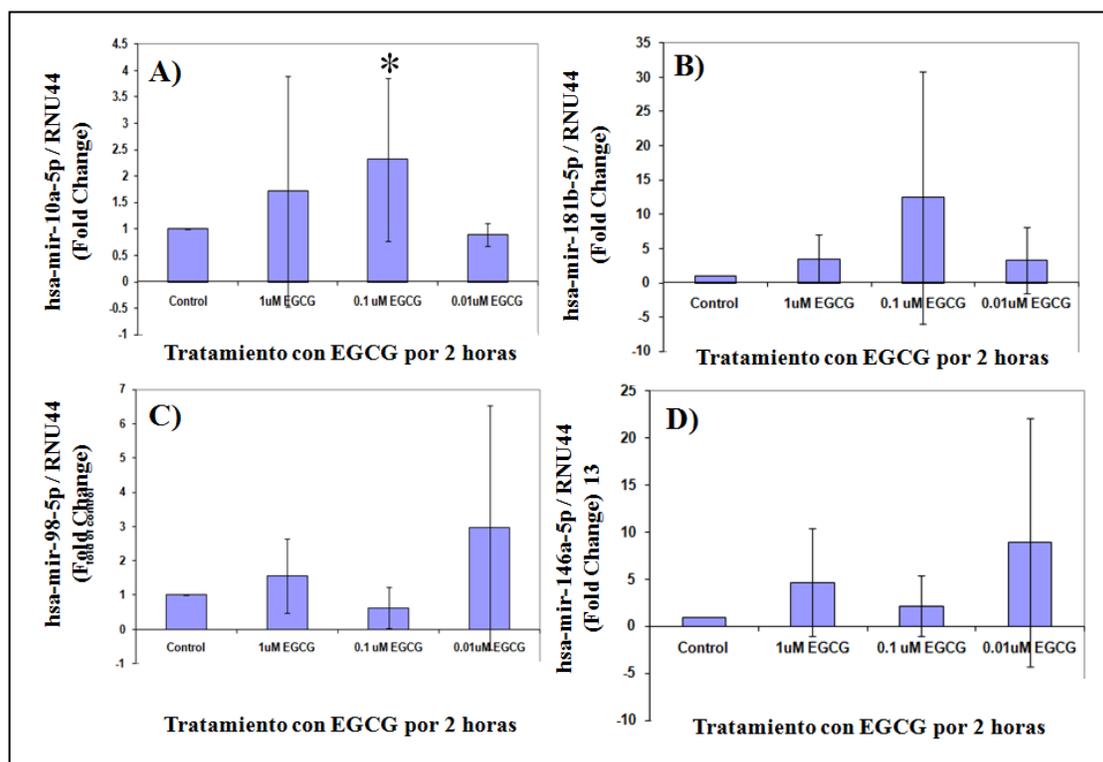


Figura 10. Expresión relativa de hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-98-5p y hsa-miR-146a-5p en HUVECs. La expresión de hsa-miR-10a-5p (A), hsa-miR-181b-5p (B), hsa-miR-98-5p (C) y hsa-miR-146a-5p (D) en HUVECs tratadas con 1, 0.1 y 0.01 μ M de EGCG por 2 horas. Datos fueron normalizados utilizando RNU44 como gen endógeno. * $P < 0.05$ vs. el grupo control, (n=3).

Se evaluó el efecto en la expresión de miRNAs reportados como antiinflamatorios (Sun *et al.*, 2012; 2014; Li, K., *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015) de las diferentes dosis de EGCG (1, 0.1 y 0.01 μ M por 2 horas) en HUVECs mediante PCR (Figura 10). El hsa-miR-10a-5p presentó un incremento en su expresión en respuesta al tratamiento con 0.1 μ M de EGCG por 2 horas, la cual fue significativa (Figura 10A) con un valor de $P = 0.020$ (Tabla 1 y 2). Los experimentos se realizaron con tres réplicas

biológicas (n=3). Es necesario incrementar la n para atenuar la variación de la expresión génica interindividual. No obstante, cuando se analizan los datos de cada cordón por separado, el efecto de la dosis 0.1 μ M EGCG por 2 horas se mantiene y la desviación disminuye (datos no mostrados). Los otros miRNAs evaluados por qPCR (**Figura 10B, C y D**), no tuvieron cambios significativos en su expresión, en respuesta a los distintos tratamientos con EGCG.

Tabla 1. Prueba de t para dos muestras relacionadas (control vs. tratado con 0.1 μ M de EGCG por 2 horas).

miRNA	Intervalo de confianza de la diferencia (inferior-superior)	T	gl	p
hsa-miR-7152-3p	0.0042 - 0.6235	2.338	8	0.048
hsa-miR-10a-5p	-2.4468 - -0.2822	-2.907	8	0.020
hsa-miR-98-5p	-0.0464 - 0.7559	2.039	8	0.076
hsa-miR-181-5p	-29.7148 - 3.8885	-1.772	8	0.114
hsa-miR-146a-5p	-3.4975 - 1.0477	-1.243	8	0.249

Los miRNAs hsa-miR-10a-5p y hsa-181b-5p presentaron un incremento en sus niveles de expresión tanto en la qPCR como en el microarreglo; en el caso del hsa-miR-10a-5p fue estadísticamente significativo ($P=0.02$), lo cual confirma lo observado en el microarreglo. En el caso del hsa-miR-181b-5p no hubo una diferencia estadísticamente significativa; sin embargo, la direccionalidad de expresión es la misma tanto en el microarreglo y como en la qPCR, lo que nos permite suponer que dicho incremento en su expresión es real (**Tabla 2**). En el caso de los miRNAs hsa-miR-7152-3p, hsa-miR-98-5p y hsa-miR-146a-5p, la direccionalidad de los niveles de expresión es contradictoria entre el microarreglo y la qPCR, por lo que fueron considerados como falsos positivos (**Tabla 2**).

Tabla 2. Análisis de la expresión de miRNAs por qPCR

miRNA	Análisis $\Delta\Delta CT$ Control vs. Tratado, normalizado con RNU44 Fold Change	Prueba de t Control vs. Tratado Significancia $P \leq 0.05$	Microarreglo Control vs. Tratado Fold Change	Microarreglo Control vs. Tratado Significancia $P \leq 0.05$
hsa-miR-7152-3p	0.660056092 ↓	0.048 *	↑	0.01 *
hsa-miR-10a-5p	2.31691371 ↑	0.020 *	↑	No significativo ($P \geq 0.05$)
hsa-miR-181b-5p	12.4329899 ↑	0.114	↑	No significativo ($P \geq 0.05$)
hsa-miR-98-5p	0.629517201 ↓	0.076	↑	No significativo ($P \geq 0.05$)
hsa-miR-146a-5p	2.172560351 ↑	0.249	↓	No significativo ($P \geq 0.05$)

6.3 Análisis de las redes de genes blanco de miRNAs diferencialmente expresados en respuesta a 0.1 μ M EGCG por 2 horas en HUVECs.

El análisis de los genes blanco de los miRNAs candidatos obtenidos del microarreglo (con un FC > 0.4 y $P < 0.05$) se realizó mediante el software IPA (por sus siglas en inglés, Ingenuity Pathway Analysis), utilizando los siguientes elementos: Base de conocimientos de ingenio (solo genes), incluyendo sólo las relaciones directas entre genes y solamente aquellos de los cuales exista evidencia experimental.

Tabla 3. Enfermedades y/o biofunciones de genes blanco de los miRNAs diferencialmente expresados.

Enfermedad o biofunción	p-value	#Moléculas involucradas
Desarrollo y función del sistema cardiovascular	1,25E-02 - 1,77E-04	3
Desarrollo y función del sistema hematológico	1,00E-02 - 1,01E-03	1
Enfermedad Inflamatoria	4,84E-02 - 2,16E-05	7
Crecimiento y proliferación celular	2,18E-02 - 2,66E-04	5

Tabla 4. Principales redes de genes blanco de los miRNAs diferencialmente expresados.

Redes génicas asociadas a funciones	Score
Supervivencia y muerte celular, expresión génica, Respuesta inflamatoria	9
Ciclo celular, mantenimiento y función celular, señalización celular	3

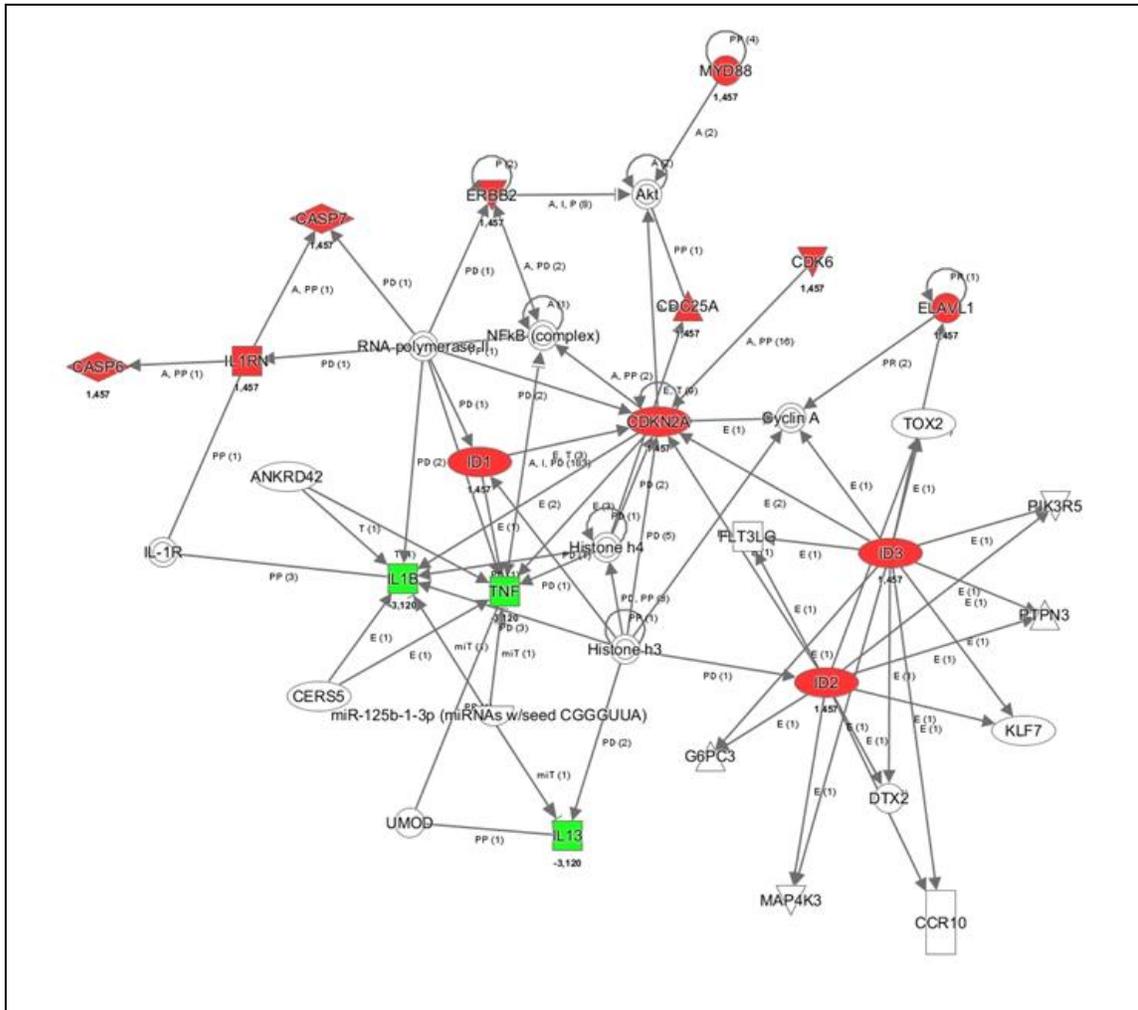


Figura 11. Interacción de genes blanco de miRNAs diferencialmente expresados en respuesta a 0.1 μ M de EGCG por 2 horas en HUVECs. Se observa que los nodos principales de interacción recaen sobre las vías de TNF, NFKB y Akt. Las flechas indican las interacciones directas entre los genes.

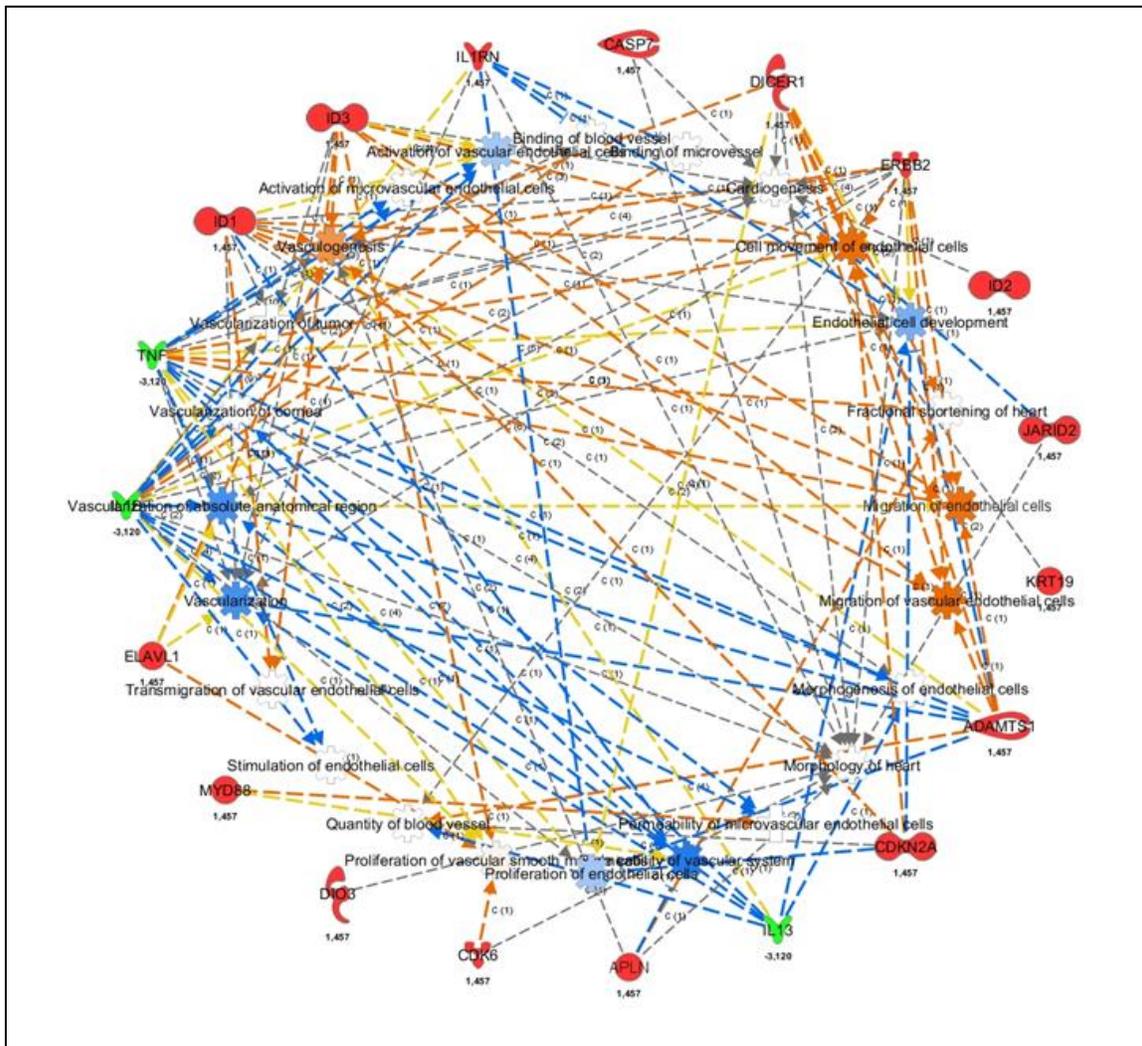


Figura 12. Vías funcionales asociadas a las interacciones de genes blanco de miRNAs diferencialmente expresados en respuesta a 0.1 μ M de EGCG por 2 horas en HUVECs. Se observa que dentro de las funciones asociadas a la interacción de los genes blancos de miRNAs candidatos se encuentran la vasculogénesis, activación de células endoteliales microvasculares, proliferación y migración de células endoteliales, entre otras.

VII. DISCUSIÓN

La mayoría de los estudios epidemiológicos demuestran un beneficio con respecto al riesgo cardiovascular con la ingestión de té y otras bebidas que contienen flavonoides (Hertog, *et al.*, 1993; Higdon, *et al.*, 2003; Peters, *et al.*, 2001 y Vita, *et al.*, 2003). La aterosclerosis es una enfermedad altamente asociada con riesgo cardiovascular (Rosas-Peralta *et al.*, 2005). Pese a que se han reportado algunos de los miRNAs blanco de la EGCG del té verde, hacen falta más estudios sobre su impacto en la expresión de los miRNAs, así como su posible efecto sobre las vías de señalización celular, como puede ser la vía de Akt, la cual es activada por muchos factores de crecimiento angiogénicos (como el factor de crecimiento endotelial vascular), por estímulos mecánicos como son las fuerzas de rozamiento generadas por el flujo sanguíneo (fluid shear stress) (Shiojima, *et al.*, 2002). Hasta el momento, este es el primer trabajo que reporta los cambios en la expresión de miRNAs en cultivos primarios de HUVECs, en respuesta a la estimulación con EGCG a dosis y tiempos encontrados en plasma humano posterior al consumo de té verde.

La vía de PI3K/Akt media varias vías de señalización para la activación de la NOS (Fulton, *et al.*, 1999 y Dimmeler, *et al.*, 1999). Se ha visto que los efectos cardioprotectores de la EGCG, son parcialmente debidos a la activación de la sintasa del óxido nítrico endotelial (eNOS) por la acción de la fosforilación dependiente de PI3K/Akt en el endotelio vascular (Kim, *et al.*, 2007). También se ha visto que EGCG inhibe la expresión de NFkB y la expresión de TNF- α (Shankar, *et al.*, 2008). TNF- α es una citoquina inducida por promotores tumorales que estimula la producción de moléculas de adhesión celular y la respuesta del proceso inflamatorio (Shankar, *et al.*, 2007).

La mayoría de los estudios *in vitro*, se han realizado en líneas celulares de cáncer, por lo cual, para estudiar el impacto de los polifenoles de la dieta sobre la expresión

de los miRNAs, es recomendable el uso de cultivos primarios en lugar de líneas celulares, utilizar metabolitos de polifenoles en circulación, y evaluar las concentraciones adecuadas (fisiológicamente alcanzables) de estos compuestos (Milenkovic *et al.*, 2013). Así también, el conocer el efecto de la EGCG sobre la expresión de los miRNAs antiinflamatorios en células endoteliales, podría dilucidar su posible papel como blancos terapéuticos para la intervención contra desórdenes vasculares que resultan de la aterosclerosis (Chen, *et al.*, 2015).

Con la finalidad de evaluar el efecto de la EGCG del té verde sobre la expresión de miRNAs, se realizó el análisis del perfil de expresión de miRNAs de células endoteliales estimuladas con 0.1 μ M de EGCG por 2 horas en contraste con los niveles de expresión de miRNAs de células endoteliales no estimuladas, utilizando microarreglos GeneChip miRNA 4.0 de Affymetrix.

El microarreglo se realizó con RNA total de células endoteliales estimuladas con 0.1 de μ M de EGCG por 2 horas vs. células no estimuladas de 4 cordones umbilicales (n=4) con el cual pudimos observar que la EGCG sí produce un efecto en los niveles de expresión de miRNAs en células endoteliales, habiendo encontrado el hsa-mir-7152-3p con expresión incrementada con un valor de $P= 0.01$ (**Tabla 2**). Los FC obtenidos en el microarreglo fueron bajos (menores a las 2 veces de cambio que comúnmente se considera como punto de corte en la literatura), lo cual puede atribuirse a que nuestro modelo no tiene un reto inflamatorio, ya que nuestro objetivo principal fue evaluar el efecto de una dosis fisiológicamente alcanzable de EGCG, es decir, cercana a la encontrada en plasma entre una hora y dos horas posteriores al consumo del té verde. Por esta razón, el criterio para elegir a este miRNA para ser validado fue su valor de P .

El análisis de validación por qPCR fue realizado con una n=3 (**Figura 9**), obteniendo una disminución estadísticamente significativa en su nivel de expresión, con un valor de P de 0.048. Sin embargo, la direccionalidad de la expresión es contraria a la

encontrada en el microarreglo, por lo que se concluye que el dato del microarreglo podría ser un falso positivo.

El análisis de los genes blanco de los miRNAs diferencialmente expresados encontrados en el microarreglo (**Figura 8**), se realizó con el software IPA, encontrando relación con enfermedades y/o biofunciones como son: desarrollo y función del sistema cardiovascular, desarrollo y función del sistema hematológico, enfermedad Inflamatoria y crecimiento y proliferación celular (**Tabla 3**), y las principales redes de genes blanco resultaron involucradas las de supervivencia y muerte celular, expresión génica, respuesta inflamatoria, ciclo celular, mantenimiento, función y señalización celular (**Tabla 4**). La interacción de los genes blanco diferencialmente expresados en respuesta a 0.1 μM de EGCG por 2 horas recaen sobre las vías de TNF, NFKB, Akt (**Figura 11**). Las vías funcionales asociadas a las redes génicas que interaccionaron fueron: la vasculogénesis, la activación de células endoteliales microvasculares, la proliferación y migración de células endoteliales, entre otras (**Figura 12**); se sabe que una de las vías importantes en la regulación de la estabilidad de células endoteliales vasculares involucra al factor de transcripción FoxO1, el cual induce la expresión del gen Ang-2 (que es un antagonista de Ang-1, asociado con la desestabilización y remodelación de vasos sanguíneos), lo que provoca que FoxO1 pueda modular la expresión de genes involucrados con la desestabilización de vasos sanguíneos, la remodelación de la matriz en la vasculatura, la migración en células endoteliales y la formación del tubo vascular (Nakae, J. *et al.*, 2008).

La determinación de la expresión de los miRNAs reportados como antiinflamatorios (hsa-miR-10a, hsa-miR-98, hsa-miR-181b y hsa-miR-146a-5p) en respuesta al tratamiento de las HUVECs con 1.0, 0.1 y 0.01 μM de EGCG expuestas por 2 horas, se realizó por RT-PCR en tiempo real (**Figura 10**). Pese a que las vías mayoritarias de interacción de los genes blanco de los miRNAs que presentaron cambios en sus niveles de expresión en respuesta a la estimulación con una concentración de 0.1 μM

EGCG por 2 horas en cultivos primarios de HUVECs corresponden a vías asociadas a inflamación, no se encontraron en el microarreglo con cambios estadísticamente significativos en su expresión a estos miRNAs descritos como miRNAs antiinflamatorios (**Figura 7**). Sin embargo, en los resultados obtenidos por la qPCR se observó que el hsa-miR-10a-5p, el cual ha sido descrito como un miRNA protector contra la aterosclerosis (Kumar, *et al.*, 2014), presentó un incremento en su expresión después de la exposición a EGCG, cuya direccionalidad de expresión concuerda con la obtenida en el microarreglo, así como también el hsa-mir-181b-5p, el cual se sabe que tiene función anti-inflamatoria y ha sido propuesto también como atero-protector (Chen, *et al.*, 2015) (**Tabla 2**).

Uno de los reguladores de la producción de mediadores inflamatorios (IL-8, IL-1, IL-6, TNF α , COX₂) es la proteína quinasa activada por mitógeno p38 (por sus siglas en inglés, MAPK p38) (Kaminska B, 2005).

Se ha observado que p38 juega un papel importante en la mayoría de los casos de cáncer asociado a inflamación a nivel de célula tumoral y del microambiente endotelial tumoral (Corre I, *et al.*, 2017). Dado que p38 es el mayor componente involucrado en la regulación de citocinas inflamatorias producidas por las células cancerosas (Gupta J, *et al.*, 2015), puede decirse que p38 es requerido para inducir la producción de IL-1 β y TNF α , los cuales son dos mediadores importantes de inflamación (Lee JC, *et al.*, 1994 y Kotlyarov A, *et al.*, 1999) que reaccionan con las células endoteliales para inducir la expresión de moléculas de adhesión. Además, la proteína cinasa 2 activada por la proteína cinasa activada por mitógeno (MK2), es efector río debajo de p38, regula la producción de TNF α mediada por LPS (Kotlyarov A, *et al.*, 1999).

Se ha reportado la participación de p38 en la progresión del cáncer mediada por aterosclerosis, la cual es una manifestación típica de disfunción endotelial y comparte varias características en común con el cáncer. Ambas patologías pueden ser inducidas por agentes similares, como son la generación de ROS y el daño celular,

ambos como resultado de la exposición al humo de cigarro y a un incremento en la ingesta de grasas en la dieta (Ross JS, *et al.*, 2001). Además, las alteraciones en las moléculas de adhesión de las células endoteliales, como VCAM están ligadas tanto a la formación de la placa aterosclerótica como a la invasión y metástasis tumoral. De manera similar, la expresión alterada de proteasas se asocia con expansión de placa y con invasión de cáncer y metástasis. Las vías de proliferación celular que involucran genes de regulación del punto de control G1/S (p53, pRb) están asociados con la progresión de la placa después de la angioplastia, así como también con la progresión del cáncer. La inactivación del factor de transcripción nuclear NFκB se asocia con la progresión de ambas enfermedades (Li JJ, *et al.*, 2005). De manera interesante, p38 está involucrado en una vía que transduce respuestas biológicas compartidas tanto en la aterosclerosis como en el cáncer. Estas respuestas incluyen la regulación del punto de control de ciclo celular G1/S, activación de NFκB, regulación de moléculas de adhesión y sensibilidad a VEGF y especies reactivas de oxígeno (ROS), por lo que, p38 es visto como un común denominador entre la aterosclerosis y la progresión del cáncer (Li JJ, *et al.*, 2005).

VIII. CONCLUSIONES

- Hasta el momento, este es el primer trabajo que ha analizado los cambios en la expresión de miRNAs de HUVECs, en respuesta a la estimulación con dosis de EGCG (0.1 μ M) y tiempos de circulación (de 1-2 horas) fisiológicamente alcanzables en el humano.
- La EGCG tiene un efecto en el perfil de expresión de miRNAs en células endoteliales a una dosis única de 0.1 μ M por 2 horas.
- El análisis del microarreglo sugiere un efecto en los niveles de expresión de miRNAs involucrados con funciones antiinflamatorias y/o ateroprotectoras en las células endoteliales (el hsa-miR-10a-5p y el hsa-miR-181b) en respuesta a 0.1 μ M de EGCG por 2 horas.
- La validación por qPCR de los miRNAs candidatos, indicó que sólo el hsa-miR-10a-5p (el cual ha sido reportado como miRNA atero-protector), presentó un incremento estadísticamente significativo en su nivel de expresión, en respuesta a la estimulación con 0.1 μ M de EGCG por 2h.
- El análisis de los genes blanco de los miRNAs diferencialmente expresados muestran la participación de la EGCG sobre la regulación de biofunciones como son el desarrollo y función del sistema cardiovascular, el desarrollo y función del sistema hematológico, la enfermedad inflamatoria, el crecimiento y la proliferación celular; y redes génicas asociadas a supervivencia y muerte celular, a expresión génica, a respuesta inflamatoria, a ciclo celular, y al mantenimiento, función y señalización celular.
- Los resultados sugieren un efecto de la EGCG sobre miRNAs cuyos blancos están involucrados en vías de señalización mediadas por FOXO1 y/o AKT, las

cuales juegan un papel importante en padecimientos asociados a la disfunción endotelial (como la aterosclerosis).

IX. PERSPECTIVAS

1. Para profundizar en los efectos de la EGCG sobre la expresión de miRNAs en general y en particular de los antiinflamatorios y/o ateroprotectores, es necesario incrementar el tamaño de la muestra, con la finalidad de disminuir la dispersión de los datos generada por la variación de la expresión génica entre un individuo y otro.
2. Repetir los abordajes realizados en este estudio comparando los resultados obtenidos de HUVECs de mujeres sanas vs. HUVECs de mujeres con preeclampsia, ya que esto nos permitiría visualizar más a fondo, el efecto de la EGCG sobre vías de señalización relacionadas con inflamación, hipertensión y disfunción endotelial.
3. Observar el efecto de la EGCG sobre la expresión de miRNAs con más de una estimulación, es decir, administrar 1, 0.1 y 0.01 μM de EGCG (o las dosis que se quieran evaluar) cada 2 horas para mantener dicha concentración estable en el modelo de estudio y así, poder determinar la concentración efectiva 50, lo cual puede ser un gran avance para la propuesta de este polifenol del té verde como un adyuvante para el tratamiento de enfermedades relacionadas con riesgo cardiovascular, inflamación y/o cáncer.
4. Evaluar el efecto de EGCG sobre la expresión de FOXO1 en HUVECs, mediante qPCR.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. A.J. Marcus, M.J. Broekman, J.H. Drosopoulos, et al., The endothelial cell ecto-adpase responsible for inhibition of platelet function is CD39, *J. Clin. Invest.* 99 (6) (1997) 1351–1360.
2. Ahmad A., Khan R.M., Alkharfy K.M. Effects of selected bioactive natural products on the vascular endothelium. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2013;62:111–121. doi: 10.1097/FJC.0b013e3182927e47.
3. Arts, I.C., van de Putte, B. Hollman, P.C. Catechin contents of foods commonly consumed in the netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 1746–1751.
4. B.E. Sumpio (Ed.), *Hemodynamic Forces and Vascular Cell Biology*, RG Landes Publishers, Austin, TX, 1993.
5. Basu-Modak, S.; Gordon, M.J.; Dobson, L.H.; Spencer, J.P.; Rice-Evans, C.; Tyrrell, R.M. Epicatechin and its methylated metabolite attenuate UVA-induced oxidative damage to human skin fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med.* 2003, 35, 910–921.
6. Brahma N. Singh, Sharmila Shankar, Rakesh K. Srivastava. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochemical Pharmacology* 82 (2011) 1807–1821.
7. Breving, K.; Esquela-Kerscher, A. The complexities of microRNA regulation: mirandering around the rules. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42:1316–1329; 2010.
8. C.J. Marshall, R.L. Moore, P. Thorogood, P.M. Brickell, C. Kinnon, A.J. Thrasher, Detailed characterization of the human aorto-gonad-mesonephros region reveals morphological polarity resembling a hematopoietic stromal layer, *Dev. Dyn.* 215 (1999) 139–147.
9. Cassidy, A.; O'Reilly, E.J.; Kay, C.; Sampson, L.; Franz, M.; Forman, J. P.; Curhan, G.; Rimm, E.B. Habitual intake of flavonoid subclasses and incident hypertension in adults. *Am. J. Clin. Nutr.* 93:338–347; 2011.
10. Chakrabarti, M.; Khandkar, M.; Banik, N.L.; Ray, S.K. Alterations in expression of specific microRNAs by combination of 4-HPR and EGCG inhibited growth of human malignant neuroblastoma cells. *Brain Res* 1454:1–13; 2012.
11. Chen, L., Lee, M. J., Li, H., and Yang, C. S. Absorption, distribution, elimination of tea polyphenols in rats. *Drug Metab. Dispos.*, 25: 1045–1050, 1997.
12. Chen, L.J; Chuang L, Huang, YH; Lin, SH; Lee, CI; Lin, WW; Lin, TE; Wang, WL; Chen, L; Chien, S; Chiu, JJ. MicroRNA Mediation of Endothelial Inflammatory Response to Smooth Muscle Cells and Its Inhibition by Atheroprotective Shear Stress. *Circ Res.* 2015; 116:1157-1169.
13. Clifford, M.N.; Brown, J. E. Dietary flavonoids and health—broadening the perspective. In: Andersen, O. M., Markham, K.R., editors. *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. Boca Raton: CRC Press; 2006.
14. Corre I, Paris F, Huot J. The p38 pathway, a major pleiotropic cascade that transduces stress and metastatic signals in endothelial cells. *Oncotarget.* 2017 May 29.

15. Croce CM, Calin GA. miRNAs, cancer, and stem cell division. *Cell*. 2005; 122:6–7. [PubMed: 16009126].
16. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999; 399:601–605.
17. E. Arciniegas, L. Ponce, Y. Hartt, R.G. Carlini, Intimal thickening involves transdifferentiation of embryonic endothelial cells, *Anat. Rec.* 258 (1) (2000) 47–57.
18. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, *et al.* Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 1999; 399:597–601.
19. G. Gallagher, B.E. Sumpio, Vascular endothelial cell, in: B.E. Sumpio, A.S. Sidawy (Eds.), *Basic Science of Vascular Disease*, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, 1997, pp. 151–186.
20. George, J.; Singh, M.; Srivastava, A. K.; Bhui, K.; Roy, P.; Chaturvedi, P. K.; Shukla, Y. Resveratrol and black tea polyphenol combination synergistically suppress mouse skin tumors growth by inhibition of activated MAPKs and p53. *PLoS One* 6:e23395; 2011.
21. Gonzalez-Sarrias, A.; Espin, J. C.; Tomas-Barberan, F. A.; Garcia-Conesa, M. T. Gene expression, cell cycle arrest and MAPK signalling regulation in Caco-2 cells exposed to ellagic acid and its metabolites, urolithins. *Mol. Nutr. Food Res.* 53:686–698; 2009.
22. Gupta J, Nebreda AR. Roles of p38 α mitogen-activated protein kinase in mouse models of inflammatory diseases and cancer. *FEBS J.* 2015; 282:1841–1857.
23. Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, *et al.* Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen Elderly Study. *Lancet.* 1993; 342:1007–1011. [PubMed: 8105262].
24. Higdon, J.V. Frei, B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 43 (2003)89–143.
25. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(1):1-13.
26. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protoc.* 2009;4(1):44-57.
27. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protoc.* 2009;4(1):44-57.
28. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probelevel data. *Biostatistics.* 2003 Apr;4(2):249-64.

29. J. Tanaka, et al., Foxo1 links hyperglycemia to LDL oxidation and endothelial nitric oxide synthase dysfunction in vascular endothelial cells, *Diabetes* 58 (2009) 2344e2354.
30. J.H. Paik, et al., FoxOs are lineage-restricted redundant tumor suppressors and regulate endothelial cell homeostasis, *Cell* 128 (2007) 309e323.
31. K. Choi, M. Kennedy, A. Kazarov, J.C. Papadimitriou, G. Keller, A common precursor for hematopoietic and endothelial cells, *Development* 125 (1998) 725–732.
32. K.K. Griedling, R.W. Alexander, Cellular biology of blood vessels, in: R.W. Alexander, R.C. Schlant, V. Fuster, et al. (Eds.), *Hurst's the Heart, Arteries and Veins*, 9th Edition, McGraw-Hill, New York, 1998, pp. 125–141.
33. Kaminska B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1754:253-262.
34. Kaminska B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy—from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1754:253-262.
35. Kim JA, Formoso G, Li Y, Potenza MA, Marasciulo FL, Montagnani M, et al. Epigallocatechin gallate, a green tea polyphenol, mediates NO-dependent vasodilation using signaling pathways in vascular endothelium requiring reactive oxygen species and Fyn. *J Biol Chem* 2007; 282:13736–13745.
36. Kotlyarov A, Neininger A, Schubert C, Eckert R, Birchmeier C, Volk HD, Gaestel M. MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis. *Nat Cell Biol*. 1999; 1:94-97.
37. Kumar, S., Kim, C. W., Simmons, R. D. & Jo, H. Role of flow-sensitive microRNAs in endothelial dysfunction and atherosclerosis: mechanosensitive athero-miRs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34, 2206–2216 (2014).
38. Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Lanvatter SW, Strickler JE, McLaughlin MM, Siemens I, et al. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*. 1994; 372:739-746.
39. Lee YS, Kim HK, Chung S, Kim KS, Dutta AJ. Depletion of human micro-RNA miR-125b reveals that it is critical for the proliferation of differentiated cells but not for the down-regulation of putative targets during differentiation". *Biol Chem*. 280:16635-16641(2005).
40. Lee MJ, Maliakal P, Chen L, Meng X, Bondoc FY, Prabhu S, Lambert G, Mohr S, Yang CS. Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002 Oct;11(10 Pt 1):1025-32.
41. Lee, M.J.; Maliakal, P.; Chen, L.; Meng, X.; Bondoc, F.Y.; Prabhu, S.; Lambert, G.; Mohr, S.; Yang, C.S. Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: Formation of different metabolites and individual variability. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 2002, 11, 1025-1032.

42. Li JJ, Gao RL. Should atherosclerosis be considered a cancer of the vascular wall? *Med Hypotheses*. 2005; 64:694-698.
43. Li, K., Ching, D., Luk, F. S., Raffai, R. L. & Apolipoprotein, E. Enhances MicroRNA-146a in Monocytes and Macrophages to Suppress Nuclear Factor-kappaB-Driven Inflammation and Atherosclerosis. *Circ Res* 117, e1–e11 (2015).
44. Libby, P., Ridker, P. M. & Maseri, A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105, 1135–1143 (2002).
45. Long, L.H ;Hoi,A.; Halliwell,B. Instability of ,and generation of hydrogen peroxide by phenolic compounds in cell culture media. *Arch.Bio chem. Biophys.* 501:162–169;2010.
46. M. Potente, et al., Involvement of Foxo transcription factors in angiogenesis and postnatal neovascularization, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 2382e2392.
47. M.F. Oellerich, M. Potente, FOXOs and sirtuins in vascular growth, maintenance, and aging, *Circ. Res.* 110 (2012) 1238e1251.
48. Manach, C.; Williamson,G. Morand, C.; Scalbert,A.; Remesy,C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bio availability studies. *Am. J.Clin.Nutr.* 81:230 S-242S;2005.
49. Marchese, A. Coppo, E. Sobolev, A.P., Rossi, D. Mannina, L. Daglia, M. Influence of in vitro simulated gastroduodenal digestion on the antibacterial activity, metabolic profiling and polyphenols content of green tea (*Camellia sinensis*), *Food Res. Int.* 63 (2014) 182–191.
50. Milenkovic, D; Baptiste Jude, Christine Morand. miRNA as molecular target of polyphenols underlying their biological effects. *Free Radic. Biol. Med.* 2013.
51. Mink, P.J.; Scrafford,C.G.; Barraj,L.M. ;Harnack,L.; Hong,C.P.; Nettleton,J.A.; Jacobs Jr. D.R. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: a prospective study in postmenopausal women. *Am. J.Clin.Nutr.* 85:895–909; 2007.
52. Nagle, D.G. Ferreira, D. Zhou, Y.D. Epigallocatechin-3-gallate (egcg): chemical and biomedical perspectives. *Phytochemistry* 67 (2006) 1849–1855.
53. Nakae J, Oki M, Cao Y. The FoxO transcription factors and metabolic regulation. *FEBS Lett.* 2008 Jan 9;582(1):54-67. Epub 2007 Nov 20. Review.
54. Natsume, M.; Osakabe, N.; Yasuda, A.; Osawa, T.; Terao, J. Inhibitory effects of conjugated epicatechin metabolites on peroxynitrite-mediated nitrotyrosine formation. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2008, 42, 50–53.
55. Neth, P., Nazari-Jahantigh, M., Schober, A. & Weber, C. MicroRNAs in flow-dependent vascular remodelling. *Cardiovasc Res* 99, 294–303 (2013).
56. O.P. Barry, D. Pratico, J.A. Lawson, G.A. Fitzgerald, Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles, *J. Clin. Invest.* 99 (1997) 2118–2127.
57. Paik, J.H., Kollipara, R., Chu, G., Ji, H., Xiao, Y., Ding, Z., Miao, L., Tothova, Z., Horner, J.W., Carrasco, D.R., Jiang, S., Gilliland, D.G., Chin, L., Wong, W.H., Castrillon, D.H. and Depinho, R.A. (2007) FoxOs are lineage-restricted

- redundant tumor suppressors and regulate endothelial cell homeostasis. *Cell* 128, 309–323.
58. Pandey K.B., Rizvi S.I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2009; 2:270–278. doi: 10.4161/oxim.2.5.9498.
 59. Perez-Jimenez, J.; Fezeu, L.; Touvier, M.; Arnault, N.; Manach, C.; Hercberg, S.; Galan, P.; Scalbert, A. Dietary intake of 337 polyphenols in French adults. *Am. J. Clin. Nutr.* 93:1220–1228; 2011.
 60. Peters U, Poole C, Arab L. Does tea affect cardiovascular disease? a meta-analysis. *Am J Epidemiol.* 2001; 154:495–503. [PubMed: 11549554].
 61. Peterson, J.J.; Dwyer, J.T.; Jacques, P.F.; McCullough, M.L. Associations between flavonoids and cardiovascular disease incidence or mortality in European and US populations. *Nutr. Rev.* 70:491–508; 2012.
 62. R. Chang, R. Powell, B.E. Sumpio, Tissue plasminogen activator—biological perspective for surgeons, *J. Am. Coll. Surg.* 185 (1997) 529–539.
 63. R.G. Gerrity, The role of the monocyte in atherogenesis. II. Migration of foam cells from atherosclerotic lesions, *Am. J. Pathol.* 103 (1981) 191–200.
 64. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 2015 Apr 20; 43(7): e47. doi: 10.1093/nar/gkv007.
 65. Ross JS, Stagliano NE, Donovan MJ, Breitbart RE, Ginsburg GS. Atherosclerosis: a cancer of the blood vessels? *Am J Clin Pathol.* 2001; 116:S97-107.
 66. Rusak G, Komes D, Likic S, Horzic D, Kovac M. Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chem* 2008; 110:852-85.
 67. Shankar S, Chen Q, Srivastava RK. Inhibition of PI3K/AKT and MEK/ERK pathways act synergistically to enhance antiangiogenic effects of EGCG through activation of FOXO transcription factor. *Journal of molecular signaling.* 2008; 3:7. [PubMed: 18355401].
 68. Shankar S, Suthakar G, Srivastava RK. Epigallocatechin-3-gallate inhibits cell cycle and induces apoptosis in pancreatic cancer. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library.* 2007; 12:5039–51. [PubMed: 17569628].
 69. Shehzad, A.; Lee, Y. S. Molecular mechanisms of curcumin action: signal transduction. *Biofactors* 39:27–36; 2013.
 70. Shiojima I, Walsh K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ Res* 2002; 90:1243–1250.
 71. Siddiqui, I. A.; Asim, M.; Hafeez, B. B.; Adhami, V. M.; Tarapore, R. S.; Mukhtar, H. Green tea polyphenol EGCG blunts androgen receptor function in prostate cancer. *FASEB J* 25:1198–1207; 2011.
 72. Singh, B.N., Sharmila Shankar, Rakesh K. Srivastava. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications *Biochem Pharmacol.* 2011 December 15; 82(12): 1807–1821. doi: 10.1016/j.bcp.2011.07.093.

73. Slavin, J.L.; Lloyd, B. Health benefits of fruits and vegetables. *Adv. Nutr.* 3:506–516;2012.
74. Steffen, Y.; Gruber, C.; Schewe, T.; Sies, H. Mono-O-methylated flavanols and other flavonoids as inhibitors of endothelial NADPH oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 2008, 469, 209–219.
75. Sun, X. *et al.* MicroRNA-181b regulates NF-kappaB-mediated vascular inflammation. *J Clin Invest* 122, 1973–1990 (2012).
76. Sun, X. *et al.* Systemic delivery of microRNA-181b inhibits nuclear factor-kappaB activation, vascular inflammation, and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circ Res* 114, 32–40 (2014).
77. Sun, X., Belkin, N. & Feinberg, M. W. Endothelial microRNAs and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 15, 372 (2013).
78. T. Furuyama, *et al.*, Abnormal angiogenesis in Foxo1 (Fkhr)-deficient mice, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 34741e34749.
79. Tsang WP, *et al.*, 2010 Tsang WP, Kwok TT. Epigallocatechin gallate up-regulation of miR-16 and induction of apoptosis in human cancer cells. *The Journal of nutritional biochemistry.* 2010; 21:140–6. [PubMed: 19269153].
80. U. Thienel, J. Loike, M.J. Yellin, CD154 (CD40L) induces human endothelial cell chemokine production and migration of leukocyte subsets, *Cell Immunol.* 198 (2) (2000) 87–95.
81. VanderLaan, P. A., Reardon, C. A. & Getz, G. S. Site specificity of atherosclerosis: site-selective responses to atherosclerotic modulators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 12–22 (2004).
82. Vita JA, Keaney JF Jr. Endothelial function: A barometer for cardiovascular risk? *Circulation.* 2002; 106:640–642. [PubMed: 12163419].
83. Vita JA. Tea consumption and cardiovascular disease: effects on endothelial function. *J Nutr.* 2003 Oct;133(10):3293S-3297S.
84. Wang X., Ouyang Y.Y., Liu J., Zhao G. Flavonoid intake and risk of CVD: A systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Br. J. Nutr.* 2014;111:1–11. doi: 10.1017/S000711451300278X.
85. Wang, H.; Bian, S.; Yang, C.S. Green tea polyphenol EGCG suppresses lung cancer cell growth through up regulating miR-210 expression caused by stabilizing HIF-1alpha. *Carcinogenesis* 32:1881–1889;2011.
86. Warnakulasuriya S.N., Ziaullah, Rupasinghe H.P. Long chain fatty acid acylated derivatives of quercetin-3-O-glucoside as antioxidants to prevent lipid oxidation. *Biomolecules.* 2014;4:980–993. doi: 10.3390/biom4040980.
87. Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF Jr, *et al.* The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2003; 42:1149–1160. [PubMed: 14522472].
88. Wu C.M., Lin K.W., Teng C.H., Huang A.M., Chen Y.C., Yen M.H., Wu W.B., Pu Y.S., Lin C.N. Chalcone derivatives inhibit human platelet aggregation and inhibit growth in human bladder cancer cells. *Biol. Pharm. Bull.* 2014;37:1191–1198. doi: 10.1248/bpb.b14-00099.
89. Wu, C.M.; Lin, K.W.; Teng, C.H.; Huang, A.M.; Chen, Y.C.; Yen, M.H.; Wu, W.B.; Pu, Y.S.; Lin, C.N. Chalcone derivatives inhibit human platelet

- aggregation and inhibit growth in human bladder cancer cells. *Biol. Pharm. Bull.* 2014, 37, 1191–1198.
90. Xu B, Luo Y, Liu Y, Li BY, Wang Y. Platelet-derived growth factor-BB enhances MSC-mediated cardioprotection via suppression of miR-320 expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015 May 1;308(9):H980-9. doi: 10.1152/ajpheart.00737.2014. Epub 2015 Feb 27.
91. Y. Huo, A. Hafezi-Moghadama, K. Ley, Role of vascular cell adhesion molecule-1 and fibronectin connection segment-1 in monocyte rolling and adhesion on early atherosclerotic lesions, *Circ. Res.* 87 (2) (2000) 153–159.
92. Yang CS, Wang H, Sheridan ZP. Studies on prevention of obesity, metabolic syndrome, diabetes, cardiovascular diseases and cancer by tea. *J Food Drug Anal.* 2018 Jan;26(1):1-13. doi: 10.1016/j.jfda.2017.10.010.
93. Yang, C. S., Maliakal, P., and Meng, X. Inhibition of carcinogenesis by tea. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 42: 25–54, 2002.
94. Zhao Y., Lu _Yu, Shengjie Xu, Fuyu Qiu, Youqi Fan et al., Guosheng Fu. Down-regulation of connexin43 gap junction by serum deprivation in human endothelial cells was improved by (-)-Epigallocatechin gallate via ERK MAP kinase pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Jan 7;404(1):217-22. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.11.096. Epub 2010 Nov 24.2011



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00187

Matrícula: 2153803913

EFFECTO DE LA
EPIGALOGATEQUINA-3-GALATO
DEL TÉ VERDE (*Camellia
sinensis*) SOBRE LA EXPRESIÓN
DE miRNAs

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 28 del mes de febrero del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. BENJAMIN PEREZ AGUILAR
DRA. AMADA TORRES SALAZAR
DRA. LEONOR JACOBO ALBAVERA
DR. FAUSTO SANCHEZ MUÑOZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: ESTELA D'ABRIL RUIZ LEYJA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



ESTELA D'ABRIL RUIZ LEYJA
ALUMNA

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. BENJAMIN PEREZ AGUILAR

VOCAL

DRA. AMADA TORRES SALAZAR

VOCAL

DRA. LEONOR JACOBO ALBAVERA

SECRETARIO

DR. FAUSTO SANCHEZ MUÑOZ