

UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **microRNAs EN EL PROCESO DE ACLIMATACIÓN AGUDA Y CRÓNICA A LA ALTITUD**

**Andrés Mauricio Garcia Caro**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Química  
Bogotá, Colombia

2019



# **microRNAs EN EL PROCESO DE ACLIMATACIÓN AGUDA Y CRÓNICA A LA ALTITUD**

**Andrés Mauricio Garcia Caro**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Bioquímica**

Director (a):

Ph.D. Claudia Consuelo Rubiano Castellanos

Codirector (a):

Ph.D Edgar Cristancho Mejia

Grupo de Investigación:

Grupo de investigaciones básicas en bioquímica -LIBBIQ- y grupo de investigación en adaptaciones a la hipoxia y al ejercicio.

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2019



*Sanarse para sanar.*

## **Agradecimientos**

Agradezco a la Universidad Nacional de Colombia por la convocatoria nacional de proyectos para el fortalecimiento de la investigación, creación e innovación 2016-2018 que permitió la financiación del proyecto 37282. A la vicedecanatura de investigación de la facultad de ciencias y al departamento de Química. Además, porque se convirtió en mi segunda casa por 8 años.

A mi directora, la profesora Claudia Rubiano que me enseñó lo necesario para iniciar el camino de la investigación.

A Camila, por la resonancia que causó la vibración de nuestras frecuencias.

A los compañeros del LIBBIQ, por sus enseñanzas permanentes.

A mi familia y amigos, que siempre han confiado en mí y han estado en mis triunfos y derrotas brindando un apoyo constante.

## Resumen

Los microRNAs (miRNAs) son transcritos cortos (22-25 nt) no codificantes que regulan la expresión génica mediante la unión a secuencias de mRNA complementarias. Un miRNA actúa sobre varios genes o varios miRNAs pueden regular el mismo gen, lo cual genera efectos cooperativos en la respuesta celular. Los “hipoxamiRs” son un grupo de miRNAs cuya expresión está relacionada con la condición de hipoxia. A la fecha, se han reportado aproximadamente 30 hipoxamiRs encargados de regular procesos relacionados con el metabolismo energético, diferenciación, proliferación, crecimiento y muerte celular. Aunque se ha estudiado el papel de los hipoxamiRs en patologías como el cáncer y las isquemias, su papel durante la aclimatación a la hipoxia hipobárica aún es incierto.

En este trabajo se evaluaron algunas variables hematológicas y el patrón de expresión de 5 hipoxamiRs circulantes en plasma de individuos expuestos a hipoxia hipobárica (2600 msnm) durante un periodo de 4 meses. Para cada miRNA se establecieron las condiciones óptimas para la amplificación mediante la técnica de reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (RT-qPCR). También se realizó el análisis bioinformático de cada miRNA para establecer su posible relación con los cambios presentes durante la aclimatación mediante redes de regulación.

Con relación a las variables hematológicas se encontraron diferencias interindividuales y entre género, que son consistentes con los cambios presentes durante el proceso de aclimatación. Por otra parte, los miRNAs presentaron variaciones interindividuales, sin embargo, la tendencia de algunos miRNAs es similar entre los individuos a lo largo del seguimiento. El análisis bioinformático reveló que los 5 hipoxamiRs evaluados se encuentran estrechamente relacionados y tienen como blanco genes involucrados en procesos como la ubiquitinación de proteínas, la regulación metabólica, la inflamación y procesos derivados del incremento en las especies reactivas de oxígeno. Así mismo, se

estableció que el componente central de regulación de estos hipoxamiRs es la vía de respuesta a estrés (MAPKs).

Los resultados indican que los niveles plasmáticos de estos hipoxamiRs tienen relación con las adaptaciones fisiológicas que se presentan durante la aclimatación a la altitud, al tener como blanco genes que codifican para proteínas relacionadas con el control de la hipertensión pulmonar, la angiogénesis, la regulación de la función de HIF y de los líquidos corporales.

**Palabras clave: Aclimatación, Hipoxia Hipobárica, miRNAs, Reacción en Cadena de Polimerasa en Tiempo Real.**



## Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are short (22-25 nt) non-coding transcripts that regulate gene expression by binding to complementary mRNA sequences. A miRNA acts on several genes or several miRNAs can regulate the same gene, which generates cooperative effects in the cellular response. The "hypoxamiRs" are a group of miRNAs whose expression is related to the hypoxia condition. To date, approximately 30 hypoxamiRs have been reported to regulate processes related to energy metabolism, differentiation, proliferation, growth and cell death. Although the role of hypoxamids in pathologies such as cancer and ischemia has been studied, their role during acclimation to hypobaric hypoxia is still uncertain.

In this work some hematological variables and the expression pattern of 5 circulating hypoxamiRs in plasma of individuals exposed to hypobaric hypoxia (2600 masl) during a period of 4 months were evaluated. For each miRNA optimal conditions for amplification were established by the real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) technique. The bioinformatic analysis of each miRNA was also performed to establish its possible relationship with the changes present during acclimation through regulation networks.

Regarding the hematological variables, interindividual and gender differences were found, which are consistent with the changes present during the acclimation process. On the other hand, the miRNAs presented interindividual variations, however, the tendency of some miRNAs is similar among individuals throughout the follow-up. The bioinformatic analysis revealed that the 5 evaluated hypoxamiRs are closely related and target genes involved in processes such as protein ubiquitination, metabolic regulation, inflammation and processes derived from the increase in reactive oxygen species. Likewise, it was established that the central regulatory component of these hypoxamids is the stress response pathway (MAPKs).

The results indicate that the plasma levels of these hypoxamiRs could be related to the physiological adaptations that occur during altitude acclimation, by targeting genes that code for proteins related to the control of pulmonary hypertension, angiogenesis, the regulation of the function of HIF and body fluids.

**Keywords: Acclimatization, Hypobaric Hypoxia, miRNAs, Real-Time Polymerase Chain Reaction.**

# Contenido

	Pág.
<b>Resumen .....</b>	<b>VII</b>
<b>Lista de figuras.....</b>	<b>XIII</b>
<b>Lista de tablas .....</b>	<b>XV</b>
<b>Lista de símbolos y abreviaturas .....</b>	<b>XVII</b>
<b>Introducción</b>	<b>19</b>
<b>1. Marco teórico.....</b>	<b>22</b>
1.1 La hipoxia hipobárica .....	22
1.2 La respuesta ante el estrés: la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y su relación con la hipoxia.....	25
1.3 Los factores inducibles por hipoxia (HIFs).....	27
1.4 Los microRNAs.....	28
1.4.1 Biogénesis de los miRNAs.....	29
1.4.2 Mecanismo de reconocimiento de los blancos de los miRNAs.....	30
1.4.3 Fuentes genómicas de nuevos miRNAs .....	32
1.4.4 Los miRNAs circulantes.....	33
1.4.5 El papel de los miRNAs en la adaptación humana.....	35
1.5 miRNAs en la hipoxia: Los hipoxamiRs .....	36
1.6 Técnicas experimentales empleadas para el estudio de expresión de los miRNAs .....	39
1.6.1 Principios de la qPCR .....	40
1.7 Consideraciones para la cuantificación de miRNAs por RT-qPCR .....	44
1.7.1 Diseño de primers.....	44
1.7.2 Normalizadores internos y externos.....	45
1.8 Análisis de los datos de la RT-qPCR.....	46
<b>2. Justificación .....</b>	<b>49</b>
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>51</b>
3.1 Objetivo general .....	51

3.2	Objetivos Específicos.....	51
<b>4.</b>	<b>Metodología.....</b>	<b>52</b>
4.1	Procedimientos experimentales .....	52
4.1.1	Selección de los participantes .....	52
4.1.2	Criterios de inclusión .....	53
4.1.3	Criterios de exclusión .....	53
4.1.4	Consentimiento informado.....	53
4.1.5	Aspectos éticos .....	54
4.1.6	Selección de los miRNAs .....	54
4.1.7	Obtención de la muestra sanguínea .....	57
4.1.8	Determinación de variables hematológicas .....	59
4.1.9	Extracción de miRNAs de plasma sanguíneo .....	59
4.1.10	Condiciones para la realización de la RT-qPCR .....	60
4.1.11	Diseño de <i>primers</i> .....	62
4.1.12	Curva estándar.....	62
4.1.13	Análisis de los datos obtenidos mediante RT-qPCR.....	63
4.2	Análisis bioinformático .....	63
<b>5.</b>	<b>Resultados y discusión .....</b>	<b>68</b>
5.1	Características de la población .....	68
5.2	Cambios en las variables hematológicas con la exposición a la altitud. ....	69
5.3	Cambios en el patrón de expresión de los miRNAs con la altitud.....	77
5.3.1	Cuantificación y rendimiento en la extracción de los miRNAs circulantes.....	77
5.3.2	Determinación de la eficiencia y la especificidad de los <i>primers</i> .....	81
5.3.3	Validación de los miRNAs de referencia.....	86
5.3.4	Normalización de los datos obtenidos mediante qPCR .....	87
5.4	Análisis bioinformático .....	92
5.4.1	Genes regulados por los hipoxamiRs .....	92
5.4.2	Redes de regulación durante la hipoxia.....	97
5.5	Integración de los resultados experimentales y bioinformáticos: Los miRNAs circulantes. ....	123
<b>6.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>132</b>
6.1	Conclusiones .....	132
6.2	Recomendaciones .....	134

## Lista de figuras

- Figura 1-1:** Vías de activación de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs).
- Figura 1.2:** Regulación dependiente de oxígeno de la proteína HIF-a.
- Figura 1-3:** Vía de síntesis de los miRNAs.
- Figura 1-4:** Gráfico de amplificación durante una reacción de PCR en tiempo real.
- Figura 1-5:** Curva de *melting* de una reacción de PCR en tiempo real.
- Figura 4-1:** Proceso de selección de los miRNAs candidatos a evaluar durante el proceso de aclimatación a la altitud.
- Figura 4-2:** Esquema de seguimiento para la toma de muestras sanguíneas.
- Figura 4-3:** Protocolo para la extracción de miRNAs de plasma sanguíneo.
- Figura 5-1:** Resultados de las variables hematológicas para cada individuo.
- Figura 5-2:** Valores promedio de las variables hematológicas.
- Figura 5-3:** Valores promedio de hemoglobina corpuscular media en mujeres y hombres.
- Figura 5-4:** Curva de calibración y de *melting* para los miRNAs evaluados.
- Figura 5-5:** Curva de calibración y de *melting* para el miR-210.
- Figura 5-6:** Valores promedio de estabilidad para los miRNAs.
- Figura 5-7:** Cantidad relativa promedio de los miRNAs amplificados.
- Figura 5-8:** Cantidad relativa de miRNAs en individuos expuestos a hipoxia hipobárica
- Figura 5-9:** *Fold change* de la cantidad relativa de miRNAs plasmáticos en cada individuo respecto a la muestra control.
- Figura 5-10:** Diagrama de Venn con el número de genes blanco para cada miRNA.
- Figura 5-11:** Términos del GO asociados con la categoría proceso biológico.

**Figura 5-12:** Vías de señalización del KEGG compartidas entre los genes blanco de los miRNAs

**Figura 5-13:** Red de regulación para el miR-21.

**Figura 5-14:** Red de regulación para el miR-22.

**Figura 5-15:** Red de regulación para el miR-130.

**Figura 5-16:** Red de regulación para el miR-181.

**Figura 5-17:** Red de regulación para el miR-210.

**Figura 5-18:** Volcano plot para la expresión de los miRNAs

## Lista de tablas

- Tabla 1-1:** Lista de hipoxamiRs de mamíferos en respuesta a hipoxia.
- Tabla 4-1:** MicroRNAs encontrados en la literatura relacionados con el estímulo hipóxico.
- Tabla 4-2:** miRNAs seleccionados para los análisis del estudio.
- Tabla 4-3:** Preparación de la mezcla para la retrotranscripción.
- Tabla 4-4:** Preparación de la mezcla para la qPCR.
- Tabla 4-5:** Secuencias de los miRNAs a amplificar y su correspondiente *primer* sentido.
- Tabla 4-6:** Diluciones para la curva de calibración del cel-miR-39.
- Tabla 5-1:** Características antropométricas y demográficas de los participantes del estudio.
- Tabla 5-2:** Valores promedio de la cuantificación de RNA para cada individuo.
- Tabla 5-3:** Porcentaje de rendimiento en la extracción de miRNAs plasmáticos.
- Tabla 5-4:** Resultados de la curva de calibración de cada uno de los miRNAs.
- Tabla 5-5:** Resultados de la curva de calibración para el miR-210.
- Tabla 5-6:** Genes compartidos por los 5 miRNAs y su función asociada a la condición de hipoxia.
- Tabla 5-7:** *Hubs* identificados para la red del miR-21.
- Tabla 5-8:** Vías de señalización de cada uno de los *clusters* presentes en la red del miR-21.
- Tabla 5-9:** *Hubs* identificados para la red del miR-22
- Tabla 5-10:** Vías de señalización de cada uno de los *clusters* presentes en la red del miR-22.
- Tabla 5-11:** *Hubs* identificados para la red del miR-130

**Tabla 5-12:** Vías de señalización de cada uno de los *clusters* presentes en la red del miR-130.

**Tabla 5-13:** *Hubs* identificados para la red del miR-181.

**Tabla 5-14:** Vías de señalización de cada uno de los *clusters* presentes en la red del miR-181.

**Tabla 5-15:** *Hubs* identificados para la red del miR-210.

**Tabla 5-16:** Vías de señalización de cada uno de los *clusters* presentes en la red del miR-210.

**Tabla 5-17:** Número de nodos relacionados con la función de los miRNAs.



## Abreviaturas

Cq	Quantification Cycle (Ciclo de cuantificación)
EPO	Eritropoyetina
$FiO_2$	Fracción inspirada de oxígeno
Hb	Hemoglobina
Hct	Hematocrito
HIFs	Factores inducibles por hipoxia
HRE	Elementos de respuesta a hipoxia
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
miRNA	MicroRNAs
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NRT	<i>No reverse transcripción</i> (Sin transcripción reversa)
NTC	<i>No template control</i> (Sin control de plantilla)
$PACO_2$	Presión alveolar de dióxido de carbono
$PaCO_2$	Presión arterial de dióxido de carbono
$PAH_2O$	Presión alveolar de agua
$PAO_2$	Presión Alveolar de Oxígeno
$PaO_2$	Presión arterial de oxígeno
$PAtm$	Presión atmosférica
PHD	Protil hidroxilasas
RT-qPCR	Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real
SatO	Saturación de oxígeno
UTR	<i>Untranslate region</i>



# Introducción

En el año de 1955, gracias a la inversión en infraestructura deportiva impulsada por las políticas públicas mexicanas, en las que se incluyó el deporte como “mecanismo para la movilización política, el desarrollo social y para reestablecer la credibilidad de México en la comunidad internacional”<sup>1</sup>, se realizaron en la ciudad de México los Juegos Panamericanos. Aunque estos fueron un éxito, se presentó una polémica relacionada con altura de la ciudad (2240 m.s.n.m.) y los resultados de algunos deportistas. Por lo anterior, se desarrolló el proyecto *Mexico2*, en el cual se realizaron una serie de medidas fisiológicas para obtener información relevante sobre el efecto de la altitud en los atletas. Los resultados presentados, indicaron que no existe ningún efecto negativo sobre el rendimiento físico de los deportistas, siempre y cuando, estos logren aclimatarse con la anticipación necesaria. De hecho, el presidente del Colegio de medicina del Deporte de los Estados Unidos sostuvo: “que las condiciones climáticas adversas llegan a producir en un buen deportista un mejor desempeño”<sup>2</sup>. Gracias a estas investigaciones, México fue seleccionada como la sede de los Juegos Olímpicos de 1968. Durante el desarrollo de estos juegos olímpicos, se rompieron setenta y seis plusmarcas olímpicas y treinta mundiales, favoreciendo a los atletas que participaron en deportes de velocidad y causando un efecto negativo en los atletas que compitieron en pruebas de resistencia (Seaton, 1969). Estos resultados desencadenaron una serie de investigaciones en torno a las adaptaciones fisiológicas, las respuestas sistémicas y las aplicaciones de la hipoxia hipobárica en los seres humanos.

A la fecha, los estudios genéticos realizados en tibetanos, etíopes y andinos -residentes a 4000 m.s.n.m por más de 15.000 años- han permitido describir patrones de adaptación

---

<sup>1</sup> Tomado de:

[https://es.wikipedia.org/wiki/Juegos\\_Ol%C3%ADmpicos\\_de\\_M%C3%A9xico\\_1968#Antecedentes](https://es.wikipedia.org/wiki/Juegos_Ol%C3%ADmpicos_de_M%C3%A9xico_1968#Antecedentes)

<sup>2</sup> Tomado de:

<http://www.colmich.edu.mx/relaciones25/files/revistas/076/ArielRodriguezKuri.pdf>

característicos de cada población. De manera análoga, se ha demostrado que los individuos residentes a nivel del mar que migran por encima del umbral altitudinal (1800 m.s.n.m) (Trompetero et al., 2015) presentan cambios en función de la altitud y el tiempo de exposición. Estos cambios están relacionados con la concentración de hemoglobina (Hb), el patrón respiratorio, la saturación arterial de oxígeno (SaO<sub>2</sub>) y la concentración de eritropoyetina (EPO). De acuerdo a lo anterior, se define adaptación a las variaciones genéticas producidas por el sometimiento continuo a la altitud y aclimatación a las respuestas que tienen lugar durante el estímulo agudo y crónico a la altitud.

Actualmente, los Factores Inducibles por hipoxia (HIFs) se han establecido como los principales reguladores moleculares de la respuesta hipóxica (Webb, Coleman, & Pugh, 2009). Sin embargo, investigaciones *in vitro* realizadas en diferentes tejidos, demostraron la existencia de algunos microRNAs (miRNAs) encargados de regular la respuesta ante la hipoxia, los cuales, recibieron el nombre de “hipoxamiRs” (Kulshreshtha et al., 2007). Los hipoxamiRs tienen patrones de expresión específicos en cada tejido e inhiben la traducción de proteínas que se encuentran en la vía de los HIFs, actuando como moduladores de la respuesta. El descubrimiento de los miRNAs ha elucidado un mecanismo de regulación génica muy flexible, rápido y de alta eficiencia para explicar las respuestas adaptativas de los organismos (Voskarides, 2017).

Aunque poco se ha estudiado el papel de los miRNAs durante el proceso de aclimatación a la altitud, existen a la fecha, dos reportes que han evaluado los perfiles de expresión de miRNAs presentes en plasma sanguíneo de individuos sometidos a hipoxia hipobárica (Liu et al., 2016; Yan et al., 2016). En estos estudios se encontró un aumento en los niveles de expresión de algunos miRNAs en personas que se desplazaban desde tierras de baja altitud a lugares por encima del umbral altitudinal, los cuales, son equiparables con los niveles de expresión de los residentes de la altitud. Además, se encontraron diferencias en los patrones de expresión de los miRNAs entre residentes nativos a nivel del mar y en la altitud.

Teniendo en cuenta la importancia que podrían tener los hipoxamiRs durante el proceso de aclimatación, y además, que las respuestas a la hipoxia varían en función del tiempo y el grado de exposición, en este trabajo se midieron algunas variables hematológicas y los niveles de expresión de 5 hipoxamiRs (miR-21, miR-22, miR-130, miR-181, miR-210) en

individuos colombianos expuestos al estímulo hipóxico altitudinal durante un periodo de cuatro meses. Adicionalmente, se realizó el análisis bioinformático de estos miRNAs con el fin de establecer su posible relación con los cambios fisiológicos presentes durante la aclimatación.

El presente trabajo consta de seis partes, la primera de ellas es el marco teórico en el cual se destacan los conocimientos necesarios para el desarrollo de este trabajo, seguido de la justificación, que recalca la importancia y los alcances del escrito; en la tercera parte se mencionan los objetivos que guiaron la investigación. Las partes cuatro, cinco y seis, corresponden a la metodología, los resultados y discusión y por último las conclusiones logradas a partir de los procedimientos experimentales y bioinformáticos realizados.

# 1. Marco teórico

En este primer capítulo, se describen las bases conceptuales necesarias para la comprensión y desarrollo de la presente investigación. En primer lugar, se hace referencia a las adaptaciones fisiológicas a la altitud, luego se explican los mecanismos moleculares relacionados con la respuesta a hipoxia, entre ellos los miRNAs. Finalmente se da un breve recuento sobre la técnica de RT-qPCR usada en este estudio para la cuantificación de los miRNAs.

## 1.1 La hipoxia hipobárica

La hipoxia hipobárica se define como la disminución en el aporte tisular de oxígeno por la caída en la presión atmosférica debido a variaciones geográficas. El aire atmosférico tiene un 21% de oxígeno y una presión a nivel del mar de 760 mmHg, sin embargo, con el aumento en la altitud la presión disminuye, llegando a valores de 560 mmHg en ciudades como Bogotá -2600 m.s.n.m.- y a 400 mmHg a los 5000 m.s.n.m. Al aplicar las propiedades de los gases durante el ciclo respiratorio se encuentra una relación entre la presión atmosférica y las presiones en el interior del sistema respiratorio (ver Ecuación 1.1).

$$P_{Atm} (760mmHg) = PAO_2 + PAH_2O + PACO_2 \quad (1.1)$$

Es decir, al finalizar una inspiración, la sumatoria de las presiones alveolares de oxígeno ( $PAO_2$ ), agua ( $PAH_2O$ ) y dióxido de carbono ( $PACO_2$ ) serán iguales a la presión atmosférica ( $P_{Atm}$ ). Teniendo en cuenta que la  $PACO_2$  tiene valores muy similares a la presión arterial de dióxido de carbono ( $PaCO_2$ ) y que el contenido de oxígeno atmosférico ( $FiO_2 = 0,21$ ) y la  $PAH_2O$  (47 mmHg) permanecen relativamente constantes es posible determinar la  $PAO_2$  de acuerdo a las variaciones en la  $P_{Atm}$  (ver Ecuación 1.2).

$$PAO_2 = (P_{\text{barométrica}} - 47 \text{ mmHg}) \times FiO_2 - PaCO_2 \quad (1.2)$$

A nivel del mar, la  $PAO_2$  es de aproximadamente 159,6 mmHg, mientras que en la ciudad de Bogotá es de 117,6 mmHg. Lo anterior, corresponde a una disminución del 28% de la presión de oxígeno a nivel del alveolo y por consiguiente la reducción en la tasa de difusión del gas al torrente sanguíneo. Esta caída en la presión arterial de oxígeno ( $PaO_2$ ) es rápidamente sensada por los receptores carotideos, activando una serie de respuestas fisiológicas relacionadas con el intercambio, transporte, entrega y utilización de oxígeno en los tejidos.

En relación con el intercambio, a nivel pulmonar la tasa de difusión de oxígeno del alveolo al capilar sanguíneo depende de la  $PAO_2$ , la ventilación y el coeficiente de difusión del gas en el medio. Si la membrana intersticial se conserva intacta (Weber, 2007), es posible mitigar la disminución de la  $PaO_2$  por un aumento en la ventilación, determinada por la morfología del pulmón, la perfusión pulmonar y la frecuencia respiratoria. Por esta razón, durante la hipoxia altitudinal se presenta un aumento de la ventilación minuto, sin embargo, esto provoca la disminución en los niveles de  $CO_2$  (hipocapnia) y alcalosis sanguínea. Lo anterior, reduce la actividad de los quimiorreceptores sensibles a  $[H^+]$  y a  $CO_2$ , evitando que la magnitud de la respuesta ventilatoria se prolongue en el tiempo (Weber, 2007).

Por otro lado, la cantidad de oxígeno sanguíneo disponible para entregar se puede cuantificar mediante el contenido arterial de oxígeno ( $CaO_2$ ), el cual depende de la concentración de hemoglobina (Hb), la saturación de oxígeno (SatO), la capacidad ventilatoria y la de difusión del gas (ver Ecuación 1.3).

$$CaO_2 = (1,36 \times Hb \times SatO_2\%) + (0,003 \times PaO_2) \quad (1.3)$$

Durante la condición de hipoxia se incrementa la concentración de Hb y su cinética de disociación con el oxígeno, permitiendo mayor afinidad en la recolección a nivel pulmonar y menor afinidad a nivel tisular, esto se traduce en el aumento del transporte y la entrega de oxígeno (Sarkar, Banerjee, & Selvamurthy, 2003). Sin embargo, el exceso en la concentración de Hb puede llevar a un aumento en la viscosidad de la sangre y provocar efectos negativos a nivel cardiovascular. Por lo tanto, algunos residentes de las alturas

presentan un hematocrito y una concentración de Hb similar a la encontrada en individuos a nivel del mar, lo que sugiere, otras posibles adaptaciones que permiten mantener el suministro de oxígeno en los tejidos, por ejemplo, el aumento del gasto cardíaco y el volumen plasmático (Sarkar et al., 2003).

Para la entrega del oxígeno a los tejidos es necesario su disociación con la hemoglobina, proceso dependiente de la temperatura, el pH y la concentración de 2,3-difosfoglicerato presente en los eritrocitos. Se ha demostrado, que en mamíferos expuestos al estímulo hipóxico hay un aumento de la concentración de 2,3-difosfoglicerato en los eritrocitos. Este efector alostérico reduce la afinidad de la Hb por el oxígeno y estabiliza su conformación deoxigenada. Otro de los mecanismos relacionados con la distribución de oxígeno en los tejidos, es el aumento de los capilares por procesos angiogénicos que aumentan la superficie de entrega de sangre a los tejidos y con ello la disponibilidad de oxígeno en las células (Weber, 2007).

Teniendo en cuenta que la hipoxia provoca la disminución de la densidad mitocondrial y la capacidad metabólica, lo que conlleva a una preferencia por la vía anaerobia, el consumo de oxígeno se reduce entre un 12 a 14%. Este *switch* en el metabolismo es rápidamente compensado luego de la aclimatación y se ha demostrado que los nativos de las alturas presentan un volumen mitocondrial más bajo, pero estas presentan un aumento en la eficiencia para la producción energética (Storz, Scott, & Cheviron, 2010).

Debido a que existen diferentes formas de compensar la caída de oxígeno en la célula, vale la pena definir las diferencias entre adaptación y aclimatación. La primera de ellas hace referencia a los cambios que se presentan a nivel genético como resultado del estímulo constante de poblaciones a la hipoxia hipobárica. Por otra parte, las respuestas agudas y crónicas presentes en individuos que se desplazan por encima del umbral altitudinal reciben el nombre de aclimatación.



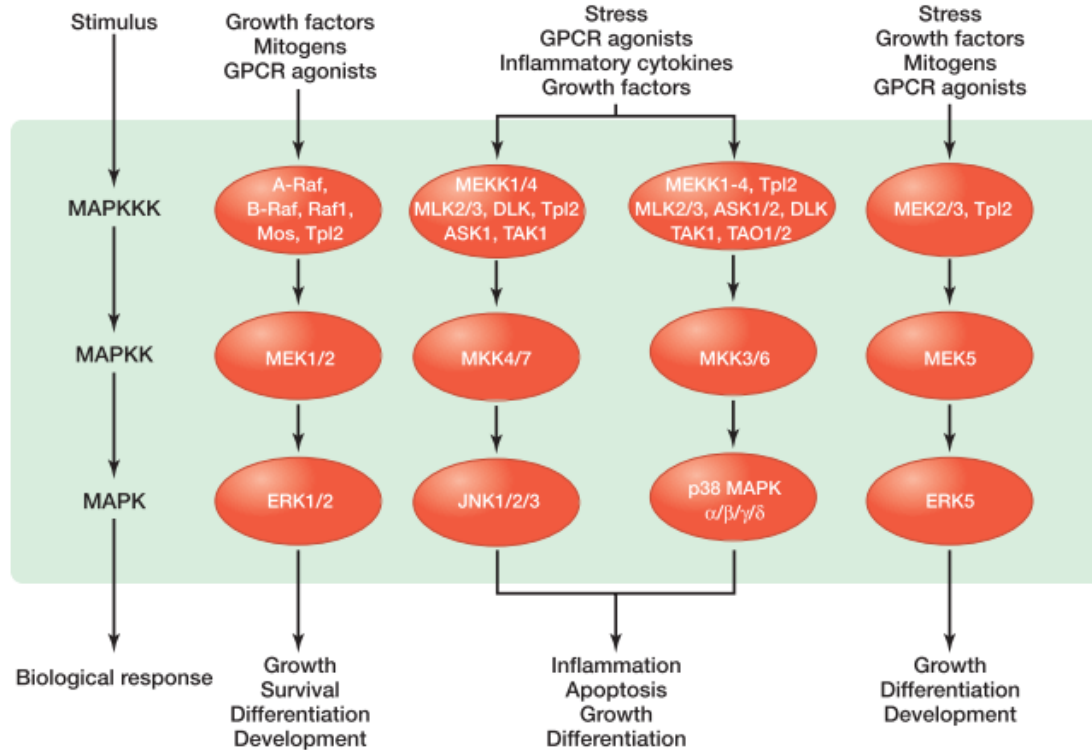
## **1.2 La respuesta ante el estrés: la vía de las proteínas quinazas activadas por mitógenos (MAPKs) y su relación con la hipoxia**

Las MAPKs son enzimas altamente conservadas, que actúan en cascadas de señalización intracelular y responden a estímulos externos para controlar procesos relacionados con el crecimiento, proliferación, diferenciación, supervivencia y apoptosis celular. Estas señales son propagadas a través de fosforilaciones que, en últimas, permiten la activación de proteínas reguladoras presentes en el citoplasma, mitocondria, aparato de Golgi, retículo endoplasmático y en el núcleo. La activación de proteínas nucleares permite la activación de factores de transcripción que regulan la expresión génica (Morrison, 2012), de allí la importancia de estas vías.

Hasta el momento, dentro de la cascada de señalización de las MAPKs se han identificado cuatro vías nombradas de acuerdo con sus componentes: La quinasa reguladora de señales extracelulares 1 y 2 (ERK 1/2), la quinasa N-terminal c-Jun (JNK), la proteína quinasa activada por estrés (p38/SAPKs) y ERK5. Cada cascada es iniciada por señales extracelulares específicas que permiten la expresión génica para ejecutar la respuesta biológica adecuada (Figura 1-1), sin embargo, a pesar de ser diferentes estas vías tienen componentes compartidos y por lo tanto puntos de integración en la señal.

Entre las funciones regulatorias que tienen las MAPKs se encuentran la activación de genes de respuesta inmediata, la supresión transcripcional, el remodelamiento de la cromatina, la regulación de la importación de proteínas al núcleo, la activación o desactivación de receptores nucleares y la determinación de la localización celular de algunos factores de transcripción (Plotnikov, Zehorai, Procaccia, & Seger, 2011).

**Figura 1-1: Vías de activación de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs).** Las cuatro vías de señalización de las MAPK (ERK1/2, JNK, p38 y SAPK) son iniciadas por señales extracelulares específicas y permiten la activación de proteínas que promueven diferentes respuestas biológicas.



Nombre de la fuente: (Morrison, 2012)

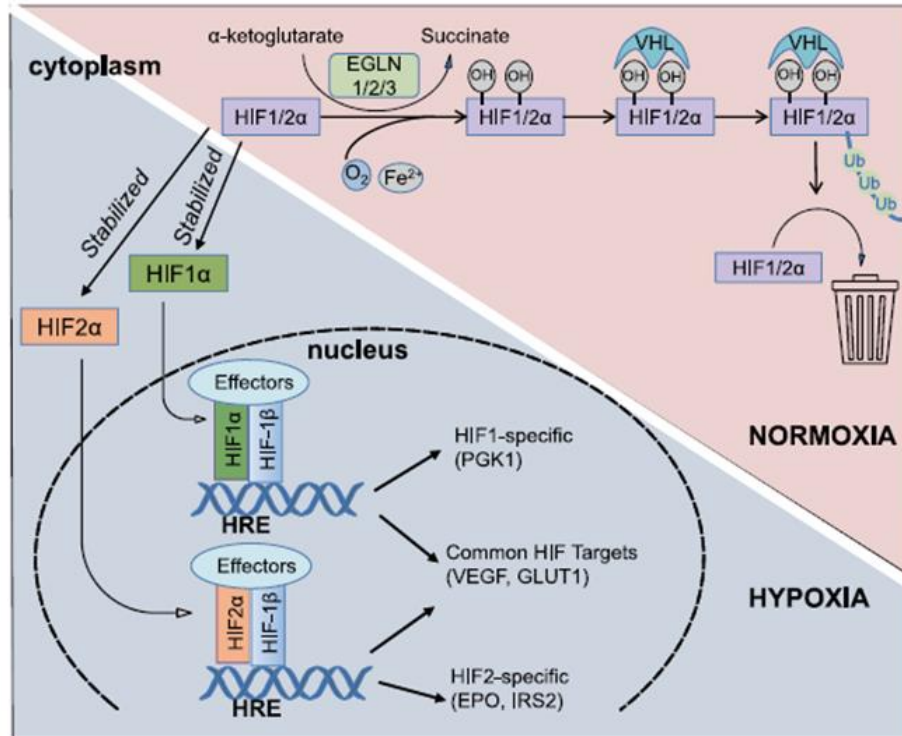
Actualmente se conoce la estrecha relación entre las MAPKs y la respuesta ante el estrés hipóxico. Por ejemplo, se ha comprobado que la activación de la vía de señalización ERK 1/2 durante la condición de hipoxia permite la fosforilación de la subunidad alfa del factor inducible por hipoxia (HIF-1α) y su posterior translocación al núcleo para promover la transcripción génica (Mylonis et al., 2006). De igual forma, las MAPKs fosforilan al coactivador transcripcional p300 promoviendo la formación del complejo HIF-p300/CBP, necesario para la activación transcripcional de HIF, estableciendo un punto de regulación en la respuesta hipóxica (Sang, Stiehl, Bohensky, Leshchinsky, & Srinivas, 2015). Por otra parte, la activación del eje PI3K/akt promueve la transcripción del gen *hif1a* aumentando su expresión y la disponibilidad de HIF-1α a nivel celular (Karapetsas, Giannakakis, Pavlaki, Panayiotidis, & Sandaltzopoulos, 2011). Estos hallazgos dan cuenta de mecanismos involucrados en la regulación de la respuesta hipóxica cascada arriba de los efectuados por los HIFs.

### 1.3 Los factores inducibles por hipoxia (HIFs)

Los principales responsables de la respuesta celular ante el estímulo hipóxico son los HIFs, heterodímeros compuestos por dos subunidades, una subunidad alfa con tres isoformas (HIF-1a, HIF-2a, HIF-3a) que se caracterizan por su corta vida media y una subunidad beta (HIF-b), que se expresa constitutivamente y se localiza a nivel nuclear. Estas dos subunidades pertenecen a la familia de factores de transcripción con dominios hélice-loop-hélice. Específicamente, la actividad de los HIFs es mediada por la estabilidad de HIF-a y esta depende de la concentración de oxígeno; una vez se detecta la caída de la presión arterial de oxígeno ocurre la traslocación de HIF-a al núcleo de las células. Allí, se forma el complejo heterodimérico con HIF-b, el cual se une a elementos de respuesta a hipoxia (HRE)  $-(A/G)CGTG-$  en los promotores de genes específicos que desencadenan una respuesta pleiotrópica (Nallamshetty, Chan, & Loscalzo, 2013; G. L. Semenza, 2012).

En condiciones de normoxia, HIF-a es rápidamente degradado por las prolin hidroxilasas (PHD1, PHD2, PHD3), enzimas que tienen una función como sensores de oxígeno y que requieren hierro como cofactor. Las PHDs hidroxilan dos residuos de prolina altamente conservados en HIF-a, lo que permite su posterior reconocimiento por el complejo de la proteína VHL (von Hippel-Lindau) que lo poliubiquitina para su degradación proteosomal (Figura 1-2) (Y. Huang, Lin, & Taniguchi, 2018). Mientras que en normoxia el tiempo de vida media de HIF es de aproximadamente 5 minutos, en condiciones de hipoxia puede aumentar hasta los 30 minutos (Schönenberger & Kovacs, 2015; Wheaton & Chandel, 2019). Adicionalmente, la función de HIF-1a está regulada por el factor inhibidor de HIF-1 (FIH-1), que tiene como función hidroxilar un residuo de asparagina (Asn803 en HIF-1a de humano) en una reacción catalizada por una PHD que utiliza oxígeno y  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG). La hidroxilación en este residuo bloquea la interacción de HIF-1a con coactivadores como p300 y CBP (proteína de unión a CREB) (G. L. Semenza, 2011)

**Figura 1.2: Regulación dependiente de oxígeno de la proteína HIF-a.** Durante la condición de normoxia, HIF-a es rápidamente hidroxilado en una reacción dependiente de oxígeno y hierro. En hipoxia esto no ocurre, lo que permite la estabilización de HIF-a, su translocación al núcleo y su dimerización con HIF-b para promover la transcripción génica.



Nombre de la fuente: (Y. Huang et al., 2018)

Una vez en el núcleo, el heterodímero de HIF se une a los HREs presentes en regiones promotoras de un conjunto de más de 100 genes (G. Semenza, 2007). Entre los genes que tienen HREs se encuentran aquellos que están involucrados en procesos a nivel sistémico como angiogénesis (*vegf*, factor de crecimiento vascular endotelial), eritropoyesis (*epo*, eritropoyetina), muerte celular, inflamación, vasoreactividad, metabolismo de glucosa (*glut1*, transportador de glucosa 1), entre otros (Nallamshetty et al., 2013).

## 1.4 Los microRNAS

Los microRNAs (miRNAs) son transcritos cortos (22-25 nt) no codificantes que regulan la expresión génica mediante la unión a secuencias de mRNA complementarias, degradándolas o evitando la traducción a nivel ribosomal (Bartel, 2013). Un miRNA actúa

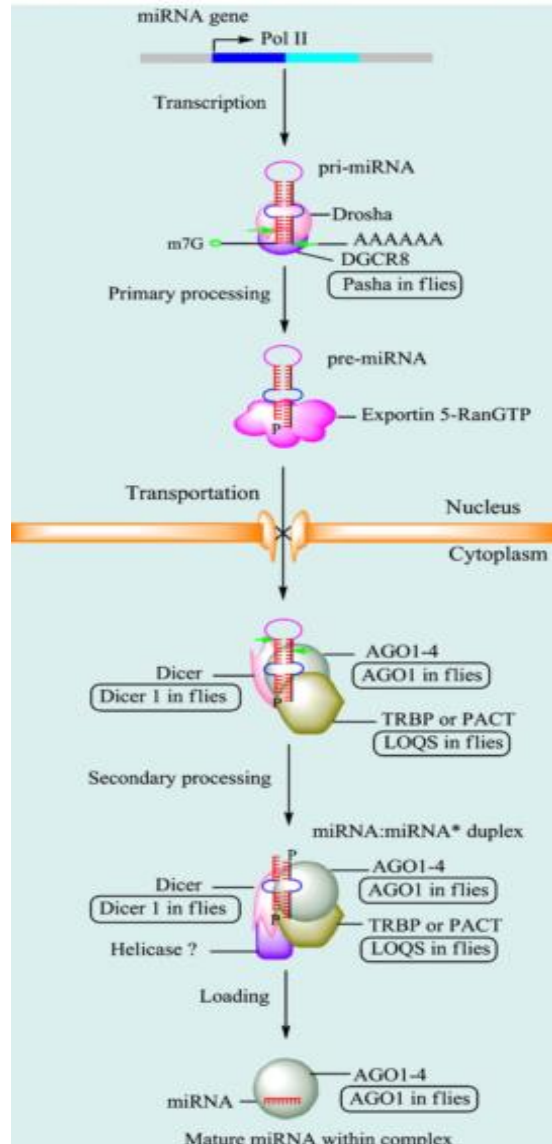
sobre varios genes o varios miRNAs pueden regular el mismo gen, lo cual genera efectos cooperativos en la respuesta celular. Así mismo, la actividad de los miRNAs permite a la célula responder ante estímulos de diferente origen e intensidad y su alteración ha sido asociada con desarrollo de patologías como la diabetes, la hipertensión, enfermedades cardíacas y el cáncer (Gee, Ivan, Calin, & Ivan, 2014).

### **1.4.1 Biogénesis de los miRNAs**

Los miRNAs generalmente están codificados en regiones intrónicas del genoma y son transcritos como pri-miRNA -primary transcript- por una polimerasa tipo II, por lo tanto, tienen en sus extremos la estructura tipo cap (5´) y la cola poli A (3´). Dentro del núcleo, este transcrito se pliega formando una estructura secundaria, la cual es reconocida por la endonucleasa de RNA III DROSHA y la proteína de unión al DNA de cadena doble DGCR8 (Figura 1-3).

La proteína DGCR8 se une al loop del pri-miRNA y guía a DROSHA a clivar desde el nucleótido 11 de la base del pri-miRNA, creando una molécula hairpin de RNA de entre 80 a 100 pb llamado pre-miRNA. Esta estructura es transportada del núcleo al citoplasma por medio de la exportina 5, una vez allí, una segunda endonucleasa RNAasa III –DICER- cliva el pre-miRNA produciendo una molécula de doble cadena de 22 a 25 nucleótidos. Una de estas cadenas se une al complejo de silenciamiento de RNA (RISC) -conformado por la proteína DICER, un miembro de la familia Argonauta (AGO) y la proteína de unión al RNA-, mientras que, la otra cadena es generalmente degradada (Figura 1-3). El miRNA maduro es llevado por RISC al extremo 3´ UTR de mRNAs específicos que presentan complementariedad con el miRNA, lo cual resulta en la inhibición de la traducción o en la degradación del transcrito (Wahid, Shehzad, Khan, & Kim, 2010).

**Figura 1-3: Vía de síntesis de los miRNAs.** Los miRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II, lo que resulta en la formación del pri-miRNA. Este transcrito es procesado por DROSHA y DGCR8 para formar el pre-miRNA, el cual es exportado al citoplasma por la exportina 5. En el citoplasma, la proteína DICER cataliza un nuevo procesamiento para producir el miRNA de doble cadena (miRNA:miRNA). Una de estas cadenas es degradada y la otra se une al complejo de silenciamiento RISC para formar el miRNA maduro.



Nombre de la fuente: (Wahid et al., 2010)

### 1.4.2 Mecanismo de reconocimiento de los blancos de los miRNAs

Los miRNAs regulan la expresión de aproximadamente un tercio del genoma humano y establecen redes complejas, debido a que un miRNA puede regular la expresión de varios

genes y así mismo, un gen puede ser regulado por más de un miRNA (Orang, Safaralizadeh, Kazemzadeh-Bavili, & Chen, 2014). A diferencia de los miRNAs de las plantas, los cuales se unen con sus blancos por apareamientos perfectos de Watson y Crick, en los animales esto no ocurre de igual manera, lo que ha llevado a realizar predicciones computacionales sesgadas.

Los estudios computacionales fueron los primeros en dar a luz los mecanismos de regulación de los miRNA en animales, al indicar que, existen regiones altamente conservadas en los miRNAs que hacen un apareamiento con las secuencias del mRNA blanco. Estas regiones son denominadas “región semilla” y se encuentran entre los nucleótidos 2 a 7 del extremo 5’ del miRNA (Bartel, 2013). Al realizar análisis bioinformáticos con la secuencia “semilla” y alinear las secuencias 3’UTR de genes ortólogos, se encuentra que, todos los miRNA de una misma familia comparten sitios de unión en las secuencias de estos transcritos (Bartel, 2004). Aunque una alta especificidad requiere de un apareamiento perfecto de Watson y Crick con las regiones UTR del mRNA, el apareamiento no siempre ocurre de esta manera y nuevos refinamientos en las predicciones bioinformáticas son necesarios (Yonghua Wang, Li, Ma, Yang, & Ai, 2010).

Computacional y experimentalmente se ha demostrado que el sitio de unión del miRNA al mRNA se da en el extremo 3’ UTR, no obstante, también se han encontrado secuencias de unión en el 5’UTR de los transcritos e inclusive en las regiones codificantes. Aunque la regulación de este tipo es poco común, algunos genes tienen más de un sitio de unión en el marco abierto de lectura, haciéndolos más susceptibles a la regulación por parte de los miRNAs. De igual manera, la regulación no solo depende del sitio de unión, sino también de su contexto, en particular la unión en la terminación del UTR y regiones ricas en A y U aparecen como determinantes en la eficiencia de la regulación. Otro factor determinante en el reconocimiento de los miRNA es la longitud del extremo 3’UTR, el cual puede ser acortado por diferentes procesos de poliadenilación y, de esta manera, disminuir los posibles sitios de unión del miRNA. Lo anterior se demuestra en estructuras de genes constitutivos, por ejemplo, los genes que codifican proteínas ribosomales (Orang et al., 2014).

En relación con los niveles de expresión, la tendencia es que, tanto el mRNA como el miRNA que tienen sitios de unión se expresen en el mismo tejido, lo que produce una

disminución parcial en la concentración del mRNA. También se ha visto que tejidos con altos niveles de miRNA y su blanco se ubican cercanos unos a otros. Esta característica enfatiza el rol de los miRNAs en el desarrollo y mantenimiento de la identidad del tejido. Por el contrario, aquellos mRNAs que contienen secuencias no conservadas con su miRNA se expresan en tejidos donde el miRNA no se expresa (Bartel, 2013).

En síntesis, el desarrollo, homeostasis y la respuesta a factores externos depende de la expresión coordinada de genes a través de redes regulatorias, en este sentido, la inclusión de los miRNA incrementa la precisión en la red. Lo anterior, es debido a que la respuesta dependiente de genes y factores de transcripción puede producir una alta tasa de variación fenotípica. A pesar de esto, es ampliamente aceptado que los miRNA solo regulan de manera parcial los transcritos de mRNA, con el fin de ampliar la robustez de la red y disminuir las variaciones del fenotipo frente a las perturbaciones. De esta manera los miRNA son candidatos a la canalización de las especies -disminución en la variabilidad de un rasgo- permitiendo la evolución del rasgo, ya que la heredabilidad es esencial para su evolución por selección natural. Debido a la función de canalización, los miRNAs contribuyen a la herencia de características esenciales en los fenotipos y contribuyen en la evolución de los linajes (Berezikov, 2011)

### **1.4.3 Fuentes genómicas de nuevos miRNAs**

El primer miRNA fue encontrado en el año 1994 en *Drosophila*, sin embargo, pasaron casi siete años antes de comprender que los miRNA juegan un papel importante en la regulación de la expresión génica. Estos hallazgos abrieron un nuevo campo de investigación con el fin de comprender la biogénesis, los mecanismos de acción y el papel de los miRNAs en los organismos (Berezikov, 2011).

Se ha demostrado que durante la evolución del filo de los bilateria se han conservado unos 34 miRNAs entre deuterostomos y protostomos, indicando una fuente de innovación génica. Además, se ha confirmado que casi un tercio de los miRNAs son adquiridos durante cada una de las derivaciones filogenéticas y su tasa de pérdida es muy baja, ejemplo de ello, es que al comparar los genomas de varios deuterostomos como los humanos, las lampreas y los gusanos solo se han perdido 12 genes de miRNAs. La evidencia filogenética indica una correlación entre el número de miRNAs expresados y la



complejidad del organismo (Berezikov, 2011), ya que se ha encontrado que en animales vertebrados y placentarios existe un aumento del número de miRNAs.

Para que un nuevo miRNA aparezca en algún *locus*

genético, el aspecto más importante es la formación en el transcrito de una estructura secundaria en forma de hairpin que pueda ser reconocido por las proteínas DROSHA y DICER para su posterior procesamiento. Debido a que termodinámicamente los RNAs tienen una alta probabilidad de organizarse en estructuras secundarias, la formación de nuevos miRNAs como mecanismo de regulación es una alternativa más simple que la formación de una nueva proteína, proceso que llevaría mucho más tiempo a nivel evolutivo (Spengler, 2013).

La evidencia sugiere que los miRNAs pueden formarse por duplicación génica, en cuyo caso, se presentan variantes de un miRNA con una alta similitud en la región semilla, estos son agrupados en familias permitiendo procesos de subfuncionalización o neofuncionalización. Otros miRNA se encuentran localizados en intrones de genes que codifican para proteínas, estos puntos son de fácil adaptación para la formación de estructuras tipo hairpin. Por otra parte, la formación de genes *mir* menos conservados y específicos al linaje tienden a surgir a través de transposones y retrotransposones.

Además de las fuentes genómicas para la formación de nuevos miRNAs, también existen diferentes mecanismos de diversificación de sus secuencias. Entre ellos, se encuentran las mutaciones en las secuencias semilla, en los sitios de corte para el procesamiento de los pri-miRNAs y pre-miRNAs, el cambio del brazo que produce el miRNA maduro y la edición de bases nitrogenadas. Estas variaciones pueden tener una alta significancia biológica al modificar los blancos y el procesamiento de los miRNAs, convirtiéndose en un mecanismo de regulación aguda y rápida ante los estímulos externos (Berezikov, 2011).

#### **1.4.4 Los miRNAs circulantes**

El descubrimiento de miRNAs en diferentes fluidos biológicos -orina, saliva, sangre y plasma- ha permitido el desarrollo de metodologías para su cuantificación y su posterior uso como biomarcadores. Por ejemplo, los cambios en los niveles de expresión de 4 miRNAs plasmáticos (miR-223, miR-128a, miR-128b y let-7b) permiten diferenciar de manera muy precisa entre la leucemia mieloide aguda y la leucemia linfoblástica aguda (Li

et al., 2014). Aunque se han identificado diferentes miRNAs asociados a estados patológicos, aún se desconocen los mecanismos implicados en la liberación y la función biológica de los mismos (Turchinovich, Weiz, Langheinze, & Burwinkel, 2011).

Respecto a los mecanismos de liberación de los miRNAs se han hecho diferentes hipótesis. En un principio, se propuso que la liberación de los miRNAs se producía por la ruptura de la continuidad de la membrana en células apoptóticas, lo que permite su encapsulación en cuerpos apoptóticos y su posterior salida al espacio extracelular. Sin embargo, algunos hallazgos han demostrado que unos miRNAs se encuentran en mayor concentración a nivel extracelular que intracelular indicando que deben existir otros mecanismos involucrados en la liberación y que además este proceso es selectivo. De hecho, estudios *in vitro* han demostrado el incremento de la concentración de miRNAs específicos en el medio líquido al sobre expresar algunos factores de transcripción, lo cual, pone de manifiesto mecanismos coordinados para la liberación de miRNAs que pueden ser modulados por estímulos externos (Turchinovich, Tonevitsky, & Burwinkel, 2016). De acuerdo con lo anterior, se han logrado evidenciar patrones dinámicos y específicos en la abundancia de miRNAs circulantes que reflejan eventos patológicos y procesos fisiológicos, por ejemplo, durante el periodo de diferenciación perinatal, la diferenciación mioblástica o en el ejercicio (Turchinovich, Weiz, & Burwinkel, 2012).

Las observaciones más consistentes indican que la liberación de los miRNAs se produce a través de cuerpos multivesiculares o exosomas que median la transferencia de mRNAs y miRNAs entre células, regulando así, la actividad en células receptoras. Un ejemplo de lo anterior es el músculo, que necesita una comunicación constante con el hígado y el cerebro, con lo cual se ha propuesto que los mio-miRs (miRNAs relacionados con la función muscular) pueden actuar como mioquinas que transfieren información a estos órganos. Esta transferencia de vesículas o exosomas se ha comprobado experimentalmente *in vitro* y promueve efectos funcionales en células receptoras, además, debido a que la liberación de vesículas es un proceso controlado, permite proteger a los miRNAs de la degradación y tener como destino tejidos definidos, ya que el contenido proteico de la membrana vesicular se une a receptores específicos. Por otra parte, las investigaciones relacionadas con la selectividad del proceso de encapsulación, han encontrado motivos de unión específicos entre algunos miRNAs circulantes y las proteínas AGO. También, existen modificaciones postraduccionales que pueden influir en este

proceso ya que se reportado que los miRNAs que se encuentran a nivel intracelular están poliadenilados mientras que, en las vesículas se encuentran poliuracilados (Makarova et al., 2016).

En contraposición a lo anterior, también se encuentran en la literatura, estudios que niegan la función de comunicación celular de los miRNAs. Estos se basan principalmente en el hecho de que en los estudios en los que se ha demostrado el transporte vesicular, la cantidad de vesículas utilizadas a nivel *in vitro* es comparable al número total de vesículas en plasma, además, se ha demostrado que algunos miRNAs circulantes están en muy pequeñas cantidades, inclusive una copia por exosoma. Lo anterior, no permite saber si el número de miRNAs transportados *in vivo* es suficiente para mediar los cambios en la transcripción entre tejidos (Turchinovich et al., 2016). Vale la pena destacar que, a pesar de que se ha reportado ampliamente en la literatura el transporte de miRNAs circulantes dentro de exosomas o vesículas, más del 95% de los miRNAs circulantes plasmáticos no se encuentran encapsulados. Por el contrario, se encuentran asociados a proteínas, que en conjunto con las características propias del miRNA, permiten su estabilidad soportando altas concentraciones de RNAsas, variaciones del pH, ciclos de calentamiento-enfriamiento y almacenamiento por largos periodos de tiempo.

A la fecha, el campo de estudio de los miRNAs circulantes continúa ampliándose, por lo tanto, aún se desconoce con exactitud los mecanismos involucrados y las funciones que pueden cumplir los miRNAs que salen al espacio extracelular. Sin embargo, existe más evidencia que indica su función endocrina y paracrina con células adyacentes o inclusive con otros órganos (Makarova et al., 2016; Turchinovich et al., 2016), tal como ocurre en las plantas. De hecho, el descubrimiento de que algunos miRNAs de plantas pueden ser encontrados en el suero y plasma de mamíferos, y que además logran regular la expresión génica en estos, ha abierto el debate de los miRNAs en la interacción entre organismos (W. Wang et al., 2018; Zhang et al., 2016). Así mismo, teniendo en cuenta que los miRNAs tienen patrones de expresión específica en cada tejido, pueden convertirse en potenciales biomarcadores y blancos terapéuticos para el tratamiento de diferentes condiciones.

#### **1.4.5 El papel de los miRNAs en la adaptación humana**

Una de las mayores dificultades de la biología, ha sido la explicación de la ganancia de un sin número de rasgos característicos de cada especie, este conjunto de rasgos es

denominado el fenotipo, el cual, se encuentra altamente influenciado por la secuencia genética de cada organismo, sin embargo, esto no logra explicar su variabilidad, lo que se denomina plasticidad fenotípica. Esta variabilidad en la expresión génica se ve alterada por condiciones medio ambientales como la temperatura, el estrés y los ritmos circadianos; si los fenotipos fueran constantes, el proceso de adaptación a diferentes situaciones sería muy complicado (Voskarides, 2017). La plasticidad, como se definió anteriormente, no requiere de la mutación genética debido a que la selección natural puede actuar sobre los fenotipos y gradualmente estabilizarlos, hasta lograr un estado ideal. Cuando se logran mantener constitutivamente estos niveles de plasticidad se llega a una asimilación genética, en la cual, el estímulo externo no es necesario para expresar el fenotipo, sin embargo, esta variación se da bajo condiciones extremas o prolongadas con el fin de evitar la eliminación de la especie.

Muchos estudios han asociado a los miRNA con diferentes enfermedades humanas, ya que mutaciones, alteraciones en la regulación y disfunción de la biogénesis de los miRNA o sus blancos producen alteraciones significativas en la fisiología. Sin embargo, alteraciones moderadas en los patrones de expresión de los miRNA, pueden determinar la plasticidad fenotípica de los organismos al controlar los niveles normales de expresión génica. De hecho, la complejidad de las redes de regulación de los miRNAs y su flexibilidad permiten una alta tasa de regulación ante diferentes estímulos, por ejemplo, en respuesta a la hipoxia altitudinal, frío, anoxia, temperatura, alteración de factores bióticos, estrés UV y salino, etc. Estas respuestas no son solo globales sino también locales, brindando plasticidad en el sistema nervioso en relación a la formación de sinapsis, experiencia sensorial y formación de memoria en el hipocampo (Voskarides, 2017).

## **1.5 miRNAs en la hipoxia: Los hipoxamiRs**

El estímulo hipóxico regula la expresión de algunos miRNA que se han denominado “hipoxamiRs”. Aunque la expresión de estos miRNA puede variar dependiendo del contexto celular y fisiológico, existen una serie de hipoxamirs que se expresan de manera regular ante la disminución del oxígeno, inclusive en diferentes situaciones (Nallamshetty et al., 2013). Algunos de estos miRNA, tienen como objetivo el mRNA de proteínas relacionadas con la programación metabólica, reparación de DNA, apoptosis,

angiogénesis y otras adaptaciones presentes durante la hipoxia (Guimbellot et al., 2009; Kulshreshtha et al., 2007).

Los hipoxamiRs no solo regulan algunas proteínas encargadas de la respuesta a la hipoxia, sino que, pueden considerarse reguladores de elementos claves en las diferentes cascadas de señalización dependientes de la vía HIF (Nallamshetty et al., 2013). Algunos son reguladores directos de la expresión de *hif1a*, por ejemplo el miR-210 o el miR-424, que son inducidos por la hipoxia a través del gen *hif1a* y estabiliza a HIF-1 evitando ser degradado (Fasanaro et al., 2008). Otros, por el contrario, como el miR-20b y miR-199a, disminuyen durante la hipoxia, incrementando la expresión del gen *hif1a* y por lo tanto la traducción de HIF. Algunos otros tienen función de retroalimentación negativa, por ejemplo miR-155 se aumenta por la condición de hipoxia y se une al transcrito del gen *hif1a*, evitando así, la respuesta hipóxica prolongada en células intestinales (Kulshreshtha et al., 2007). Los hipoxamiRs reportados en la literatura se pueden encontrar en la Tabla 1-1.

El estímulo hipóxico puede ser rápido, transitorio y localizado como ocurre en diferentes tipos de isquemia cerebral o puede ser sistémico por condiciones extremas como la variación de la presión alveolar de oxígeno, que se presenta en los escaladores de montaña como un proceso de aclimatación. También puede darse un proceso permanente de hipoxia como es la adaptación de las especies a diferentes niveles altitudinales. Independientemente del tipo de estímulo –agudo o crónico-, los miRNAs pueden ser responsables de la respuesta biológica a la hipoxia por la respuesta coordinada de diferentes genes.

Se han hecho varios estudios *in vitro* (Ivan, Krichevsky, & Gabriely, 2009; Xu et al., 2011)(Xu et al., 2011) para identificar los posibles “hipoxamiRs” que se expresan ante diferentes situaciones y en diferentes tipos de células, sin embargo, a la fecha solo se encontraron tres estudios que realizaron análisis transcriptómico de miRNA *in vivo* (Liu et al., 2016; Yan et al., 2015, 2016). Estos estudios realizados con tibetanos que habitan a 3560 msnm y con chinos Han que habitan a 8,9 msnm evaluaron el papel de los miRNAs como posibles elementos regulatorios del proceso de adaptación a la altura. Al realizar perfiles de miRNAs circulantes evidenciaron diferencias entre estas poblaciones encontrando que, entre los residentes Han –nivel del mar- y los tibetanos, se aumentó la

expresión de 105 miRNA y 67 disminuyeron su expresión, sin embargo, no todos estos miRNAs son considerados como hipoxamiRs.

**Tabla 1-1: Lista de hipoxamiRs de mamíferos en respuesta a hipoxia.** Lista de hipoxamiRs revisados en la literatura que aumentan o disminuyen sus niveles de expresión ante la condición de hipoxia.

Upregulated by Hypoxia	Downregulated by Hypoxia
Let-7b,e,1 [33]	Let-7a,c,d,f [33]
miR-7 [105]	miR-15b [105]
miR-21 [2]	miR-16 [33]
miR-23a,b [2]	miR-19a [33]
miR-24 [2]	miR-20a,b [33]
miR-26a,b [33]	miR-29b [105]
miR-27a [105]	miR-30e [105]
miR-30b [33]	miR-92 [106]
miR-93 [2]	miR-101 [105]
miR-98 [105]	miR-122a [105]
miR-103 [2]	miR-135a [110]
miR-106a [2]	miR-141 [105]
miR-125b [2]	miR-186 [2]
miR-130 [106]	miR-197 [105]
miR-146a,b [8]	miR-199a [111]
miR-148a,b [105]	miR-200b [112]
miR-151 [33]	miR-224 [33]
miR-181a,b,c [2, 33]	miR-320 [105]
miR-188 [33]	miR-374 [33]
miR-191 [105]	miR-422b [105]
miR-192 [2]	miR-449a,b [113]
miR-195 [105]	miR-565 [105]
miR-199a-5p [107]	
miR-204 [108]	
miR-205 [109]	
miR-210 [2, 33, 87]	
miR-213 [2]	
miR-335 [109]	
miR-373 [105]	
miR-424 [11, 104]	
miR-429 [105]	
miR-451 [95]	
miR-491 [109]	
miR-498 [105]	
miR-563 [105]	
miR-572 [105]	
miR-628 [105]	
miR-637 [105]	

Nombre de la fuente: (Nallamshetty et al., 2013)

## 1.6 Técnicas experimentales empleadas para el estudio de expresión de los miRNAs

Existen diferentes maneras de evaluar la expresión de los miRNAs, entre ellas se encuentra la secuenciación directa (RNA-seq), los microarreglos o la qRT-PCR, siendo esta última una de las más utilizadas por la alta especificidad y sensibilidad que ofrece una reacción en cadena de polimerasa (PCR). La PCR es un proceso enzimático que permite que regiones específicas de DNA puedan ser amplificadas exponencialmente generando grandes cantidades del fragmento seleccionado y de esta manera facilitar la medición de la expresión génica. En la PCR tradicional (a punto final), la detección o cuantificación de la secuencia amplificada es realizada luego del último ciclo de amplificación y requiere de un análisis posterior, por ejemplo, un gel de electroforesis. Por otro lado, en la PCR en tiempo real (qPCR) el producto amplificado es medido en cada ciclo, lo que permite determinar con gran precisión la cantidad inicial de plantilla (BioRad, 2006).

Generalmente la PCR consta de tres etapas, la primera de ellas se realiza a una temperatura de 95° C lo que permite la desnaturalización de la doble cadena de DNA y su separación en cadenas simples. Es necesario que esta fase sea lo suficientemente larga para separar la molécula de DNA sin llegar a dañarla, ya que la degradación o la desnaturalización incompleta durante esta fase, puede resultar en una disminución en la sensibilidad de la reacción. Este paso se repite en cada ciclo en tiempos más cortos que la desnaturalización inicial, para luego disminuir la temperatura a la cual los *primers* se unen con el DNA (*Annealing*). La segunda etapa se denomina de anillaje o *annealing*, en esta, la pareja de *primers* se une a la secuencia complementaria de DNA de cadena simple rodeando el fragmento a amplificar, en general, la temperatura de anillamiento es aproximadamente 5° C por debajo de la temperatura de *melting* de los *primers*. El paso final de extensión se realiza a una temperatura aproximada de 72°C, lo que permite que la enzima polimerasa extienda las secuencias de los *primers* desde el extremo 3' para obtener el fragmento de interés, denominado amplicon. Debido a que las temperaturas y los tiempos de incubación son dependientes del instrumento, los reactivos y la longitud de la secuencia a amplificar, es necesario establecer las condiciones óptimas para cada experimento (Nolan, Huggett, & Sanchez, 2013).

A diferencia de la PCR convencional, la qPCR utiliza un sistema de detección de fluorescencia que permite cuantificar el aumento del número de copias del gen de interés

durante cada ciclo, es decir, cada vez que transcurren las 3 etapas. Entre los compuestos fluorescentes, el SYBR green es el colorante de unión al DNA más usado para los análisis de qPCR, este se une de manera no específica a las cadenas dobles de DNA aumentando hasta 1000 veces su fluorescencia. Las ventajas de usar un compuesto fluorescente son la sencillez y simplicidad en los ensayos, un costo más bajo y la posibilidad de comprobar la especificidad de la reacción a través de la curva de *melting*. Además del SYBR green, se han diseñado otros métodos para cuantificar la fluorescencia durante los ciclos de la qPCR, estos se basan en los principios de la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) y el *quenching*, con lo que se asegura que la fluorescencia es específica al amplicon, por ejemplo, se han desarrollado las sondas TaqMan, las pruebas de hibridación y las pruebas de eclipse, entre otras. Actualmente, es posible el uso de una molécula fluorescente para diferentes amplicados, lo que permite cuantificar la expresión de diferentes genes en una sola reacción de qPCR (BioRad, 2006).

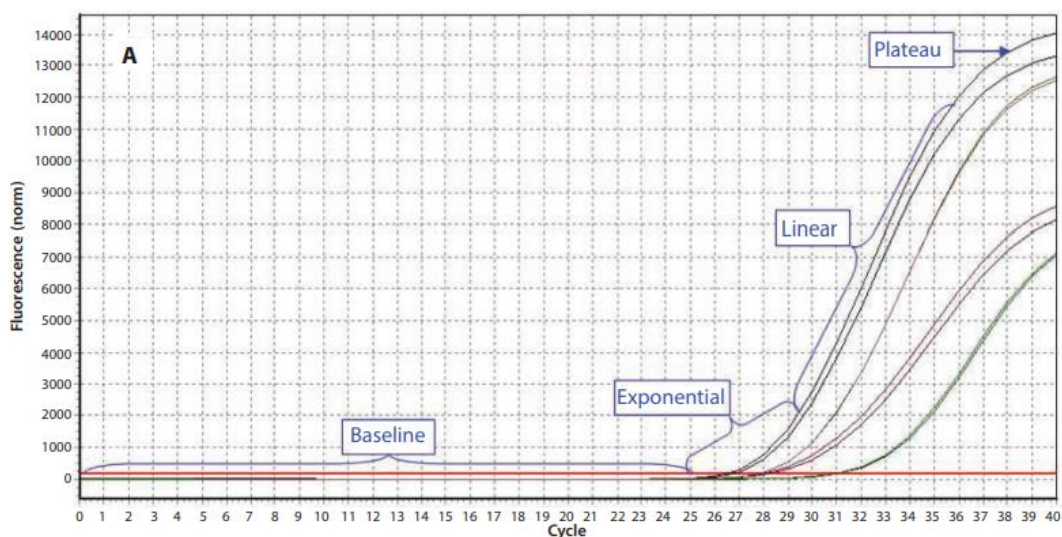
### 1.6.1 Principios de la qPCR

Al realizar una qPCR el resultado final se presenta en el gráfico de amplificación, en el cual, el número de ciclos se presenta en el eje X y la fluorescencia de la reacción en el eje Y, esta última es proporcional a la cantidad de producto amplificado en el tubo. Al observar la curva de amplificación se hace evidente un primer momento, en el que se presenta un aumento exponencial de la cantidad de producto de PCR que se duplica en cada ciclo, seguido de una fase lineal de amplificación y por último una meseta o "*plateau*", en la que los componentes de la reacción son consumidos y alguno de ellos termina siendo limitado, evitando el incremento continuo de la fluorescencia (Figura 1-4).

Una vez que el producto de la qPCR se acumula, emite una señal detectable por encima de la línea de base y empieza la fase exponencial, este punto se denomina el ciclo umbral o Cq (*quantification cycle*). El valor de Cq depende de la cantidad inicial de plantilla presente en la reacción, por lo tanto, a mayores cantidades iniciales de DNA pocos ciclos serán necesarios para llegar al Cq y por ende su valor será más bajo. Por el contrario, a medida que disminuye la cantidad de plantilla el valor de Cq aumentará proporcionalmente, esta relación es la que permite determinar la cantidad inicial de DNA presente en la reacción.



**Figura 1-4: Gráfico de amplificación durante una reacción de qPCR.** Durante la fase inicial (*baseline*) la fluorescencia es insuficiente para lograr discriminar el ruido presente en la reacción. Luego, en la fase exponencial se supera el umbral de fluorescencia y los reactivos están en suficiente cantidad para lograr una eficiencia del 100%. En la fase lineal los reactivos empiezan a agotarse y se presenta un decaimiento en la actividad enzimática y por último, la fase estacionaria (*plateau*) indica que alguno de los reactivos se ha limitado y por lo tanto el producto obtenido es constante.



Nombre de la fuente: (Nolan et al., 2014)

Debido a que la cuantificación está basada en la relación entre la cantidad inicial de plantilla y el valor de  $C_q$ , es necesario garantizar unas condiciones óptimas de la qPCR con el fin de obtener resultados reproducibles y precisos en las muestras a analizar. Para ello, el primer paso es realizar una curva estándar con diluciones seriadas de la plantilla, esta curva se grafica con el logaritmo de la cantidad inicial o el factor de dilución en función del valor de  $C_q$  de cada una de las diluciones. La ecuación de la regresión lineal, el coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ) o el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) son utilizados para evaluar si las condiciones de la qPCR son adecuadas (BioRad, 2006). Por ejemplo, el valor  $r$  ó  $R^2$  demuestra que tan bien se acoplan los datos experimentales a la regresión lineal, es decir qué tan lineal es la curva, del mismo modo, la linealidad muestra la variabilidad

entre ensayos y sus replicados y si la eficiencia de la qPCR es la misma para diferentes cantidades iniciales de plantilla. Se recomienda que el valor de  $R^2$  esté por encima de 0,98. Una vez se obtiene la gráfica es posible calcular la eficiencia usando el valor de la pendiente de la ecuación lineal (ver Ecuación 1.4). Generalmente, la eficiencia suele presentarse en valores porcentuales, es decir el porcentaje de plantilla amplificado en cada ciclo (ver Ecuación 1.5).

$$E = 10^{\left(-\frac{1}{\text{Pendiente}}\right)} \quad (1.4)$$

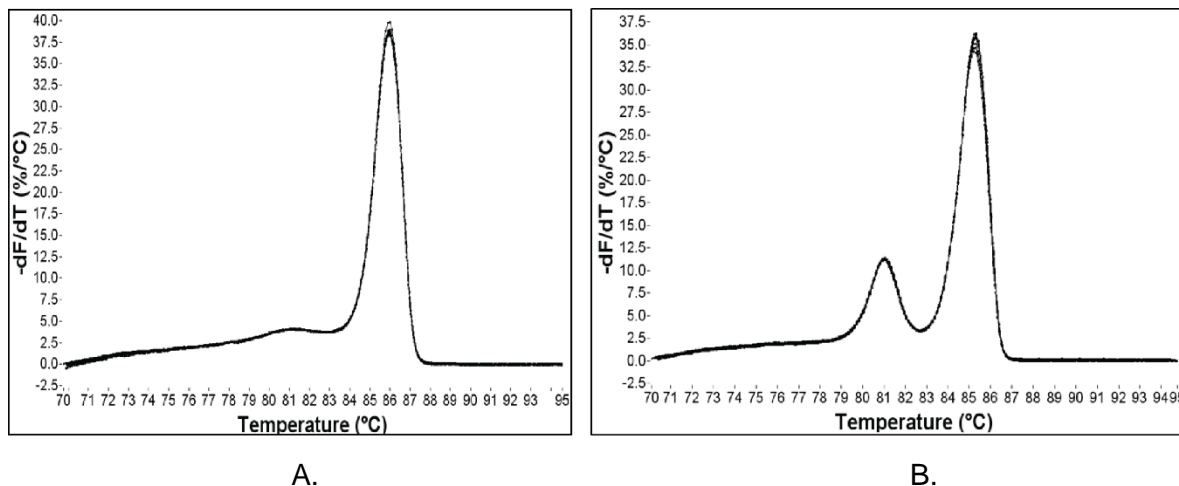
$$\%Eficiencia = (E - 1) * 100 \quad (1.5)$$

Una eficiencia del 100% indica que con cada ciclo el total de la plantilla es duplicada, sin embargo, se ha establecido que valores de eficiencia entre 90 y 110% son aceptables. Los valores bajos de eficiencia pueden asociarse a un mal diseño de los *primers* o a condiciones subóptimas de la PCR, por otro lado, eficiencias mayores al 100% indican errores en el pipeteo – ya sea durante la realización de las diluciones o en el montaje de la PCR- o coamplificación de productos no específicos (Nolan et al., 2013), por ejemplo, la formación de dímeros de *primers*. Otro de los usos de la curva estándar, es la determinación de la cantidad de plantilla adecuada para la reacción, ya que, generalmente las muestras con grandes cantidades de plantilla tienen una mayor cantidad de inhibidores, lo que puede modificar los valores del Cq. Por lo tanto, la cantidad más baja y más alta de plantilla que puede ser ajustada a la curva estándar se define como el rango de sensibilidad.

Por otro lado, la determinación de la especificidad en los ensayos de PCR se realiza a través de la curva de *melting*. Luego de completar los ciclos de amplificación, se incrementa en forma de gradiente la temperatura y se realiza la medición de fluorescencia punto a punto. A medida que la temperatura aumenta, las cadenas dobles de DNA se separan y la fluorescencia disminuye, luego, al obtener la primera derivada de la fluorescencia en función de la temperatura se obtiene un pico de cada producto (Figura 1-5 A). El pico de *melting* puede confirmar la especificidad de los *primers* y distinguir el producto deseado de otros, como la formación de dímeros de primer o las inespecificidades (Figura 1-5 B). Debido a su tamaño, los dímeros de primer generalmente tienen un pico

menor al del producto y las inespecificidades se asocian con picos a temperaturas mayores o menores a las del amplificado (Figura 1-5 B).

**Figura 1-5: Curva de *melting* de una reacción de qPCR.** Resultados de la curva de *melting* para: (A) amplificado que muestra la aparición de un solo pico, reflejando la especificidad de la reacción; (B) formación de inespecificidades durante la reacción, el pico presente a 81°C corresponde a la dimerización de los *primers*.



Nombre de la fuente: Tomado de <https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/interpreting-melt-curves-an-indicator-not-a-diagnosis>

En relación con el uso de controles, es importante incluir en cada ensayo un control positivo y uno negativo, los cuales pueden variar de acuerdo al tipo de experimento. El control positivo ayuda a la identificación de falsos negativos que pueden ocurrir debido a la calidad de la plantilla o los inhibidores de PCR, entre otros. Teniendo en cuenta lo anterior, las reacciones en las que no hay amplificación del control positivo indican problemas con los reactivos o el tipo de ensayo. Por otro lado, el control negativo se realiza al dejar de incluir algún elemento esencial en la reacción, en caso de presentarse amplificación, puede ser indicador de contaminación o formación de productos no específicos, como en el caso del control sin plantilla (*No Template Control*, NTC). Finalmente, el uso de controles sin transcripción reversa (NRT), indica contaminación de la muestra de RNA con DNA (Life Technologies Corporation, 2012).

## 1.7 Consideraciones para la cuantificación de miRNAs por RT-qPCR

### 1.7.1 Diseño de primers

Debido a que el tamaño de los miRNAs (20-25 nucleótidos) coincide con el tamaño estándar de un *primer*, se han diseñado métodos basados en la elongación de la cadena de nucleótidos para permitir la construcción de secuencias complementarias o *primers* necesarias para el proceso de amplificación. El proceso puede realizarse en reacciones de un solo paso o en reacciones de dos pasos; la primera de ellas utiliza una única reacción para producir cDNA y su posterior amplificación y cuantificación mediante una sonda específica a la secuencia, este método disminuye la manipulación de los RNAs altamente inestables y fáciles de contaminar. La reacción en dos pasos requiere un primer momento en el que se aumenta la longitud de la cadena en su extremo 3' a través de una orquilla o un Tag-poli(A), luego se utiliza un *primer* universal que puede llevar a cabo la síntesis de cDNA en los miRNAs que se encuentran en la muestra. Una vez que se tiene el cDNA, se diseña un *primer* "sentido" y otro "antisentido" que permiten la amplificación del miRNA de manera específica. Para ello, Busk (2014) desarrollo un algoritmo llamado miRprimer que brinda una lista de *primers* para la amplificación de un miRNA de acuerdo a un puntaje establecido por el programa (Busk, 2014).

La construcción de los *primers* se basa en el diseño del mejor extremo 3' y empezar a construir el *primer* a lo largo del extremo 5' hasta alcanzar una temperatura de alineamiento de 59°C. Si el constructo es muy corto puede añadirse un par de nucleótidos en la secuencia para aumentar la temperatura de anillamiento. Además de la temperatura, miRprimer tiene en cuenta la estructura de los *primers* para así evitar la formación de dímeros, las inespecificidades o la formación de estructuras secundarias.

La secuencia que utiliza miRprimer para el diseño de los *primers* consiste en diseñar todos los constructos con la temperatura de anillaje correcta, luego se les asigna un puntaje de acuerdo a la secuencia en el extremo 3', la longitud del *primer* y la estructura secundaria. Además de los valores del score para cada uno de los *primers*, este algoritmo también indica un puntaje para cada una de las parejas construidas (Ecuación 1.6). Los parámetros que tiene en cuenta el algoritmo son: la diferenciación de las adeninas del tag poli(A) con las que son intrínsecas de la secuencia en el extremo 3', la longitud de la cadena y la

concentración de sales (Se utiliza como base una concentración de 115 nM NaCl), con el fin de establecer una temperatura de anillaje de 59° C. En caso de tener una temperatura menor, el algoritmo usa la secuencia GACGC para alargar los *primers*, aumentando la temperatura de anillaje debido a su alto contenido de G y C (Busk, 2014).

$$Pair\ scor = Fprimer\ score \times Rprimer\ score \times Fprimer_{anneal} \times Rprimer_{anneal} \times Primer_{dimer} \quad (1.6)$$

### 1.7.2 Normalizadores internos y externos

El propósito de la normalización es reducir las variaciones técnicas que se pueden presentar debido a la recolección y manejo de la muestra, la extracción de RNA y la cantidad inicial de muestra. El efecto de la variación técnica puede ser reducido a través de la normalización con uno o más genes de referencia endógenos y de esta manera permitir la cuantificación correcta de los niveles de miRNAs.

La selección de los genes de normalización de los miRNAs depende del tipo de estudio, por ejemplo, si el estudio es un *screening* que contiene una gran cantidad de miRNAs, el mejor método de normalización puede ser la media global de todos los miRNAs expresados. Por otro lado, en estudios que evalúan la expresión de algunos miRNAs, la selección de uno o varios miRNAs endógenos con niveles de expresión estables, es la mejor opción. Estos normalizadores pueden ser seleccionados a través de un *screening* en donde se muestre su estabilidad ante ciertas condiciones o pueden ser seleccionados de la literatura. Entre las características que debe tener un buen control endógeno se encuentran: una expresión invariante entre las diferentes muestras y un tamaño similar al de los miRNAs a evaluar. Teniendo en cuenta que es necesario validar la información experimental, existen algoritmos como GeNorm (Vandesompele et al., 2002) o NormFinder (Andersen, Jensen, & Ørntoft, 2004) que utilizan la media geométrica de los resultados de expresión de cada miRNA para calcular su índice de variabilidad, de esta manera confirmar la estabilidad y permitir la selección de un buen gen normalizador.

Por otra parte, el uso de genes exógenos -es decir, que no están presentes en el genoma del organismo estudiado- es otra alternativa utilizada para la normalización y control de la variabilidad técnica presente en los datos. Agregar un miRNA sintético durante el proceso de extracción permite controlar la calidad y el rendimiento del proceso de purificación,

comprobar la síntesis de cDNA en la retrotranscripción y la presencia de inhibidores (Exiqon, 2012).

## 1.8 Análisis de los datos de la RT-qPCR

A la fecha, existen dos métodos que permiten realizar el análisis de los datos que resultan del proceso de amplificación, estos son la cuantificación absoluta y relativa. La cuantificación absoluta se basa en la comparación de los valores del Cq con una curva estándar, esto da como resultado la cantidad de copias con relación a la cantidad de muestra. En lo que se refiere a la cuantificación relativa el resultado del análisis es una relación, es decir, la cantidad relativa o el cambio entre la expresión del gen estudiado y un gen o muestra de referencia.

Por una parte, la cuantificación absoluta suele usarse cuando es posible saber con precisión la cantidad de material inicial (número de células, ug de DNA o cDNA para la qPCR) y permite determinar el número de copias inicial del gen a investigar. Para este método, es necesario realizar una serie de diluciones de la plantilla y luego amplificarlo con el fin de construir una curva estándar en la que se grafica la concentración en función del Cq, para ello, es necesario tener conocimiento del número inicial de copias. Una vez hecha la curva, la ecuación de la regresión lineal puede ser usada para determinar la cantidad inicial de una muestra desconocida (ver Ecuación 1.7 y 1.8). Vale la pena recordar que debido a la posibilidad de pérdida de la linealidad por fuera de los puntos presentes en la gráfica, esta curva solo puede ser usada para interpolar y no extrapolar la información experimental.

$$N_n = 10^{\left(n - \frac{b}{m}\right)}, \text{ donde } n = Ct \quad (1.7)$$

$$\text{Número de copias} = 10^{\left(Ct - \frac{b}{m}\right)} \quad (1.8)$$

Por otro lado, la cuantificación relativa mide la expresión de un gen en relación a un normalizador y permite conocer su cantidad relativa o la variación respecto a una muestra control. Existen dos algoritmos para realizar la cuantificación relativa, el primero de ellos, conocido como el método del  $2^{\Delta Ct}$  permite cuantificar la expresión de un gen respecto a otro usado como normalizador. En el 2001, Livak desarrolló otro método denominado

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ , con el que se comparan los resultados de las muestras experimentales con una muestra control y un gen normalizador de referencia, lo que determina el aumento o la disminución respecto al control (*Fold Change*) (Livak & Schmittgen, 2001). Para usar este método es necesario que las eficiencias de cada amplificado sean idénticas (100%) o muy cercanas (5% de diferencia) (Livak & Schmittgen, 2001). Con el fin de corregir las variaciones en la eficiencia entre el amplificado y el normalizador, Pfaffl diseñó una alternativa para determinar la relación de expresión entre la muestra y el control (ver Ecuación 1.9), esta expresión es similar a la propuesta por Livak ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ), sin embargo, corrige el valor de la eficiencia cuando esta no es del 100% (Pfaffl, 2001).

$$Relación = \frac{(E_{target})^{\Delta Ct, target(normalizador-control)}}{(E_{referencia})^{\Delta Ct, referencia(normalizador-control)}} \quad (1.9)$$





## 2. Justificación

La hipoxia es un tema de interés general debido a que tiene lugar en múltiples situaciones como el desarrollo embrionario, el ejercicio, procesos patológicos como el cáncer, isquemias, hipertensión y en enfermedades relacionadas con la altitud en alpinistas. Aunque el efecto de estas situaciones es diferente, en cada caso, existen mecanismos moleculares que regulan la respuesta ante la condición de hipoxia y que dependen del tiempo y el grado de exposición.

A la fecha, hay estudios que evalúan a nivel molecular los cambios presentados por células y tejidos ante la condición de hipoxia, lo que ha permitido profundizar en el conocimiento de los diferentes niveles de regulación génica implicados en la disminución de oxígeno. De igual forma, con el fin de extrapolar estos resultados *in vivo*, hay estudios en modelos animales que evalúan los cambios moleculares provocados por la condición de hipoxia, mientras que los estudios en humanos son limitados y presentan entre ellos amplias variaciones metodológicas.

Entre las diferencias metodológicas que se encuentran en los estudios, se ha reportado el uso de cámaras hiperbáricas, mezcla de gases e hipoxia hipobárica. Esta última, presenta desafíos metodológicos relacionados con la obtención de la muestra y el seguimiento, ya que requiere de una estancia permanente a lo largo del tiempo de seguimiento de los participantes y la toma de muestras en lugares geográficos de altitud. A la fecha, no hay estudios longitudinales que den cuenta del proceso de aclimatación a lo largo del tiempo, por lo tanto, el objetivo de este trabajo exploratorio fue realizar el seguimiento continuo a un grupo de individuos sometidos a hipoxia hipobárica por un periodo de 4 meses, con el fin de evaluar cambios en los perfiles de expresión de algunos miRNAs y su posible relación a través de redes de regulación en los procesos fisiológicos durante la aclimatación a altitud moderada.

Los resultados de este trabajo tienen impacto en la investigación relacionada con los factores moleculares y fisiológicos implicados en la condición de hipoxia hipobárica ya que la comprensión de los mecanismos moleculares relacionados con el proceso de aclimatación es determinante para el diseño de nuevas herramientas clínicas y terapéuticas que contrarresten los efectos negativos de la hipoxia en diferentes procesos celulares. Así mismo, la comprensión de estos mecanismos puede brindar nuevos usos de la hipoxia controlada como herramienta terapéutica, como es el caso del pre-condicionamiento isquémico, los procesos de cicatrización de tejidos y la optimización del rendimiento físico.

De igual forma, el estudio de la hipoxia hipobárica es importante debido a que esta condición puede inducir mayor susceptibilidad a patologías que se exacerban ante una baja presión de oxígeno, tales como el retardo de crecimiento fetal y la mayor incidencia de pre-eclampsia. A su vez, puede agravar condiciones pre-existentes como cardiopatías congénitas, cuadros anémicos y enfermedades pulmonares en personas residentes de nivel del mar y recién llegados a la altitud. Por tal razón, este estudio con enfoque exploratorio se realizó con el fin de evaluar los cambios en los perfiles de expresión de los miRNAs estudiados y la predicción de sus genes blanco y vías de señalización, lo cual constituye una aproximación a la identificación de posibles biomarcadores relacionados con el proceso de aclimatación.

## **3. Objetivos**

### **3.1 Objetivo general**

- Determinar el efecto de la hipoxia ambiental aguda y crónica en los niveles de expresión de algunos hipoxamiRs en un grupo de individuos colombianos y hacer un acercamiento a su red de regulación.

### **3.2 Objetivos Específicos**

- Definir la población de miRNAs que han sido asociados con adaptaciones a la altitud de acuerdo con la literatura disponible y sus implicaciones a nivel de la expresión génica.
- Establecer las condiciones experimentales óptimas para el aislamiento de miRNAs circulantes en plasma sanguíneo.
- Cuantificar la expresión de los miRNAs definidos previamente en muestras de plasma provenientes de la población objeto de estudio.
- Establecer mediante métodos bioinformáticos la relación de los miRNAs seleccionados con la regulación de la expresión genes asociados con aclimatación o adaptación a la altitud.
- Establecer las posibles correlaciones entre los hallazgos moleculares a nivel de expresión de miRNAs circulantes con la aclimatación a la hipoxia ambiental.
- Comparar los resultados obtenidos con la literatura disponible para otros grupos poblacionales.

## 4. Metodología

El desarrollo de esta investigación se dividió en dos partes, una experimental en la que se analizó el patrón de expresión de 5 miRNAs a lo largo de un periodo de seguimiento de 4 meses y una parte bioinformática en la cual se buscó relacionar la acción de los 5 miRNAs con la expresión de genes asociados a hipoxia y su posible función. A continuación, se describen con detalle los procedimientos realizados en cada una de las partes.

### 4.1 Procedimientos experimentales

#### 4.1.1 Selección de los participantes

- Convocatoria

Para la selección de los participantes del estudio se solicitó la base de datos de los estudiantes del programa PEAMA-Orinoquia los cuales se encontraban a una altura menor a los 1000 msnm. Estos estudiantes empezaron a cursar sus estudios en la Sede Bogotá durante el semestre 2017-II. La invitación para participar en el estudio se envió a través del correo electrónico institucional, en el cual se informaba a los estudiantes el objetivo, una breve introducción, los requisitos para la participación en el proyecto y un enlace con la encuesta de participación.

- Encuesta de participación

Los participantes interesados en el estudio realizaron una encuesta de participación como forma de “screening” para conocer las características sociodemográficas, el lugar de residencia, los hábitos de vida y la condición de salud. Esta encuesta permitió realizar un filtro para que los participantes cumplieran con los criterios de inclusión y exclusión, luego, por medio de llamada telefónica se informó al participante su aptitud o no para la participación en el estudio. La encuesta de participación puede verse en el Anexo A.

### **4.1.2 Criterios de inclusión**

- Haber nacido y residido durante mínimo 2 años a una altitud < 1400 m.s.n.m.
- Tener una edad mayor a los 16 años.
- Haber firmado el consentimiento informado si es mayor de edad o el asentimiento informado en conjunto con el consentimiento de sus padres si es menor de edad.
- Tener la disposición para realizar el seguimiento durante 4 meses.

### **4.1.3 Criterios de exclusión**

- Estar en estado de embarazo o lactancia.
- Haber viajado a zonas geográficas por encima de los 1800 m.s.n.m en los últimos 6 meses o permanecer más de un día a esa altitud.
- Usar algún medicamento bajo prescripción médica.
- Tener alguna enfermedad hematológica, respiratoria o renal diagnosticada por un médico.
- Ser fumador.
- Realizar ejercicio físico de manera recurrente
- Ser vegetariano o tener otro tipo de dieta especial.

### **4.1.4 Consentimiento informado**

Los participantes que cumplían con los requisitos establecidos y que eran mayores de 18 años firmaron un consentimiento informado (Anexo B) de acuerdo con la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud, la cual define las normas técnicas y científicas para la investigación en salud; en este consentimiento se describieron los procedimientos, riesgos, beneficios y el tratamiento de las muestras. Teniendo en cuenta que tanto niños como adolescentes son sujetos activos en ejercicio de sus derechos, cuya autonomía y razonamiento moral se encuentra en un proceso continuo de desarrollo, y que, según la convención de las Naciones Unidas los menores de edad tienen derecho de libertad, de conciencia y pensamiento se hace necesario que el participante directo de la investigación decida de manera libre y voluntaria la participación en el estudio, por tal razón los participantes menores de 18 años firmaron un asentimiento informado (Anexo C) y sus padres un consentimiento informado para la participación en el estudio (Pinto, 2013).

#### 4.1.5 Aspectos éticos

Este estudio fue aprobado por el comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional mediante acta No. 09-2017(Anexo D), además se desarrolló según la legislación Colombiana de Buenas Prácticas Clínicas (Resolución número 2378 de 2008 del Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos -INVIMA)) y la Declaración de Helsinki, en los cuales se regula la confidencialidad de la identidad de los sujetos, los consentimientos informados, los métodos, el aval ético y el bienestar de los individuos. De acuerdo a lo establecido en la Resolución No. 843 de 1993 del Ministerio de Salud este trabajo es de riesgo mínimo para los participantes.

#### 4.1.6 Selección de los miRNAs

Para la selección de los miRNAs que fueron amplificados, se realizó una búsqueda de artículos con los términos MeSH *hypoxia*, *microRNA*, *adaptation* y *acclimatization*, desde el año 2010 hasta el año 2017. El resultado de la búsqueda arrojó un total de 225 artículos, de los cuales se seleccionaron 10 que utilizaron análisis transcriptómicos *in vivo* e *in vitro*, las revisiones y las investigaciones realizadas en seres humanos. Teniendo en cuenta que se encontraron 3 estudios que se realizaron en seres humanos en condición de hipoxia hipobárica, se identificaron los miRNAs que incrementaron sus niveles de expresión en estos estudios y se compararon con los reportados en los análisis transcriptómicos y las revisiones encontradas. De este resultado se seleccionaron los miRNAs presentes en plasma sanguíneo y que aumentaban sus niveles de expresión en los 3 tipos de estudio (Tabla 4-1). Para cada uno de ellos se identificó su función principal reportada en la bibliografía y por último se seleccionaron aquellos que presentaron relación con procesos fisiológicos asociados con la aclimatación a la hipoxia hipobárica (Tabla 4-2). Como resultado se seleccionaron 5 miRNAs a los que se les midió su nivel de expresión a lo largo de 4 meses. Los miRNAs seleccionados y su secuencia puede verse en la Tabla 4-2.

**Tabla 4-1: MicroRNAs encontrados en la literatura relacionados con el estímulo hipóxico.**

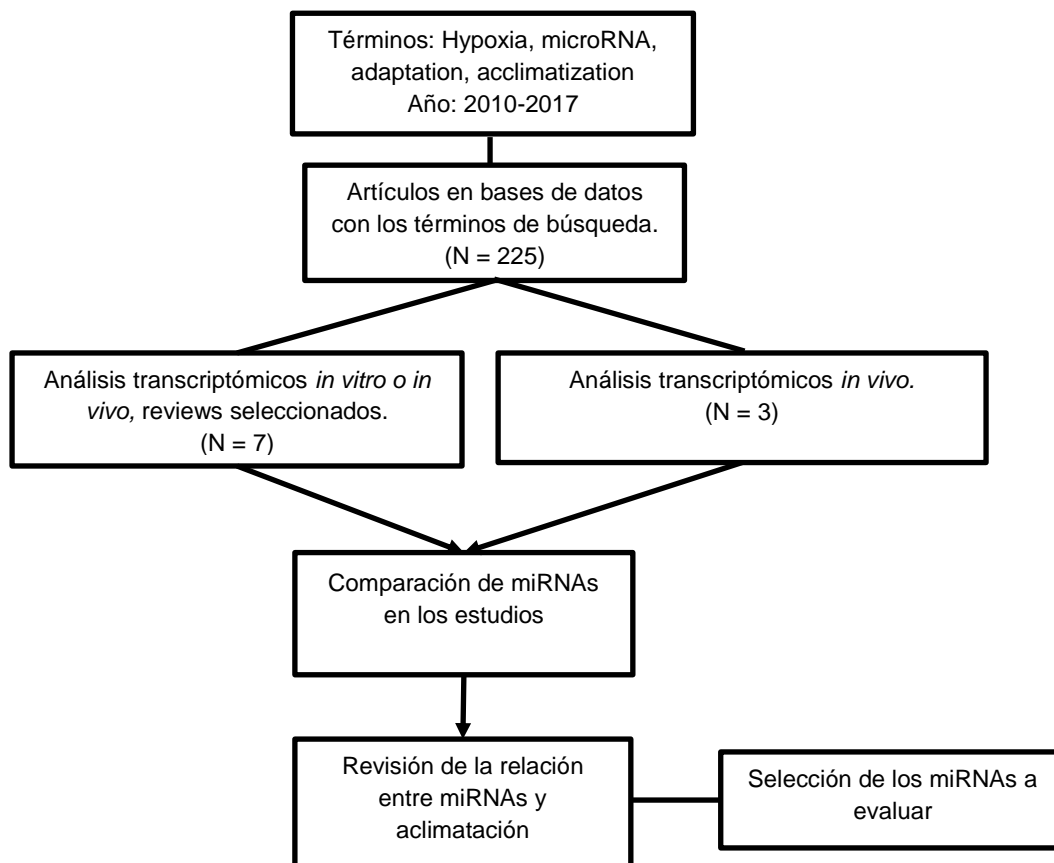
MicroRNAs	Referencias
<b>miR-210-3p</b>	(Kulshreshtha et al., 2007),(Yan et al., 2015),(Yan et al., 2016),(Liu et al., 2016),(Simonson, T. S., Yang, Y., Huff, C. D., Yun, H., Qin, G., Witherspoon, D. J., ... Ge, 2009),(Nallamshetty et al., 2013),(Cottrill, Chan, & Loscalzo, n.d.),(Hale, White; kevin, & Chan, 2012)
<b>miR-21</b>	(Kulshreshtha et al., 2007),(Yan et al., 2015),(Nallamshetty et al., 2013),(Cottrill et al., n.d.),(Hale et al., 2012)
<b>miR-23 a/b</b>	(Kulshreshtha et al., 2007),(Nallamshetty et al., 2013),(Das et al., 2014) ,(X. Huang & Zuo, 2014)
<b>miR-103-1</b>	(Kulshreshtha et al., 2007),(Nallamshetty et al., 2013),(X. Huang & Zuo, 2014),(Gee et al., 2014)
<b>miR-103-2</b>	(Kulshreshtha et al., 2007),(Nallamshetty et al., 2013),(X. Huang & Zuo, 2014),(Gee et al., 2014)
<b>miR-22-3p</b>	(Kulshreshtha et al., 2007),(Nallamshetty et al., 2013), (Hale et al., 2012)
<b>miR-125b-1</b>	(Kulshreshtha et al., 2007),(Nallamshetty et al., 2013), (Cottrill et al., n.d.)
<b>miR-181c</b>	(Kulshreshtha et al., 2007),(Cottrill et al., n.d.),(Nallamshetty et al., 2013),(Hale et al., 2012)
<b>miR-107</b>	(Kulshreshtha et al., 2007),(X. Huang & Zuo, 2014),(Gee et al., 2014)
<b>miR-23a</b>	(Kulshreshtha et al., 2007),(Simonson, T. S., Yang, Y., Huff, C. D., Yun, H., Qin, G., Witherspoon, D. J., ... Ge, 2009),(Nallamshetty et al., 2013)
<b>miR-23b</b>	(Kulshreshtha et al., 2007),(Simonson, T. S., Yang, Y., Huff, C. D., Yun, H., Qin, G., Witherspoon, D. J., ... Ge, 2009),(Nallamshetty et al., 2013)
<b>miR-24-1-3p</b>	(Kulshreshtha et al., 2007),(Yan et al., 2015),(Nallamshetty et al., 2013),(Hale et al., 2012)
<b>miR-26a</b>	(Kulshreshtha et al., 2007),(Simonson, T. S., Yang, Y., Huff, C. D., Yun, H., Qin, G., Witherspoon, D. J., ... Ge, 2009),(Nallamshetty et al., 2013)
<b>miR-27a</b>	(Kulshreshtha et al., 2007),(Nallamshetty et al., 2013),(Hale et al., 2012)
<b>miR-30b</b>	(Kulshreshtha et al., 2007),(Yan et al., 2015),(Nallamshetty et al., 2013),(Hale et al., 2012)
<b>miR-130a-3p</b>	(Yan et al., 2015),(Nallamshetty et al., 2013),(Hale et al., 2012),(Madanecki et al., 2013)
<b>miR-424</b>	(Nallamshetty et al., 2013),(Cottrill et al., n.d.),(X. Huang & Zuo, 2014),(Madanecki et al., 2013)
<b>miR-181a-1</b>	(Kulshreshtha et al., 2007),(Nallamshetty et al., 2013),(Hale et al., 2012)
<b>miR-181a-2</b>	(Kulshreshtha et al., 2007),(Nallamshetty et al., 2013),(Hale et al., 2012)
<b>miR-181b-1</b>	(Kulshreshtha et al., 2007),(Nallamshetty et al., 2013),(Hale et al., 2012),(Gee et al., 2014)
<b>miR-181b-2</b>	(Kulshreshtha et al., 2007),(Nallamshetty et al., 2013),(Hale et al., 2012),(Gee et al., 2014)

**Tabla 4-2: miRNAs seleccionados para los análisis del estudio.** \*La información se obtuvo de la base de datos miRBase (<http://www.mirbase.org/>) (Kozomara & Griffiths-Jones, 2014). El ID hace referencia al término usado para cada miRNA en este trabajo.

<b>miRNA</b>	<b>Número de acceso*</b>	<b>Secuencia</b>	<b>ID</b>
hsa-miR-21-5p	MIMAT0000076	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	miR-21
hsa-miR-22-3p	MIMAT0000077	AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU	miR-22
hsa-miR-130a-3p	MIMAT0000425	CAGUGCAAUGUUAAAAGGGCAU	miR-130
hsa-miR-181a-5p	MIMAT0000256	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU	miR.181
hsa-miR-210-3p	MIMAT0000267	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA	miR-210



**Figura 4-1: Proceso de selección de los miRNAs candidatos a evaluar durante el proceso de aclimatación a la altitud.**



#### 4.1.7 Obtención de la muestra sanguínea

- Extracción de muestra sanguínea

La extracción de sangre se llevó a cabo de acuerdo al protocolo desarrollado por la Secretaría Distrital de Salud en su Manual para la toma de muestras para análisis biológico (Salud, 2008). Luego del lavado de manos y con el uso de guantes estériles se realizó la limpieza con alcohol antiséptico y gasas en el pliegue bicipital realizando movimientos circulares desde el interior hacia el exterior. Mediante bloqueo por compresión a nivel bicipital se pidió al paciente que abriera y cerrara la mano en repetidas ocasiones; una vez identificada la vena para la punción se introdujo la aguja en un ángulo de 45° hasta donde se evidenció llenado de la aguja, en el vacutainer se colocaron tubos con EDTA al vacío con un volumen de 3 mL. Luego se retiró la compresión y se realizó la recolección de la

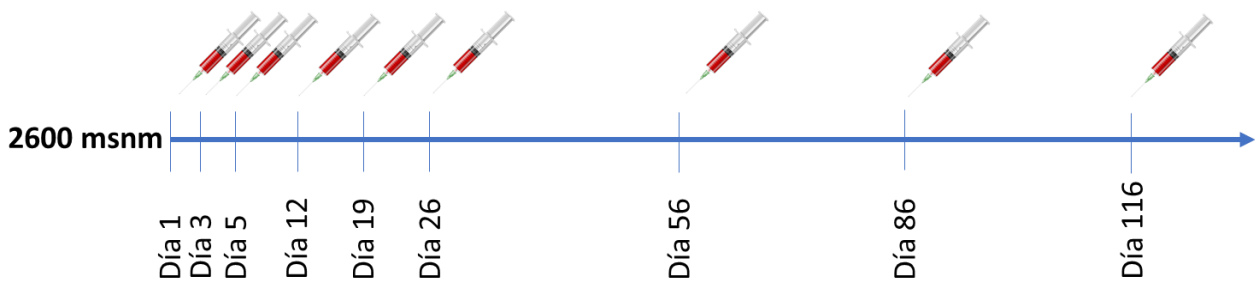
muestra. Con el tubo lleno se retiró la aguja y se hizo presión con un algodón para evitar el sangrado.

Los tubos se agitaron manualmente invirtiéndolos 10 veces para mezclar la sangre con el anticoagulante, luego de 10 minutos a temperatura ambiente se realizó la centrifugación. Las muestras fueron transferidas a tubos eppendorf de 1,5 mL y se realizaron 2 alícuotas. Cada muestra se centrifugó durante 20 minutos a 1500g a 20°C (Alexis & Moncada, 2014) y se separó el plasma de los glóbulos rojos. Por último, el plasma recolectado se centrifugó a 2500 g por 15 minutos a 20°C para obtener plasma pobre en plaquetas y evitar productos de degradación plaquetaria (Sapan & Lundblad, 2006). El sobrenadante se retiró y se agregó 1 uL de inhibidor de proteasas por cada 400 uL de la muestra. Se realizaron tres alícuotas de aproximadamente 400 uL en tubos eppendorf de 0,6 mL y la muestra se almacenó a -80°C hasta su análisis.

- Esquema de seguimiento

Para realizar el control y el seguimiento durante el proceso de aclimatación aguda y crónica se tomaron 9 muestras a cada individuo desde el momento de llegada a la ciudad de Bogotá y durante los 4 meses siguientes. El esquema para la toma de muestras puede observarse en la Figura 4-2. La primera muestra se tomó el primer día después de la llegada de cada participante a la ciudad de Bogotá.

**Figura 4-2: Esquema de seguimiento para la toma de muestras sanguíneas.** La primera muestra corresponde al primer día después de la llegada de los participantes a Bogotá.



#### **4.1.8 Determinación de variables hematológicas**

De las muestras de sangre se obtuvo una alícuota de 0,6 mL para la medición de hematocrito y la concentración de Hb.

- **Hematocrito**

El hematocrito (Hct) es la medida porcentual de la cantidad de glóbulos rojos en la sangre cuyos valores de referencia para adultos se encuentran entre 38% a 47%. Para la determinación de hematocrito, la muestra de sangre se llevó a un capilar, se selló en uno de sus extremos con plastilina y se centrifugó durante 5 minutos. Con el lector de hematocrito se realizó la determinación del porcentaje de glóbulos rojos en cada una de las muestras por duplicado.

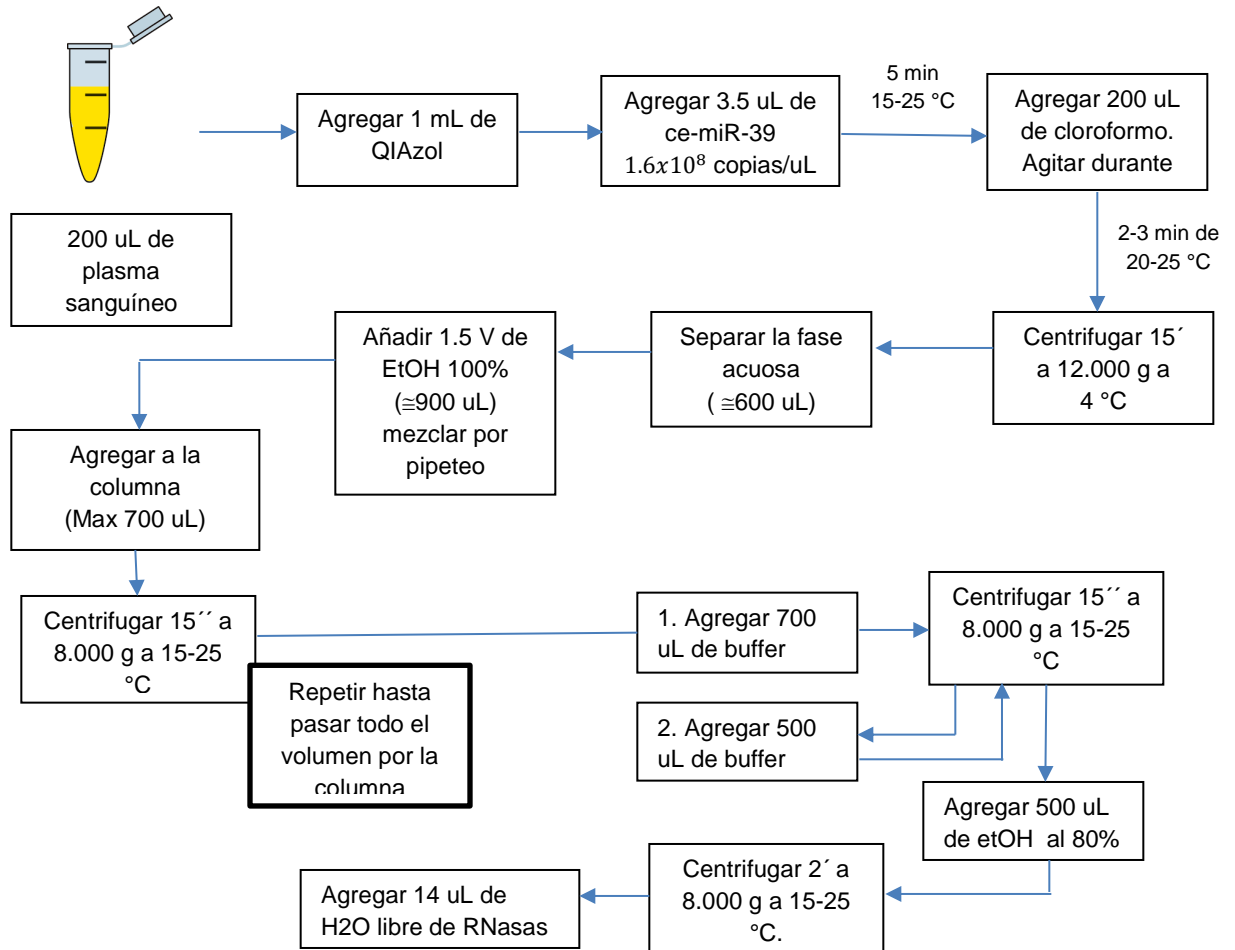
- **Hemoglobina**

La hemoglobina (Hb) es la proteína encargada del transporte del oxígeno en la sangre y sus concentraciones dan cuenta de procesos adaptativos y patológicos que pueden sufrir los individuos. Los valores de referencia en la concentración de Hb para personas de 18 años en adelante son diferenciales entre hombres y mujeres encontrándose valores de 15,5 mg/dL (13,5-17,5) y 13,8 mg/dL (12-15,6) respectivamente. La determinación de la concentración de Hb se realizó por duplicado para cada una de las muestras en el equipo OSM-3 por método espectrofotométrico.

#### **4.1.9 Extracción de miRNAs de plasma sanguíneo**

Para el proceso de extracción de los miRNAs se utilizó el kit miRNeasy Serum/Plasma (Qiagen), el cual utiliza una extracción orgánica mediante la lisis y separación de las muestras con el reactivo QIAzol, posteriormente la fase acuosa se pasa por una columna que purifica los RNAs de tamaños comprendidos entre los 18 a 200 nucleótidos. Este kit ha sido ampliamente usado para la extracción de miRNAs en diferentes estudios mostrando un alto rendimiento (Brunet-Vega et al., 2015) y calidad en la extracción. La purificación se realizó siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante y el diagrama de flujo puede verse en la Figura 4-3.

**Figura 4-3: Protocolo para la extracción de miRNAs de plasma sanguíneo.** La extracción se realizó siguiendo las especificaciones del kit miRNeasy Serum/Plasma (Qiagen).



#### 4.1.10 Condiciones para la realización de la RT-qPCR

Una vez finalizada la extracción de los miRNAs se realizó la retrotranscripción con el kit Mir-X™ miRNA First Strand Synthesis (Takara Bio). Las cantidades de los reactivos para la retrotranscripción se encuentran en la Tabla 4-3.

**Tabla 4-3: Preparación de la mezcla para la retrotranscripción.**

REACTIVO	VOLUMEN (uL)
mRQ Buffer 2x	5,0
RNA muestra (0,25 – 8 ug)	3,7
Enzima mRQ	1,3
Total	10,0

La mezcla se dejó incubar en el termociclador (Veritti – Applied Biosystems) por 60 minutos a 37°C, luego se terminó el ciclo a una temperatura de 85°C por 5 minutos con el fin de inactivar la enzima. Se agregaron 90 uL de agua libre de RNAsas y se realizaron 3 alícuotas de 33 uL que fueron almacenadas a -80°C hasta su uso.

A su vez, la qPCR se realizó con el kit Mir-X miRNA qRT-PCR SYBR® (Takara Bio), la mezcla de los reactivos para la qPCR se encuentra resumida en la Tabla 4-4.

**Tabla 4-4: Preparación de la mezcla para la qPCR.**

REACTIVO	VOLUMEN (uL)
H <sub>2</sub> O	9,0
SYBR Advantage Premix (2X)	12,5
ROX Dye (50X)	0,5
miRNA- Specific Primer (10 uM)	0,5
mRQ 3'Primer	0,5
cDNA	2,0
Volumen Total	25,0

El termociclador fue programado con un ciclo inicial de desnaturalización de 10 segundos a 95°C y 40 ciclos de amplificación (95°C por 5 segundos y 60°C por 20 segundos). La curva de melting se realizó con aumentos progresivos de 0,5 °C desde los 65 hasta los 95°C. Para cada miRNA se utilizaron controles sin plantilla (NTC) y controles sin retrotranscripción (NRT) para evaluar la presencia de contaminación por DNA en las muestras.

#### 4.1.11 Diseño de *primers*

Durante la retrotranscripción, el kit agrega a cada miRNA una cola poli (A) a través de una poli (A) polimerasa, luego en el paso de la síntesis de cDNA se utiliza un adaptador poli (T) con una extensión en el extremo 5', el cual va a permitir reducir la temperatura de fusión y mejorar la eficiencia de la qPCR. En todos los casos se usó el *primer* mRQ 3' Primer (incluido en el kit) como *primer* reverso para realizar la amplificación de cada uno de los miRNAs. El *primer* sentido se diseñó manualmente con la secuencia complementaria de cada miRNA, según las recomendaciones del fabricante (Figura 4-5).

**Tabla 4-5: Secuencias de los miRNAs a amplificar y su correspondiente *primer* sentido.**

miRNA	Secuencia (5'-3')	<i>Primer</i> sentido (5'-3')
miR-21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	TAGCTTATCAGACTGATGTTGA
miR-22	AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU	AAGCTGCCAGTTGAAGAAGTGT
miR-130	CAGUGCAAUGUUAAAAGGGCAU	CAGTGCAATGTTAAAAGGGCAT
miR-181	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU	AACATTCAACGCTGTCGGTGAGT
miR-210	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA	CTGTGCGTGTGACAGCGGCTGA

#### 4.1.12 Curva estándar

Para controlar la calidad de la extracción se agregó durante el paso de lisis  $5,6 \times 10^8$  copias/uL del miRNA normalizador exógeno cel-miR-39 (Figura 4-3). Luego se realizaron cuatro diluciones seriadas partiendo de una concentración inicial de  $5 \times 10^5$  copias/uL para la realización de la curva de calibración. Las concentraciones y las cantidades usadas durante la RT-qPCR se encuentran en la Tabla 4-6.

**Tabla 4-6: Diluciones para la curva de calibración del cel-miR-39.**

Tubo	cDNA	H <sub>2</sub> O (uL)	Concentración (copias/uL)	Uso en la PCR (copias/uL)
1	20 uL	20	$5 \times 10^5$	$1 \times 10^6$
2	5 uL de 1	45	$5 \times 10^4$	$1 \times 10^5$
3	5 uL de 2	45	$5 \times 10^3$	$1 \times 10^4$
4	5 uL de 3	45	$5 \times 10^2$	$1 \times 10^3$

De igual manera para cada miRNA se realizaron diluciones seriadas con un factor de dilución de 1:2 partiendo del cDNA luego de la retrotranscripción, con los resultados de la amplificación se graficó el logaritmo del factor de dilución contra el valor del Cq en cada una de las diluciones. Con estas gráficas fue posible demostrar la linealidad y el rango dinámico para optimizar la RT-qPCR (ver Ecuación 1.4 y 1.5).

#### 4.1.13 Análisis de los datos obtenidos mediante RT-qPCR

Para la cuantificación relativa, se utilizó un control externo (cel-miR-39) y dos controles internos (hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-320a) seleccionados por su baja variabilidad en plasma en condiciones relacionadas con la hipoxia. Con el fin de validar su uso como normalizadores se utilizó el software libre geNorm (Vandesompele et al., 2002), para evaluar la estabilidad de estos miRNAs a lo largo del seguimiento. Una vez seleccionados los genes de referencia se procedió con el análisis de cada uno de los miRNAs amplificados usando el método de Pfaffl para el cálculo de la expresión relativa respecto a la primera muestra (ver Ecuación 1.9) y la cuantificación relativa respecto a los genes normalizadores para cada miRNA ( $2^{\Delta Cq}$ )

El análisis estadístico para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las muestras se llevó a cabo mediante un ANOVA de un factor con un test *post hoc* de Holm, que permite determinar las variaciones significativas respecto a la muestra control. Los valores de  $p < 0,05$  fueron considerados significativos.

## 4.2 Análisis bioinformático

En primer lugar, se realizó la predicción de los blancos para los miRNAs seleccionados con la herramienta integrativa miRDIP (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/>) (Tokar et al., 2018), la cual agrupa la información de 30 predictores que utilizan diferentes métodos y asigna un *score* integrativo a cada gen blanco para clasificarlos de acuerdo al nivel de confianza.

Dentro de los predictores utilizados para desarrollar miRDIP se incluyen algunos que utilizan los siguientes métodos de predicción: la conservación evolutiva de la secuencia, análisis de la secuencia blanco (que incluye los análisis de las propiedades del sitio de unión, complementariedad de la secuencia, contenido de G y C, etc.), cálculos de la

energía de unión entre miRNA y mRNA, información experimental por inmunoprecipitación y métodos de aprendizaje de maquina e integrativos. El desarrollo de miRDIP permitió poner en evidencia la poca coincidencia que existe entre los diferentes predictores, indicando que, los resultados de cada predictor dependen del método utilizado y, por lo tanto, el uso de métodos integrativos disminuye los falsos positivos que pueden presentarse en este tipo de análisis. Esto lo hace al compilar las medidas de probabilidad de interacción entre mRNA y miRNA de cada uno de los predictores en un *score* integrativo que permite una comparación cuantitativa entre las interacciones. Vale la pena destacar, que miRDIP utiliza información experimental con el fin de validar la herramienta y de esta manera asignar los niveles de confianza relacionados con el *score* integrativo.

La herramienta miRDIP permite realizar análisis de tipo unidireccional y bidireccional. El primero, es usado para identificar los genes blanco de un conjunto de miRNAs o los miRNAs que regulan la función de un gen en particular. En este tipo de búsqueda, la interfaz requiere como entrada el nombre del miRNA o de los genes a los cuales se quiere realizar el análisis y el nivel de confianza para las interacciones de acuerdo a su *score*. Los resultados son organizados por el *score* integrativo y pueden ser descargados en archivo de texto. En la búsqueda bidireccional, miRDIP requiere que se especifiquen los miRNAs y los genes a analizar. Como resultado se tienen las predicciones que relacionan los miRNAs y los genes especificados en cada uno de los 30 predictores que utiliza miRDIP. La predicción puede ser restringida a las interacciones confirmadas por un cierto número de predictores (de 1 a 30) y por el nivel de confianza. En este trabajo se utilizó la herramienta miRDIP con su opción de búsqueda unidireccional y se estableció el nivel de confianza más alto para la predicción.

Con la información que se obtuvo luego de la predicción se identificaron los genes blancos que son compartidos por los 5 miRNAs. Para estos genes que compartían regulación por los 5 miRNAs se indagó su función durante la condición de hipoxia. Los resultados fueron presentados en un diagrama de Venn que muestra las relaciones entre el número de blancos y el correspondiente miRNA.

Los genes blanco de cada miRNA fueron cruzados con los genes reportados en la base de datos de factores de transcripción -DBD: Transcription Factor prediction database- (<http://www.transcriptionfactor.org/index.cgi?About>) (Kummerfeld & Teichmann, 2006) con



el fin de conocer cuántos de los genes blanco codifican para factores de transcripción (FT). Este método se basa en la predicción de genes que codifican para FTs por homología a través de un Modelo Oculto de Markov (MMV). Según lo reportado, esta base de datos aumenta la sensibilidad de la predicción al usar comparación de secuencias múltiples y solo reconoce FT que utilizan secuencias específicas de unión al DNA, en contraposición, a la clasificación funcional que incluye otras proteínas en la categoría de FTs, por ejemplo, los coactivadores o las enzimas modificadoras de cromatina. Las librerías utilizadas para el desarrollo de este predictor son SUPERFAMILY y Pfam, aunque las dos dan información sobre los dominios en las proteínas difieren en el método de construcción y la definición de estos. Por un lado, SUPERFAMILY utiliza dominios de estructuras tridimensionales conocidas basados en la clasificación estructural de proteínas, mientras que, Pfam contiene información curada manualmente de alineamientos múltiples de secuencias para clasificar a cada proteína en una misma familia. Al incluir estas dos bases de datos en la predicción se mejoran los resultados, de hecho este método de predicción tiene una exactitud del 95 al 99% (Kummerfeld & Teichmann, 2006).

De igual forma, se utilizó el portal MEME Suite (<http://meme-suite.org/index.html>) (Bailey et al., 2009) con el fin de identificar en los genes blanco de cada miRNA elementos de respuesta a hipoxia (NCGTG; N= A o G), que indiquen una regulación directa por HIF. Este portal contiene diferentes herramientas para la búsqueda y análisis de motivos, entre ellas se encuentra FIMO (Find Individual Motif Occurrences) que es una herramienta utilizada para buscar ocurrencias de motivos en secuencias específicas. FIMO da una puntuación para cada *match* de los motivos dentro de posiciones específicas de la secuencia, los cuales son tratados de manera independiente. Como resultado de la búsqueda se obtiene el valor p, que es obtenido a través de procedimientos de programación dinámica y un valor q, específico a cada *match* respecto al conjunto completo de datos.

Para este trabajo se utilizó la herramienta FIMO con el fin de buscar de elementos de respuesta a hipoxia en la región promotora de los genes blanco de los miRNAs. Para ello, se descargaron en archivo fasta las secuencias promotoras de cada gen con una longitud de 500 pares de bases corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción. Con el fin de hacer más astringente la búsqueda se estableció como umbral para la detección de los motivos un valor  $p < 0,001$ .

Así mismo, se realizó el análisis de enriquecimiento para la lista de genes blanco de cada miRNA con el fin de identificar los términos del Gene Ontology (GO) (<http://www.geneontology.org/>) (Ashburner et al., 2000) asociados a la categoría de procesos biológicos. El consorcio del Gene Ontology consiste en un gran número de bases de datos que trabajan en conjunto con el fin de estandarizar anotaciones para el GO. El GO es un vocabulario controlado y estructurado subdividido en tres categorías: Función molecular, proceso biológico y localización celular; cada uno de estos términos describe un aspecto particular de un gen o de su producto (proteína) (Ashburner et al., 2000). La función molecular hace referencia a la actividad bioquímica del producto del gen, este solo describe lo que puede hacer y no especifica dónde o cuando ocurre; por otro lado, el proceso biológico es el objetivo para el cual está diseñado el producto, por ejemplo, “crecimiento celular” y “transducción de señales”. Por último, el componente celular menciona la ubicación en donde se encuentra activo el producto génico (Plessis, Nives, & Dessimoz, 2011).

Adicionalmente se identificaron las vías de señalización del KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (<https://www.genome.jp/kegg/>) (Kanehisa & Goto, 2000). Este es un recurso de referencia que puede ser utilizado para la interpretación biológica de los genomas. Entre los múltiples recursos que tiene, se encuentran los mapas de vías de señalización que son diagramas gráficos que representan el conocimiento relacionado en las interacciones moleculares presentes a nivel celular, resumiendo la información experimental desarrollada hasta la fecha (Kanehisa, Goto, Sato, Furumichi, & Tanabe, 2012).

Finalmente, se realizó el análisis de redes con el servidor STRING (<https://string-db.org/>) (Szklarczyk et al., 2015), un recurso en línea dedicado a establecer las asociaciones funcionales entre proteínas. En este recurso se integra información de interacción proteína-proteína con datos experimentales y de predicciones bioinformáticas, permitiendo una cobertura muy amplia de los análisis a realizar. Las interacciones posibles pueden derivar de las siguientes fuentes: Interacciones comprobadas experimentalmente, bases de datos curadas manualmente de información de vías de señalización, minería de datos, interacciones *de novo* o análisis de coexpresión y homología.

Para este trabajo se realizó la red de los genes blanco de cada uno de los miRNAs, los parámetros se restringieron a interacciones comprobadas experimentalmente y en bases de datos utilizando la confianza más alta (0,9). Los resultados de la interacción proteína - proteína fueron descargados para luego organizar y diseñar la red con el programa Cytoscape (<https://cytoscape.org/>). Primero, se creó un nuevo nodo de interacción entre el miRNA correspondiente y todos los nodos dentro de la red, luego se realizó el análisis estadístico de la red y cada uno de sus nodos. De acuerdo con los datos de conectividad, centralidad y agrupamiento se identificaron los principales *hubs* y se establecieron relaciones con los datos obtenidos de genes codifican para FT y los que contienen HREs. De igual forma se eliminaron manualmente algunos nodos que presentaban poca relevancia en la red. Por último, se realizó la intersección de las 5 redes y se identificaron los *hubs* y el agrupamiento de diferentes puntos de la red con el fin de analizar sus funciones a través de los términos del GO y presentar un acercamiento a los mecanismos regulatorios durante la hipoxia de estos 5 miRNAs.

## **5. Resultados y discusión**

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos a partir de la metodología propuesta para el desarrollo de este trabajo y su respectivo análisis. Los resultados, comprenden la descripción de la población, la evaluación de las variables hematológicas, los datos obtenidos a través de RT-qPCR y el análisis bioinformático. En cada una de las secciones se realiza la discusión correspondiente y la integración de la información obtenida, cabe destacar que el análisis de la expresión de cada miRNA se integra junto con los hallazgos bioinformáticos en una sección separada hacia el final del capítulo.

### **5.1 Características de la población**

Luego del proceso de selección de la población, un total de 7 estudiantes universitarios (5 hombres y 2 mujeres) oriundos del departamento de Arauca y que residían en lugares por debajo de los 400 metros sobre el nivel del mar cumplieron con las condiciones para participar en el estudio. Las características antropométricas y el lugar de residencia de cada uno de los individuos se encuentran consignadas en la Tabla 5-1. Aunque el individuo 4 presentaba un IMC que indicaba obesidad grado I, se mantuvo dentro del estudio para observar diferencias en las variables hematológicas en relación con los demás; por otra parte, el individuo 5 fue excluido durante el transcurso del estudio debido a que no completó el esquema de seguimiento. Es necesario destacar, que los individuos manifestaron presentar hábitos de alimentación saludable, no realizar actividad física de alta intensidad y sus padres son procedentes de altitudes cercanas a nivel del mar.

**Tabla 5-1: Características antropométricas y demográficas de los participantes del estudio.**

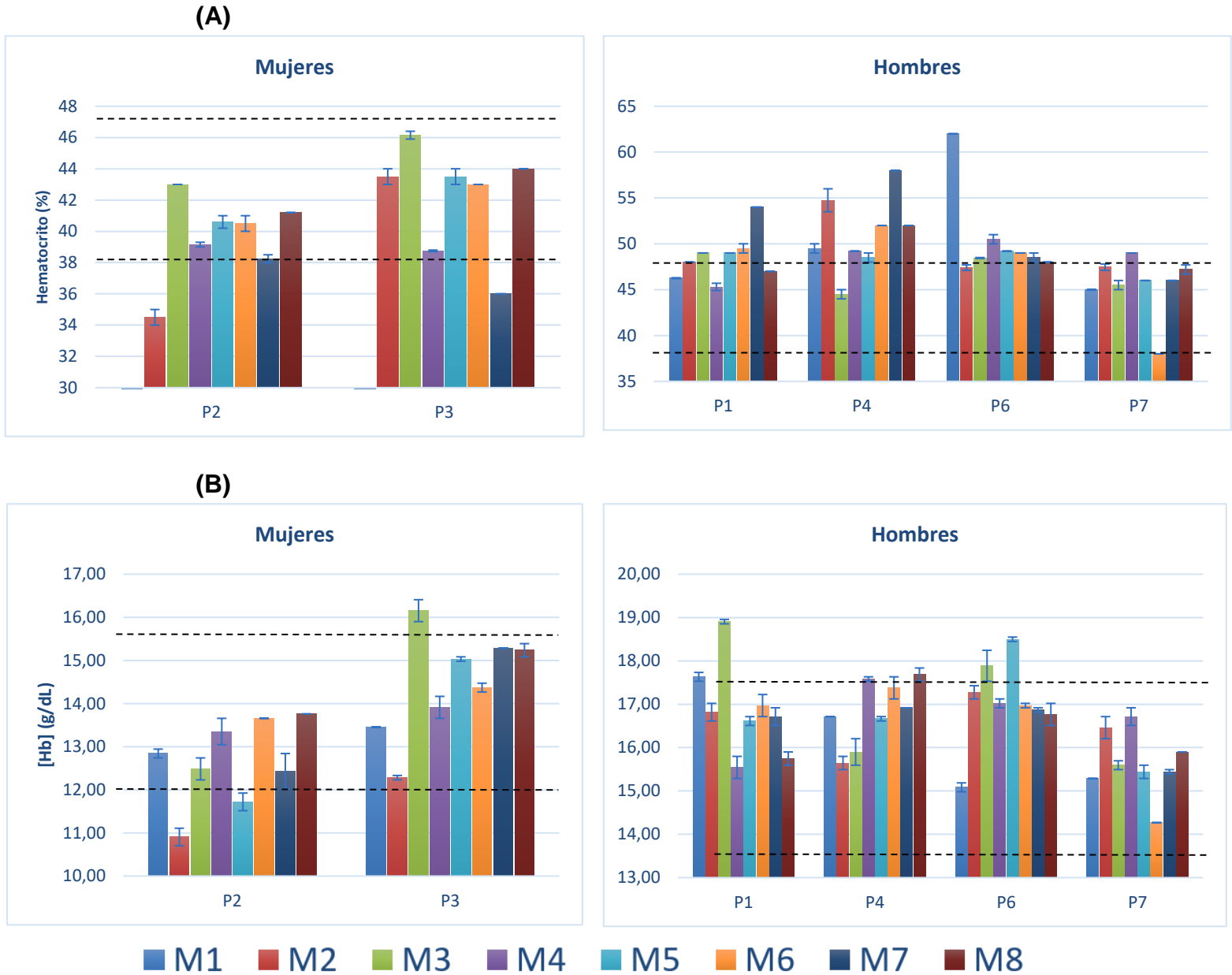
Individuo	Género	Edad (años)	Estatura (cm)	Peso (kg)	IMC ( $kg/m_2$ )	Lugar de origen y altitud (msnm)
1	M	19	172,0	68,8	23,3	Saravena-223
2	F	18	153,0	52,7	22,5	Arauca-125
3	F	17	156,5	59,6	24,5	Yopal-390
4	M	18	172,0	117,0	39,6	Arauca-125
5*	M	X	X	X	X	X
6	M	22	166,0	66,8	24,2	Saravena-223
7	M	22	163,0	57,7	21,7	Araucita-165

## 5.2 Cambios en las variables hematológicas con la exposición a la altitud.

La evaluación de variables hematológicas ha sido la primera aproximación para la comprensión de los mecanismos fisiológicos que tienen lugar en la altitud durante la aclimatación, por lo cual fue uno de los componentes de este trabajo. Entre las variables más estudiadas se encuentran la masa de hemoglobina, el hct y la concentración de Hb. En este trabajo se realizó la evaluación de estas dos últimas, específicamente, el hct representa el porcentaje del volumen de sangre que corresponde a los glóbulos rojos y depende de su número y tamaño, mientras que, la concentración de Hb es una medida de cantidad por unidad de volumen (g/dL).

Los valores de referencia a nivel clínico para el Hct de individuos a nivel del mar se encuentran en un intervalo de 38-47% para hombres y mujeres, y el promedio de la concentración de Hb para mujeres mayores de 21 años se ha reportado como 13.8 g/dl (12.0-15.6) y para hombres 15.5 g/dl (13.5-17.5) (Figura 5-1).

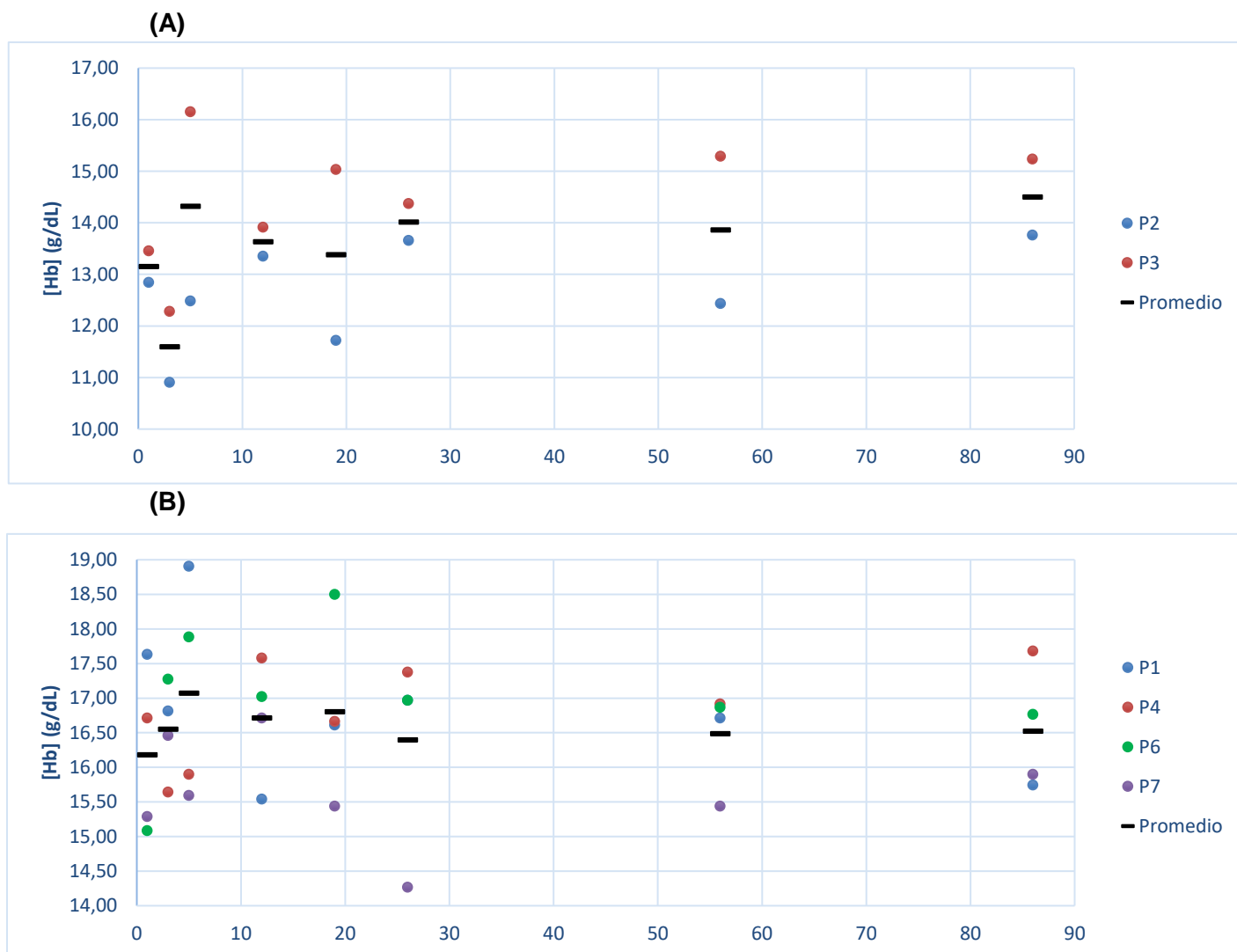
**Figura 5-1: Resultados de las variables hematológicas para cada individuo.** Se presentan los valores del hematocrito (A) y la concentración de hemoglobina (B) a lo largo del seguimiento en mujeres (n=2) y hombres (n=4). Las líneas verticales sobre cada barra representan los valores máximos y mínimos. La línea punteada negra representa los valores clínicos reportados para hombres y mujeres.



Con relación a los valores iniciales y finales de estas variables durante el tiempo de seguimiento se observaron incrementos respecto al valor inicial excepto para el individuo 1 en la concentración de Hb y el 6 en el Hct (Figura 5-1). En general, los resultados

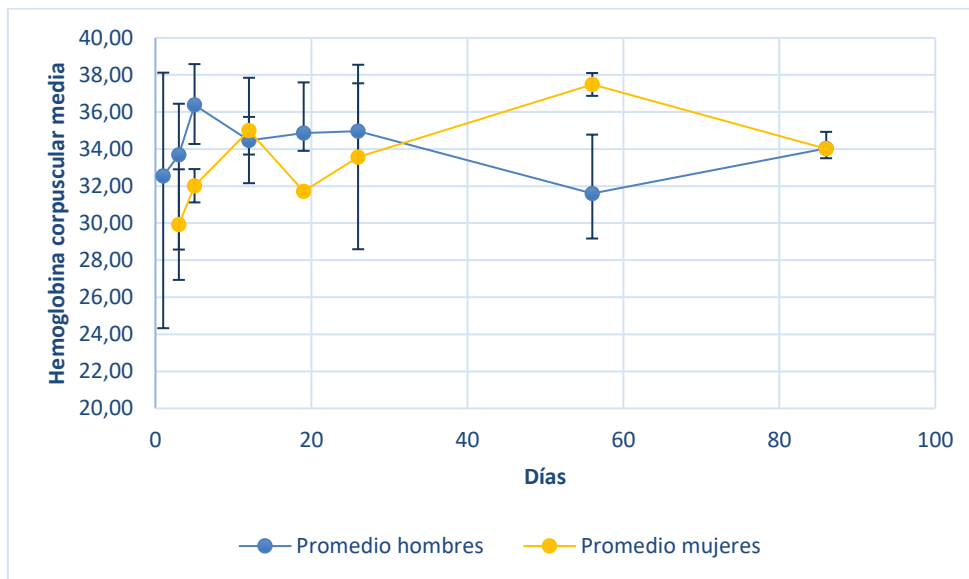
respecto a las dos variables analizadas son heterogéneos entre los individuos y por lo tanto es evidente que a lo largo del seguimiento no hay ninguna tendencia de normalización, y aunque así fuera, sería discutible establecer un punto de ajuste constante después de los tres meses de seguimiento que represente una forma de aclimatación exitosa debido al tamaño de la muestra. Por otro lado, como se puede observar en la figura 5-2, hay diferencias claras entre el promedio de la concentración de Hb entre mujeres (P2, P3: 13,14 g/dL) y hombres (P1, P4, P6, P7: 16,17 g/dL), que se pueden atribuir principalmente al género, debido a que, es evidente que el valor promedio es más alto para los hombres respecto a las mujeres (Figura 5-2).

**Figura 5-2: Valores promedio de las variables hematológicas.** Se presentan los valores de cada individuo y el valor promedio de la concentración de hemoglobina para mujeres (A) y hombres (B).



Con los resultados de las dos variables analizadas es posible determinar la hemoglobina corpuscular media, debido a que esta es una medida que establece la relación entre la concentración de Hb y el Hct,  $((Hb/\%Hct)*100)$  y permite determinar la cantidad de Hb por glóbulo rojo, con lo cual es posible plantear hipótesis respecto a los cambios que tienen lugar durante la aclimatación (Figura 5-3). Como se puede observar en la figura 5-3, en los primeros días de seguimiento en los hombres se presenta un mayor incremento de la concentración de Hb por glóbulo rojo respecto a las mujeres y posteriormente se observan cambios menores, excepto para el caso de las mujeres, que presentan un pico atípico en la muestra que corresponde al día 56 del seguimiento, lo cual puede ser debido a que se encontraban en la fase lútea de su ciclo menstrual y por esto se presenta un efecto de hemoconcentración (Figura 5-3).

**Figura 5-3: Valores promedio de hemoglobina corpuscular media en mujeres y hombres.** Las barras verticales sobre cada punto representan los valores máximos y mínimos para mujeres y hombres en cada muestra.



Por otra parte, en este trabajo se propuso un esquema de seguimiento de los individuos durante 3 meses con el objetivo de evaluar las respuestas agudas y crónicas que tienen lugar durante el proceso de aclimatación, sin embargo, a la fecha no hay un consenso que permita determinar el tiempo requerido para este proceso. De acuerdo con los resultados de estudios que han realizado la evaluación de variables hematológicas, se ha evidenciado que durante el proceso de aclimatación hay cambios determinantes a nivel fisiológico que



---

están relacionados con la producción de EPO y son dependientes de la altitud. Sin embargo, estos no se mantienen después de 24 horas en la mayoría de los individuos, lo cual constituye evidencia de que con el tiempo se reduce la magnitud del estímulo eritropoyético (Porcelli et al., 2017) (Ge et al., 2002).

Como es ampliamente conocido, la concentración de Hb es un componente clave para el transporte de oxígeno, sin embargo, su utilidad como marcador de adaptación a la altitud todavía no es claro debido a que se han documentado diferencias en esta variable entre individuos de diferentes poblaciones a la misma altitud, lo que pone en evidencia que los cambios además de estar relacionados con el tiempo de exposición, también dependen del origen étnico. En consecuencia, aunque el ajuste hematológico más relevante durante la exposición a hipoxia hipobárica es el incremento de la capacidad sanguínea para transportar oxígeno, los factores determinantes para este ajuste son la disminución del volumen plasmático inicial (exposición aguda) y el posterior incremento en la síntesis de Hb y eritrocitos (exposición crónica).

Bajo la condición de hipoxia, la respuesta eritropoyética se alcanza cuando la presión parcial de oxígeno disminuye aproximadamente a 65-70 Torr, lo que corresponde a una altitud entre 2100 y 3000 msnm, por lo cual, parece que a altitudes mayores a 2100 msnm ocurre la liberación de EPO, sin embargo, no ha sido posible determinar un umbral bajo el cual se favorece su producción y liberación sostenida (Ge et al., 2002). Así mismo, se ha determinado que hay grandes diferencias en la respuesta eritropoyética de acuerdo al género, lo cual está relacionado con la carga de testosterona y estrógenos en hombres y mujeres. Específicamente, el aumento de testosterona en individuos expuestos a hipoxia hipobárica se ha relacionado con una respuesta favorable durante la aclimatación debido a que esta hormona regula la eritropoyesis y la ventilación en diversas especies de mamíferos, incluyendo humanos, así como también está relacionada con la disponibilidad de hierro en el organismo, junto con la hepcidina. Por otra parte, se ha postulado que las hormonas sexuales femeninas pueden modular la ventilación hipóxica al afectar la secreción dopaminérgica del cuerpo carotídeo. De hecho, en un estudio de 2006 se reportó que los esteroides ováricos estimulan la ventilación al disminuir el impulso inhibitorio dopaminérgico periférico, y los resultados demuestran que la regulación dependiente de la ventilación hipóxica implica la interacción entre la EPO y los esteroides sexuales (Gassmann & Soliz, 2009). En su conjunto, lo anterior constituye evidencia de que las

hormonas cumplen una función importante en el proceso de aclimatación a pesar de que los mecanismos subyacentes siguen siendo poco conocidos (Gonzales, 2011).

Aunque la mayoría de los estudios ha sugerido que el patrón característico de nativos a nivel del mar en altitud consiste en un aumento de la concentración de Hb y el porcentaje de hct para mejorar la capacidad aeróbica, esto puede tener un efecto negativo debido a que el aumento excesivo de la concentración de Hb genera eritrocitosis y dificulta la oxigenación de los tejidos al aumentar la viscosidad sanguínea y la resistencia vascular (13,18). Como un ejemplo de esto, el aumento en nativos de grandes altitudes se ha asociado con policitemia y en las mujeres se ha determinado que hay una menor incidencia de enfermedad crónica de montaña (CMS) en edad premenopáusica que aumenta luego de la menopausia. Lo anterior constituye evidencia de los efectos negativos producto de la condición de hipoxia hipobárica tienen lugar cuando hay alteraciones en los mecanismos de respuesta a esta condición (Cheviron & Brumfield, 2012), y por lo cual se ha establecido que el tiempo y el grado de exposición son los factores fundamentales en la respuesta a hipoxia hipobárica.

Respecto al tiempo de exposición en altitud, en diferentes estudios se ha reportado que este factor es determinante en cuanto a los cambios que se pueden presentar en la concentración de Hb y el porcentaje de hct en habitantes de tierras bajas. Se debe tener en cuenta, que la respuesta eritropoyética tanto en hombres como en mujeres depende del volumen inicial de glóbulos rojos, ya que, una concentración inicial baja de Hb genera un aumento más dramático a mayores altitudes que aquellos con una concentración de Hb inicial más alta (Rasmussen, Siebenmann, Díaz, & Lundby, 2013). Así mismo, los individuos más jóvenes, independientemente del género, también presentan un aumento más dramático a mayores altitudes que los individuos mayores de 60 años. Paralelo a esto, se ha determinado que el tiempo de exposición a altitudes por encima de los 4000 msnm debe ser superior a 2 semanas para que tenga lugar un efecto estadísticamente significativo en la concentración de Hb, así como a altitudes más bajas (1300-2950 msnm) se requieren tiempos de exposición más prolongados (Porcelli et al., 2017).

Por otra parte, en cuanto al análisis de variables hematológicas es importante destacar que el patrón de adaptación de nativos de grandes altitudes difiere de los habitantes de tierras bajas, lo cual está directamente relacionado con los mecanismos de respuesta regulados por los HIFs como principales mediadores de la respuesta molecular y fisiológica

a hipoxia (Chevion & Brumfield, 2012). Dado los efectos pleiotrópicos de la cascada de señalización de los HIFs, no es claro si la concentración de Hb es el objetivo fenotípico directo de la selección natural o si representa un efecto de selección sobre otro rasgo fisiológico que está regulado por la señalización de los HIFs (Chevion & Brumfield, 2012).

Estudios previos en población colombiana universitaria a diferentes altitudes han determinado que con el incremento de la altitud hay un incremento de la concentración de Hb y el porcentaje de Hct y este a su vez es mayor en los hombres respecto a las mujeres, lo cual está de acuerdo con los resultados de este estudio (Trompetero et al., 2015). En este mismo sentido, las diferencias entre género en el porcentaje de hct, la masa y la concentración de Hb se atribuyen principalmente a factores como el contenido de masa muscular, grasa corporal y los niveles de testosterona. Además, se ha establecido que la determinación de estas variables en las mujeres en edad reproductiva depende de la fase del ciclo menstrual y la carga hormonal principalmente (Benavides, 2013). Lo anterior teniendo en cuenta que las diferencias en la respuesta eritropoyética son dependientes del género y como se ha reportado las mujeres presentan un menor incremento en las respuestas asociadas a eritropoyesis que los hombres, lo cual, se ha sugerido puede ser debido a que presentan mayores valores en la saturación arterial de oxígeno como una ventaja ventilatoria por las hormonas sexuales femeninas que modulan la respuesta eritropoyética (Benavides, 2013) (Pe, 2016).

En diferentes estudios también se ha reportado que el incremento rápido y masivo de la concentración de Hb y el porcentaje de Hct en altitud se debe a un efecto de hemoconcentración provocado por un desplazamiento de fluidos hacia el intersticio. En consecuencia, durante la fase aguda de aclimatación el incremento observado en estas variables puede ser causado por una reducción del volumen de plasma y no por un incremento de la tasa de producción de eritrocitos, ya que, el volumen de plasma puede disminuir debido a un efecto de deshidratación a causa del patrón de respiración, la inspiración de aire frío y seco, así como por otros factores como la ingesta reducida de líquidos y la diuresis (San et al., 2013). Lo anterior incrementa el contenido de oxígeno en la sangre arterial a valores superiores a los observados después del arribo a la altitud. Sin embargo, aunque el volumen plasmático disminuye en la altitud, este aumenta nuevamente al regresar a menor altitud, y esta capacidad de oscilación se ha evidenciado aún después de 20 años de exposición a cambios continuos de altitud (Benavides, 2013).

Por lo anterior, la oscilación entre ciclos de hipoxia-normoxia, es evidente tanto en el volumen total de sangre como en la concentración de Hb, el porcentaje de Hct y la concentración de EPO plasmática (Schmidt, 2002).

De acuerdo con lo anterior, la respuesta diurética hipóxica se ha relacionado también con cambios en la concentración de hormonas relacionadas con la diuresis, la natriuresis y la función renal. Por ejemplo, existen reportes que indican la disminución en la fase aguda de aclimatación de los niveles de aldosterona, la hormona antidiurética (ADH), y un aumento en los ANPs, lo que podría explicar el comportamiento del volumen plasmático. En este mismo sentido, un estudio demostró que, aunque hombres y mujeres aumentan la producción de orina a los 3 días de exposición a 3500 msnm, solo en los hombres disminuyen los niveles de ADH y renina, mientras que, en las mujeres este fenómeno se presentó a mayor altitud y tiempo de exposición. Por otra parte, los ANPs aumentaron en hombres a los tres días y en las mujeres no hubo cambios, lo cual se relaciona con la pérdida del volumen plasmático en las mujeres.

Por último, el comportamiento observado para las variables evaluadas en los individuos incluidos en el estudio corresponde con lo que se ha reportado en la literatura porque, aunque estos parámetros son evaluados comúnmente como indicadores del proceso de aclimatación, se ha establecido que estos son variables de acuerdo con factores como la dieta, el género y la edad. En consecuencia, estas variables no son suficientes para dar cuenta del proceso de aclimatación en humanos, así como también sugiere la existencia de mecanismos de respuesta diferencial inter e intraindividuos que dependen principalmente del género. Por lo anterior, es evidente la necesidad de realizar la determinación de otras variables hematológicas como la masa de Hb que no depende del volumen, la saturación arterial de oxígeno y la concentración de EPO que puede ser indicadores más objetivos de los cambios relacionados con el transporte de oxígeno en comparación con las otras variables ya descritas. En el caso de la determinación de la masa de Hb, el método para su determinación es más sensible y ha sido útil para establecer diferencias entre residentes de varias altitudes, así como para comprobar el efecto del entrenamiento físico. De hecho, la evidencia sugiere el aumento en la masa de Hb en altitudes moderadas como efecto de la aclimatación, aunque también es importante destacar que esta puede incrementar por efecto del entrenamiento regular de resistencia, el uso de EPO humana recombinante y transfusiones sanguíneas (Schmidt, 2002) .

## **5.3 Cambios en el patrón de expresión de los miRNAs con la altitud**

Como se ha mencionado, durante la aclimatación a la hipoxia hipobárica las mujeres presentan respuestas diferenciales y más variables que los hombres, por lo tanto, se decidió excluirlas de este análisis. De igual forma, el individuo 5 fue excluido del estudio por no completar el esquema de seguimiento y el 4 presentaba un IMC que indicaba obesidad grado I, lo que incluía otra variable que podría alterar los patrones de expresión de los miRNAs. Por lo anterior y de acuerdo con los resultados de las variables hematológicas presentados anteriormente, se decidió realizar los análisis de las variaciones en los patrones de expresión de los miRNAs con los individuos 1, 6 y 7 (P1, P6 y P7).

### **5.3.1 Cuantificación y rendimiento en la extracción de los miRNAs circulantes**

A la fecha, se ha demostrado que los miRNAs circulantes pueden ser utilizados como biomarcadores para la detección de enfermedades cardiovasculares, cáncer, daño en los tejidos y otras condiciones que alteran el funcionamiento del organismo, de hecho, la capacidad de los miRNAs de regular una gran cantidad de genes relacionados con procesos específicos permite una gran precisión para identificar ciertas condiciones (Li et al., 2014). Sin embargo, para utilizar el potencial de estos biomarcadores en la detección, pronóstico, tratamiento y toma de decisiones clínicas es necesario estandarizar las condiciones para su cuantificación, debido a que es común encontrar resultados contradictorios cuando se comparan diferentes estudios (Poel, Buffart, Oosterling-jansen, Verheul, & Voortman, 2018).

Dentro de las consideraciones a tener en cuenta se deben incluir todos los procedimientos preanalíticos (colección, procesamiento y almacenamiento), como el tiempo de procesamiento de la muestra, ya que los miRNAs pueden ser liberados por las células sanguíneas al plasma (Kirschner et al., 2011); el método de purificación utilizado, en lo que se recomienda el uso de algún transportador (RNA de levadura) que permita aumentar el rendimiento en la extracción; y también especificar los procedimientos y kits comerciales utilizados. Siempre se debe establecer la fuente de extracción de los miRNAs circulantes, ya que se ha demostrado que durante el proceso de coagulación las células sanguíneas

se encuentran bajo estrés y por lo tanto pueden liberar algunos miRNAs y mRNAs alterando el contenido de miRNA circulantes, por tal razón, se propone el uso del plasma como fuente para la cuantificación de miRNAs circulantes (K. Wang et al., 2012). Por último, se debe considerar el almacenamiento de las muestras, sin embargo, debido a sus características, se ha demostrado que una vez purificados los miRNAs son muy estables. Por otro lado, si la muestra que se va a almacenar es plasma, se hace necesario que este sea pobre en plaquetas debido a que se ha evidenciado que las alteraciones en la cantidad de miRNAs en el plasma por ciclos de calentamiento-enfriamiento se debe a la presencia de plaquetas en las muestras (Muth, Powell, Zhao, & Witwer, 2018). En este estudio se tomaron estas consideraciones con el fin de obtener resultados reproducibles, a excepción del uso del RNA transportador, sin embargo, el kit escogido para la extracción ha sido referenciado en diferentes estudios y los resultados estuvieron acorde a lo reportado (El-Khoury, Pierson, Kaoma, Bernardin, & Berchem, 2016; Meerson & Ploug, 2016; Rice et al., 2015).

Una vez realizado el proceso de extracción de los miRNAs circulantes se realizó su cuantificación espectrofotométrica con NanoDrop, el promedio de concentración de RNA presente en las muestras fue de 40,57 +/- 13,07 ng/uL. Los resultados promedio para cada individuo se encuentran consignados en la Tabla 5-2, mientras que las concentraciones de cada muestra se encuentran en el Anexo G. Los valores encontrados son superiores a los reportados en otro estudio en el cual la concentración de miRNAs circulantes fue de 15,00 ng/uL +/- 3,70 (Media +/- DE) usando el mismo kit de extracción (Moret et al., 2013).

**Tabla 5-2: Valores promedio de la cuantificación de RNA para cada individuo.** Se presenta el promedio de la concentración de RNA (ng/uL), relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230 con su correspondiente desviación estándar (DE).

Individuo	Concentración (ng/uL)	DE (ng/uL)	A260/280	DE	A260/230	DE
1	42,74	10,83	1,40	0,03	0,44	0,11
6	40,71	17,68	1,39	0,04	0,29	0,09
7	38,27	10,70	1,41	0,44	0,44	0,22
Total	40,57	13,07	1,40	0,03	0,39	0,16

La cuantificación mediante NanoDrop tiene un límite de detección de 2 ng/uL, por lo tanto, se ha mencionado en algunos estudios y protocolos que es inadecuado realizar la medición de la concentración de miRNAs circulantes por métodos espectrofotométricos debido a su poca concentración (Exiqon, 2014; Moret et al., 2013). Sin embargo, como se puede evidenciar (Tabla 5-2), los valores de concentración presentados se encuentran por encima del límite de detección.

En congruencia con lo anterior, un estudio que comparó diferentes métodos para la cuantificación de miRNAs encontró que los espectrofotómetros suelen sobreestimar la cantidad de miRNAs en las muestras, ya que pueden detectar otros ácidos nucleicos, proteínas o contaminantes derivados del proceso de extracción (Garcia-Elias et al., 2017). Por ejemplo, las relaciones de absorbancia a 260/280 y 260/230 son bajas (Tabla 5-2), lo que podría indicar contaminación de las muestras por proteínas y fenoles respectivamente, sin embargo, hay estudios que reportan valores similares (Relación 260/280: 1,48 +/- 0,17) (Moret et al., 2013). De manera interesante, otros trabajos que miden la concentración de miRNAs partiendo de diferentes cantidades de células, encontraron valores en las relaciones de absorbancia más bajos cuando se partía de una menor cantidad de células. A medida que se aumentaba la cantidad del material inicial, el valor en las relaciones de absorbancia se normalizó hasta alcanzar valores que indican una pureza óptima para posteriores análisis (El-Khoury et al., 2016). De igual manera, en los estudios en los que se agregaron RNAs transportadores de levadura las relaciones de absorbancia se encontraron por encima de 2,00 indicando un alto grado de pureza (Moret et al., 2013; Rice et al., 2015).

Estos resultados sugieren que debido a la baja concentración de miRNAs presentes en plasma pueden presentarse confusiones en la cuantificación y la determinación de la pureza de la muestra de RNA, no obstante, el uso del NanoDrop puede ser una aproximación para determinar la concentración de miRNAs en una muestra. De hecho, al observar los resultados de la cuantificación del cDNA, la absorbancia a 260 nm aumentó y las relaciones de absorbancia a 260/280 y 260/230 presentaron valores de 2,15 +/- 0,02 y 2,6 +/- 0,16 respectivamente (media +/- DE)(ver Anexo G). Esto indica que, los valores en los radios de absorbancia no se deben a contaminación de las muestras, por el contrario, son producto de la baja concentración de miRNAs.

En relación con el rendimiento de la extracción, se utilizaron los valores de Cq y la curva estándar del miRNA exógeno (cel-miR-39) para calcular el número de copias inicial de este miRNA en la PCR. Con este valor fue posible calcular el porcentaje de rendimiento del proceso de purificación para cada una de las muestras (Tabla 5-4), esto se realizó teniendo en cuenta que en una extracción con un rendimiento del 100% se esperarían un total de 3'000.000 de copias como plantilla en la RT-qPCR. El rendimiento en la extracción de los miRNAs en este trabajo, se encuentra dentro de los rangos reportados por otros estudios que utilizaron el mismo kit de extracción (miRNeasy serum/plasma kit) (Brunet-Vega et al., 2015; Meerson & Ploug, 2016). A la fecha, existen varios kits que utilizan diferentes metodologías para la extracción de miRNAs, algunos de ellos se basan en el uso de solventes orgánicos como el tiocianato de guanidinio y el fenol (Trizol LS), otros utilizan fenol y filtros en fibra de vidrio (MirVana miRNA Isolation Kit) y, por último, se encuentran aquellos que utilizan una extracción orgánica y el paso por una columna de sílica, como el utilizado en este trabajo. Los estudios que comparan estos kits han demostrado que estos últimos presentan un mayor rendimiento, cantidad y pureza en la extracción de los miRNAs (Brunet-Vega et al., 2015; Farina et al., 2014; Meerson & Ploug, 2016; Wilcox & Hirshkowitz, 2015).

**Tabla 5-3: Porcentaje de rendimiento en la extracción de miRNAs plasmáticos.** El rendimiento se calculó en relación al miRNA exógeno para cada una de las muestras de los individuos.

<b>Muestra</b>	<b>P1 (%)</b>	<b>P6 (%)</b>	<b>P7 (%)</b>
<b>M1</b>	3,84	3,10	3,76
<b>M2</b>	8,76	2,81	2,72
<b>M3</b>	4,63	1,18	3,53
<b>M4</b>	5,50	4,97	2,65
<b>M5</b>	2,84	3,70	1,53
<b>M6</b>	1,93	2,84	2,81
<b>M7</b>	1,55	2,91	2,06
<b>M8</b>	3,22	3,94	3,61
<b>M9</b>	2,91	4,15	2,53



### 5.3.2 Determinación de la eficiencia y la especificidad de los *primers*

En congruencia con lo anterior, dentro de las consideraciones analíticas (extracción, síntesis de cDNA y qPCR) se incluyen los procesos de amplificación, normalización y cuantificación. Teniendo en cuenta que la mayoría de los kits utilizados para la amplificación de los miRNAs utiliza un *primer* antisentido universal y la secuencia complementaria del miRNA como *primer* sentido, la especificidad de estos ensayos suele ser muy alta. Esto se ha demostrado al cambiar la secuencia del *primer* sentido en un nucleótido, lo que da como resultado, la no amplificación del producto o la presencia de otro pico en la curva de *melting*. Esta característica ofrece una gran ventaja en el estudio de los miRNAs, ya que algunas familias de estos RNAs no codificantes presentan variaciones de tan solo un nucleótido en su secuencia (Shi & Chiang, 2005).

Una vez purificados los miRNAs, se realizó la curva de calibración con el fin de comprobar la eficiencia de la reacción y la especificidad de cada uno de los *primers*. Se partió del cDNA obtenido y se realizaron 3 diluciones seriadas de 1:2, del mismo modo, se agregó el volumen del cDNA requerido en la reacción y un último punto que consideraba el doble del volumen que se utilizaría en la reacción de PCR; cada una de las curvas se realizó por duplicado. Los valores del coeficiente de determinación de la curva y las eficiencias pueden verse en la tabla 5-4, mientras que, las gráficas de la curva estándar y las curvas de *melting* se encuentran en la figura 5-4.

Los resultados de las curvas de calibración mostraron una reacción óptima en términos de eficiencia y especificidad para todos los miRNAs, a excepción del miR-210. En el caso de los miR-21 y miR-22 se evidenció, que al aumentar al doble el volumen de cDNA respecto al recomendado a usar en el kit se perdía la linealidad en la curva, por esta razón, los puntos fueron eliminados de la gráfica. Teniendo en cuenta lo anterior, la cuantificación de las muestras se realizó con un volumen de partida de 2 uL de cDNA, garantizando así la linealidad dentro de la curva (Figura 5-4). Por otro lado, el cálculo del porcentaje de eficiencia para los miRNAs arrojó valores que oscilaban entre el 93% y el 110%, estos valores corresponden con los aceptados dentro de los protocolos de RT-qPCR (Tabla 5-4) (BioRad, 2006).

**Tabla 5-4: Resultados de la curva de calibración de cada uno de los miRNAs.** Se presentan los valores del coeficiente de determinación ( $R^2$ ), Eficiencia (Ecuación 1.4) y porcentaje de eficiencia (Ecuación 1.5) de cada uno de los miRNAs.

miRNA	$R^2$	Eficiencia	% Eficiencia
miR-21	0,96	1,93	94,8
miR-22	0,99	1,96	96,1
miR-130	0,95	2,11	110,0
miR-181	0,99	1,93	93,4
miR-210	0,97	2,01	100,7
miR-106	0,98	2,03	103,0
miR-320	0,99	1,98	98,9
Cel-miR-39	0,99	1,95	95,4

En el caso del miR-210 se evidenció una curva con un coeficiente de determinación alto ( $R^2=0,99$ ), sin embargo, el porcentaje de eficiencia fue de 154,6%. Generalmente, los valores de eficiencia por encima del 110% se asocian con la formación de inespecificidades en la reacción. Al observar la curva de *melting*, es evidente la formación de otros picos en la gráfica, lo que sugiere, la dimerización de los *primers*. Por tal razón, se modificaron las condiciones de amplificación al aumentar a 65°C (+5°C) la temperatura de anillaje de los *primers* para este miRNA y se realizó nuevamente la curva de calibración. Como resultado, se obtuvo un porcentaje de eficiencia del 100,7% (Tabla 5-5) y la amplificación de un solo producto, como se refleja en la curva de *melting* (Figura 5-5). Las demás curvas de *melting* mostraron solo un pico de amplificación para cada miRNA indicando la especificidad de los *primers* y la amplificación de un solo producto de PCR (Figura 5-4).

**Figura 5-4: Curva de calibración y de *melting* para los miRNAs evaluados.** Curva de calibración (izquierda); curva de *melting* (derecha). Para el cel-miR-39 se graficó el Cq en función del log10 del número de copias. Las barras verticales indican el valor mínimo y el valor máximo de las mediciones.

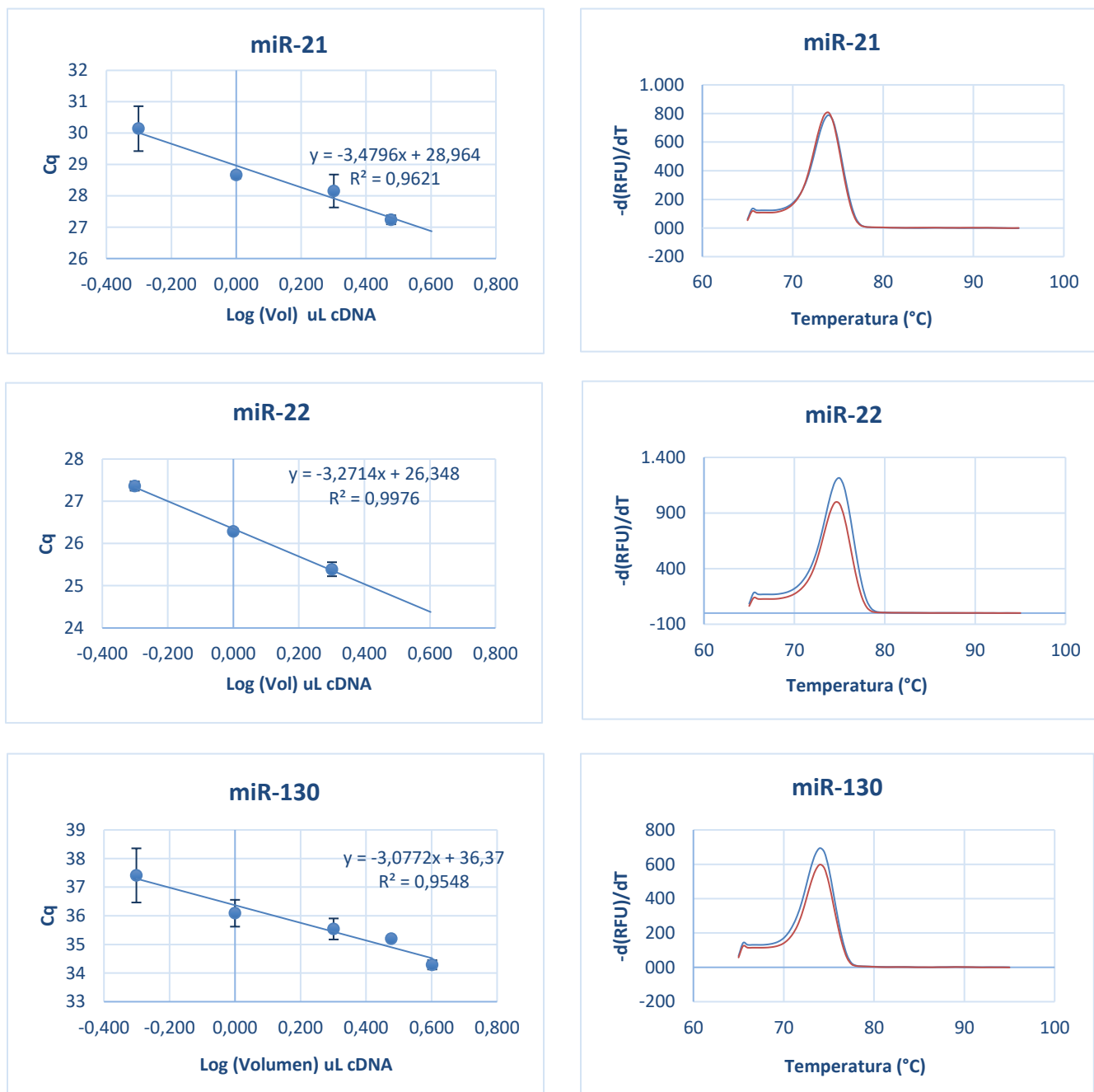
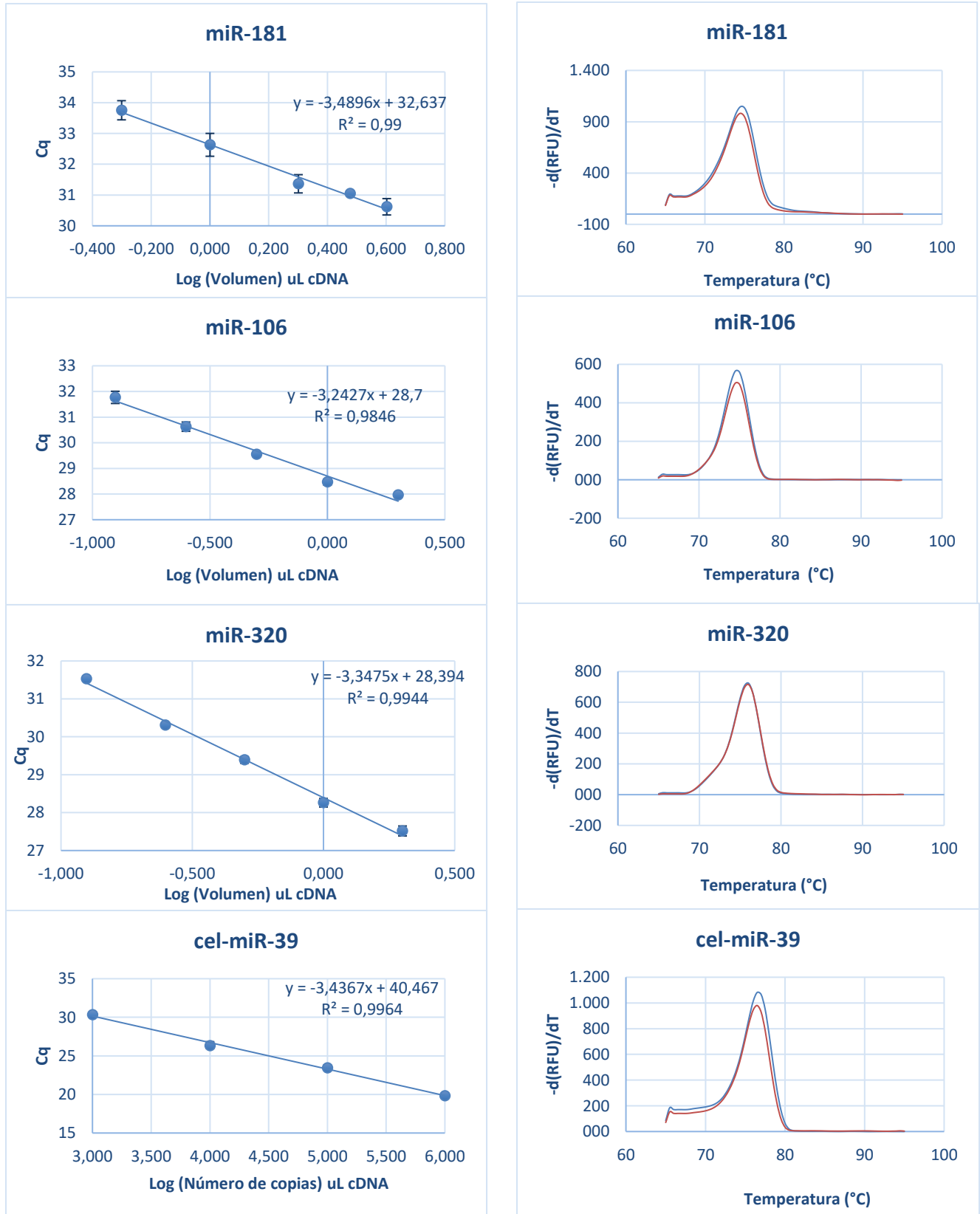
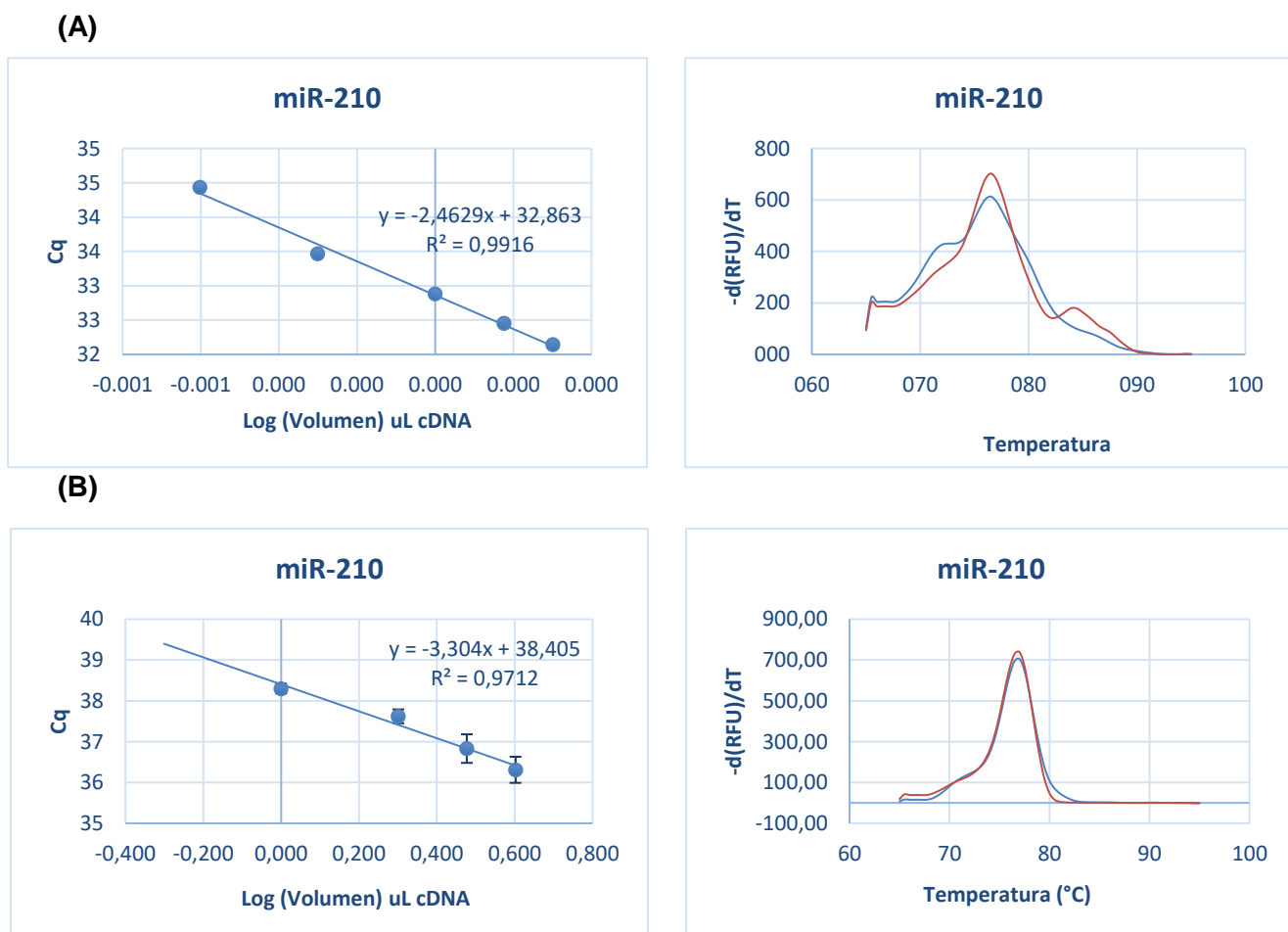


Figura 5-4: Continuación



**Figura 5-5: Curva de calibración y de *melting* para el miR-210.** La amplificación se realiza a una temperatura de anillaje de (A) 60°C y (B) 70°C.



**Tabla 5-5: Resultados de la curva de calibración para el miR-210.**

°T Anillaje (°C)	R <sup>2</sup>	Eficiencia	% Eficiencia
60	0,99	2,54	154,6
65	0,97	2,01	100,7

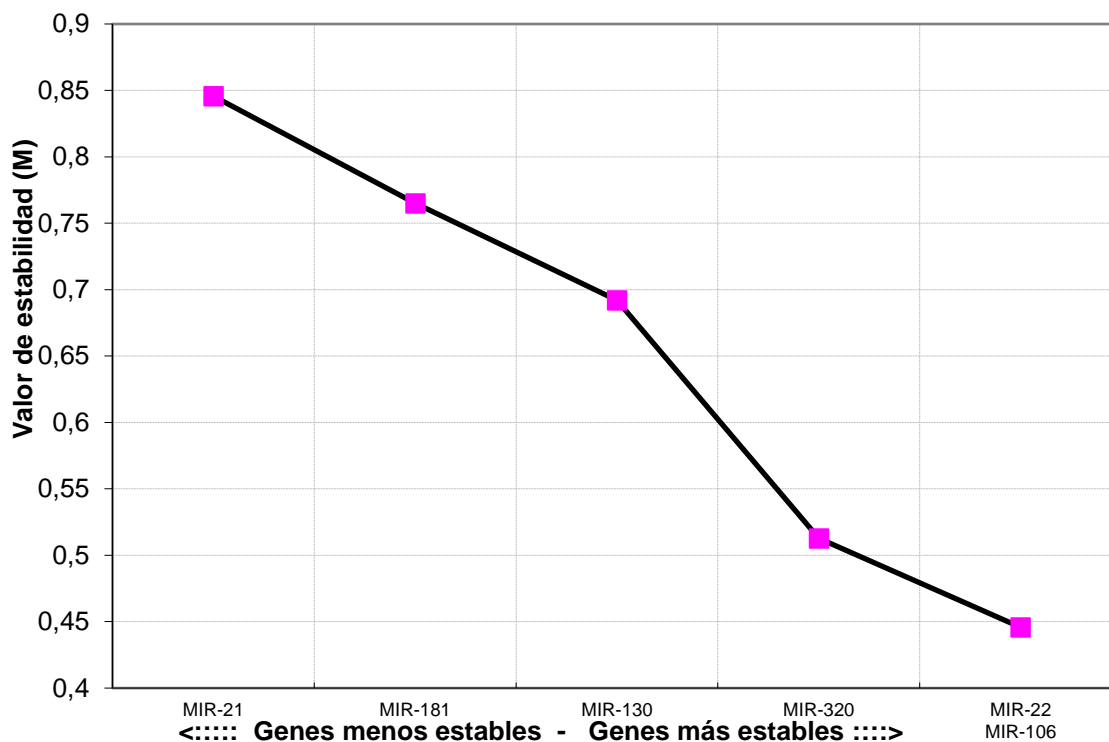
### 5.3.3 Validación de los miRNAs de referencia

De acuerdo con la literatura, en los estudios que se desarrollan con biofluidos se recomienda usar al menos dos miRNAs normalizadores endógenos, circulantes y que no cambien sus patrones de expresión ante la condición a evaluar. Para ello, existen diferentes algoritmos como geNorm (Vandesompele et al., 2002) o NormFinder (Andersen et al., 2004), los cuales permiten determinar el índice de estabilidad de los miRNAs y de esta manera seleccionar los normalizadores más adecuados. Los estudios transcriptómicos permiten usar otras medidas como la media global o la normalización intercuartiles, al utilizar la información de los niveles de expresión de un gran número de genes.

Para la validación de los miRNAs de referencia seleccionados (miR-320 y miR-106), se utilizó el software GeNorm. Este paquete busca validar la estabilidad en la expresión de algunos genes internos utilizados como control a través de una medida de estabilidad de la expresión génica (M). La medida de estabilidad M se define como el promedio de variación de un gen particular con otros genes, de esta manera, los genes con un valor M menor presentan una mayor estabilidad (Vandesompele et al., 2002).

Al utilizar este software con las muestras del estudio se encontró que los genes más estables fueron el miR-106 y el miR-320 con valores de Cq de 27,25 +/- 0,65 y 28,28 +/- 0,64 (media +/- DE) respectivamente. De manera interesante, el miR-22 tuvo el segundo menor valor M con valores de Cq de 28,58 +/- 0,84, lo que indica su poca variabilidad a lo largo del seguimiento. De acuerdo con lo anterior se concluye que los miRNAs miR-106 y el miR-320 pueden utilizarse para la normalización de los datos de la RT-qPCR.

**Figura 5-6: Valores promedio de estabilidad para los miRNAs.** Se utilizó el software geNorm para calcular el valor promedio de estabilidad de expresión (M).



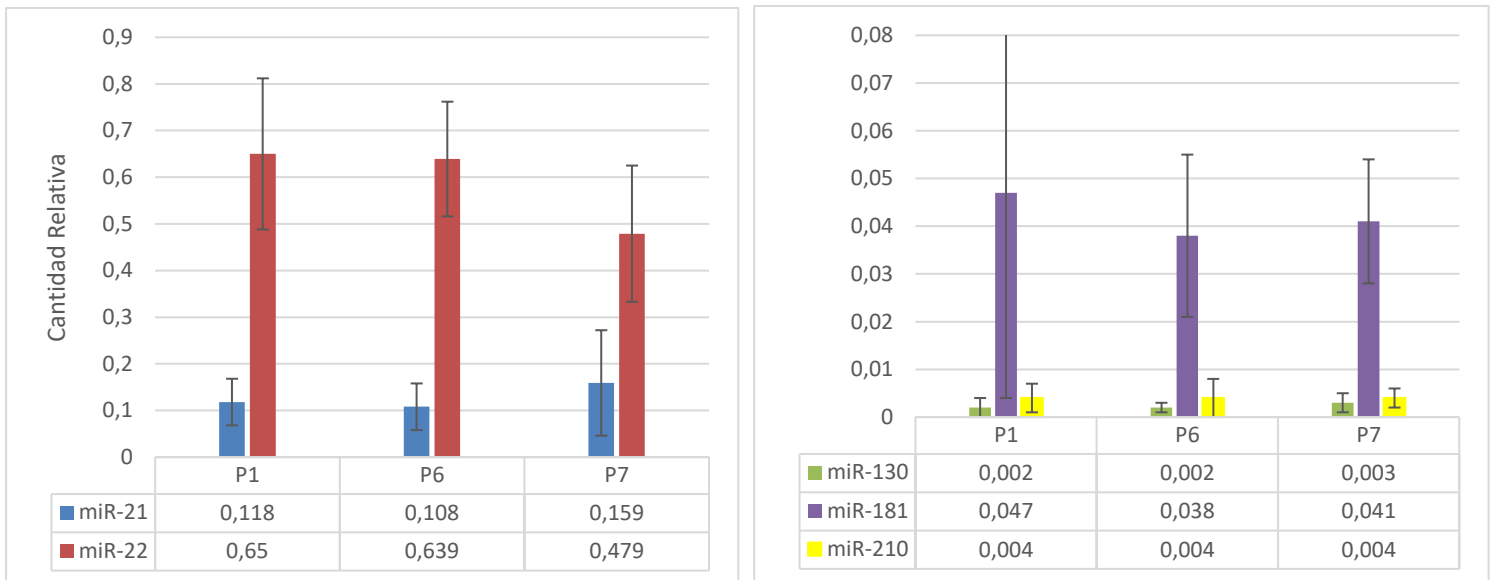
Por último, vale la pena mencionar que con el fin de homogenizar los resultados de las pruebas de RT-qPCR se utilizó como base las guías MIQE (Minimal Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR experiments) (Bustin et al., 2009), las cuales presentan una serie de parámetros a reportar para asegurar la calidad de los experimentos de RT-qPCR. Estas guías deben ser acogidas por todos aquellos que utilicen esta técnica con el fin de diseñar y reportar sus experimentos, medir la calidad técnica de los experimentos y permitir la replicación de estos.

### 5.3.4 Normalización de los datos obtenidos mediante qPCR

Para evaluar los perfiles de cambio de algunos miRNAs durante la exposición aguda y crónica a hipoxia hipobárica se cuantificaron los niveles de expresión en plasma de 5 hipoxamiRs (miR-21, miR-22, miR-130, miR-181, miR-210) en 3 hombres expuestos por 4 meses a la altitud. Para los 3 individuos, las cantidades relativas de cada uno de los miRNAs fueron diferentes, de hecho, es posible evidenciar que unos se expresan más que

otros. Entre ellos, el miR-22 fue el que presentó los mayores niveles de expresión, seguido del miR-21 y el miR-181, mientras que, los miR-130 y miR-210 presentaron los valores más bajos de expresión (Figura 5-7).

**Figura 5-7: Cantidad relativa promedio de los miRNAs amplificados.** Se presenta la cantidad promedio de las nueve muestras de cada individuo para cada miRNA y la desviación estándar de cada una (Barras verticales).



Como se mencionó anteriormente, el orden en los niveles de expresión de los miRNAs se mantuvo entre individuos, sin embargo, se presentaron variaciones interindividuales a lo largo del tiempo de seguimiento. Para mostrar estas variaciones se realizaron los gráficos de cantidad relativa (Figura 5-8) y el *fold change* (Figura 5-9), el cual se calculó con respecto a la primera muestra, correspondiente al primer día de estadía en altitud.

El miR-21 presentó un aumento en todos los individuos en la muestra número 2 (Día 3) (Figura 5-8), luego se presentó un periodo de variabilidad (Figura 5-9) y un posterior aumento en la muestra 6 (Día 26) en P1 y la muestra 7 (Día 56) en P6 y P7 (Figura 5-8). El miR-22 fue el miRNA que presentó los niveles de expresión más elevados en plasma sanguíneo, su cantidad relativa se encontró un orden de magnitud por encima de los miR-210 y miR-130. Aunque existieron puntos con diferencias estadísticamente significativas (Figura 5-8) no se presentó una tendencia clara durante el seguimiento de cada uno de los individuos, pero al ver las gráficas, la tendencia en P6 y P7 es a aumentar hacia el final. Respecto a la primera muestra existieron variaciones individuales marcadas para cada individuo (Figura 5-9).



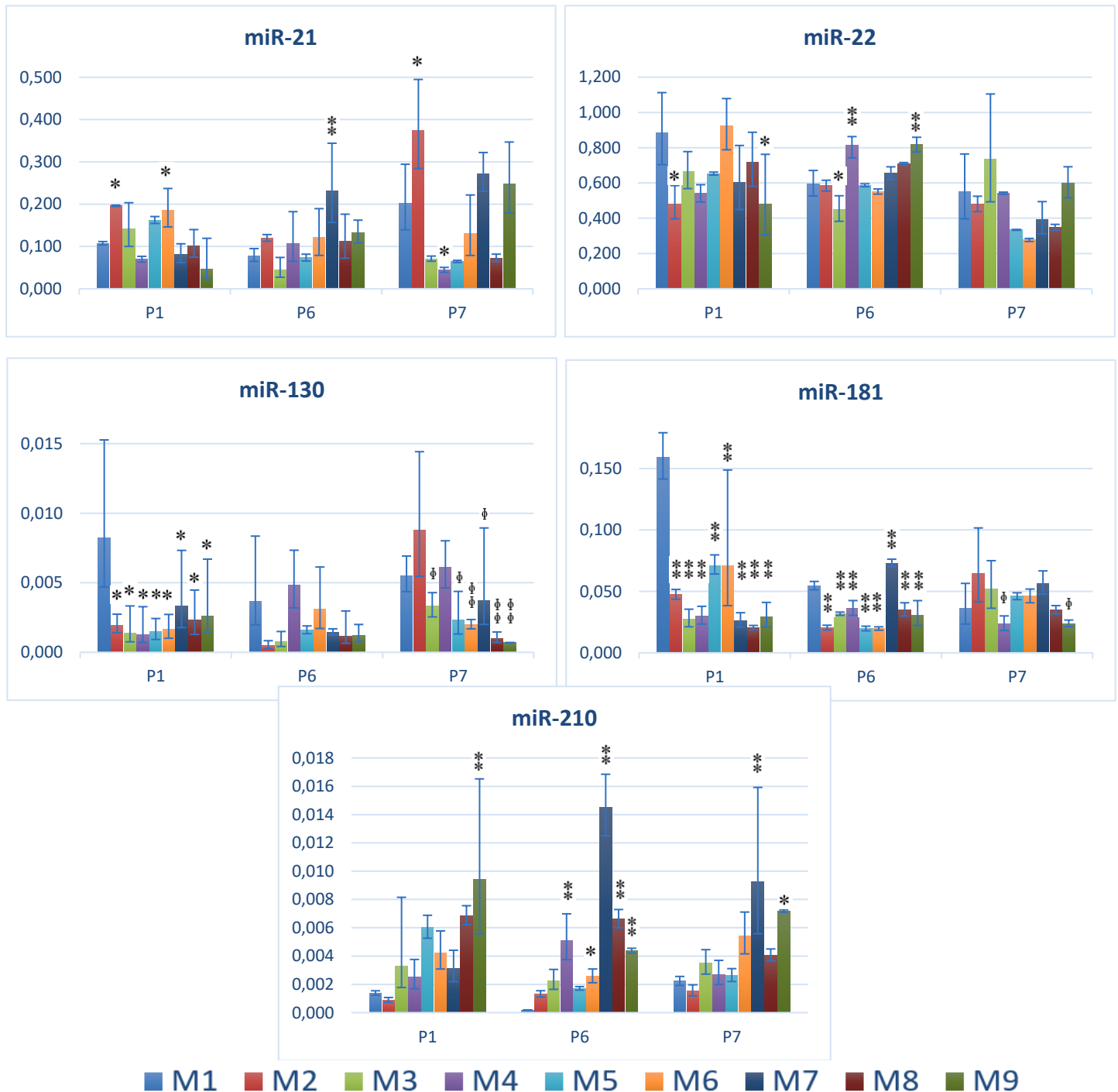
---

En relación al miR-181, este disminuyó en P1 y P6 en todas las muestras respecto al control (Figura 5-9) . Para P7, la expresión en la mayoría de las muestras aumentó con respecto al control del día 1. Este individuo tuvo los mayores niveles de miR-181 en la muestra 2 (Día 3) y al realizar el análisis estadístico en relación a la muestra 2, se encontraron diferencias significativas en la muestra 4 y 9 (Figura 5-8).

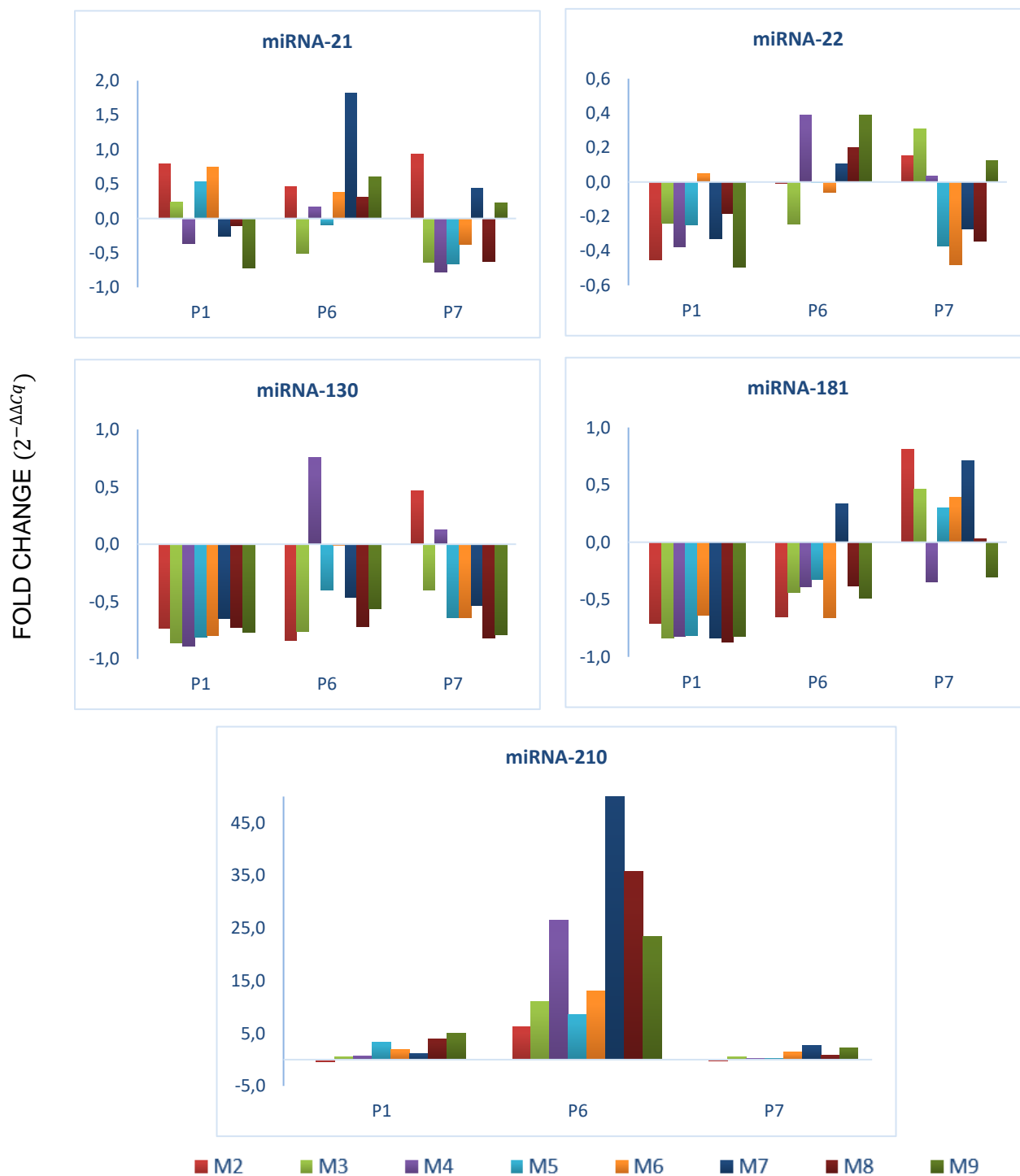
Respecto a los miRNAs que presentaron valores más bajos de expresión (miR-130 y miR-210), se puede observar que para P1, el miR-130 presentó una disminución constante a lo largo del tiempo en todas las muestras respecto a la primera (Figura 5-9). En P6 no ocurre lo mismo, en este individuo la muestra que presentó los niveles más altos de este miRNA fue la número 4 (Día 12) (Figura 5-8). Sin considerar esta muestra, se conserva la disminución en los niveles de expresión de este miRNA en comparación con la muestra 1 (Figura 5-9), como ocurrió con P1. En P7 la tendencia general es disminución también en este miRNA (Figura 5-8).

Por último, el miR-210 tuvo un comportamiento contrario al miR-130 ya que aumentó constantemente en el tiempo, presentando dos picos en los niveles de expresión, uno en los primeros días de exposición a la altitud y otro hacia el final del periodo de seguimiento (Figuras 5-8 y 5-9). Este aumento fue más marcado en el individuo P6 (Figura 5-9).

**Figura 5-8: Cantidad relativa de miRNAs en individuos expuestos a hipoxia hipobárica.** La significancia fue determinada por ANOVA de un factor (Test pos hoc de Holm) para determinar las diferencias estadísticamente significativas con relación a la muestra 1. \*p<0,05; \*p<0,01. En P7 para los miRNA-130 y miR-181 se realizó el análisis estadístico respecto a la muestra 2.  $\phi$ p<0,05;  $\phi$ p<0,01. M1 a M9= Muestras tomadas los días 1,3,5,12,19,26,56,86 y 116 respectivamente.



**Figura 5-9: *Fold change* de la cantidad relativa de miRNAs plasmáticos en cada individuo respecto a la muestra control.** La gráfica muestra el cambio relativo desde M2 hasta M9. La muestra 1 fue considerada la muestra control para la determinación del *fold change*. El cálculo del cambio relativo se realizó con la ecuación 1.9.



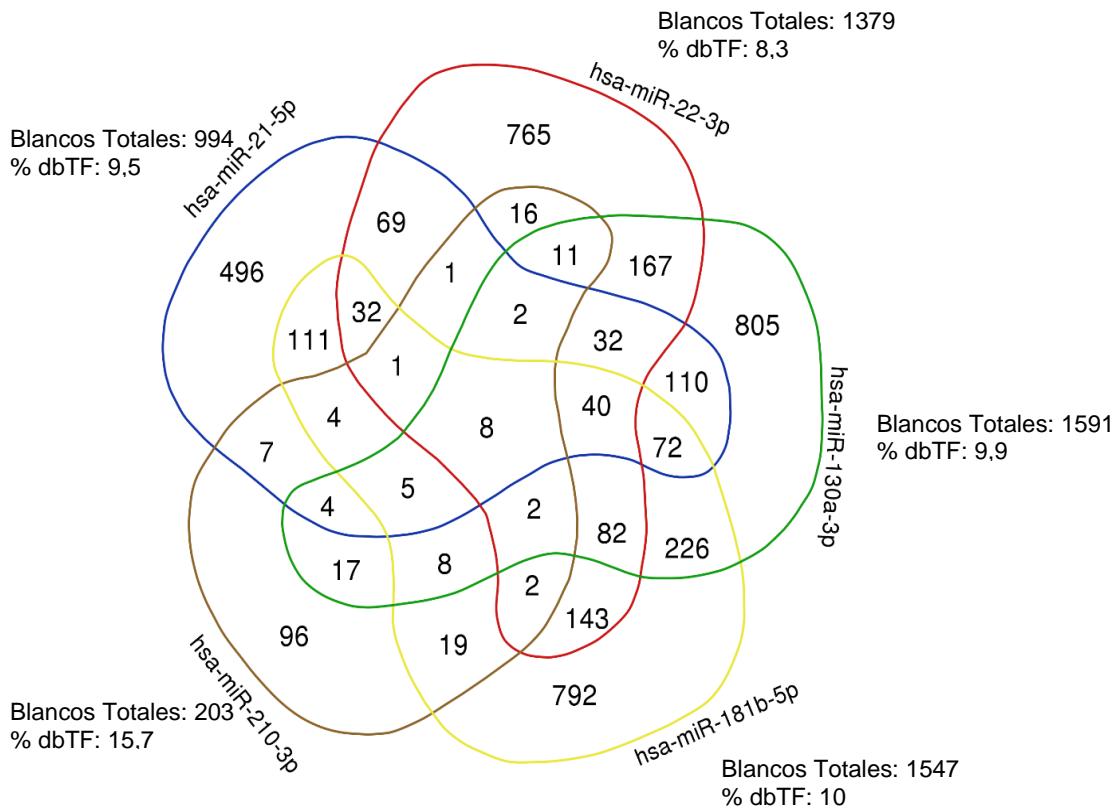
## 5.4 Análisis bioinformático

### 5.4.1 Genes regulados por los hipoxamiRs

Como se mencionó en la metodología, se realizó la predicción de los genes blancos de regulación para cada miRNA con el recurso miRDIP, el cual permite la selección de cuatro niveles de confianza clasificados como muy alto (1%), alto (5%), medio (1/3 de las predicciones) y bajo (total de las predicciones). Al usar el nivel de confianza más alto, se encontró que el miR-130 y el miR-181 tienen el mayor número de genes blanco (1591 y 1547), mientras que, el miR-210 fue el que presentó menor cantidad (203). Al cruzar la información de los genes blanco de cada miRNA con la base de datos de FTs que se usó en este trabajo, se encontró que el 15% de los genes blancos del miR-210 corresponden a FTs, indicando su importancia como regulador de la expresión génica (Figura 5-10).

**Figura 5-10: Diagrama de Venn con el número de genes blanco para cada miRNA.**

Se presenta el número de blancos totales y el porcentaje de ellos que se encuentra en la base de datos de factores de transcripción (dbTF).



La identificación de los blancos comunes de regulación entre los 5 miRNAs dio como resultado un total de 8 genes, de los cuales 7 tienen evidencia experimental de su relación con la respuesta a hipoxia. Entre ellos se encuentran los genes que codifican para el factor nuclear de células T activadas (NFTAT5), el Factor Kruepel (KLF6), la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK1), la proteína fork head box (FOXP1) y TNRC6B (*Trinucleotide repeat-containing gene 6B protein*) (Tabla 5-6). Cabe resaltar que un total de 50 blancos fueron compartidos entre 4 miRNAs y 248 entre 3 miRNAs, revelando la posible integración y modulación de la respuesta a hipoxia.

**Tabla 5-6: Genes compartidos por los 5 miRNAs y su función asociada a la condición de hipoxia.** El nombre de los genes y las proteínas codificadas corresponden a los encontrados en la base de datos UniProt (<https://www.uniprot.org/>).

GEN	PROTEINA CODIFICADA	FUNCIÓN
BCL11A	<i>B-cell lymphoma/leukemia 11A</i>	Se encarga del silenciamiento del gen <i>γ-globin</i> . Permite el switch fisiológico de hemoglobina F (HbF) a hemoglobina A (HbA) durante el desarrollo.
FOXP1	<i>Forkhead box protein P1</i>	Regula el desarrollo del tejido pulmonar, cerebral y cardíaco. Aumenta la proliferación de células musculares vasculares. Es un represor transcripcional de la expresión de genes relacionados con gluconeogénesis.
KLF6	<i>Kruppel-like factor 6</i>	Su expresión es dependiente de HIF-1a. Está relacionado con proliferación y angiogénesis. Contribuye en la activación transcripcional de la sintasa de óxido nítrico.
MAPK1	<i>Mitogen-activated protein kinase 1 (ERK)</i>	Participa en la vía de respuesta ante el estrés hipóxico. Aumenta la expresión del gen <i>hif1a</i> . Fosforila a HIF-1a lo que permite su traslocación al núcleo.
NFAT5	<i>Nuclear factor of activated T-cells 5</i>	Aumenta su expresión de manera independiente a HIF durante hipoxia. Se encuentra relacionado con roles osmoprotectores.
NFIB	<i>Nuclear factor 1 B-type</i>	Está relacionado con crecimiento celular, además, es necesario para la maduración pulmonar y el desarrollo cerebral. La regulación a la baja del producto de este gen promueve la fosforilación de PI3K.
TNRC6B	<i>Trinucleotide repeat-containing gene 6B protein</i>	Esta proteína es requerida para la represión de la traducción mediada por miRNAs y se relaciona con las proteínas argonautas (AGO)

En relación con las categorías del GO, vale la pena recordar que son características de cada gen, y su relación puede ser muy amplia, indicando que una misma proteína puede actuar en diferentes procesos, contener dominios que llevan a cabo funciones moleculares específicas y presentar actividad en diferentes partes de la célula (Plessis et al., 2011). En este trabajo se realizó el análisis de enriquecimiento de la categoría proceso biológico, buscando identificar un perfil funcional de un conjunto de genes y su posible relación a nivel celular.

Al realizar el análisis de GO en la categoría de proceso biológico para los genes blanco de los miRNA, se encontró que muchos de los genes están relacionados con la transcripción y la traducción de genes, y en general con, reacciones en las que se incluyen RNAs. Esto se encuentra asociado a que muchos genes que codifican para FTs son regulados por miRNAs, de hecho, se encontró que el miR-210 solo obtuvo niveles de significancia para estas categorías, indicando su capacidad como regulador maestro de la condición de hipoxia. De igual forma, la menor cantidad de genes blanco para el miR-210, en comparación con los genes blanco de otros miRNAs puede ser indicio de la existencia de programas celulares específicos que medien la respuesta hipóxica, tal como se muestra en la figura 5-11.

Así mismo, el análisis de los genes blancos de los otros miRNAs (miR-21, miR-22, miR-130 y miR-181) en la categoría de proceso biológico, permitió encontrar términos relacionados con las respuestas a hipoxia. Entre ellos se encuentran, el desarrollo de vasos sanguíneos, del sistema cardiovascular, pulmonar y nervioso, la regulación de la transducción de señales y de compuestos nitrogenados, la vía de señalización tirosin quinasa y de la insulina y procesos catabólicos dependientes de ubiquitinación. Todos estos procesos biológicos guardan estrecha relación con las adaptaciones presentes durante la hipoxia y con los mecanismos para sensar y responder ante el estímulo. Además, la figura 5-11 muestra la estrecha relación de estos miRNA en la regulación de los procesos biológicos mencionados anteriormente, debido a la regulación de múltiples genes por varios de estos miRNAs.

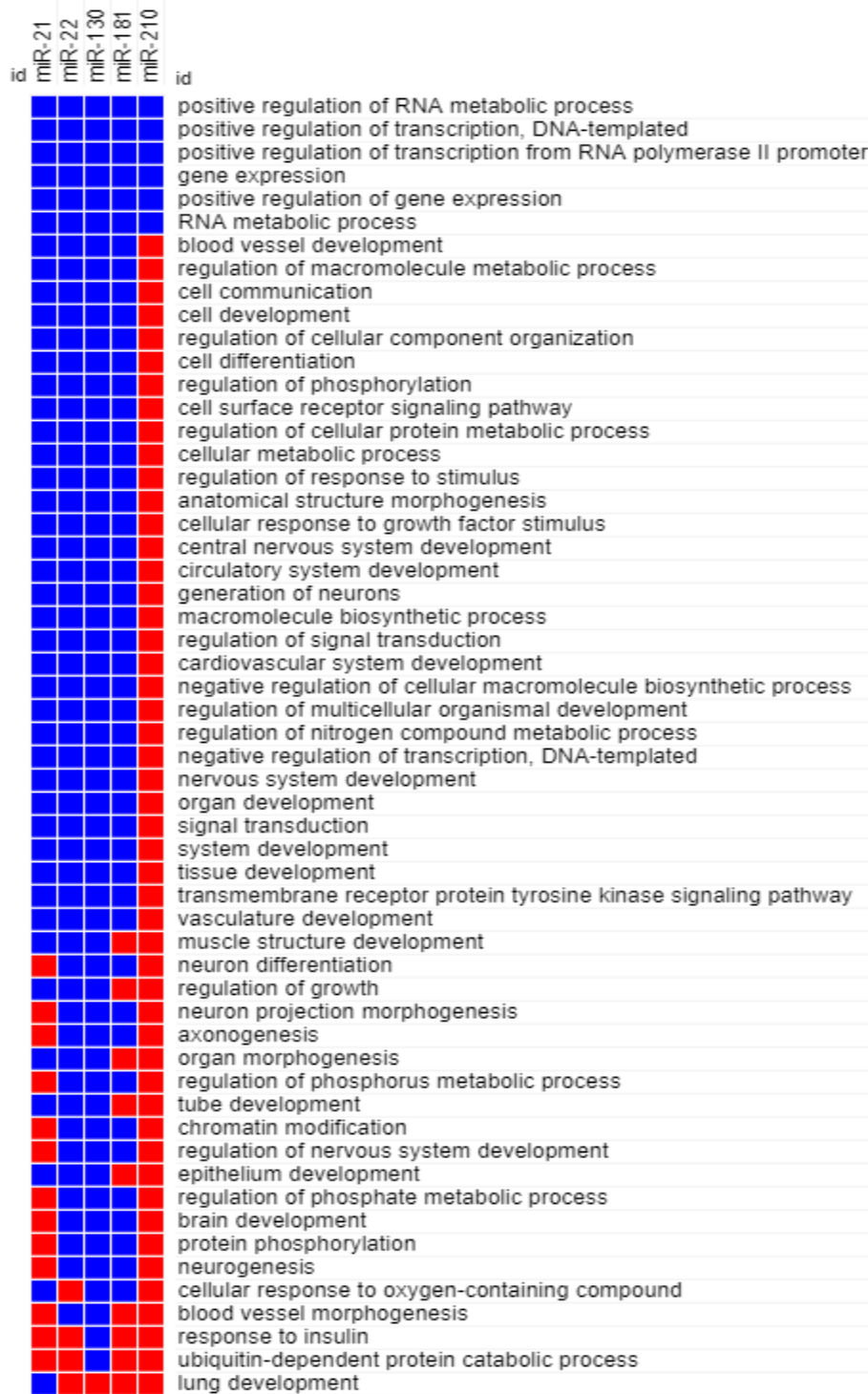
En cuanto a las vías de señalización del KEGG, no se encontraron resultados para los genes blanco del miR-210, posiblemente debido a que muchos de los blancos de este miRNA son FTs. Los genes blanco de los demás miRNAs mostraron una fuerte relación

---

con vías asociadas al cáncer, debido a la relación existente entre esta condición y la hipoxia, además, cabe destacar que estos miRNAs han sido utilizados en muchos estudios como biomarcadores para alertar sobre este estado patológico. Por otra parte, algunas de las vías enriquecidas en el análisis están relacionadas con la respuesta ante la hipoxia, como son la vía de las MAPK y AMPK que contribuyen a la estabilidad y la translocación de HIF al interior del núcleo, las adaptaciones metabólicas y el uso de la glucosa (mTOR y PI3K/Akt), la angiogénesis (VEGF), el manejo del tono vascular, la disponibilidad corporal de agua (contracción del músculo liso vascular y reabsorción de agua regulada por vasopresina) y finalmente la vía de señalización de HIF (Figura 5-12).

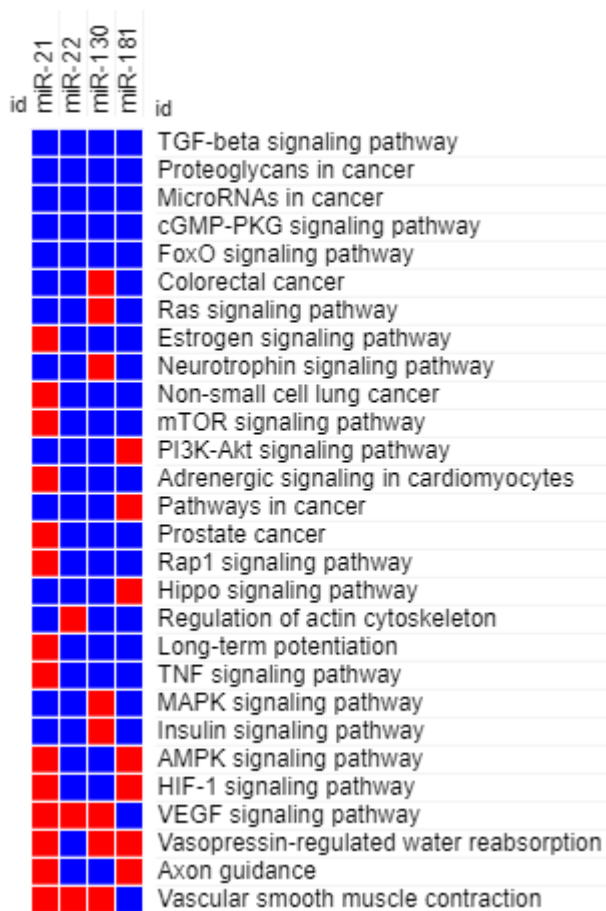
Es importante mencionar, que, aunque solo algunos de los genes blanco de los miRNAs se relacionan con las vías mencionadas anteriormente, existen grandes puntos de convergencia que demuestran la importancia de estos miRNAs durante la hipoxia y la acción cooperativa que estos pueden ejercer para causar en el organismo respuestas globales, tejido específicas y variables que permiten a la célula determinar un camino dependiendo el grado y el tiempo de exposición a hipoxia.

**Figura 5-11: Términos del GO asociados con la categoría proceso biológico.** En color azul se presentan los miRNAs que tienen como blanco genes relacionados con los diferentes términos asociados a la categoría de proceso biológico. El color rojo indica ausencia de relación.





**Figura 5-12: Vías de señalización del KEGG compartidas entre los genes blanco de los miRNAs.** En color azul se presentan los miRNAs que tienen como blanco genes relacionados con las diferentes vías de señalización del KEGG. El color rojo indica ausencia de relación.



### 5.4.2 Redes de regulación durante la hipoxia

Con el fin de hacer un acercamiento al mecanismo de regulación de cada miRNA, se construyeron redes de interacción con los productos codificados por los genes blanco de cada miRNA y así establecer las relaciones entre cada uno de ellos. Las redes se construyeron con el servidor STRING y para el análisis y diseño de estas se utilizó el programa Cytoscape, el cual permite la visualización gráfica de las interacciones proteína-proteína y su correspondiente análisis estadístico. Una vez abierta la red con las interacciones proteína-proteína de los genes blanco de cada miRNA, se usó la función de análisis estadístico para calcular el valor de algunas características de la red y con esta información realizar su diseño.

Para el diseño de la red, el primer parámetro a tener en cuenta fue el número de componentes conectados, el cual se restringió a 1. Es valor indica que todos los nodos debían tener interacción con la red central, de lo contrario eran eliminados. Debido al tamaño y la complejidad de las redes (a excepción del miR-210), el segundo parámetro buscó disminuir el número de nodos que se encontraban con la red central. Para ello, se filtró la red de acuerdo al número de conexiones (*degree*) que tiene cada nodo dentro de la red. Por defecto se estableció que el número mínimo de conexiones requeridas para pertenecer a la red era de 6.

Una vez seleccionados los nodos más relevantes, se diseñó la red de acuerdo al análisis estadístico. Para todas las redes, el tamaño del nodo se relacionó con el valor de conectividad de la vecindad (*neighborhood connectivity*), siendo los nodos más pequeños aquellos con un bajo valor para este parámetro. Teniendo en cuenta que la conectividad se relaciona con el número de vecinos, la conectividad de la vecindad de un nodo  $n$  es definida como el promedio de conectividad de todos los vecinos de  $n$ . Por otra parte, el color del nodo se relacionó con la información que se obtuvo de los predictores, de esta manera, los nodos de color verde son FTs, los de color azul son proteínas con HREs en sus promotores, los de color naranja son aquellos genes que codifican para FTs y tienen HREs y los nodos color violeta corresponden a los *hubs*.

Con el fin de identificar proteínas relacionadas, se utilizó la excentricidad para separar los nodos de la red y de esta manera seleccionar manualmente los *clusters* (Clu). Para cada uno de los Clu se identificó la vía de señalización en la que se encuentra relacionado usando como parámetro estadístico la tasa de falsos positivos (*False Discovery Rate*). Esta es una medida estadística que indica la proporción esperada de errores tipo I, es decir la aparición de falsos positivos. Las vías de señalización con una tasa de falsos positivos (FDR) $<0,05$  y que tenían relación con la hipoxia fueron seleccionadas. La información que se obtuvo de cada vía de señalización se tomó de las anotaciones realizadas y las descripciones que se encontraron en cada uno de los identificadores.

### **miR-21**

La red para este miRNA evidenció un total de 149 nodos, los cuales fueron agrupados en 7 Clu diferentes (Figura 5-13). Se identificaron un total de 13 *hubs*, de los cuales, tres son

FTs y contienen HREs en la región promotora de su gen. Las características de conectividad de estos *hubs* se encuentran en la tabla 5-7 (Figura 5-13).

**Tabla 5-7: Hubs identificados para la red del miR-21.**

<b>Nodo</b>	<b>Closeness</b>	<b>Neighborhood connectivity</b>	<b>TF</b>	<b>HRE</b>
CBFB	0.323	10.18	X	X
ERBB4	0.304	26.75	X	X
HGF	0.296	18.85		X
ITGB3	0.325	10.42		
PRKCE	0.293	18.66		X
SP1	0.329	10.45	X	
TFDP1	0.300	12.12	X	
TGFBR1	0.289	10.63		
TGFBR2	0.319	12.18		X
VCL	0.290	10.52		
WWP1	0.315	22.78	X	X
PPP1CC	0.285	8.05		
MAPK1	0.334	6.20		

El componente principal de regulación de esta red se relaciona con la señalización del eje TGFR-SMAD-BMP, debido a que un total de 4 Clu tienen efecto sobre esta vía. Este eje comprende varias vías de señalización que se enmarcan en un componente central de respuesta, en el que el factor de crecimiento transformante beta (TGFB) se une a su receptor (TGFR), lo que permite su internalización y la posterior activación de la familia de proteínas SMAD. Estas proteínas actúan en conjunto con un gran número de activadores y represores transcripcionales para regular positiva o negativamente la transcripción de genes cascada abajo, por lo tanto, el efecto de esta señal depende del tipo de célula y la relación con otras vías de señalización. La activación de esta vía regula procesos de migración, diferenciación, proliferación y apoptosis celular, además, se relaciona con algunas enfermedades. El Clu4 fue el que presentó la mayor cantidad de proteínas dentro de este eje, relacionadas con la señalización por los BNPs (bone morphogenetic proteins), una familia de factores de crecimiento que pertenecen a los TGFs y que se expresan ante diferentes condiciones activando la vía de señalización SMAD por una fosforilación de

receptores serina-treonina quinasa. Los BMPs tienen diferentes actividades biológicas en los tejidos, incluidos el hueso, cartílago, vasos sanguíneos, corazón, riñones, neuronas, hígado y pulmón, además su señalización está ligada a diferentes patologías, incluidas las vasculares, esqueléticas y el cáncer. Tanto el Clu1 como el Clu4 compartieron funciones en esta vía de señalización. Otra de las vías de señalización del Clu4 es la vía hippo, la cual controla el crecimiento de los tejidos y la vía de ALK, que está involucrada con la remodelación cardiovascular y su activación permite la angiogénesis, mientras que la deficiencia de ALK se traduce en una disminución de TGF2b evitando la señal paracrina relacionada con el crecimiento. La vía de Wnt y antiBMPs evitan el desarrollo y crecimiento vascular (Tabla 5-8).

En el Clu1 se encuentran proteínas relacionadas principalmente con la degradación proteosomal por ubiquitinación y tiene una gran relación con el Clu4, debido a que los niveles intracelulares de SMADs son regulados por ubiquitinación y degradación proteosomal. Los SMADs pueden ser ubiquitinados a nivel nuclear y degradados por este sistema, así mismo, hay moléculas inhibitoras de SMAD (I-SMAD) que llevan al receptor TGFR a degradación, estableciendo sistemas de retroalimentación negativos para bloquear la señal. Este *cluster* también puede relacionarse con la estabilidad de los HIFs al tener como blanco proteínas relacionadas con la degradación proteosomal.

El Clu3 se relacionó con vías de señalización de activación del eje RAS/RAF/MAPK, el cual ha sido fuertemente asociado con cáncer debido a las mutaciones de sus componentes. La vía de señalización del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) es un estimulador potente del crecimiento de los tejidos conectivos en células como fibroblastos, endotelio capilar y neuronas. Esto se realiza a través de la activación de las vías de MAPKs, en especial la vía de ERK. De igual forma, este *cluster* tiene proteínas relacionados con proliferación celular mediada por VEGFR2 que activa la vía de ERK-MAPK promoviendo angiogénesis (Tabla 5-8).

En el Clu5 se encuentra la señalización por neurotrofinas y la del factor de crecimiento epidérmico, cuyas funciones están relacionadas con la supervivencia, diferenciación y proliferación. También se encontraron proteínas en la vía de las MAPK, especialmente la vía de RAS/PI3K. Este eje está centrado en proteger a la célula de la apoptosis gracias a

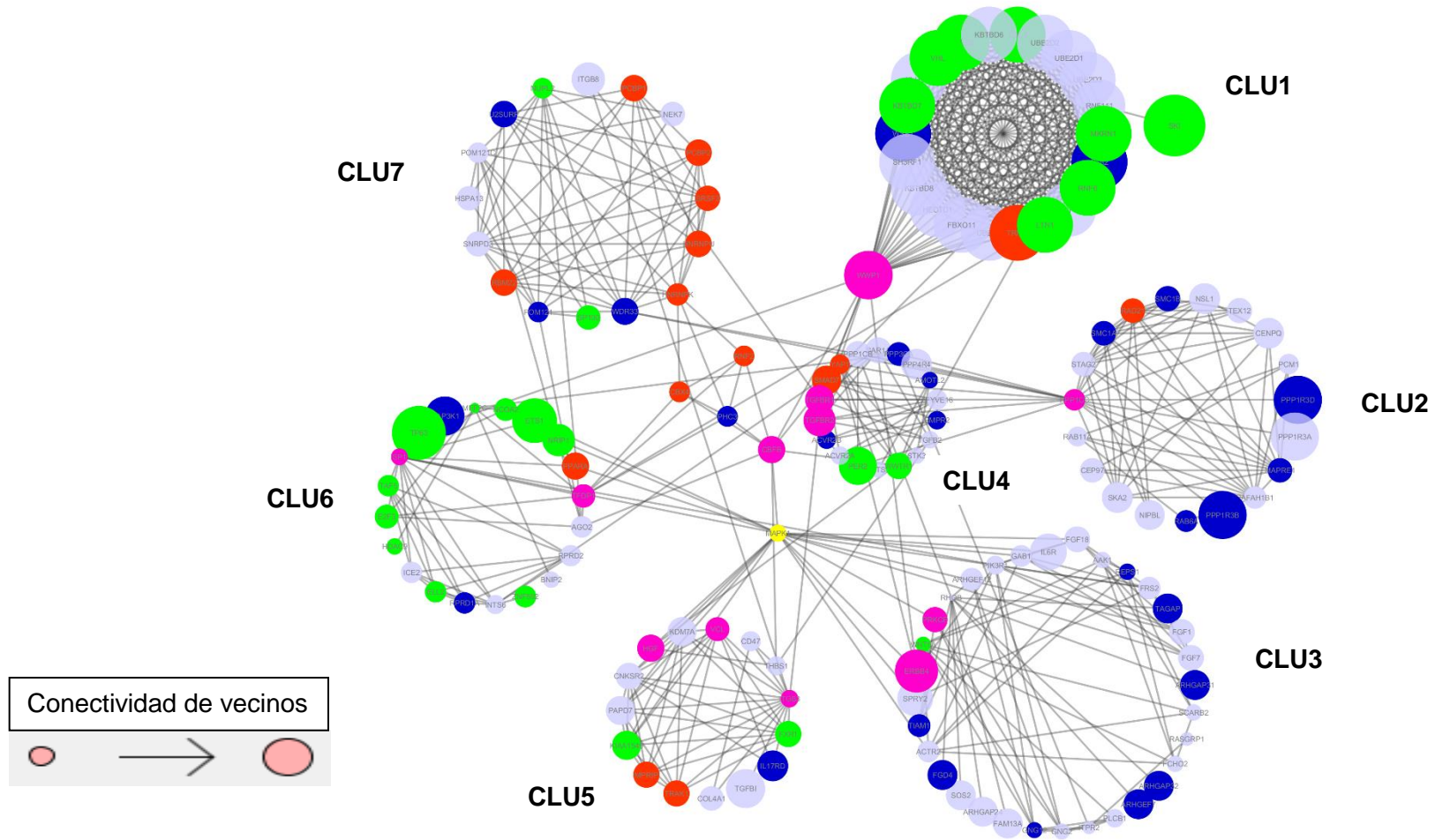
los factores de crecimiento y también en el control del metabolismo celular, supervivencia y la expresión génica.

El Clu2 agrupó proteínas con funciones asociadas a la progresión del ciclo celular, el desenrollamiento de la cromatina y la organización del citoesqueleto durante la división celular. El Clu6 se relacionó principalmente con la inducción de la transcripción génica, y el metabolismo de lípidos por medio de PPAR $\gamma$ , cuyo gen es uno de los que presenta variantes genotípicas asociadas al estímulo altitudinal. En este Clu también se encontraron términos asociados a la regulación de la biogénesis mitocondrial y a la vía de HIF. Finalmente, el Clu7 se relaciona con mecanismos implicados en el splicing y el transporte de mRNA al citoplasma (Tabla 5-8).

**Tabla 5-8: Vías de señalización de cada uno de los *clusters* presentes en la red del miR-21.**

Clu	Vía de señalización	FDR	Proteínas
1	Antigen processing: Ubiquitination & Proteasome degradation	1.56E-28	22
	Ubiquitin mediated proteolysis	9.23E-14	9
	Downregulation of SMAD2/3:SMAD4 transcriptional activity	2.74E-09	4
	Oxygen-dependent proline hydroxylation of Hypoxia-inducible Factor Alpha	1.51E-07	4
	Signaling by BMP	1.73E-07	3
2	Resolution of Sister Chromatid Cohesion	1.21E-12	9
	Cell Cycle	8.40E-12	13
3	Oncogenic MAPK signaling	4.08E-13	8
	Signaling by PDGF	2.78E-06	7
	MAPK1/MAPK3 signaling	5.98E-05	5
	NCAM signaling for neurite out-growth	9.39E-06	6
	Prolonged ERK activation events	5.98E-05	5
	VEGFR2 mediated cell proliferation	5.98E-05	5
	VEGFA-VEGFR2 Pathway	1.08E-04	5
4	TGF-beta signaling pathway	1.09E-12	10
	Hippo signaling pathway	1.82E-10	10
	ALK1 signaling events	1.61E-09	6
	Signaling by BMP	1.75E-07	5
5	Signalling by NGF	8.61E-12	16
	Signaling by EGFR	4.55E-10	13
	Ras signaling pathway	6.50E-10	11
	PI-3K cascade:FGFR2	1.53E-09	6
6	RNA polymerase II transcribes snRNA genes	2.66E-09	7
	RORA activates gene expression	5.04E-04	3
	Transcriptional activation of mitochondrial biogenesis	1.12E+03	3
	HIF-1-alpha transcription factor network	2.05E+03	3

**Figura 5-13: Red de regulación para el miR-21.** Se presentan los productos de los genes blanco del miR-21. En color verde se presentan los FTs, en azul aquellas proteínas cuyo gen presenta HREs, en naranja aquellas proteínas que son FTs y sus genes contienen HREs, en violeta se presentan los *hubs* y en amarillo las proteínas codificadas por genes blanco de los 5 miRNAs. El tamaño del nodo se relaciona con la conectividad de vecinos (*neighborhood connectivity*).



## miR-22

Esta red presentó una gran heterogeneidad lo que indica la participación de este miRNA en diferentes procesos metabólicos y en consecuencia el número de genes que tiene como blanco. Esta red tiene 168 nodos agrupados en 6 *clusters* que se relacionan principalmente con la vía MAPKs/Ras y la respuesta inflamatoria. Se encontraron un total de 29 hubs de los cuales 7 son FTs y también contienen HREs en el promotor de su gen (Tabla 5-9) (Figura 5-14).

**Tabla 5-9: Hubs identificados en la red del miR-22**

<b>Nodo</b>	<b>Closeness</b>	<b>Neighborhood connectivity</b>	<b>FT</b>	<b>HRE</b>
ITGB3BP	0.315	18.93	X	
ETS2	0.313	31.00		
CSNK1A1	0.321	22.00		
HMGB1	0.345	21.38	X	X
SP1	0.350	19.36	X	
TP63	0.322	22.50	X	
SMURF1	0.338	20.80		X
RUNX1	0.331	18.58	X	
WNT5A	0.328	22.36	X	
TNRC6B	0.334	20.66		
PRKCE	0.316	20.58		X
TNRC6C	0.334	20.66		
UBE2N	0.321	19.73	X	X
AGO1	0.336	19.75		X
TNRC6A	0.334	20.66	X	
RARG	0.331	25.88		
FOXO3	0.319	22.83	X	X
RELA	0.366	19.57	X	X
STAG2	0.331	20.77		
PPARA	0.330	21.00	X	X
ESR1	0.361	23.08	X	
PRKAR2A	0.329	20.81		X
PPP2R1B	0.354	18.56		
ARRB1	0.327	18.97	X	X
RAN	0.313	19.72	X	X
AP2M1	0.313	24.50		
AP2B1	0.313	23.23		X
ACTR2	0.317	19.93		
CDKN1A	0.343	21.69	X	



En este caso, el Clu1 involucra proteínas que promueven el desarrollo y progresión del ciclo celular, regulando las modificaciones del citoesqueleto. El Clu2 tiene una estrecha relación con el sistema de ubiquitinación de proteínas y la respuesta inmune adaptativa. El Clu3 está relacionado con procesos de internalización y tráfico de moléculas biológicas, involucrando diferentes sitios celulares como el retículo endoplasmático, complejo de Golgi y membrana plasmática. También se encuentra la señalización de EPH-Eprin que permite a las células migrar a su destino dependiendo de una señal de la membrana. El Clu4 se relacionó con la señalización de proteínas G, las cuales corresponden a la familia más grande de receptores transmembranales y que dentro de sus funciones se encuentra la regulación del sistema inmune, la inflamación a través de la vía de las MAPK (ERK, JNK y p38) y la apertura de canales de calcio. Uno de los aspectos más importantes de este *cluster* es la regulación de la contracción del músculo liso vascular que permite la vasoconstricción para regular el flujo sanguíneo y la presión por medio de la apertura de canales de calcio. Dentro de las vías de señalización de las proteínas presentes en la red de este miRNA se encuentran la regulación de las RHO quinasas y la regulación de la vasopresina, que permite la reabsorción de agua a nivel renal a través de acuaporinas (Tabla 5-10).

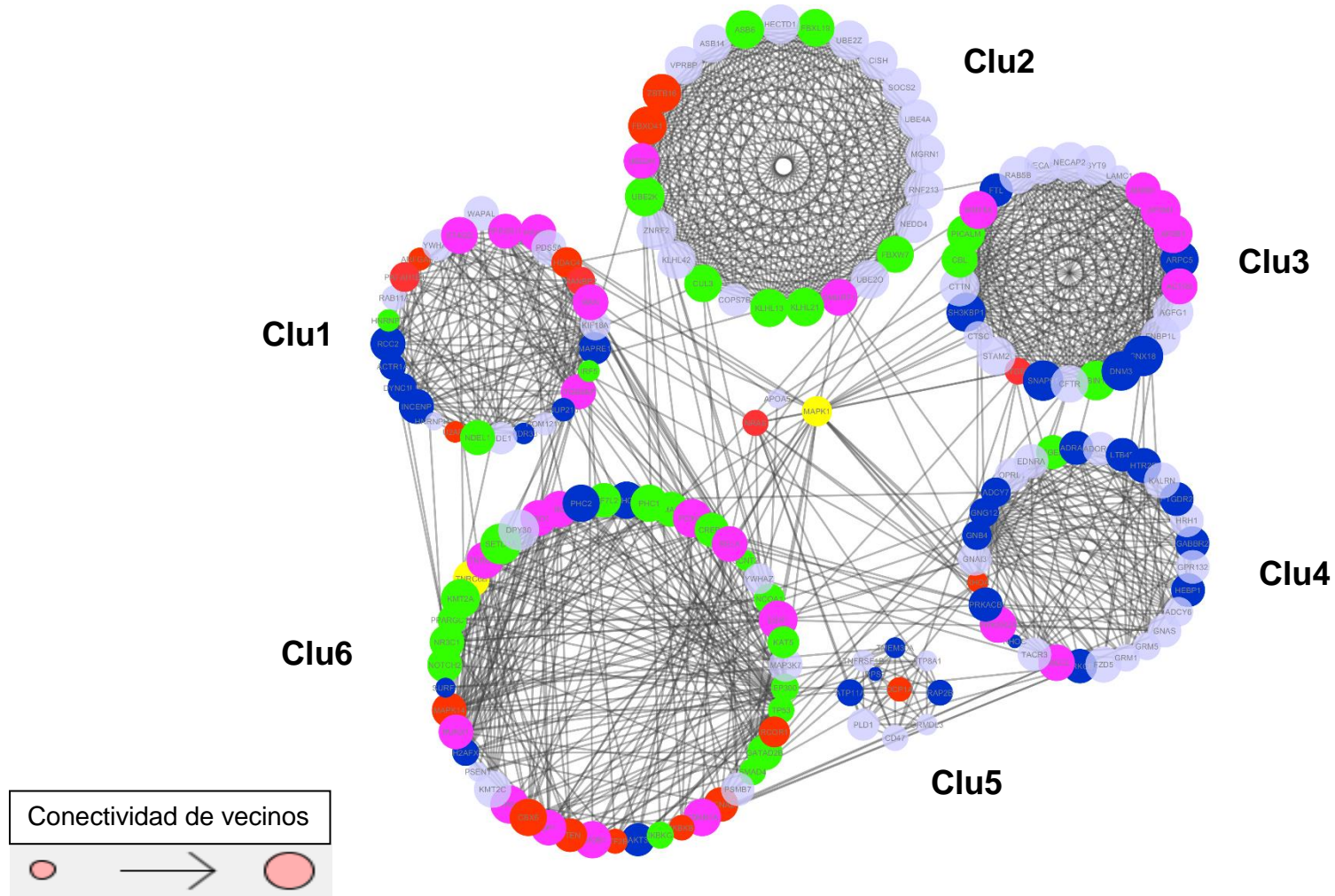
El cluster 5 se relacionó con la degranulación de leucocitos en respuesta a la infección y la liberación de moléculas de señalización celular. El Clu6 involucra la reorganización de la cromatina para promover un fenotipo secretor senescente asociado al estrés oxidativo, actuando como un mecanismo protector del cáncer. También se encontró relación con p53 un FT que bajo condiciones de estrés regula la transcripción de genes asociados al metabolismo, sobrevivencia, senescencia y la apoptosis. Una de las formas de regulación metabólica por p53 ocurre al inhibir la producción de ROS, esto lo logra al disminuir la tasa de glucólisis limitando la cantidad de receptores GLUT. De igual forma regula negativamente a PI3K/AKT y mTOR disminuyendo la tasa de síntesis de proteínas y por lo tanto el crecimiento celular. Esta vía promueve además un incremento en la tasa de respiración mitocondrial al disminuir las ROS. Estas proteínas se han relacionado con el efecto Warburg, que hace referencia al *switch* metabólico producido por las células cancerígenas que se encuentran en hipoxia permanente. Es de gran importancia es mencionar el hecho de que todos los *clusters* se relacionaron con la diferenciación y proliferación del sistema nervioso (Tabla 5-10).

De acuerdo con los resultados, este miRNA se relaciona con los procesos de inflamación que se presentan posterior al estímulo hipóxico y también con la regulación del tono vasomotor en diferentes tejidos, el cual es importante para compensar la hipertensión presente durante la altitud. Esta función, también la ejerce al controlar la reabsorción de líquidos a nivel renal, lo que determina la viscosidad sanguínea y por lo tanto la resistencia vascular periférica, que igualmente puede producir hipertensión a nivel pulmonar o sistémico.

**Tabla 5-10: Vías de señalización de cada uno de los *clusters* presentes en la red del miR-22.**

<b>Clu</b>	<b>Vía de señalización</b>	<b>FDR</b>	<b>Proteínas</b>
<b>1</b>	Resolution of Sister Chromatid Cohesion	3.06E-13	12
	Cell Cycle, Mitotic	3.91E-11	16
<b>2</b>	Antigen processing: Ubiquitination & Proteasome degradation	4.88E-26	21
	Class I MHC mediated antigen processing & presentation	1.19E-24	21
	Adaptive Immune System	1.46E-17	21
	Ubiquitin mediated proteolysis	1.94E-11	11
<b>3</b>	Clathrin-mediated endocytosis	7.57E-35	22
	Membrane Trafficking	1.53E-24	24
	Vesicle-mediated transport	5.94E-24	24
	Cargo recognition for clathrin-mediated endocytosis	1.30E-18	14
<b>4</b>	Signaling by GPCR	4.22E-23	29
	Calcium signaling pathway	2.43E-10	12
	Vascular smooth muscle contraction	1.43E-07	9
	Vasopressin regulates renal water homeostasis via Aquaporins	1.43E-07	7
	Aquaporin-mediated transport	4.87E-07	7
<b>5</b>	Neutrophil degranulation	5.28E-06	8
<b>6</b>	Cellular Senescence	7.96E-12	16
	Cellular responses to stress	3.91E-09	18
	Transcriptional Regulation by TP53	2.51E-08	16
	Oxidative Stress Induced Senescence	9.97E-08	11
	TP53 Regulates Metabolic Genes	1.67E-06	9

**Figura 5-14: Red de regulación para el miR-22.** Se presentan los productos de los genes blanco del miR-22. En color verde se presentan los FTs, en azul aquellas proteínas cuyo gen presenta HREs, en naranja aquellas proteínas que son FTs y sus genes contienen HREs, en violeta se presentan los *hubs* y en amarillo las proteínas codificadas por genes blanco de los 5 miRNAs. El tamaño del nodo se relaciona con la conectividad de vecinos (*neighborhood connectivity*).



### **miR-130**

Esta red contó con un total de 342 nodos agrupados en 8 *clusters* que se relacionaron principalmente con adaptaciones metabólicas a través de la vía de mTOR. Adicionalmente, se encontraron un total de 36 *hubs*, de los cuales 4 son FTs y sus genes contienen HREs en su promotor (Tabla 5-11) (Figura 5-15).

El Clu1 y 4 se relacionaron con la formación, la internalización y el tráfico de vesículas para la comunicación celular. El Clu2 agrupa proteínas relacionadas con la señalización de diferentes factores de crecimiento, entre ellos el factor de crecimiento del nervio (NGF), el factor de crecimiento de la insulina (IGFR), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento epidermal (EGF) y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). Los receptores de estos factores de crecimiento suelen expresarse de manera diferencial en las células, por ejemplo, los receptores del NGF se encuentran a nivel nervioso, los de PDGF en células del tejido conectivo y endotelial promoviendo el crecimiento y la movilidad del tejido conectivo y el receptor de VEGF en células endoteliales. Estas vías de señalización permiten la activación de la señal intracelular por la vía RAS-MAF-MAPK (ERK) y la vía de PI3K-PKB, lo que permite el crecimiento, diferenciación, desarrollo y supervivencia de la célula. En este *cluster* también se encontraron proteínas involucradas en la vía de señalización para la diferenciación y plasticidad neuronal (Tabla 5-12).

**Tabla 5-11: Hubs identificados en la red del miR-130**

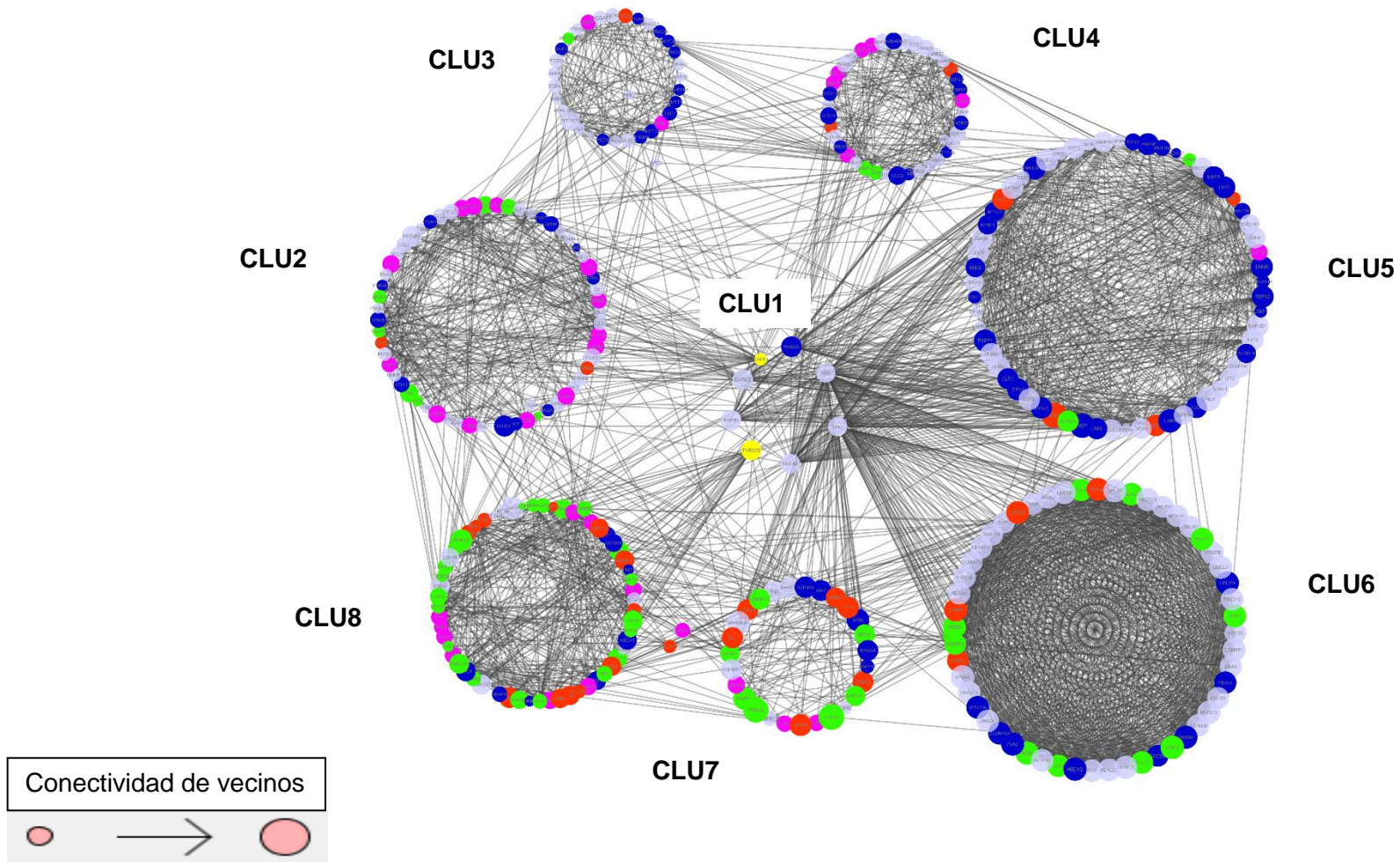
<b>Nodo</b>	<b>Closeness</b>	<b>Neighborhood connectivity</b>	<b>FT</b>	<b>HRE</b>
CENPO	0.292	18.36		
CCT6A	0.300	20.57		X
CLCN6	0.312	21.36		
KDM7A	0.312	21.36		
COG5	0.300	18.08		X
ELAVL2	0.291	17.66	X	X
EDN1	0.315	18.00		
NCKAP1	0.311	19.20		
KMT2C	0.306	21.16		
S1PR1	0.324	20.00		X
S1PR2	0.317	21.07		X
ERBB3	0.307	18.85		X
E2F2	0.296	20.06	X	
CSK	0.334	20.06		X
FXR1	0.312	19.58	X	
E2F3	0.304	21.16	X	
SIRT1	0.310	20.71	X	X
MARK3	0.319	21.66		
NDEL1	0.294	17.41	X	
YY1	0.318	20.38	X	
ACVR2B	0.291	20.00		X
ACVR2A	0.291	20.00		
PHC3	0.293	19.31		X
RBM17	0.291	17.66		X
U2SURP	0.291	17.66		X
SMAD5	0.293	21.61	X	
MAX	0.301	17.61	X	
SRSF11	0.299	17.84		
PUF60	0.291	17.66	X	
QKI	0.314	20.41		
BCL2L11	0.326	21.35	X	
EFNB2	0.308	18.76		
IGF1R	0.302	21.33		
NCOA3	0.318	19.34	X	X
CREB1	0.329	17.43	X	
PPARG	0.304	18.88	X	X

Los demás *clusters* se relacionaron principalmente con la regulación negativa de la vía de señalización de mTOR, promoviendo el cambio metabólico ampliamente descrito durante la condición de hipoxia. Esta proteína regula el crecimiento celular y la división en respuesta a los niveles de energía y los nutrientes disponibles al balancear los procesos anabólicos (síntesis de proteínas y almacenamiento de nutrientes) con los catabólicos (autofagia y utilización de las reservas energéticas). Dentro del Clu3 se agruparon proteínas relacionadas con p53, un supresor tumoral que regula negativamente proteínas en la vía de PI3K y mTOR disminuyendo la tasa de síntesis proteica y por lo tanto el crecimiento celular. En relación con lo anterior, en el Clu4 hay proteínas que están involucradas en el procesamiento de mRNA y del *splicing*, indicando que pueden regular la inhibición de la síntesis proteica. El Clu 5 presentó proteínas relacionadas con el tráfico de vesículas, entre ellas la vía de señalización de Wnt, una familia de morfogenes que activan vías de señalización en procesos de comunicación célula-célula, mientras que el Clu6 se relacionó con procesos de degradación dependientes de Ubiquitina. El siguiente cluster (Clu7), se relacionó con las vías de señalización de los TGF, BMPs y ALK, determinando el tamaño y el crecimiento de los órganos y tejidos. Finalmente, el Clu8 tuvo relación con la regulación del metabolismo de lípidos a través de PPAR, esta proteína se considera como la mayor reguladora de la oxidación de ácidos grasos en el hígado, lo que permite controlar procesos como la oxidación, transporte y producción de ácidos grasos. Esto lo realiza en conjunto con la proteína RORA, cuyo gen se ha reportado que guarda estrecha relación con la adaptación de etíopes luego de periodos prolongados de residencia en la altitud (Tabla 5-12).

**Tabla 5-12: Vías de señalización de cada uno de los *clusters* presentes en la red del miR-130.**

<b>Clu</b>	<b>Vía de señalización</b>	<b>FDR</b>	<b>PROTEINAS</b>
<b>1</b>	Clathrin-mediated endocytosis	1.59E-12	6
	Membrane Trafficking	1.41E-08	6
	Vesicle-mediated transport	2.17E-08	6
<b>2</b>	Vesicle-mediated transport	2.17E-08	6
	Signalling by NGF	3.05E-16	22
	IGF1R signaling cascade	4.56E-14	17
	EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	1.06E-13	11
	Signaling by PDGF	1.34E-13	18
	Signaling by EGFR	1.09E-12	17
	VEGFA-VEGFR2 Pathway	3.27E-12	16
<b>3</b>	Macroautophagy	8.17E-18	11
	Energy dependent regulation of mTOR by LKB1-AMPK	2.92E-15	8
	mTOR signalling	7.06E-14	8
	TP53 Regulates Metabolic Genes	2.16E-09	7
<b>4</b>	mRNA Splicing - Major Pathway	5.45E-15	13
	Processing of Capped Intron-Containing Pre-mRNA	1.98E-14	13
	Membrane Trafficking	1.40E-09	14
	Vesicle-mediated transport	3.57E-09	14
<b>5</b>	Clathrin-mediated endocytosis	1.42E-28	25
	Membrane Trafficking	2.13E-28	35
	Wnt signaling pathway	9.49E-10	10
<b>6</b>	Antigen processing: Ubiquitination & Proteasome degradation	5.19E-46	36
	Ubiquitin mediated proteolysis	2.12E-17	16
<b>7</b>	TGF-beta signaling pathway	8.00E-18	11
	ALK1 signaling events	7.51E-12	6
<b>8</b>	PPARA activates gene expression	6.06E-13	11
	Regulation of lipid metabolism by Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha)	7.91E-13	11
	RORA activates gene expression	5.08E-08	5

**Figura 5-15: Red de regulación para el miR-130.** Se presentan los productos de los genes blanco del miR-130. En color verde se presentan los FTs, en azul aquellas proteínas cuyo gen presenta HREs, en naranja aquellas proteínas que son FTs y sus genes contienen HREs, en violeta se presentan los *hubs* y en amarillo las proteínas codificadas por genes blanco de los 5 miRNAs. El tamaño del nodo se relaciona con la conectividad de vecinos (*neighborhood connectivity*).





## miR-181

Esta red tiene un total de 190 nodos agrupados en 8 *clusters*. Se identificaron un total de 19 *hubs*, entre estos *hubs* no se encontró ninguna proteína que fuera FTs y que a su vez tuviera HREs en la región promotora de su gen (Tabla 5-13) (Figura 5-16).

**Tabla 5-13: Hubs identificados en la red del miR-181**

<b>Nodo</b>	<b>Closeness</b>	<b>Neighborhood connectivity</b>	<b>FT</b>	<b>HRE</b>
CCNB1	0.311	18.13		X
SIN3B	0.286	20.05	X	
PHC3	0.286	19.7		X
PCGF2	0.271	21.38	X	
CBX4	0.286	18.61	X	X
KMT2A	0.284	19.08	X	
YY1	0.309	19.31	X	
ATP11A	0.278	17.66		X
AGO4	0.314	18.18		
AKAP9	0.314	18.34	X	
PPP2R5E	0.308	18.73		
KMT2C	0.279	18.18		
CNR1	0.266	17.72		X
PTGER3	0.266	17.72	X	
TUBB	0.291	1925		X
SLC2A3	0.278	17.66		
S1PR1	0.305	20.04		X
CXCL2	0.281	18.41		X
CENPO	0.290	18.3		

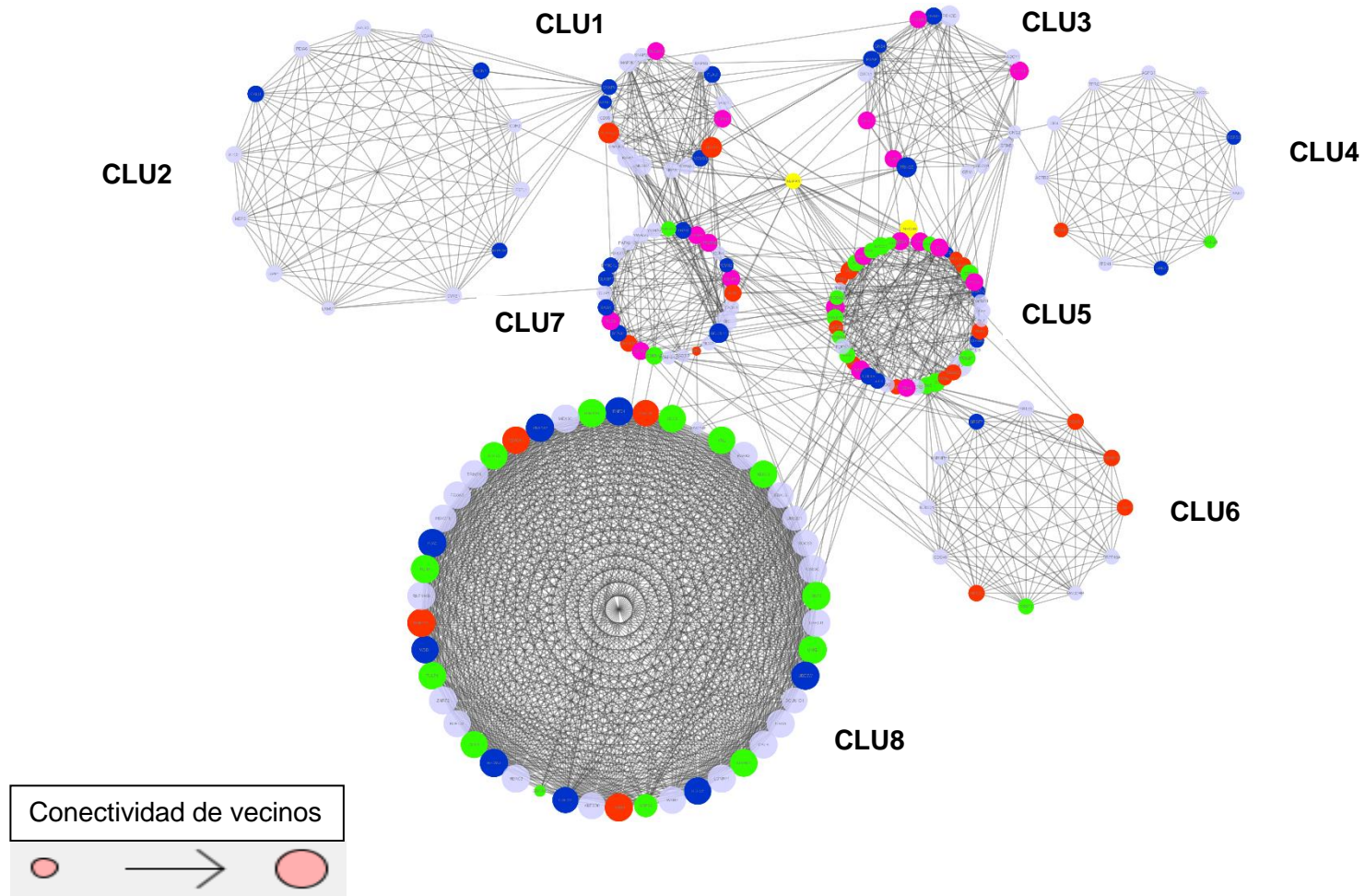
Para esta red, en el Clu1 se encuentran proteínas relacionadas con la activación de la vía de señalización de Ras, desencadenando cascadas que promueven la proliferación y la supervivencia celular. Este Clu también se relacionó con la señalización de VEGF ya que este factor de crecimiento activa la vía de Ras, para promover angiogénesis. El Clu2 agrupa proteínas cuya función se centra en el remodelamiento de la matriz extracelular, entre ellas se encuentran proteínas necesarias para la producción de colágeno, glicoproteínas y proteoglicanos. El Clu3 se relaciona con proteínas receptoras G, una gran familia de receptores que transmiten señales extracelulares de hormonas y neurotransmisores. Otras proteínas presentes en este Clu regulan la señalización del glucagón para promover la ruptura de glucógeno y también la regulación de la homeostasis

del agua a través de la vasopresina y las aquaporinas. Las proteínas presentes en el Clu4 se relacionaron con la endocitosis y el tráfico de membranas, como se puede ver en la red (Figura 5-16) el Clu4 se relaciona únicamente con el Clu3 y tienen relación al ser estos mediadores de la respuesta intracelular por moléculas externas. En el Clu5 se encuentra la vía de resistencia a la insulina, una de las vías de señalización más representativa de la red. Esta vía reduce la translocación del receptor GLUT4 y como resultado se produce un incremento en la captación de glucosa y la producción de glucógeno en el músculo, de igual forma promueve el incremento de la gluconeogénesis y la disminución de la síntesis de glucógeno en el hígado. En este *cluster* se encontraron proteínas relacionadas con la inducción de senescencia asociada al estrés oxidativo. El siguiente cluster (Clu6) se asoció con la transcripción génica y la vía de *splicing* del mRNA. En el Clu7 se encontraron proteínas relacionadas con la regulación del ciclo celular a través de la familia de los FTs FoxO y la activación de la vía RHO-GTPasa que regulan la organización del citoesqueleto. Por último, el Clu8 agrupo proteínas relacionadas con la vía de degradación ubiquitina-proteosoma (Tabla 5-14).

**Tabla 5-14: Vías de señalización de cada uno de los *clusters* presentes en la red del miR-181.**

<b>CLU</b>	<b>Vía de señalización</b>	<b>FDR</b>	<b>Proteínas</b>
<b>1</b>	Neutrophil degranulation	3.51E-15	13
	Innate Immune System	2.65E-14	16
	Ras signaling pathway	1.36E-05	5
	VEGFR2 mediated cell proliferation	2.67E-05	5
<b>3</b>	Signaling by GPCR	3.14E-12	15
	Vasopressin regulates renal water homeostasis via Aquaporins	1.64E-04	4
	Aquaporin-mediated transport	3.57E-04	4
<b>4</b>	Clathrin-mediated endocytosis	1.91E-19	11
<b>5</b>	Insulin resistance	1.68E-09	10
	Oxidative Stress Induced Senescence	3.02E-07	9
<b>6</b>	mRNA Splicing - Major Pathway	9.87E-20	12
	mRNA Splicing	1.65E-19	12
<b>7</b>	Cell Cycle	6.92E-16	19
	FoxO family signaling	8.93E-09	7
	RHO GTPase Effectors	4.31E-07	10
<b>8</b>	Antigen processing: Ubiquitination & Proteasome degradation	1.33E-50	35

**Figura 5-16: Red de regulación para el miR-181.** Se presentan los productos de los genes blanco del miR-181. En color verde se presentan los FTs, en azul aquellas proteínas cuyo gen presenta HREs, en naranja aquellas proteínas que son FTs y sus genes contienen HREs, en violeta se presentan los *hubs* y en amarillo las proteínas codificadas por genes blanco de los 5 miRNAs. El tamaño del nodo se relaciona con la conectividad de vecinos (*neighborhood connectivity*).



## miR-210

La red de interacción para las proteínas codificadas por los blancos de este miRNA evidenció un total de 28 nodos interrelacionados en dos *clusters*. Los *hubs* identificados corresponden a los puntos de mayor conectividad de cada una de las agrupaciones y ambos poseen HRE en la región promotora de su gen (Tabla 5-15) (Figura 5-17).

**Tabla 5-15: Hubs identificados para la red del miR-210**

<b>Nodo</b>	<b>Degree</b>	<b>Neighborhood connectivity</b>	<b>TF</b>	<b>HRE</b>
KRAS	10	2.50		X
SIN3A	6	4.33	X	X

En este caso, el Clu1 está relacionado con la activación de la vía de p38, la regulación del metabolismo de lípidos por PPARP (el mayor regulador de oxidación de ácidos grasos en el hígado) y la vía de señalización de NOTHC. Esta es una vía de señalización conservada para la comunicación célula a célula involucrada en la regulación de la diferenciación, proliferación y especificación celular. Esta vía permite renovar células que se encuentran en la sangre, piel, intestino y sistema nervioso, y además, la regulación de la angiotensina que se relaciona con el remodelamiento cardíaco al estimular la síntesis de proteínas de la matriz extracelular. La producción de fibronectina mediada por angiotensina es regulada transcripcionalmente por la apolipoproteína II. La vía de la apelina está relacionada con procesos de angiogénesis y la angiogénesis patológica (Tabla 5-16)

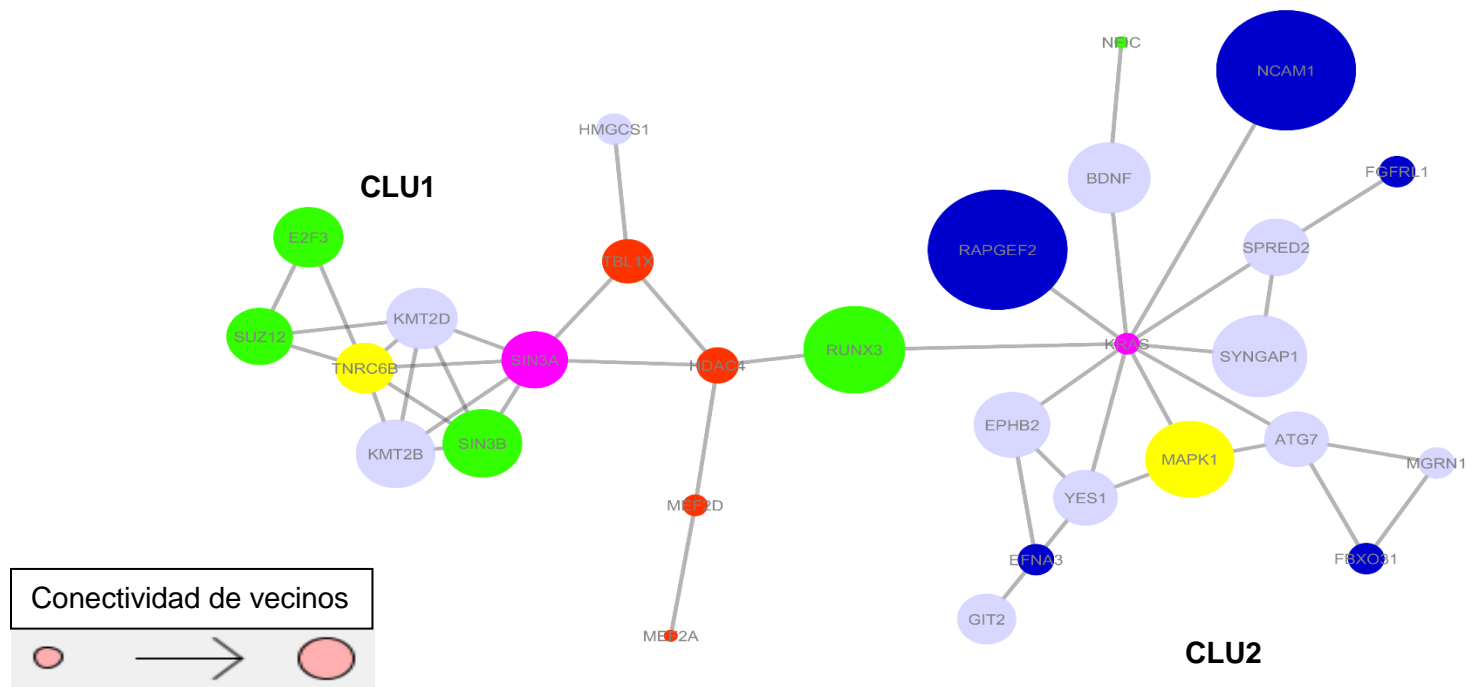
El clu2, se relacionó con procesos de neurogénesis, además allí se encuentran proteínas relacionadas con la activación cascada abajo de los receptores del factor de crecimiento endotelial (EGFR) encargados de la migración y especialización del epitelio y la activación del pro-oncogen RAS. Esta última esta encargada de la diferenciación y proliferación, el control de los receptores de insulina, y la señalización relacionada con la vía de VEGF. El gen *ehphrin* también es blanco de este miRNA y se relaciona con diferenciación nerviosa y angiogénesis. Como se evidencia, los genes blanco de este miRNA regulan funciones presentes en las redes de los demás miRNAs, entre ellas, las relacionadas con el transporte, la entrega y el uso del oxígeno, por lo tanto, es conocido como el regulador maestro de la hipoxia. El tamaño de la red puede asociarse a su capacidad regulatoria ya que controla un gran número de FTs que pueden influir en procesos de señalización cascada abajo. También tiene como punto central de control las MAPKs, estableciendo un

loop de retroalimentación positivo con la cantidad de HIF presente en la célula (Tabla 5-16).

**Tabla 5-16: Vías de señalización de los *clústers* presentes en la red del miR-210.**

CLU	VIA DE SEÑALIZACIÓN	FDR	PROTEINAS
1	Signaling by NOTCH	3.01E-03	4
	Regulation of lipid metabolism by Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha)	4.80E-03	4
	PKMTs methylate histone lysines	4.10E-02	3
	Chromatin organization	1.06E-01	4
	Role of Erk5 in Neuronal Survival	1.29E-01	2
	Oxidative Stress Induced Senescence	2.13E-01	3
	Regulation of PGC-1a	2.32E-01	2
	Apelin signaling pathway	2.73E-01	3
	Myogenesis	3.41E-01	2
	Angiotensin II mediated activation of JNK Pathway via Pyk2 dependent signaling	4.70E-01	2
	p38 MAPK pathway	5.27E-01	2
	p38 MAPK Signaling Pathway	6.51E-01	2
	2	Axon guidance	5.55E-06
Interleukin-3, 5 and GM-CSF signaling		2.24E-05	7
Signaling by SCF-KIT		9.86E-05	7
SOS-mediated signalling		3.98E-04	6
SHC1 events in EGFR signaling		3.98E-04	6
GRB2 events in EGFR signaling		3.98E-04	6
Signaling by FGFR1		4.04E-04	4
Signalling to p38 via RIT and RIN		4.38E-04	6
Frs2-mediated activation		4.48E-04	6
MAPK1/MAPK3 signaling		4.59E-04	6
Signaling by Leptin		4.80E-04	6
Signalling to RAS		5.14E-04	6
VEGFR2 mediated cell proliferation		5.38E-04	6
FCER1 mediated MAPK activation		7.16E-04	6
Insulin receptor signalling cascade		1.24E-03	6
IGF1R signaling cascade		1.27E-03	6
Signaling by Type 1 Insulin-like Growth Factor 1 Receptor (IGF1R)		1.29E-03	6
VEGFA-VEGFR2 Pathway	2.24E-03	6	

**Figura 5-17: Red de regulación para el miR-210.** Se presentan los productos de los genes blanco del miR-210. En color verde se presentan los FTs, en azul aquellas proteínas cuyo gen presenta HREs, en naranja aquellas proteínas que son FTs y sus genes contienen HREs, en violeta se presentan los *hubs* y en amarillo las proteínas codificadas por genes blanco de los 5 miRNAs. El tamaño del nodo se relaciona con la conectividad de vecinos (*neighborhood connectivity*).







El análisis de redes, en conjunto con el desarrollo de bases de datos permite analizar el perfil funcional de uno o muchos genes con el fin de establecer relaciones a nivel fisiológico. En este trabajo se analizaron las redes de regulación de los 5 hipoxamiRs seleccionados ubicando los FTs y los genes que presentan en su promotor HREs (Tabla 5-14). Esto permitió identificar proteínas clave en los procesos de respuesta a hipoxia y establecer que, para cada red, aproximadamente un tercio de los nodos contiene al menos uno de estos elementos.

Como resultado se encontró una importante regulación de componentes en común entre las redes, por ejemplo, la vía de señalización de ubiquitinación, el desarrollo del sistema nervioso, la respuesta inflamatoria, angiogénesis, endocitosis, la regulación de los fluidos corporales y la señalización de la vía de las MAPKs. Esta última se convierte en el efector central de la respuesta a hipoxia, ya que todos los miRNAs evaluados presentaron control transcripcional sobre componentes de esta vía, tal como se muestra en la tabla 5-6. Como se ha mencionado, esta vía en conjunto con la inhibición del sistema de degradación proteosomal por ubiquitina permite la estabilidad y la translocación de HIF-a al núcleo para que actúe como efector transcripcional. De igual forma se encontró que los genes blanco de estos miRNAs están involucrados en mecanismos que han sido reportados durante la condición de hipoxia como son la inflamación, la regulación metabólica, cambios en la dinámica mitocondrial y variaciones a nivel cardiovascular. También se encontraron genes relacionados con las adaptaciones necesarias para la supervivencia en poblaciones nativas a la altitud, como el caso de RORA y PPAR $\gamma$ .

Unas de las vías de señalización que se encuentran reguladas por los 5 miRNAs estudiados son las relacionadas con el tráfico de vesículas y la comunicación extracelular. Estas vías de señalización median la internalización de los receptores cuando se unen a sus ligandos con el fin de promover cascadas de señalización, también se encontraron vías de señalización relacionadas con la endocitosis. Estos hallazgos pueden dar cuenta de la función paracrina y endocrina de los miRNAs para la comunicación celular, estableciendo mecanismos de respuesta global del organismo ante la condición de estrés. Lo anterior tiene relación con que la mayoría de los programas celulares de cada miRNA tenga como eje central la vía de las MAPK la cual responde ante estímulos externos.

Un aspecto importante que se presenta como resultado del análisis, se centra en el hecho de que las redes de regulación de cada miRNA tienen funciones convergentes con las

otras redes. Sin embargo, se pudo evidenciar que cada miRNA tiene una función relacionada con una vía de activación principal y que las proteínas reguladas por el miRNA se encuentran a lo largo de la cascada de señalización, es decir desde la activación del receptor, las proteínas que median la señal intracelular y los FTs presentes en el núcleo. Por ejemplo, el miR-21 tiene nodos relacionados con los receptores de TGF-beta, la regulación de proteínas SMAD y el sistema de ubiquitinación, y todos estos componentes hacen parte de una misma vía de señalización.

Los resultados de las redes dan indicios que los miRNAs provocan respuestas adecuadas de acuerdo a la intensidad del estímulo, esto lo realizan a través de mecanismos de retroalimentación y posalimentación con FTs y otros miRNAs, que permiten la sincronía en la respuesta que se presenta durante la hipoxia. Estas formas de regulación son conocidas como regulación dual y pueden presentarse de diferentes maneras para controlar de manera muy precisa los programas celulares. Como se sabe, los miRNAs tienen un efecto moderado en la expresión génica, sin embargo, la regulación dual puede formar redes complejas y producir efectos aditivos a niveles celulares y fisiológicos.

Posiblemente durante la condición de hipoxia, se incrementa la producción de algunos miRNAs, lo que permite una respuesta específica dependiendo el tiempo y el grado de exposición. Cuando esta condición aumenta o se prolonga en el tiempo, estos mismos miRNAs pueden continuar aumentando sus niveles de expresión, hasta el punto en el que, su sobreexpresión puede inducir la producción de otros miRNAs. Los genes que regulan este segundo grupo de miRNAs pueden ejercer funciones inhibitorias que modifiquen la respuesta para crear nuevos programas celulares para mantener la integridad celular. Este incremento en el número de reguladores que pueden influir en los programas celulares hace necesario observar la relación dinámica entre FT, miRNAs y mRNAs con el fin de mitigar el ruido biológico y mantener la homeostasis en estados estables, brindando robustez a la red y convirtiendo señales específicas en respuestas a largo plazo. La alteración de alguno de estos reguladores puede causar cambios en la red y alterar el *switch* que regula programas específicos promoviendo así el desarrollo de cáncer. Esto indica la necesidad de realizar estudios de la función de los miRNAs desde las ciencias omicas, del manejo de una gran cantidad de datos y la integración desde la biología de sistemas en la comprensión de los procesos fisiológicos que pueden regular los miRNAs.

**Tabla 5-17: Número de nodos relacionados con la función de los miRNAs.** Se presentan para cada red el número de genes con elementos de respuesta a hipoxia (HREs) y factores de transcripción (TF).

miRNA	No. Nodos	HRE	TF	TF+HRE
miR-21	149	48	46	18
miR-22	168	60	61	21
miR-130	342	126	98	36
miR-181	190	66	62	25
miR-210	29	4	4	4

La aproximación bioinformática presentada en este trabajo permitió la identificación de las vías de señalización en las que se encuentra involucrado cada miRNA. El reconocimiento de genes potencialmente regulados por HIF y las vías de señalización en las que participan las proteínas codificadas por ellos permite la integración de varios miRNAs que pueden regular un proceso celular. Además, la identificación de los *hubs* establece posibles genes que participan en procesos clave y cuya expresión se puede evaluar a nivel experimental. De esta forma, es posible establecer relaciones más precisas de los mecanismos moleculares de regulación de los miRNAs. Adicionalmente el análisis de redes puede complementarse con perfiles de expresión de los genes blanco en diferentes tejidos y, de esta manera establecer las diferencias en la respuesta.

## 5.5 Integración de los resultados experimentales y bioinformáticos: Los miRNAs circulantes.

Con los resultados obtenidos, es posible realizar una aproximación a las variaciones de los miRNAs circulantes analizados en función de la aclimatación a la altitud. En primer lugar, aunque este trabajo no fue de tipo poblacional, si vale la pena destacar que el orden de magnitud en la expresión relativa para los miRNAs analizados fue consistente entre los tres individuos, como se puede observar en la figura 5-7. Adicionalmente, al establecer los valores de *fold change* (FC) para cada miRNA e individuo con respecto a la muestra 1 (Figura 5-9) y contar con el valor p para establecer diferencias significativas en la expresión de cada miRNA (Figura 5-8) fue posible obtener un gráfico de volcano plot (Figura 5-18).

El *volcano plot* es un tipo de gráfico de dispersión que permite identificar cambios en un conjunto de datos. En este se grafica el logaritmo del *fold change* en función del logaritmo de la significancia estadística. La información resultante se presenta en cuatro cuadrantes dentro del gráfico y es una manera simple de representar grandes conjuntos de datos. El cuadrante superior izquierdo indica aquellos puntos en los que el *fold change* presentó valores negativos respecto al control y además existen diferencias estadísticamente significativas entre los datos; por otro lado, el cuadrante inferior izquierdo presenta los datos cuyo *fold change* es negativo pero la diferencia no es estadísticamente significativa. En contraposición, los cuadrantes del extremo derecho indican que el *fold change* fue positivo, por lo tanto, se presentó un aumento en estos puntos. La construcción de los cuadrantes depende del investigador, sin embargo, el valor mínimo de significancia aceptado a nivel experimental corresponde a un valor de  $p < 0,05$ . Para el gráfico de este *volcano plot* se aceptó este nivel de significancia y se estableció un *fold change* mayor a 1,5.

En la figura 5-18 se puede evidenciar que los puntos correspondientes a cada miRNA se encuentran distribuidos de manera similar entre los individuos. A partir de esta gráfica se puede observar que el miR-210 y el miR-181 son los que más cambian de manera significativa, entonces, potencialmente estos serían los que se seleccionarían para un estudio poblacional. El miR-210 es conocido por ser el regulador maestro de la hipoxia debido a sus diferentes funciones ante esta condición, en las que se incluye la neurogénesis, el metabolismo mitocondrial, angiogénesis, proliferación, apoptosis y la regulación negativa de la respiración mitocondrial (Chan & Loscalzo, 2010). Además, se ha demostrado que la expresión de este miRNA está directamente relacionada con la de HIF-1a de manera positiva debido a la presencia de elementos de respuesta a hipoxia en el promotor del gen del miR-210 (Gee et al., 2014) , de manera interesante, se logró evidenciar que la expresión de este miRNA se reguló de manera positiva a lo largo del tiempo de seguimiento. Esto puede indicar que luego de cuatro meses de exposición a hipoxia moderada los mecanismos subsecuentes para la adaptación continúan activos al promover la actividad y la estabilidad de HIF-1a. De hecho, se ha demostrado que en células sometidas a hipoxia se encuentra un pico en la expresión del miR-210 a las 48 horas y sus niveles se mantienen a lo largo del tiempo hasta que el estímulo es suspendido (Fasanaro et al., 2008). Al parecer, estos resultados coinciden con lo planteado por Porcelli (2017) quien reportó niveles aumentados de hemoglobina, disminución de la presión

---

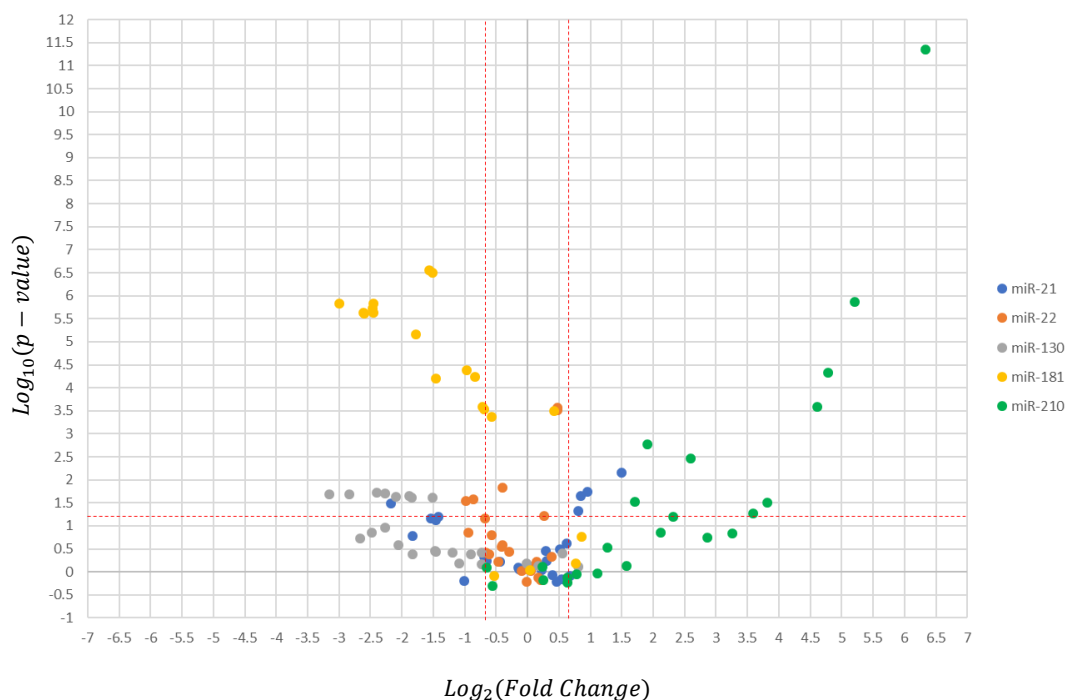
parcial de dióxido de carbono sanguíneo y de la saturación arterial de oxígeno, indicando la falta de aclimatación de los seres humanos después de 300 días en la altitud (Porcelli et al., 2017).

En el presente trabajo se encontró que los niveles de expresión en plasma de este miRNA fueron relativamente bajos en comparación con otros miRNAs (Figura 5-8), sin embargo, se ha demostrado que pequeñas variaciones en los niveles de extracelulares de este miRNA son suficientes para desencadenar las respuestas regulatorias durante la hipoxia en células receptoras (Hale et al., n.d.). Del mismo modo, el análisis de redes evidenció su capacidad de regular programas específicos al tener un número muy bajo de genes blanco en comparación a los otros miRNAs, por lo anterior, es posible intuir que bajas concentraciones del miR-210 puedan desencadenar la respuesta ante la condición de hipoxia. Así mismo, es necesario que los niveles de expresión de este miRNA se relacionen con los de otros, para evidenciar efectos cooperativos en la respuesta. Teniendo en cuenta que la expresión de este miRNA depende del grado y el tiempo de exposición, se esperaría que a mayor altitud los niveles de este miRNA aumenten.

Por otra parte, el miR-181 está relacionado con el cambio metabólico, la regulación de la angiogénesis y el glucagón, los cuales son procesos fundamentales en la respuesta de aclimatación a la altitud. En este trabajo, el miR-181 presentó una tendencia a la baja en sus niveles de expresión, como es evidente al comparar la última muestra en relación a la primera (Figura 5-9). Los estudios relacionados con este miRNA han descrito su papel como regulador metabólico al tener como blanco a la proteína PTEN (Kaech et al., 2013), que como era de esperarse fue uno de los blancos predichos para este miRNA. La inhibición de PTEN permite la activación de la vía PI3K/Akt, la cual está encargada de regular el crecimiento celular y el metabolismo de la glucosa, de hecho, estudios en ratones deficientes de miR-181 han evidenciado una disminución en proteínas claves de procesos relacionados con la vía de las pentosas fosfato y la vía glucolítica disminuyendo la captación y uso de glucosa. A diferencia de otros miRNAs, en los cuales la pérdida de función no se relaciona con cambios específicos en el fenotipo, el *knock out* de este miRNA produjo ratones más pequeños y con menos cantidad de grasa corporal (Chu, Wu, Miao, Mei, & Wu, 2015). Teniendo en cuenta que la familia del miR-181 es una de las más expresadas en muchos tejidos, este miRNA se convierte en un candidato ideal para la regulación metabólica tejido específica (Williams, Henao-Mejia, Harman, & Flavell, 2013).

En relación con el proceso de aclimatación, es bien conocido el cambio metabólico presente durante la hipoxia hipobárica, en la que se presenta en principio una disminución en la cantidad de proteínas relacionadas con el ciclo de Krebs y un aumento en las proteínas relacionadas con la glucólisis (Cerretelli, Marzorati, & Marconi, n.d.; Chicco et al., 2018; Levett et al., 2015). Estos estudios han evaluado el proteoma muscular luego de 7 días de hipoxia hipobárica a más de 5000 msnm, sin embargo, no se encuentran reportes de los posibles cambios que se presenten en periodos más cortos de tiempo. En este trabajo la expresión del miR-181 disminuyó en P1 y P6 luego de la primera muestra, mientras que en P7 los niveles se mantuvieron elevados luego de una semana. Estos resultados sugieren que a nivel metabólico existe una respuesta rápida que promueve la glucólisis y que es rápidamente modulada luego de los primeros días de estadía en altitud moderada. Al parecer este miRNA también se encuentra relacionado con el efecto Warburg, en el cual las células cancerígenas cambian a un metabolismo anaeróbico cuando se encuentran en el foco tumoral, sitio que tiene bajas concentraciones de oxígeno (Wei, Cui, Mei, Liu, & Zhang, 2014).

**Figura 5-18: Volcano plot para la expresión de los miRNAs.** En la figura se grafica el  $\text{Log}_{10}(p - \text{value})$  en función de  $\text{Log}_2(\text{Fold Change})$ . Se estableció como punto de corte un fold change de 1.5 (líneas rojas verticales) y un valor  $p < 0,05$  (línea roja horizontal). Se presentan los datos de cada miRNA para los individuos.



Al igual que el miR-181, el miR-130 disminuyó los niveles de expresión al comparar la primera con la última muestra, sin embargo, las diferencias solo fueron significativas para dos de los individuos. Por otra parte, el análisis de redes de este miRNA se asoció con la función reguladora de los lípidos por medio de la proteína PPAR y la vía de señalización de mTOR (Tabla 5-12). Estudios realizados en humanos, han demostrado que los individuos con obesidad presentan niveles elevados de miR-130 en plasma por liberación directa de los adipocitos, y además este miRNA puede ingresar a los miocitos y disminuir la función oxidativa por sus efectos sobre PPAR y PGC-1alfa (Lee et al., 2011) que en conjunto son conocidos como los principales reguladores de la función mitocondrial (Yucheng Wang, Li, Wang, & Zhang, 2013). Cabe resaltar que este miRNA también regula proteínas relacionadas con el tráfico de vesículas a nivel intracelular (Tabla 5-12). De manera interesante, para el individuo P1, los niveles de miR-181 y miR-130 presentaron comportamientos idénticos, disminuyendo su expresión después de la primera muestra (Figuras 5-8 y 5-9). Al parecer, el cambio metabólico está influenciado por estos dos miRNAs y como se mencionó anteriormente, existe una respuesta aguda que promueve la glucólisis y disminuye el metabolismo de lípidos y el ciclo de Krebs, de esta manera, la célula requiere menos oxígeno y al mismo tiempo evita la producción de especies reactivas de oxígeno. En el sujeto P7 los niveles de estos miRNAs fueron elevados después de la primera muestra, sin embargo, al realizar el análisis estadístico y el *fold change* respecto a la segunda muestra se encontró un patrón similar a P1, lo que puede indicar tiempos de respuesta diferenciales entre individuos.

Así mismo, en algunos otros procesos relacionados con la aclimatación se encontraron efectos cooperativos de los miRNAs estudiados. En relación con la angiogénesis se ha encontrado que la expresión del miR-210 se encuentra estrechamente relacionada con la del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) gracias a la inhibición por parte de este miRNA de la proteína “EPHRIN A3” lo que permite la proliferación de células endoteliales y la formación de nuevos vasos (Pizzicanella, 2018; Madanecki, 2012). También se ha estudiado el posible rol de este miRNA para dirigir la angiogénesis al demostrarse la producción de exosomas en células mesenquimales que contienen el miR-210 y que promovieron la angiogénesis en células cardíacas que habían sufrido previamente isquemia (Bavelloni, 2008). Se ha reportado que el tiempo de expresión necesario de VEGF para promover la creación de nuevos vasos es de cuatro semanas, lo que coincide con unos de los picos de expresión del miR-210 en este estudio, que para P1

fue en la semana 3, P6 en la semana 8 y para P7 en la semana 4; luego de este punto los niveles de este miRNA permanecieron elevados.

Otro de los miRNAs relacionados con la angiogénesis es el miR-130, que tiene como uno de sus blancos el gen “homeobox” *gax*. Este gen se ha relacionado como un gran regulador del fenotipo de células endoteliales en respuesta a factores proangiogénicos y antiangiogénicos, además, es expresado en altos niveles en células quiescentes y rápidamente regulado a la baja cuando las células son expuestas a mitógenos o factores proangiogénicos. De igual forma, estos factores aumentan la expresión del miR-130 lo que indica la posible regulación de la función de este miRNA con la angiogénesis, aunque los resultados del presente estudio arrojaron una disminución de este miRNA luego de la primera muestra, existen picos en los niveles de expresión que varían entre la semana 3 y la semana 8, en consecuencia con lo previamente descrito para el miR-210, sin embargo estos resultados no presentaron diferencia significativa respecto a la primera muestra por la variabilidad presente en los datos. Lo anterior se puede evidenciar en la figura 5-18, en el que se evidencia que este miRNA está ligeramente regulado a la baja y el *fold change* coincide con los reportados para el miR-181.

Por último, la hipertensión pulmonar ha sido un proceso patológico asociado a la hipoxia y se ha descrito que su aumento excesivo puede llevar a enfermedades como el edema pulmonar. Durante la hipoxia se presenta el incremento del hematocrito, lo cual, en conjunto con la vasoconstricción aumentan la presión de las arterias pulmonares desencadenando esta patología (Fasanaro et al., 2008). De los miRNAs evaluados, el miR-21 y el miR-130 se han relacionado con diferentes estímulos que pueden controlar la aparición de la hipertensión pulmonar al controlar genes cascada debajo de las vías involucradas en este proceso (Sitbon, 2012). Por ejemplo, se encontró a través del análisis de redes que el miR-21 reprime la activación de la vía de señalización Rho quinasa, esta vía induce la vasoconstricción al activar la endotelina 1 y reprimir el óxido nítrico sintasa (NOS), esta fue una de las vías de señalización que aparecieron en el enriquecimiento de los genes blanco de este miRNA. Otra proteína ligada intrínsecamente al proceso de hipertensión pulmonar es BMPR2 al promover fenotipos patológicos, esta proteína es regulada negativamente por el miR-21 (Parik, 2012). Por otra parte, el miR-130 se incrementa durante la hipertensión pulmonar inhibiendo la vasoconstricción, fibrosis y la proliferación, debido a su acción sobre la vía de PPARY. La regulación del tono vasomotor



---

es una de las principales formas en las cuales este miRNA regula la aparición de hipertensión pulmonar (Bertero, T, 2015)

Teniendo en cuenta que la hipertensión pulmonar se produce de forma aguda ante el estímulo hipóxico en las primeras horas de exposición, esto se relaciona positivamente con el hecho de que el miR-130 aumentó sus niveles de expresión en la primera muestra y el miR-21 hasta la muestra dos es decir el tercer día. De manera interesante, estos hallazgos se relacionan con las variables hematológicas en las cuales el efecto de hemoconcentración asociado al aumento del hematocrito que se presentó en las primeras muestras puede aumentar la resistencia al flujo de sangre. Al parecer la regulación para el control de la hipertensión pulmonar aguda asociada a la hipoxia se da por estos miRNAs y en un principio se encuentra asociada a los cambios en la hemoconcentración. Cabe anotar que el individuo P7 presentó los mayores niveles de miR-21 en la muestra 1 y 2 y como se mencionó anteriormente los niveles de expresión del miR-130 permanecieron elevados hasta la segunda muestra, lo cual puede ser indicador de una mayor susceptibilidad a la hipertensión pulmonar en concordancia con lo mencionado anteriormente en este individuo asociado al cambio metabólico.

Es importante notar, que en todos los procesos relacionados con la aclimatación el miR-210 estaba involucrado y que está estrechamente relacionado con la expresión de HIF-1a. Este mecanismo entre HIF y el miR-210 es denominado como un proceso de posalimentación coherente, es decir, que la acción de un FT promueve la expresión de un miRNA y este regula la expresión de genes cascada debajo de este FT. De igual forma, los miRNAs evaluados mantienen los niveles de HIF, lo cual brinda precisión y estabilidad a los sistemas de regulación, logrando controlar el ruido causado corriente abajo por la fluctuación en los reguladores superiores (Zhao, Liu, Yao, 2016). Por lo tanto, los miRNAs podrían ser el mecanismo mediante el cual se puede controlar de manera selectiva las respuestas a hipoxia dependientes del tiempo y el grado de exposición.

Finalmente, al comparar los resultados de este trabajo con dos estudios en los que se evalúan los perfiles de expresión ante la hipoxia hipobárica en poblaciones de chinos Han, se encuentran algunos resultados congruentes. Cabe señalar, que en estos estudios se midieron los niveles de expresión de miRNAs circulantes en sujetos nativos de grandes altitudes (Tibet), en poblaciones chinas residentes a nivel del mar (Han) y en residentes a

nivel del mar que migraron a la altitud hace más de un año, a diferencia de este trabajo en el cual se realizó el seguimiento continuo en el tiempo de individuos andinos expuestos a altitud moderada. En uno de los estudios (Yan et al., 2015), en el cual se evaluaron un total de 754 miRNAs circulantes, se encontró que los niveles de expresión de los 5 hypoxamiRs aumentó en la población residente en la altitud. De los 5 miRNAs, el miR-22 fue el que presentó los valores más altos de cambio en comparación con los residentes a nivel del mar (Fold change Tibet Han/ Nanjing Han= 7871.5), de manera análoga, en este trabajo el miR-22 fue el que presentó una mayor cantidad relativa (Figura 5-7) y la menor variación entre los 5 miRNAs (Figura 5-18), lo que sugiere que la respuesta inflamatoria asociada a la hipoxia se mantiene a lo largo del tiempo y puede ser independiente a las variaciones en el grupo étnico.

Por otra parte, en el estudio de Yan (2015) el miR-210 presentó los valores de Cq más bajos entre los 5 miRNAs indicando una mayor cantidad a nivel circulante, a diferencia de este trabajo, en el cual presentó uno de los valores promedio de Cq más bajos. Sin embargo, en otro estudio realizado por el mismo autor y en el cual se cuantificó únicamente la expresión del miR-210 en individuos Han sometidos a la hipoxia, se encontraron valores de Cq similares a los presentados en este trabajo (Yan et al., 2016). Posiblemente la diferencia puede atribuirse a la altitud ya que en el primer estudio los individuos residían a una altitud de 4500 y en el segundo a 3500 msnm. De acuerdo con lo mencionado anteriormente, el miR-210 tiene HREs en su promotor, por lo tanto, el aumento en el grado de hipoxia aumenta los niveles de este miRNA.

De manera interesante, la cantidad de miR-130 en chinos Han residentes a nivel del mar no pudo ser determinada ya que los autores establecieron como parámetro un Cq máximo de 40, lo que indica una poca cantidad de este miRNA a nivel circulante. Durante la condición de hipoxia los niveles de este miRNA aumentaron, sin embargo, el Cq sigue siendo uno de los más altos. Esto sugiere que, a pesar de que se encuentra en cantidades muy por debajo en comparación a otros miRNAs puede tener efectos relevantes por ser tejido específico, como se mencionó anteriormente en su relación entre el tejido adiposo y el tejido muscular. Por otra parte, el miR-181 y el miR-21 presentaron valores similares de Cq a los encontrados en el presente estudio y aumentaron 2 veces en relación con los individuos a nivel del mar. Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, que la expresión de los hypoxamiRs se relaciona con el grado del estímulo hipóxico, y además

que estos estudios se realizaron a diferentes altitudes, el encontrarse valores similares de Cq entre estos dos miRNAs puede asociarse específicamente al grupo étnico. Lo anterior, debido a que se ha demostrado que las poblaciones andinas residentes en la altitud presentan patrones de adaptación asociadas a variaciones fenotípicas que se relacionan con la actividad cardiovascular, con el fin de compensar el incremento en la viscosidad sanguínea por la policitemia, a diferencia de la población China que tiene atenuada esta respuesta. Como se ha demostrado, el miR-21 tiene un papel fundamental en la remodelación cardiovascular y se ha asociado a diferentes patologías a nivel cardíaco (Cheng & Zhang, 2010), por lo tanto, puede que existan diferencias en los patrones de expresión de este miRNA entre poblaciones chinas y andinas expuestas a hipoxia hipobárica. Lo anterior indica que, al parecer, los 5 miRNAs evaluados responden a la hipoxia de manera dependiente al grupo étnico, y sus patrones de expresión no aumentan gradualmente, presentando variaciones ante los cambios en la altitud.

## 6. Conclusiones y recomendaciones

### 6.1 Conclusiones

1. Los estudios realizados en miRNAs relacionados con la hipoxia se centran en procesos patológicos como el cáncer, las isquemias y el metabolismo, sin embargo, con la información disponible fue posible seleccionar 5 miRNAs circulantes en plasma que tuvieran asociaciones con la altitud. Además, los resultados experimentales y bioinformáticos permitieron determinar que estos miRNAs tienen implicaciones en el proceso de aclimatación de individuos de poblaciones andinas sometidos a hipoxia hipobárica.
2. La metodología presentada en este trabajo estableció las condiciones para la extracción, tratamiento, purificación y almacenamiento de miRNAs circulantes en plasma pobre en plaquetas, así mismo, se estandarizaron las condiciones experimentales para la RT-qPCR de 5 hipoxamiRs y 2 miRNAs normalizadores presentes en plasma sanguíneo de individuos expuestos a hipoxia hipobárica. Por otra parte, los métodos de Livak y Pfaffl empleados en la cuantificación de los miRNAs implican la normalización con controles que dan como resultado la cantidad relativa respecto a otro miRNA o el *fold change* en relación a una muestra control. Estos dos métodos brindan información diferente y pueden ser usados para la interpretación de los datos o para la construcción de *volcano plots* que indiquen cuales son los genes que presentaron mayor variabilidad.
3. El análisis bioinformático demostró que los miRNAs seleccionados tenían genes blancos compartidos en procesos biológicos relacionados con la aclimatación. Entre ellos se encuentran la regulación de la angiogénesis, la homeostasis del agua, la regulación del metabolismo de los lípidos y la glucosa, la degradación proteica y la comunicación extracelular. Estos procesos tienen la vía de

señalización de las MAPKs como integrador central de la respuesta al estabilizar y activar a HIF- $\alpha$ .

4. Los resultados experimentales presentados pudieron establecer que el miR-210 aumentó sus niveles de expresión a lo largo del seguimiento, mientras que el miR-181 disminuyó, estos fueron los miRNAs que presentaron las variaciones más significativas y se relacionaron con procesos como el metabolismo y la respuesta global a hipoxia. El miR-130 también disminuyó sus niveles de expresión y se relacionó con el metabolismo de lípidos, mientras que los miR-21 y miR-22 presentaron un patrón de expresión variable y se relacionaron con el remodelamiento cardiovascular, la hipertensión pulmonar y la inflamación. Así mismo, se demostró que los miRNAs presentaron efectos cooperativos en procesos como la angiogénesis, la ubiquitinación de proteínas y la regulación del tráfico extracelular y las variaciones en los niveles de expresión corresponden temporalmente con algunos cambios presentes durante la aclimatación aguda y crónica a la altitud.
5. Los hallazgos en los niveles de expresión de estos miRNAs fueron congruentes con otros estudios realizados en poblaciones de chinos sometidos a la altitud, sin embargo, se presentaron diferencias asociadas a la altitud y a la etnia, indicando que los cambios en estas variables pueden alterar los patrones de expresión de estos miRNAs.

## 6.2 Recomendaciones

Los resultados presentados en este trabajo sientan las bases para el desarrollo de estudios poblacionales en los cuales se pueda medir la expresión de algunos miRNAs específicos asociados a adaptación a la altitud. Para ello, se recomienda la obtención de una muestra de los individuos previa al estímulo altitudinal, ya que en este trabajo no fue posible obtenerla debido a consideraciones económicas y técnicas. Así mismo, será necesaria la evaluación de los perfiles de expresión de algunos mRNA o proteínas codificadas por genes blanco de estos miRNAs que sean claves para establecer la regulación de la respuesta a hipoxia.

# A. Anexo: Encuesta de participación

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CUESTIONARIO DE TAMIZAJE  
PROYECTO

“MicroRNAs y péptidos circulantes asociados al proceso de adaptación a la altura”

## IDENTIFICACIÓN

Nombres y Apellidos:

Edad:

Documento de Id:

Lugar y fecha de nacimiento:

Teléfono:

Dirección:

Correo:

Lugar de residencia:

Tiempo de residencia:

Nombre de los padres: Padre:

Madre:

Lugar de Nacimiento: Padre:

Madre:

Nombres y apellidos del acudiente:

Teléfono:

Correo:

## ANTECEDENTES

¿Ha vivido en algún lugar diferente al de nacimiento? SI NO ¿Cuál?

¿Cuánto tiempo?

¿Durante el último año ha viajado a lugares por encima de los 2000 msnm? SI

NO

¿Sus padres han residido en algún lugar diferente al de nacimiento? SI NO

¿Cuál?

¿Cuánto tiempo?

## CONDICIÓN DE SALUD

Fuma SI NO

Cantidad a la semana

Bebe SI NO Cantidad por semana

Consume sustancias psicoactivas SI NO ¿Cuáles?

¿El médico le ha indicado que sufre de algún tipo de enfermedad? SI NO

¿Cuál?

Actualmente ¿Consume algún medicamento? SI NO

¿Cuál?

¿Tiene o ha tenido alguna enfermedad del sistema cardiovascular-hematológico o del sistema respiratorio? SI NO

¿Cuál?

Mujeres: ¿Planifica con algún método? SI NO ¿Cuál?

¿Presenta ciclo menstrual irregular? SI NO

¿Participa de algún programa de ejercicio físico regular? SI NO

¿Cuál? ¿Tiempo por semana?

¿Es usted vegetariano? SI NO



## **B. Anexo: Consentimiento informado**

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CONSENTIMIENTO INFORMADO  
PROYECTO

“MicroRNAs y péptidos circulantes asociados al proceso de adaptación a la altura”  
Claudia Consuelo Rubiano; Edgar Crisancho; Camila Gonzales; Andrés Garcia

### INTRODUCCIÓN

Por medio del presente documento queremos invitarlo a participar del proyeCto de investigación titulado “MicroARNs y péptidos circulantes asociados con adaptación a hipoxia ambiental en población colombiana” en el cual se pretende estudiar los cambios en la cantidad de algunos biomarcadores que se encuentran en la sangre con el proceso de adaptación a la altura, al evaluar individuos de tierras bajas (-1800 msnm) que llegan a la ciudad de Bogotá (2600 msnm) y de esta manera poder relacionar dichos marcadores con las variaciones fisiológicas del proceso adaptativo.

Este estudio fue aprobado por el comité de ética de la facultad de Ciencias de la Universidad Nacional según resolución \_\_\_\_\_ , Además se desarrollará según la legislación Colombiana de Buenas PráCticas Clínicas (Resolución número 002378 de 2008) y la Declaración de Helsinki, en los cuales se regula la confidencialidad de la identidad de los sujetos, los consentimientos informados, los métodos, aval ético y el bienestar de los individuos. De acuerdo a lo establecido en la Resolución No. 00843 de 1993 del Ministerio de Salud este proyeCto es de riesgo mínimo para los participantes.

### PROCEDIMIENTOS

Para el desarrollo de la investigación es necesario que como participante del estudio se le tomen 10 muestras de sangre a lo largo de 4 meses, distribuidas de la siguiente manera:

0. Antes de la llegada a Bogotá; 1. Al primer día de llegada a Bogotá; 2. a los 3 días; 3. a los 5 días; 4. a las 2 semanas; 5. A las 3 semanas; 6. Al mes; 7 a los dos meses; 8. A los tres meses; 9 a los cuatro meses.

Este procedimiento se llevará a cabo en las instalaciones de la Universidad Nacional de Colombia, bajo la dirección de los profesores \_\_\_\_\_ y \_\_\_\_\_. Las muestras serán tomadas por el \_\_\_\_\_. Para las muestras se realizará citación previa por medio telefónico, una vez se encuentre en las instalaciones se darán 5 minutos de reposo y para la toma de datos, posterior a esto se realiza la toma de la muestra por venopunción a nivel braquial de 10 mL de sangre distribuidos en dos tubos que serán utilizados para posteriores análisis de microRNAs, péptidos, hematocrito y hemoglobina.

Junto con la muestra de sangre es posible que se realicen otros procedimientos los cuales serán notificados oportunamente. Estos procedimientos serán de tipo no invasivo y puede incluir la medición de parámetros ventilatorios y espirométricos como la ventilación minuto, la frecuencia respiratoria, frecuencia cardíaca, VO<sub>2</sub> y VCO<sub>2</sub>.

#### RIESGOS

A pesar de ser considerado un procedimiento de bajo riesgo y que no causa problemas a la mayoría de los individuos puede provocar problemas inherentes a cualquier procedimiento médico y/o quirúrgico como sangrado, cambios en los signos vitales (Tensión arterial, respiración, pulso) y desmayos.

#### BENEFICIOS

Se brindará a los individuos participantes del estudio un resultado con análisis por profesionales de la salud de los parámetros hematológicos básicos.

#### CONFIDENCIALIDAD

Toda la información obtenida y los resultados serán tratados confidencialmente, esta información será almacenada en una base de datos y al finalizar el estudio se le entregará un documento con los resultados individuales de algunos parámetros medidos para su conocimiento. A menos que usted lo permita, los resultados no estarán disponibles para terceras personas como empleadores, organizaciones u otras instituciones o personas naturales o jurídicas.

#### TRATO DE LA MUESTRA

Las muestras de sangre obtenidas en el presente estudio se utilizarán para lo descrito anteriormente, sin embargo, puede que queden remanentes de las muestras que podrían ser utilizados para fines investigativos con otros propósitos. Sin embargo, es necesario su consentimiento y aprobación para el uso de las muestras sobrantes, por tal razón

solicitamos a usted que señale con una X la opción que según su voluntad considere la mejor:

-Las muestras sobrantes pueden ser utilizadas con fines investigativos y solicito que se me informe de los resultados obtenidos. \_\_\_\_

-Las muestras sobrantes pueden ser utilizadas con fines investigativos y no quiero que se me informe de los resultados obtenidos- \_\_\_\_

-Quiero que las muestras sobrantes sean destruidas y no almacenadas una vez concluido este estudio. \_\_\_\_

#### DERECHOS Y RESPONSABILIDADES

Los participantes que firmen este documento tienen la responsabilidad de asistir a las citas programadas, sin embargo, también tienen derecho a renunciar y anular este documento en cualquier momento informando al grupo de investigación la decisión de no seguir participando en el estudio sin ningún tipo de repercusión legal.

#### PALABRA FINAL

La persona \_\_\_\_\_ explicó la naturaleza de este consentimiento informado, los procedimientos a realizar y yo \_\_\_\_\_ identificado con TI \_\_\_\_\_ me he familiarizado con el documento, he tenido la oportunidad de hacer preguntas que han sido respondidas, entiendo y comprendo los contenidos del mismo, por tal razón estoy de acuerdo en participar en el estudio.

#### FIRMA

Nombre:

Teléfono:

Cédula:

Fecha:



## **C. Anexo: Asentimiento informado**

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS

ASENTIMIENTO INFORMADO

PROYECTO

“MicroRNAs y péptidos circulantes asociados al proceso de adaptación a la altura”

Claudia Consuelo Rubiano; Edgar Crispancho; Camila Gonzales; Andrés Garcia

Teniendo en cuenta que tanto niños como adolescentes son sujetos activos en ejercicio de sus derechos y cuya autonomía y razonamiento moral se encuentra en un proceso continuo de desarrollo; que además según la convención de las Naciones Unidas los menores de edad tienen derecho de libertad, de conciencia y pensamiento es necesario que el participante directo de la investigación decida de manera libre y voluntaria la participación en el estudio.

Por medio del presente documento queremos invitarlo a participar del proyecto de investigación titulado “MicroARNs y péptidos circulantes asociados con adaptación a hipoxia ambiental en población colombiana” en el cual se pretende estudiar los cambios en la cantidad de algunos biomarcadores que se encuentran en la sangre con el proceso de adaptación a la altura, al evaluar individuos de tierras bajas (-1800 msnm) que llegan a la ciudad de Bogotá (2600 msnm) y de esta manera poder relacionar dichos marcadores con las variaciones fisiológicas del proceso adaptativo.

Este estudio fue aprobado por el comité de ética de la facultad de Ciencias de la Universidad Nacional según resolución \_\_\_\_\_, Además se desarrollará según la legislación Colombiana de Buenas Prácticas Clínicas (Resolución número 002378 de 2008) y la Declaración de Helsinki, en los cuales se regula la confidencialidad de la identidad de los sujetos, los consentimientos informados, los métodos, aval ético y el

bienestar de los individuos. De acuerdo a lo establecido en la Resolución No. 00843 de 1993 del Ministerio de Salud este proyeCto es de riesgo mínimo para los participantes.

#### PROCEDIMIENTOS

Para el desarrollo de la investigación es necesario que a su hijo/a como participante del estudio se le tomen 10 muestras de sangre a lo largo de 4 meses, distribuidas de la siguiente manera: 0. Antes de la llegada a Bogotá; 1. Al primer día de llegada a Bogotá; 2. a los 3 días; 3. a los 5 días; 4. a las 2 semanas; 5. A las 3 semanas; 6. Al mes; 7 a los dos meses; 8. A los tres meses; 9 a los cuatro meses.

Este procedimiento se llevará a cabo en las instalaciones de la Universidad Nacional de Colombia, bajo la dirección de los profesores \_\_\_\_\_ y \_\_\_\_\_. Las muestras serán tomadas por el \_\_\_\_\_. Para las muestras se realizará citación previa por medio telefónico, una vez se encuentre en las instalaciones se darán 5 minutos de reposo y para la toma de datos, posterior a esto se realiza la toma de la muestra por venopunción a nivel braquial de 10 mL de sangre distribuidos en dos tubos que serán utilizados para posteriores análisis de microRNAs, péptidos, hematocrito y hemoglobina.

Junto con la muestra de sangre es posible que se realicen otros procedimientos los cuales serán notificados oportunamente. Estos procedimientos serán de tipo no invasivo y puede incluir la medición de parámetros ventilatorios y espirométricos como la ventilación minuto, la frecuencia respiratoria, frecuencia cardíaca, VO<sub>2</sub> y VCO<sub>2</sub>.

#### RIESGOS

A pesar de ser considerado un procedimiento de bajo riesgo y que no causa problemas a la mayoría de los individuos puede provocar problemas inherentes a cualquier procedimiento médico y/o quirúrgico como sangrado, cambios en los signos vitales (Tensión arterial, respiración, pulso) y desmayos.

#### BENEFICIOS

Se brindara a los individuos participantes del estudio un resultado con análisis por profesionales de la salud de los parámetros hematológicos básicos.

#### CONFIDENCIALIDAD

Toda la información obtenida y los resultados serán tratados confidencialmente, esta información será almacenada en una base de datos y al finalizar el estudio se le entregará un documento con los resultados individuales de algunos parámetros medidos para su conocimiento. A menos que usted lo permita, los resultados no estarán disponibles para

terceras personas como empleadores, organizaciones u otras instituciones o personas naturales o jurídicas.

#### TRATO DE LA MUESTRA

Las muestras de sangre obtenidas en el presente estudio se utilizarán para lo descrito anteriormente, sin embargo, puede que queden remanentes de las muestras que podrían ser utilizados para fines investigativos con otros propósitos. Sin embargo, es necesario su consentimiento y aprobación para el uso de las muestras sobrantes, por tal razón solicitamos a usted que señale con una X la opción que según su voluntad considere la mejor:

-Las muestras sobrantes pueden ser utilizadas con fines investigativos y solicito que se me informe de los resultados obtenidos. \_\_\_\_

-Las muestras sobrantes pueden ser utilizadas con fines investigativos y no quiero que se me informe de los resultados obtenidos- \_\_\_\_

-Quiero que las muestras sobrantes sean destruidas y no almacenadas una vez concluido este estudio. \_\_\_\_

#### DERECHOS Y RESPONSABILIDADES

Los participantes que firmen este documento tienen la responsabilidad de asistir a las citas programadas, sin embargo, también tienen derecho a renunciar y anular este documento en cualquier momento informando al grupo de investigación la decisión de no seguir participando en el estudio sin ningún tipo de repercusión legal.

#### PALABRA FINAL

La persona \_\_\_\_\_ explicó la naturaleza de este consentimiento informado, los procedimientos a realizar y yo \_\_\_\_\_ identificado con TI \_\_\_\_\_ me he familiarizado con el documento, he tenido la oportunidad de hacer preguntas que han sido respondidas, entiendo y comprendo los contenidos del mismo, por tal razón estoy de acuerdo en participar en el estudio. Por tal razón yo \_\_\_\_\_ con TI \_\_\_\_\_ he leído y he podido hacer preguntas que fueron respondidas y he analizado, comprendido y reflexionado los riesgos y los beneficios que para traen para mi este estudio, he decidido participar de manera voluntaria en este estudio.

Nombre:

Fecha:

Edad:

## D. Anexo: Aval ético

COMITÉ DE ÉTICA FACULTAD DE CIENCIAS

Bogotá, agosto 14 de 2017

Profesora Claudia Consuelo Rubiano Castellanos

Departamento de Biología

Respetada Profesora:

Atentamente le comunico que el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias, en reunión realizada el día 14 de agosto de 2017 (ACta 09-2017), evaluó aspectos éticos del proyecto presentado por usted. Como resultado de esta revisión, el Comité considera que el proyecto cumple con los aspectos éticos básicos. Para los fines pertinentes, se transcriben las observaciones y el concepto final.

P1: Proyecto / Investigadores — Grupos — Dependencias / Observaciones. Proyecto: MicroARNs (miRNAs) y péptidos circulantes asociados con adaptación a hipoxia ambiental en población colombiana.

Responsables: Claudia Consuelo Rubiano Castellanos (Investigadora Principal) y Édgar Cristancho Mejía (Grupo de Investigación en Adaptaciones a la Hipoxia y al Ejercicio).  
Tesis de Maestría: Camila A. González Quiroga y Andrés Mauricio García Caro.

Observaciones: Se tendrá como sujetos de estudio a estudiantes de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, provenientes de regiones de altitud menor o igual a 1400 msnm y que se trasladan a Bogotá para realizar sus estudios universitarios. La



participación de los voluntarios, hombres y mujeres mayores de edad se formalizará mediante la aplicación de protocolos de "Consentimiento Informado".

Es necesario el muestreo de pequeños volúmenes de sangre (punción venosa), correspondiendo a un experimento de riesgo mínimo (Resolución 008430 de 1993, MinSalud). Se deberán aplicar los protocolos de bioseguridad adecuados para este tipo de experimentos. Se garantizará la protección de la identidad de los participantes, la confidencialidad de la información, así como el acceso exclusivo de los investigadores a los datos del estudio. Los datos obtenidos serán usados solamente para los fines científicos del estudio.

Los aspectos de Propiedad Intelectual se establecerán según los lineamientos del Acuerdo 008 del 8 de mayo de 2008 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional de Colombia.

La manipulación de reactivos químicos y biológicos, así como la disposición de sus desechos se hará acorde con los protocolos de bioseguridad contemplados en el sistema institucional de gestión ambiental.

Concepto: Avalado.



LUIS FERNANDO OSPINA G.  
Coordinador Comité de Ética

## E. Anexo: Valores de hemoglobina, hematocrito y hemoglobina corpuscular media de los participantes del estudio a lo largo del seguimiento

**Tabla E-1:** Valores promedio de hemoglobina (Hb), hematocrito (HCt) y hemoglobina corpuscular media (HCM) a lo largo del seguimiento.

INDIVI DUO	Mujeres						Hombres											
	P2			P3			P1			P4			P6			P7		
MUES TRA	Hb	HC t	HC M	Hb	HC t	HC M	Hb	HC t	HC M	Hb	HC t	HC M	Hb	HC t	HC M	Hb	HC t	HC M
M1	12, 84	-	-	13, 45	-	-	17, 63	46, 25	38, 12	16, 71	49, 50	33, 77	15, 08	62, 00	24, 33	15, 29	45, 00	33, 97
M2	10, 91	34, 50	31, 61	12, 28	43, 50	28, 23	16, 82	48, 00	35, 04	15, 64	54, 75	28, 57	17, 28	47, 40	36, 45	16, 46	47, 45	34, 69
M3	12, 49	43, 00	29, 04	16, 15	46, 15	35, 00	18, 91	49, 00	38, 58	15, 90	44, 50	35, 73	17, 89	48, 45	36, 92	15, 59	45, 50	34, 27
M4	13, 35	39, 15	34, 10	13, 91	38, 75	35, 90	15, 54	45, 30	34, 31	17, 58	49, 20	35, 73	17, 02	50, 50	33, 70	16, 71	49, 00	34, 11
M5	11, 72	40, 60	28, 87	15, 03	43, 50	34, 56	16, 61	49, 00	33, 90	16, 66	48, 50	34, 36	18, 50	49, 20	37, 60	15, 44	46, 00	33, 57
M6	13, 66	40, 50	33, 72	14, 37	43, 00	33, 42	16, 97	49, 50	34, 28	17, 38	52, 00	33, 42	16, 97	49, 00	34, 63	14, 27	38, 00	37, 55
M7	12, 43	38, 25	32, 51	15, 29	36, 00	42, 47	16, 71	54, 00	30, 95	16, 92	58, 00	29, 17	16, 87	48, 50	34, 78	15, 44	46, 00	31, 51
M8	13, 76	41, 20	33, 40	15, 24	44, 00	34, 63	15, 75	47, 00	33, 50	17, 68	52, 00	34, 01	16, 77	48, 00	34, 93	15, 90	47, 20	33, 69

**Tabla E-2:** Valores de la concentración de hemoglobina a lo largo del seguimiento.

G	dividu	M1			M2			M3			M4			M5			M6			M7			M8		
		Hb	Hb 2	Prom	Hb	Hb 2	Prom	Hb	Hb 2	Prom	Hb	Hb 2	Prom	Hb	Hb 2	Prom	Hb	Hb 2	Prom	Hb	Hb 2	Prom	Hb	Hb 2	Prom
F	P2	12,74	12,94	12,84	10,70	11,11	10,91	12,74	12,23	12,49	13,05	13,66	13,35	11,52	11,92	11,72	13,66	13,66	13,66	12,84	12,03	12,43	13,76	13,76	13,76
F	P3	13,45	13,45	13,45	12,23	12,33	12,28	16,41	15,90	16,15	14,17	13,66	13,91	15,08	14,98	15,03	14,27	14,47	14,37	15,29	15,29	15,29	15,39	15,08	15,24
M	P1	17,53	17,73	17,63	16,61	17,02	16,82	18,96	18,86	18,91	15,29	15,80	15,54	16,51	16,71	16,61	16,71	17,22	16,97	16,92	16,51	16,71	15,59	15,90	15,75
M	P4	16,71	16,71	16,71	15,80	15,49	15,64	15,59	16,21	15,90	17,63	17,53	17,58	16,71	16,61	16,66	17,63	17,12	17,38	16,92	16,92	16,92	17,53	17,84	17,68
M	P6	14,98	15,19	15,08	17,12	17,43	17,28	17,53	18,24	17,89	16,92	17,12	17,02	18,55	18,45	18,50	17,02	16,92	16,97	16,82	16,92	16,87	16,51	17,02	16,77
M	P7	15,29	15,29	15,29	16,21	16,71	16,46	15,49	15,70	15,59	16,51	16,92	16,71	15,59	15,29	15,44	14,27	14,27	14,27	15,49	15,39	15,44	15,90	15,90	15,90

\*F: Femenino ; M: Masculino.

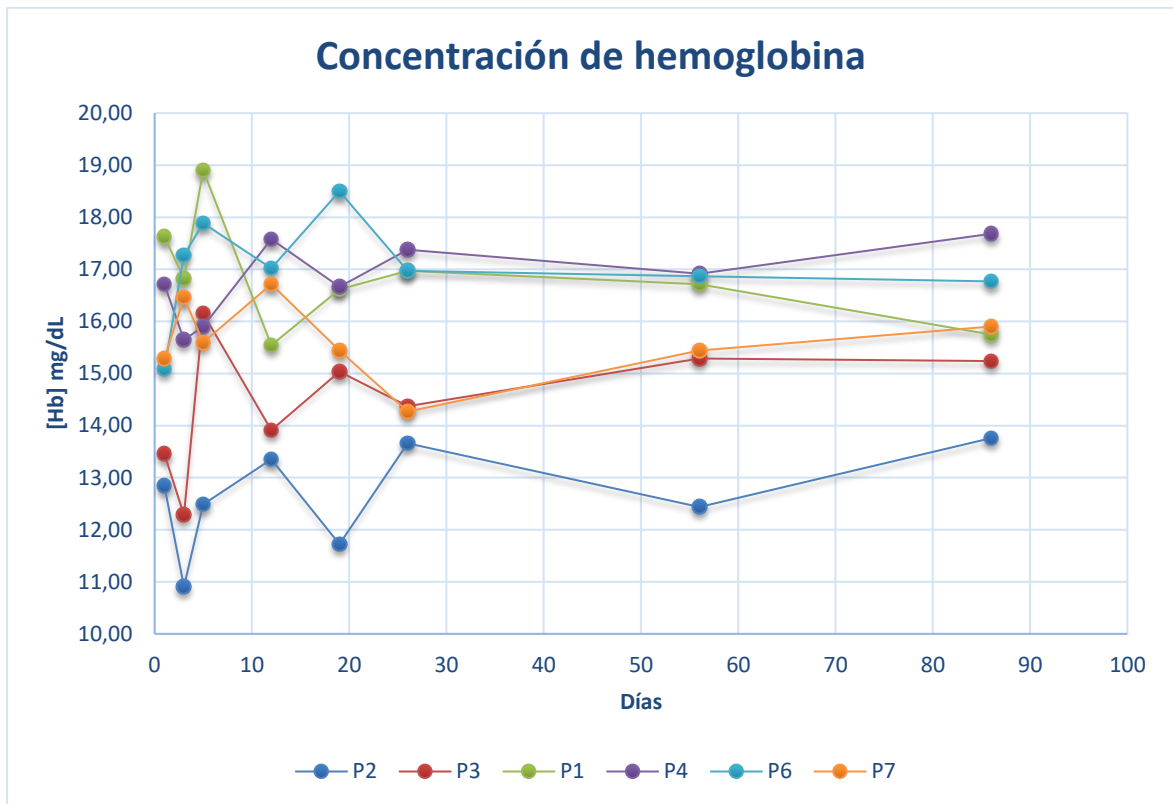
**Figura E-3:** Valores de hematocrito a lo largo del seguimiento.

G	Individuo	Muestra 1			Muestra 2			Muestra 3			Muestra 4			Muestra 5			Muestra 6			Muestra 7			Muestra 8		
		HCt	HCt 2	Prom	HCt	HCt 2	Prom	HCt	HCt 2	Prom	HCt	HCt 2	Prom	HCt	HCt 2	Prom	HCt	HCt 2	Prom	HCt	HCt 2	Prom	HCt	HCt 2	Prom
		HCt	2	Prom	HCt	2	Prom	HCt	2	Prom	HCt	2	Prom	HCt	2	Prom	HCt	2	Prom	HCt	2	Prom	HCt	2	Prom
F	P2	--	--	--	35	34	34,5	43	43	43	39,3	39	39,15	40,2	41	40,6	40	41	40,5	38	38,5	38,25	41,2	41,2	41,2
F	P3	--	--	--	43	44	43,5	46,4	45,9	46,15	38,7	38,8	38,75	43	44	43,5	43	43	43	36	36	36	44	44	44
M	P1	46,3	46,2	46,25	48	48	48	49	49	49	45,7	44,9	45,3	49	49	49	49	50	49,5	54	54	54	47	47	47
M	P4	49	50	49,5	53,5	56	54,75	44	45	44,5	49,2	49,2	49,2	48	49	48,5	52	52	52	58	58	58	52	52	52
M	P6	62	62	62	47,7	47,1	47,4	48,5	48,4	48,45	51	50	50,5	49,2	49,2	49,2	49	49	49	48	49	48,5	48	48	48
M	P7	45	45	45	47,8	47,1	47,45	45	46	45,5	49	49	49	46	46	46	38	38	38	46	46	46	47,7	46,7	47,2

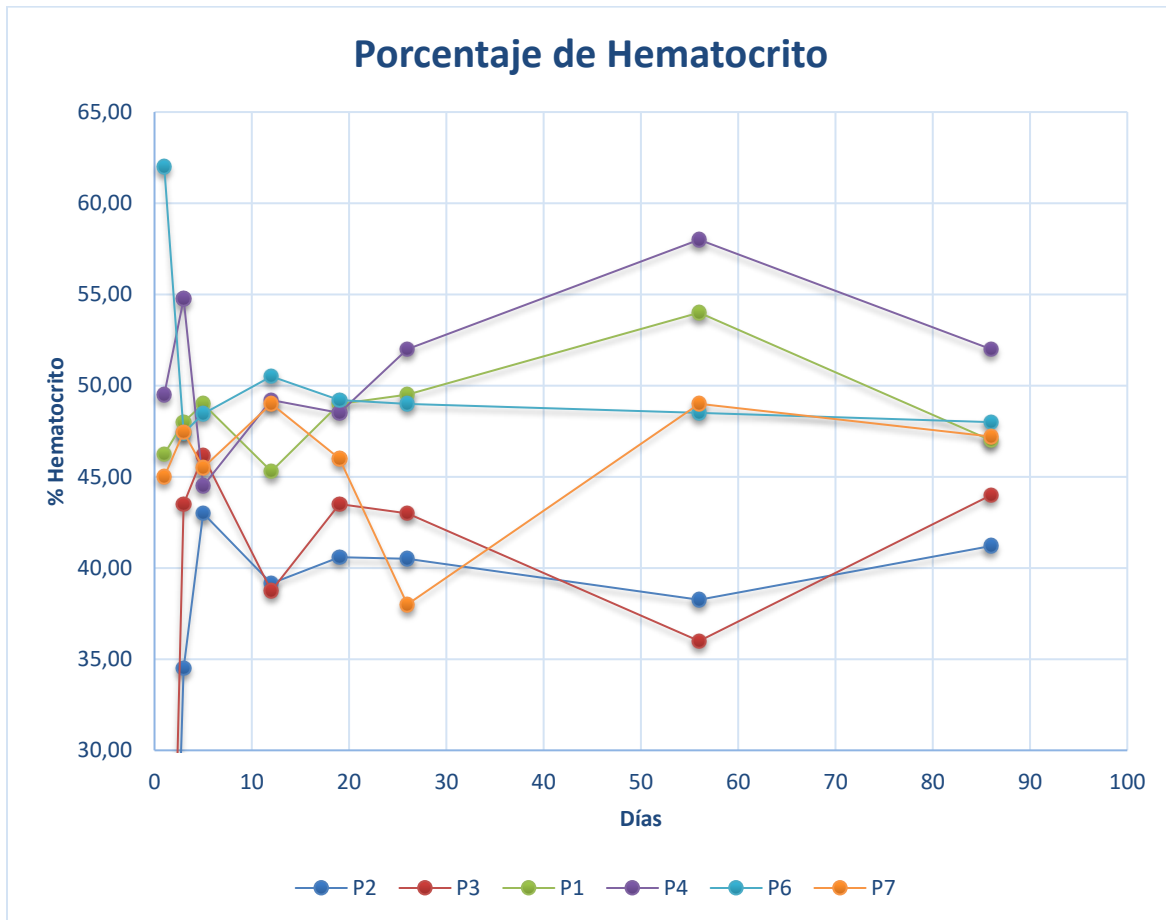
\*F: Femenino ; M: Masculino

## F. Anexo: Variación interindividual en los valores de hemoglobina, hematocrito y hemoglobina corpuscular media

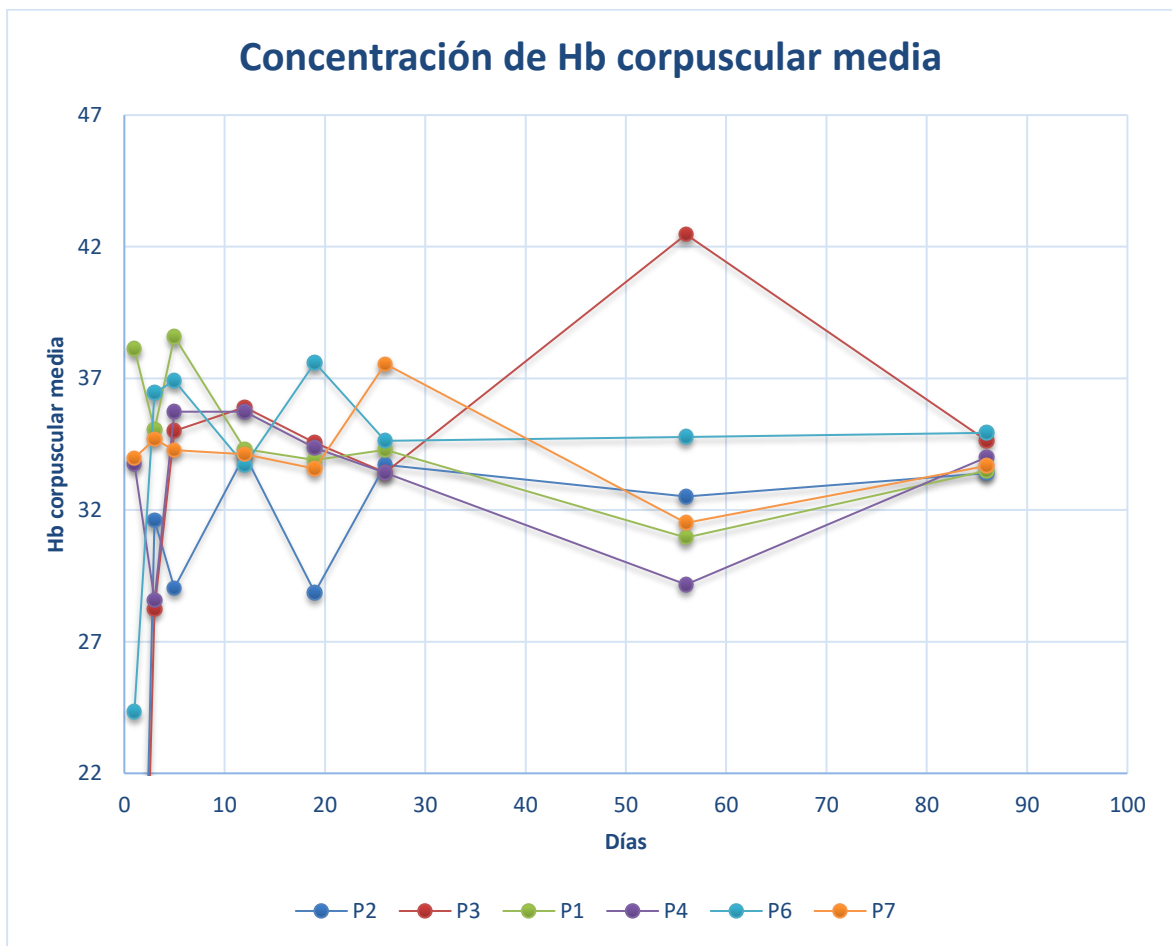
Figura F-1: Variación interindividual en los valores de concentración de hemoglobina para cada uno de los individuos.



**Figura F-2:** Variación interindividual en los valores de hematocrito para cada uno de los individuos.



**Figura F-3:** Variación interindividual en los valores de hemoglobina corpuscular media para cada uno de los individuos.



## G. Anexo: Cuantificación espectrofotométrica de los miRNAs a través del NanoDrop

**Figura G-1:** Valores de concentración, absorbancia a 260 nm y 280 nm y ratios de absorbancia (260/280 y 260/230) de las muestras de RNA purificado para el individuo 1 (A), 6 (B) y 7 (C).

A)

Muestra	[ng/uL]	A260	A280	260/280	260/230
P1M1	68,30	1,70	1,20	1,42	0,49
P1M2	40,00	1,00	0,71	1,40	0,33
P1M3	32,70	0,81	0,60	1,35	0,31
P1M4	40,10	1,00	0,71	1,40	0,31
P1M5	35,30	0,88	0,63	1,39	0,44
P1M6	45,30	1,13	0,78	1,45	0,44
P1M7	33,00	0,82	0,58	1,42	0,60
P1M8	43,80	1,09	0,80	1,36	0,59
P1M9	46,20	1,15	0,81	1,42	0,41
<b>Promedio</b>	<b>42,74</b>	<b>1,06</b>	<b>0,76</b>	<b>1,40</b>	<b>0,44</b>
<b>Desviación</b>	<b>10,83</b>	<b>0,27</b>	<b>0,19</b>	<b>0,03</b>	<b>0,11</b>



Figura G-1: Continuación.

B)

<b>Muestra</b>	<b>[ng/uL]</b>	<b>A260</b>	<b>A280</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
P6M1	44,30	1,10	0,79	1,39	0,24
P6M2	36,70	0,91	0,67	1,35	0,26
P6M3	75,70	1,89	1,41	1,34	0,47
P6M4	45,60	1,14	0,84	1,35	0,26
P6M5	41,90	1,05	0,74	1,42	0,30
P6M6	23,50	0,58	0,41	1,43	0,41
P6M7	15,80	0,39	0,28	1,38	0,20
P6M8	53,80	1,34	0,92	1,46	0,20
P6M9	29,10	0,72	0,50	1,43	0,31
<b>Promedio</b>	<b>40,71</b>	<b>1,01</b>	<b>0,73</b>	<b>1,39</b>	<b>0,29</b>
<b>Desviación</b>	<b>17,68</b>	<b>0,44</b>	<b>0,33</b>	<b>0,04</b>	<b>0,09</b>

C)

<b>Muestra</b>	<b>[ng/uL]</b>	<b>A260</b>	<b>A280</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
P7M1	40,80	1,02	0,71	1,44	0,09
P7M2	59,10	1,47	1,04	1,42	0,60
P7M3	38,70	0,96	0,71	1,36	0,31
P7M4	36,90	0,92	0,65	1,40	0,41
P7M5	28,70	0,71	0,51	1,40	0,52
P7M6	24,80	0,62	0,44	1,39	0,34
P7M7	39,00	0,97	0,67	1,44	0,72
P7M8	28,20	0,70	0,50	1,40	0,75
P7M9	48,20	1,20	0,89	1,45	0,23
<b>Promedio</b>	<b>38,27</b>	<b>0,95</b>	<b>0,68</b>	<b>1,41</b>	<b>0,44</b>
<b>Desviación</b>	<b>10,70</b>	<b>0,27</b>	<b>0,19</b>	<b>0,03</b>	<b>0,22</b>

## H. Anexo: Cuantificación espectrofotométrica de las muestras de cDNA a través del NanoDrop

**Figura H-1:** Valores de concentración, absorbancia a 260 nm y 280 nm y ratios de absorbancia (260/280 y 260/230) de las muestras de cDNA para el individuo 1 (A), 6 (B) y 7 (C).

A)

<b>Muestra</b>	<b>[ng/uL]</b>	<b>A260</b>	<b>A280</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
P1M1	151,50	3,00	1,40	2,16	2,57
P1M2	161,50	3,20	1,50	2,10	2,50
P1M3	179,10	3,50	1,60	2,10	2,70
P1M4	170,40	3,40	1,60	2,10	2,50
P1M5	156,00	3,12	1,48	2,11	2,55
P1M6	213,00	4,25	1,99	2,14	2,63
P1M7	168,50	3,37	1,58	2,12	2,72
P1M8	169,20	3,38	1,57	2,15	2,81
P1M9	156,80	3,13	1,43	2,18	2,99
<b>Promedio</b>	<b>169,56</b>	<b>3,37</b>	<b>1,57</b>	<b>2,13</b>	<b>2,66</b>
<b>Desviación</b>	<b>18,43</b>	<b>0,37</b>	<b>0,17</b>	<b>0,03</b>	<b>0,16</b>

Figura H-1: Continuación.

B)

<b>Muestra</b>	<b>[ng/uL]</b>	<b>A260</b>	<b>A280</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
P6M1	264,40	5,28	2,40	2,20	2,67
P6M2	220,70	4,41	2,01	2,19	2,76
P6M3	134,20	2,68	1,25	2,14	2,71
P6M4	122,50	2,45	1,14	2,15	2,66
P6M5	142,00	2,84	1,32	2,14	2,73
P6M6	150,90	3,01	1,48	2,15	2,86
P6M7	152,90	3,05	1,47	2,16	2,80
P6M8	163,70	3,34	1,55	2,15	2,38
P6M9	153,50	3,07	1,42	2,15	2,72
<b>Promedio</b>	<b>167,20</b>	<b>3,35</b>	<b>1,56</b>	<b>2,16</b>	<b>2,70</b>
<b>Desviación</b>	<b>45,69</b>	<b>0,91</b>	<b>0,40</b>	<b>0,02</b>	<b>0,13</b>

C)

<b>Muestra</b>	<b>[ng/uL]</b>	<b>A260</b>	<b>A280</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
P7M1	171,1	3,5	1,61	2,17	2,11
P7M2	168,4	3,36	1,57	2,14	2,72
P7M3	186,8	3,73	1,72	2,17	2,69
P7M4	211,2	4,22	1,97	2,14	2,69
P7M5	191,4	3,82	1,77	2,16	2,67
P7M6	206,9	4,13	1,92	2,15	2,7
P7M7	256,3	5,12	2,36	2,17	2,71
P7M8	312,2	6,24	2,86	2,18	2,63
P7M9	286,1	5,72	2,62	2,18	2,56
<b>Promedio</b>	<b>221,16</b>	<b>4,43</b>	<b>2,04</b>	<b>2,16</b>	<b>2,61</b>
<b>Desviación</b>	<b>51,72</b>	<b>1,03</b>	<b>0,46</b>	<b>0,02</b>	<b>0,19</b>

## Bibliografía

- Alexis, W., & Moncada, U. (2014). Obtención de plasma sanguíneo y de médula ósea para análisis proteómico diferencial entre niños sanos y con diagnóstico de Leucemia Linfocítica Aguda.
- Andersen, C. L., Jensen, J. L., & Ørntoft, T. F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research*, *64*(15), 5245–5250. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., ... Sherlock, G. (2000). Gene Ontology : tool for the unification of biology. *Nature Genetics*, *25*(1), 25–29. <https://doi.org/10.1038/75556.Gene>
- Bailey, T. L., Boden, M., Buske, F. A., Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., ... Noble, W. S. (2009). MEME SUITE : tools for motif discovery and searching, *37*(May), 202–208. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp335>
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and function. *Cell*, *116*, 281–297. Retrieved from [http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674\(04\)00045-5.pdf](http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674(04)00045-5.pdf)
- Bartel, D. P. (2013). microRNA Target recognition and regulatory functions. *Cell*, *136*(2), 215–233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002.MicroRNA>
- Benavides, W. (2013). *Ubicación altitudinal del umbal hipóxico para la masa total de hemoglobina en poblaciones colombianas*. Universidad Nacional de Colombia.
- Berezikov, E. (2011). Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. *Nature Reviews Genetics*. <https://doi.org/10.1038/nrg3079>
- BioRad. (2006). *Real-Time PCR Applications Guide. Methods*. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2004.07.009>
- Brunet-Vega, A., Pericay, C., Quílez, M. E., Ramírez-Lázaro, M. J., Calvet, X., & Lario, S. (2015). Variability in microRNA recovery from plasma: Comparison of five commercial kits. *Analytical Biochemistry*, *488*, 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.07.018>
- Busk, P. K. (2014). A tool for design of primers for microRNA-specific quantitative RT-qPCR. *BMC Bioinformatics*, *15*(1), 29. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-29>
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., ... Shipley, G. L. (2009). The MIQE Guidelines : Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments SUMMARY ;, *622*, 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Cerretelli, P., Marzorati, M., & Marconi, C. (n.d.). Muscle Bioenergetics and Metabolic Control at Altitude.

- Chan, S. Y., & Loscalzo, J. (2010). MicroRNA-210: A unique and pleiotropic hypoxamir. *Cell Cycle*, 6, 1072–1083. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2912143/pdf/nihms189800.pdf>
- Cheng, Y., & Zhang, C. (2010). microRNA-21 in cardiovascular disease. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 3(3), 251–255. <https://doi.org/10.1007/s12265-010-9169-7>.MicroRNA-21
- Cheviron, Z. A., & Brumfield, R. T. (2012). Genomic insights into adaptation to high-altitude environments. *Heredity*, 108(4), 354–361. <https://doi.org/10.1038/hdy.2011.85>
- Chicco, A. J., Le, C. H., Gnaiger, E., Dreyer, H. C., Muyskens, J. B., D'Alessandro, A., ... Roach, R. C. (2018). Adaptive remodeling of skeletal muscle energy metabolism in high-altitude hypoxia: Lessons from AltitudeOmics. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000470>
- Chu, B., Wu, T., Miao, L., Mei, Y., & Wu, M. (2015). MiR-181a regulates lipid metabolism via IDH1. *Scientific Reports*, 5, 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep08801>
- Cottrill, K. A., Chan, S. Y., & Loscalzo, J. (n.d.). Hypoxamirs and Mitochondrial Metabolism. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5641>
- Das, S., Bedja, D., Campbell, N., Dunkerly, B., Chenna, V., Maitra, A., & Steenbergen, C. (2014). miR-181c Regulates the Mitochondrial Genome, Bioenergetics, and Propensity for Heart Failure In Vivo. *PLoS ONE*, 9(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096820>
- El-Khoury, V., Pierson, S., Kaoma, T., Bernardin, F., & Berchem, G. (2016). Assessing cellular and circulating miRNA recovery: The impact of the RNA isolation method and the quantity of input material. *Scientific Reports*, 6(December 2015), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep19529>
- Exiqon. (2012). Pitfalls and recommendations for microRNA expression analysis using qPCR. *Protocol*.
- Exiqon. (2014). *Biofluids Guidelines-Analyzing microRNAs in liquid biopsies*.
- Farina, N. H., Wood, M. E., Perrapato, S. D., Francklyn, C. S., Stein, G. S., Stein, J. L., & Lian, J. B. (2014). Standardizing Analysis of Circulating MicroRNA: Clinical and Biological Relevance. *Journal of Cell Biochemistry*, 115(5), 805–811. <https://doi.org/10.1002/jcb.24745>.Standardizing
- Fasanaro, P., D'Alessandra, Y., Di Stefano, V., Melchionna, R., Romani, S., Pompilio, G., ... Martelli, F. (2008). MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand ephrin-A3. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800731200>
- Garcia-Elias, A., Alloza, L., Puigdecenet, E., Nonell, L., Tajés, M., Curado, J., ... Benito, B. (2017). Defining quantification methods and optimizing protocols for microarray hybridization of circulating microRNAs. *Scientific Reports*, 7(1), 1–14.

<https://doi.org/10.1038/s41598-017-08134-3>

Gassmann, M., & Soliz, J. (2009). Erythropoietin modulates the neural control of hypoxic ventilation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(22), 3575–3582.

<https://doi.org/10.1007/s00018-009-0142-z>

Ge, R., Witkowski, S., Zhang, Y., Alfrey, C., Sivieri, M., Karlsen, T., ... Determinants, B. D. L. (2002). Determinants of erythropoietin release in response to short-term hypobaric hypoxia, 75231, 2361–2367.

Gee, H. E., Ivan, C., Calin, G. A., & Ivan, M. (2014). HypoxamiRs and Cancer: From Biology to Targeted Therapy. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8, 1220–1238.

<https://doi.org/10.1089/ars.2013.5639>

Gonzales, F. G. (2011). Hemoglobin and testosterone: importance on high altitude acclimatization and adaptation. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 28(1), 92–100. <https://doi.org/10.1590/S1726-46342011000100015>

Guimbellot, J. S., Erickson, S. W., Mehta, T., Wen, H., Page, G. P., Sorscher, E. J., & Hong, J. S. (2009). BMC Medical Genomics Correlation of microRNA levels during hypoxia with predicted target mRNAs through genome-wide microarray analysis. *BMC Medical Genomics*, 2(2). <https://doi.org/10.1186/1755-8794-2-15>

Hale, A., Lee, C., Annis, S., Min, P.-K., Pande, R., Creager, M. A., ... Chan, S. Y. (n.d.). An Argonaute 2 Switch Regulates Circulating miR-210 to Coordinate Hypoxic Adaptation across Cells. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.06.012>

Hale, A., White; kevin, & Chan, S. (2012). Hypoxamirs in pulmonary hypertension: breathing new life into pulmonary vascular research. *Cardiovasc Diagn Ther*, 2(3), 200–212. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-3652.2012.08.01>

Huang, X., & Zuo, J. (2014). Emerging roles of miR-210 and other non-coding RNAs in the hypoxic response. *Acta Biochim Biophys*, 46, 220–232. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmt141>

Huang, Y., Lin, D., & Taniguchi, C. M. (2018). Hypoxia inducible factor (HIF) in the tumor microenvironment: Friend or foe. *Science China Life*, 60(10), 1114–1124. <https://doi.org/10.1007/s11427-017-9178-y.Hypoxia>

Ivan, G. E. M., Krichevsky, A. M., & Gabriely, G. (2009). miR-21: a small multi-faceted RNA. *Cellular Molecular Med*, 13(1), 39–53. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00556.x>

Kaech, S. M., Henao-mejia, J., Williams, A., Goff, L. A., Staron, M., Licona-limo, P., ... Flavell, R. A. (2013). The MicroRNA miR-181 Is a Critical Cellular Metabolic Rheostat Essential for NKT Cell Ontogenesis and Lymphocyte Development and Homeostasis. *Cell Press*, 38, 984–997. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.02.021>

Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27–30.

Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Furumichi, M., & Tanabe, M. (2012). KEGG for

- integration and interpretation of large-scale molecular data sets, *40*(November 2011), 109–114. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr988>
- Karapetsas, A., Giannakakis, A., Pavlaki, M., Panayiotidis, M., & Sandaltzopoulos, R. (2011). Biochemical and molecular analysis of the interaction between ERK2 MAP kinase and hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ .pdf.
- Kirschner, M. B., Kao, S. C., Edelman, J. J., Armstrong, N. J., Vallely, M. P., Zandwijk, N. Van, & Reid, G. (2011). Haemolysis during Sample Preparation Alters microRNA Content of Plasma, *6*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024145>
- Kozomara, A., & Griffiths-Jones, S. (2014). miRBase: Annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Research*, *42*(D1), 68–73. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1181>
- Kulshreshtha, R., Ferracin, M., Wojcik, S. E., Garzon, R., Alder, H., Agosto-Perez, F. J., ... Ivan, M. (2007). A MicroRNA Signature of Hypoxia. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, *27*(5), 1859–1867. <https://doi.org/10.1128/MCB.01395-06>
- Kummerfeld, S. K., & Teichmann, S. A. (2006). DBD : a transcription factor prediction database, *34*, 74–81. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj131>
- Lee, E. K., Lee, M. J., Abdelmohsen, K., Kim, W., Kim, M. M., Srikantan, S., ... Gorospe, M. (2011). miR-130 Suppresses Adipogenesis by Inhibiting Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Expression. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/MCB.00894-10>
- Levett, D. Z. H., Viganò, A., Capitanio, D., Vasso, M., De Palma, S., Moriggi, M., ... Gelfi, C. (2015). Changes in muscle proteomics in the course of the Caudwell Research Expedition to Mt. Everest. *Proteomics*. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400306>
- Li, X., Li, Y., Zhao, L., Zhang, D., Yao, X., Zhang, H., ... Yan, J. (2014). Circulating Muscle-specific miRNAs in Duchenne Muscular Dystrophy Patients. *Molecular Therapy*, *3*(January), e177. <https://doi.org/10.1038/mtna.2014.29>
- Life Technologies Corporation. (2012). *Real-time PCR handbook*. Applied Biosystems.
- Liu, B., Huang, H., Wang, S.-X., Wu, G., Xu, G., Sun, B.-D., ... E-I, Z. (2016). Physiological Adjustments and Circulating MicroRNA Reprogramming Are Involved in Early Acclimatization to High Altitude in Chinese Han Males. *Frontiers in Physiology Front. Physiol*, *7*(7), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00601>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, *25*(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Madanecki, P., Kapoor, N., Bebok, Z., Ochocka, R., Collawn, J. F., & Bartoszewski, R. (2013). Regulation of angiogenesis by hypoxia: The Role of micro-RNA. *Cell Mol Biol*, *18*, 1–10. <https://doi.org/10.2478/s11658-012-0037-0>
- Makarova, J. A., Shkurnikov, M. U., Wicklein, D., Lange, T., Samatov, T. R., Turchinovich,

- A. A., & Tonevitsky, A. G. (2016). Intracellular and extracellular microRNA: An update on localization and biological role. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 51(3–4), 33–49. <https://doi.org/10.1016/j.proghi.2016.06.001>
- Meerson, A., & Ploug, T. (2016). Assessment of six commercial plasma small RNA isolation kits using qRT-PCR and electrophoretic separation: higher recovery of microRNA following ultracentrifugation. *Biology Methods and Protocols*, bpw003. <https://doi.org/10.1093/biomethods/bpw003>
- Moret, I., Sánchez-Izquierdo, D., Borra, M. I., Tortosa, L., Puche, A. N., Nos, P., ... Beltrán, B. (2013). Assessing an improved protocol for plasma microRNA extraction. *PLoS ONE*, 8(12), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082753>
- Morrison, D. K. (2012). MAP Kinase Pathways, 1–6.
- Muth, D. C., Powell, B. H., Zhao, Z., & Witwer, K. W. (2018). miRNAs in platelet - poor blood plasma and purified RNA are highly stable : a confirmatory study. *BMC Research Notes*, 1–5. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3378-6>
- Mylonis, I., Chachami, G., Samiotaki, M., Panayotou, G., Paraskeva, E., Kalousi, A., ... Simos, G. (2006). Identification of MAPK Phosphorylation Sites and Their Role in the Localization and Activity of Hypoxia-inducible Factor-1  $\alpha$  \*, 281(44), 33095–33106. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605058200>
- Nallamshetty, S., Chan, S. Y., & Loscalzo, J. (2013). Hypoxia: A master regulator of microRNA biogenesis and activity. *Free Radical Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.022>
- Nolan, T., Anders Bergkvist, C., Carvallo, C., Peter Chereson, M. H., Daley, L., Heath, A., ... Marina Wiklander, B. (2014). A Technical Guide - PCR Technologies, 164.
- Nolan, T., Huggett, J., & Sanchez, E. (2013). Good Practice Guide for the Application of Quantitative PCR (qPCR). *National Measurement System*, 50. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.05.013>
- Orang, A. V., Safaralizadeh, R., Kazemzadeh-Bavili, M., & Chen, S. L. (2014). Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation. <https://doi.org/10.1155/2014/970607>
- Pe, O. (2016). Diurnal changes of arterial oxygen saturation and erythropoietin concentration in male and female highlanders, 4, 1–7. <https://doi.org/10.14814/phy2.12901>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT – PCR, 29(9), 16–21.
- Pinto, B. (2013). Asentimiento y consentimiento informado en pediatría: aspectos bioéticos y jurídicos en el contexto colombiano. *Bioética*, 8, 144–165.
- Plessis, L., Nives, S., & Dessimoz, C. (2011). The what , where , how and why of gene ontologyça primer for bioinformaticians, 12(6). <https://doi.org/10.1093/bib/bbr002>



- Plotnikov, A., Zehorai, E., Procaccia, S., & Seger, R. (2011). The MAPK cascades : Signaling components , nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation ☆. *BBA - Molecular Cell Research*, 1813(9), 1619–1633. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.12.012>
- Poel, D., Buffart, T. E., Oosterling-jansen, J., Verheul, H. M. W., & Voortman, J. (2018). Evaluation of several methodological challenges in circulating miRNA qPCR studies in patients with head and neck cancer. *Nature Publishing Group*, 50(3), e454-10. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.288>
- Porcelli, S., Marzorati, M., Healey, B., Terraneo, L., Vezzoli, A., Bella, S. Della, ... Samaja, M. (2017). Lack of acclimatization to chronic hypoxia in humans in the Antarctica. *Scientific Reports*, (Mi), 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18212-1>
- Rasmussen, P., Siebenmann, C., Díaz, V., & Lundby, C. (2013). Red cell volume expansion at altitude: A meta-analysis and Monte Carlo simulation. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e31829047e5>
- Rice, J., Roberts, H., Burton, J., Pan, J., States, V., Rai, S. N., & Galandiuk, S. (2015). Assay reproducibility in clinical studies of plasma miRNA. *PLoS ONE*, 10(4), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121948>
- Salud, S. D. de. (2008). *Manual para la toma de muestras para análisis microbiológico*. Bogotá. Retrieved from [http://www.saludcapital.gov.co/sitios/VigilanciaSaludPublica/Todo IHH/Manual Toma Muestras.pdf](http://www.saludcapital.gov.co/sitios/VigilanciaSaludPublica/Todo%20IIH/Manual%20Toma%20Muestras.pdf)
- San, T., Polat, S., Cingi, C., Eskiizmir, G., Oghan, F., & Cakir, B. (2013). Effects of High Altitude on Sleep and Respiratory System and Theirs Adaptations, 2013(i).
- Sang, N., Stiehl, D. P., Bohensky, J., Leshchinsky, I., & Srinivas, V. (2015). MAPK signaling Up-regulates the Activity of Hypoxia-inducible Factors by its Effects on p300. *Journal of Biological Chemistry*, 278(16), 14013–14019. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209702200.MAPK>
- Sapan, C., & Lundblad, R. (2006). Considerations Regarding the use of blood samples in the proteomic identification of biomarkers for cancer diagnosis. *Cancer Genomics & Proteomics*, 3(227), 230. Retrieved from <http://cgp.iarjournals.org/content/3/3-4/227.full.pdf>
- Sarkar, S., Banerjee, P. K., & Selvamurthy, W. (2003). High altitude hypoxia: An intricate interplay of oxygen responsive macroevents and micromolecules. *Molecular and Cellular Biochemistry*. <https://doi.org/10.1023/A:1026080320034>
- Schmidt, W. (2002). Effects of Intermittent Exposure to High Altitude on Blood Volume and Erythropoietic Activity, 3(2).
- Schönenberger, M. J., & Kovacs, W. J. (2015). Hypoxia signaling pathways : modulators of oxygen-related organelles, 3(July). <https://doi.org/10.3389/fcell.2015.00042>
- Seaton, D. C. (1969). Effect of Altitude upon 1968 Olympic Games Running

- Performances by, 13(3), 309–311.
- Semenza, G. (2007). Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1. *Biochemistry*, 9, 1–9. <https://doi.org/10.1042/BJ20070389>
- Semenza, G. L. (2011). Oxygen Sensing, Homeostasis, and Disease, 537–547.
- Semenza, G. L. (2012). Hypoxia-Inducible Factor 1 ( HIF-1 ) Pathway, 1(November), 9–12. <https://doi.org/10.1126/stke.4072007cm8>
- Shi, R., & Chiang, V. L. (2005). Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR. <https://doi.org/10.2144/000112010>
- Simonson, T. S., Yang, Y., Huff, C. D., Yun, H., Qin, G., Witherspoon, D. J., ... Ge, R. (2009). Correlation of microRNA levels during hypoxia with predicted target mRNAs through genome-wide microarray analysis. *BMC Medical Genomics*, 2, 15. <https://doi.org/10.1186/1755-8794-2-15>
- Spengler, R. M. (2013). Mechanisms Of MicroRNA evolution, regulation and function: computational insight, biological evaluation and practical application. Retrieved from <http://ir.uiowa.edu/etd/2636>
- Storz, J. F., Scott, G. R., & Cheviron, Z. A. (2010). Phenotypic plasticity and genetic adaptation to high-altitude hypoxia in vertebrates, 4125–4136. <https://doi.org/10.1242/jeb.048181>
- Szklarczyk, D., Franceschini, A., Wyder, S., Forslund, K., Heller, D., Huerta-cepas, J., ... Mering, C. Von. (2015). STRING v10 : protein – protein interaction networks , integrated over the tree of life, 43(October 2014), 447–452. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1003>
- Tokar, T., Pastrello, C., Rossos, A. E. M., Abovsky, M., Hauschild, A., Tsay, M., ... Jurisica, I. (2018). mirDIP 4 . 1 — integrative database of human microRNA target predictions, 46(November 2017), 360–370. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1144>
- Trompetero, C., Cristancho, E., Benavides, W., Serrato, M., Landinez, P., & Rojas, J. (2015). Comportamiento de la concentración de hemoglobina , el hematocrito y la saturación de oxígeno en una población universitaria en Colombia a diferentes alturas. *Nutrición Hospitalaria*, 32(5), 2309–2318. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.32.5.9711>
- Turchinovich, A., Tonevitsky, A. G., & Burwinkel, B. (2016). Extracellular miRNA: A Collision of Two Paradigms. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(10), 883–892. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.08.004>
- Turchinovich, A., Weiz, L., & Burwinkel, B. (2012). Extracellular miRNAs: The mystery of their origin and function. *Trends in Biochemical Sciences*, 37(11), 460–465. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2012.08.003>
- Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A., & Burwinkel, B. (2011). Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Research*, 39(16), 7223–7233. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr254>

- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(4), 1–12. <https://doi.org/10.3109/14397595.2014.1001475>
- Voskarides, K. (2017). Plasticity vs Mutation. The role of microRNAs in human adaptation. *Mechanisms of Ageing and Development*. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2016.12.014>
- Wahid, F., Shehzad, A., Khan, T., & Kim, Y. Y. (2010). MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *BBA - Molecular Cell Research*, 1803, 1231–1243. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.06.013>
- Wang, K., Yuan, Y., Cho, J., McClarty, S., Baxter, D., & Galas, D. J. (2012). Comparing the MicroRNA Spectrum between Serum and Plasma, 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041561>
- Wang, W., Liu, D., Zhang, X., Chen, D., Cheng, Y., & Shen, F. (2018). Plant microRNAs in cross-kingdom regulation of gene expression. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7). <https://doi.org/10.3390/ijms19072007>
- Wang, Y., Li, Y., Ma, Z., Yang, W., & Ai, C. (2010). Mechanism of MicroRNA-Target Interaction: Molecular Dynamics Simulations and Thermodynamics Analysis. *PLoS Comput Biol*, 6(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000866>
- Wang, Y., Li, Y., Wang, X., & Zhang, D. (2013). Circulating miR-130b mediates metabolic crosstalk between fat and muscle in overweight / obesity. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-2996-8>
- Webb, J. D., Coleman, Æ. M. L., & Pugh, C. W. (2009). Hypoxia , hypoxia-inducible factors ( HIF ), HIF hydroxylases and oxygen sensing, 1, 3539–3554. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0147-7>
- Weber, R. E. (2007). High-altitude adaptations in vertebrate hemoglobins. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 158, 132–142. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2007.05.001>
- Wei, Z., Cui, L., Mei, Z., Liu, M., & Zhang, D. (2014). miR-181a mediates metabolic shift in colon cancer cells via the PTEN / AKT pathway. *FEBS Letters*, 588(9), 1773–1779. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.03.037>
- Wheaton, W. W., & Chandel, N. S. (2019). Hypoxia . 2 . Hypoxia regulates cellular metabolism, 2909. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00485.2010>
- Wilcox, T., & Hirshkowitz, A. (2015). Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods*, 85(0 1), 1–27. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.08.045>
- Williams, A., Henao-Mejia, J., Harman, C. C. D., & Flavell, R. A. (2013). miR-181 and metabolic regulation in the immune system. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 78(1), 223–230. <https://doi.org/10.1101/sqb.2013.78.020024>

- Xu, D., Takeshita, F., Hino, Y., Fukunaga, S., Kudo, Y., Tamaki, A., ... Tahara, H. (2011). miR-22 represses cancer progression by inducing cellular senescence. *Journal of Cell Biology*, 193(2), 409–424. <https://doi.org/10.1083/jcb.201010100>
- Yan, Y., Shi, Y., Wang, C., Guo, P., Wang, J., Zhang, C.-Y., & Zhang, C. (2015). Influence of a high-altitude hypoxic environment on human plasma microRNA profiles. *Scientific Reports*, 5, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep15156>
- Yan, Y., Wang, C., Zhou, W., Shi, Y., Guo, P., Liu, Y., ... Zhang, C. (2016). Elevation of circulating miR-210-3p in high-altitude hypoxic environment. *Frontiers in Physiology*, 7, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00084>
- Zhang, H., Li, Y., Liu, Y., Liu, H., Wang, H., Jin, W., ... Xu, D. (2016). Role of plant MicroRNA in cross-species regulatory networks of humans. *BMC Systems Biology*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12918-016-0292-1>