



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

**Cuantificación de microRNAs en neonatos con normopeso, bajo  
peso y macrosomía usando tarjetas de tamiz neonatal**

Tesis que presenta

**Sandra Patricia Rodil García**

Para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias en Biología Molecular**

Director de la tesis:

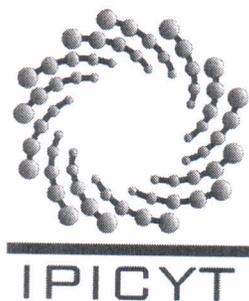
**Dr. Luis Antonio Salazar Olivo**

Asesores:

**Dra. Lina Raquel Riego Ruiz**

**Dr. Rubén López Revilla**

**San Luis Potosí, S.L.P., Septiembre de 2014**



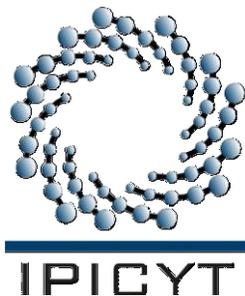
## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Cuantificación de microRNAs en neonatos con normopeso, bajo peso y macrosomía usando tarjetas de tamiz neonatal**” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Sandra Patricia Rodil García** y aprobada el **diecinueve de septiembre del dos mil catorce** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

**Dr. Luis Antonio Salazar Olivo**  
Director de la tesis

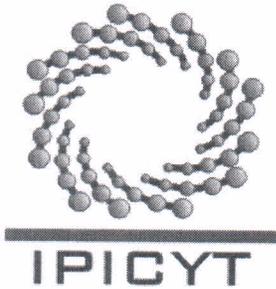
**Dr. Rubén López Revilla**  
Miembro del Comité Tutoral

**Dra. Lina Raquel Riego Ruiz**  
Miembro del Comité Tutoral



## CRÉDITOS INSTITUCIONALES

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Médica de la División de Biología Molecular del IPICYT con apoyo financiero de FOMIX-SLP (FMSLP-2012-C01-195024). Las muestras de tamiz neonatal fueron donadas por el Laboratorio Estatal de Salud Pública de San Luis Potosí. SPRG contó con una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-279196). Agradecemos a los doctores Rubén López Revilla y Lina Riego Ruiz (IPICYT) sus valiosos comentarios, al Dr. Pedro Luna Arias (CINVESTAV) y al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (IPICYT) por permitirnos el uso de sus equipos.



# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 121 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 19 días del mes de septiembre del año 2014, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Rubén Hipólito López Revilla</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Lina Raquel Riego Ruiz</b>	<b>Secretaria</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Luis Antonio Salazar Olivo</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó la C.

**Sandra Patricia Rodil García**

sobre la Tesis intitulada:

*Cuantificación de microRNAs en neonatos con normopeso, bajo peso y macrosomía usando tarjetas de tamiz neonatal*

que se desarrolló bajo la dirección de

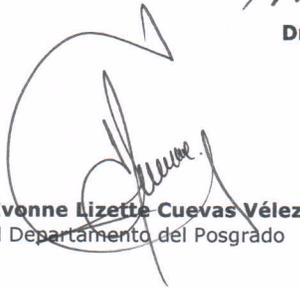
**Dr. Luis Antonio Salazar Olivo**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 17:35 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 19 días del mes de septiembre de 2014.

  
**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado

  
**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico



## **Cuantificación de microRNAs en neonatos con normopeso, bajo peso y macrosomía usando tarjetas de tamiz neonatal**

Patricia Rodil-García, Luis A Salazar-Olivo

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, México.

Camino a la Presa San José 2055 Col. Lomas, C.P. 78216, SLP, México.

**Título corto:** Cuantificación de microRNAs en neonatos con diferentes pesos al nacimiento

**Autor para correspondencia:** Dr. Luis A Salazar-Olivo. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, México. Camino a la Presa San José 2055 Col. Lomas, C.P. 78216, SLP, México. Tel. +52 (444) 834 20 00 ext. 2054. Correo electrónico: [olivo@ipicyt.edu.mx](mailto:olivo@ipicyt.edu.mx)

**Palabras clave:** programación fetal, peso bajo al nacimiento, macrosomía, hsa-miR-454-3p, hsa-miR-33b, hsa-miR-375.

## RESUMEN

### **Cuantificación de microRNAs en neonatos con normopeso, bajo peso y macrosomía usando tarjetas de tamiz neonatal**

El peso al nacimiento es un indicador temprano de enfermedades metabólicas y los microRNAs (miRNAs) son reguladores post-transcripcionales relacionados con diabetes y obesidad. En este trabajo estandarizamos un protocolo para extraer y cuantificar miRNAs a partir de muestras de sangre de tamiz neonatal almacenada en tarjetas de Guthrie y analizamos la expresión de los miRNAs hsa-miR-375, hsa-miR-33b y hsa-miR-454-3p de neonatos con normopeso (n=20), bajo peso (n=20) y macrosomía (n=20). La expresión de hsa-miR-375 no tuvo diferencias significativas en los tres grupos ( $p=0.153$ ), pero hsa-miR-454-3p se sobreexpresó en neonatos con peso bajo ( $p<0.001$ ) y hsa-miR-33b se sobreexpresó en neonatos macrosómicos ( $p<0.001$ ). Para explorar el posible papel de los miRNAs sobreexpresados sobre la programación fetal de enfermedades metabólicas, mediante análisis bioinformático encontramos que los posibles genes blanco se asocian a procesos como neurogénesis, homeostasis de glucosa, metabolismo de sustancias orgánicas y respuesta celular a estímulos nutricionales ( $p<0.01$ ). Nuestros resultados constituyen la primera evidencia de alteraciones en la expresión de miRNAs en neonatos con peso alto y bajo al nacimiento y abren una promisoriosa área de investigación sobre los mecanismos moleculares de la programación fetal.

**Palabras clave:** programación fetal, peso bajo al nacimiento, macrosomía, hsa-miR-454-3p, hsa-miR-33b, hsa-miR-375.

## ABSTRACT

### **MicroRNAs quantification in normal birth weight, low birth weight and macrosomic neonates using neonatal screening cards**

Birth weight is an early predictor for metabolic diseases and microRNAs (miRNAs) are post-transcriptional regulators related to diabetes and obesity. In this work we standardized a protocol for miRNAs extraction and quantification from neonatal screening blood samples stored in Guthrie cards and analyzed the expression of miRNAs hsa-miR-375, hsa-miR-33b and hsa-miR-454-3p in normal birth weight (n=20), low birth weight (n=20) and macrosomic (n=20) neonates. hsa-miR-375 expression did not vary significantly among groups ( $p=0.153$ ), whereas hsa-miR-454-3p was over-expressed in low birth weight neonates ( $p<0.001$ ) and hsa-miR-33b was over-expressed in macrosomic neonates ( $p<0.001$ ). To explore the possible role of the over-expressed miRNAs on the fetal programming of metabolic diseases, through bioinformatic analysis we found their potential target genes are associated to processes such as neurogenesis, glucose homeostasis, organic substance metabolism and cellular response to nutrient stimulus ( $p<0.01$ ). Our results constitute the first evidence of altered miRNAs expression in neonates with high and low birth weight and open up a promising research area on the molecular mechanisms of fetal programming.

**Keywords:** fetal programming, low birth weight, macrosomia, hsa-miR-454-3p, hsa-miR-33b, hsa-miR-375.

## INTRODUCCIÓN

La programación fetal se refiere a una serie de condiciones que se presentan en un lapso crítico durante el desarrollo del feto que determinan en buena medida las características de desarrollo postnatal y pueden incrementar el riesgo de desarrollar enfermedades metabólicas a lo largo de la vida [1]. Numerosas evidencias epidemiológicas y experimentales sugieren que el ambiente nutricional, hormonal y metabólico de la madre, así como el ambiente post-parto temprano, pueden programar el desarrollo de enfermedades metabólicas en la vida adulta del hijo.

El concepto de programación fetal implica la existencia de periodos críticos en el desarrollo humano, a saber: preimplantacional, gestación temprana, gestación media, gestación tardía y postnatal. En cada una de estas etapas el organismo es particularmente sensible a ciertas señales del ambiente, por lo cual los efectos de la programación fetal varían dependiendo del tipo de estrés y el momento en que este ocurre [2]. Cada vez hay más pruebas de que un desarrollo fetal insuficiente puede tener consecuencias permanentes en la salud a lo largo de la vida del individuo. Entre ellas se encuentran mayores cargas de enfermedades infecciosas y de enfermedades no transmisibles, como obesidad, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), hipertensión y enfermedades cardiovasculares (ECs) [3].

El peso al nacimiento se relaciona con el estado del recién nacido, el de la madre y el ambiente, y se ha utilizado durante muchos años como principal indicador de la salud perinatal [4]. Existen datos epidemiológicos que relacionan el peso o la talla al nacimiento con el riesgo subsecuente de desarrollar alteraciones a la salud tales como resistencia a insulina y dislipidemia [5,6].

Los neonatos con peso menor a 2500 g [4] presentan niveles elevados de colesterol total y LDL, aumento en la resistencia a insulina y cifras de tensión arterial sistólica más altas que los neonatos de peso normal [7]. Además, el peso bajo natal se ha asociado con dislipidemias, hipertensión arterial, intolerancia a la glucosa y obesidad en la edad adulta [8], lo que conlleva un aumento en el riesgo de éstos niños de sufrir DM2 y ECs a edades más tempranas [4].

Es necesario poner especial atención en las estrategias de prevención de obesidad y diabetes en niños nacidos con peso bajo, ya que más de 20 millones de niños alrededor del mundo nacen con esta condición, lo cual representa el 15.5% de los nacimientos, de los cuales el 95.6% sucede en países en desarrollo [4]. En México, el 8.37% de los nacidos vivos durante 2010 presentaron bajo peso natal [9].

Recientemente, las consecuencias del peso alto al nacimiento también han suscitado interés. El peso alto natal o macrosomía se asigna a neonatos con peso mayor a 4000 g al nacimiento [3] y se ha asociado con aumento en el riesgo de mortalidad, obesidad, cáncer y otras enfermedades crónicas [3]. La relación entre diabetes materna y macrosomía fetal es un hecho muy estudiado. Sin embargo, el 80% de los recién nacidos macrosómicos nacen de madres no diabéticas. Diversos estudios vinculan la macrosomía en hijos de madres diabéticas, obesas e incluso en la población normal, con un mayor riesgo de desarrollar DM2 y síndrome metabólico tanto en la infancia o como en la edad adulta [10].

La importancia de realizar estudios en neonatos macrosómicos se refuerza por el reciente aumento en el índice de masa corporal (IMC) en las mujeres en edad reproductiva, también ha implicado un incremento en la incidencia de recién

nacidos con peso alto [11]. En 2010 en México, 3 de cada 100 nacidos vivos fueron macrosómicos [12].

Las evidencias que asocian el desarrollo fetal con el riesgo de desarrollar enfermedades se siguen acumulando, pero se desconocen los mecanismos que desencadenan enfermedades en la edad adulta. El uso de marcadores moleculares como complemento a los marcadores tradicionales que se utilizan en la actualidad desde edades tempranas, ayudaría a prevenir diversas enfermedades incluyendo ECs y DM2 [13].

Los microRNAs (miRNAs) son RNAs pequeños no codificantes que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional de forma importante, ya que se calcula que regulan hasta el 30% de los genes [14]. Los miRNAs tienen ventajas que los hacen candidatos atractivos como biomarcadores tempranos: es probable que tengan una función en el desarrollo de la enfermedad al estar implicados en redes de regulación [15]; son metabólicamente estables en diferentes tejidos y líquidos biológicos, incluyendo suero, plasma y orina [16,17]; y pueden ser específicos para diferentes tejidos y etapas de las enfermedades [18].

Numerosas evidencias relacionan la programación fetal y el peso al nacimiento con el desarrollo de enfermedades adultas y sugieren la posibilidad de encontrar biomarcadores tempranos. Los miRNAs tienen potencial como biomarcadores que pueden encontrarse alterados en etapas tempranas de diversas enfermedades. Hasta el momento, no hay reportes de la expresión de miRNAs en neonatos con diferentes condiciones de peso al nacimiento.

El propósito de este trabajo fue investigar si existe diferencia en la expresión de miRNAs en diferentes estados de peso al nacimiento: normopeso,

peso bajo y macrosomía. En particular, la utilidad de analizar miRNAs obtenidos de muestras de tamiz neonatal como biomarcadores tempranos de desórdenes que han sido asociados al peso al nacimiento. Asimismo, predecir los genes blanco de los miRNAs estudiados y las vías metabólicas asociadas a estos genes para intentar inferir los probables mecanismos relacionados con la programación fetal de enfermedades metabólicas adultas.

Para la prueba de tamiz neonatal se toma una muestra de sangre del talón del recién nacido, la cual se almacena en forma de sangre seca en piezas de papel filtro denominadas tarjetas de Guthrie. En 1991 se reportó la extracción de DNA genómico de muestras de sangre seca [19], lo que abrió la posibilidad de utilizar las muestras de tamiz neonatal para análisis genómicos.

Para este estudio elegimos miRNAs que se han asociado a procesos clave en el desarrollo de diabetes y obesidad. Hsa-miR-33b se ha relacionado previamente con metabolismo de glucosa y lípidos [20,21], mientras que hsa-miR-375 presenta una expresión alterada en pacientes diabéticos y en modelos animales [22,23]. Finalmente, se decidió investigar el posible uso de hsa-miR-454-3p como control positivo, ya que su expresión se ha reportado en monocitos de neonatos [24].

## RESULTADOS

### ***Estandarización de un protocolo para la purificación de miRNAs a partir de tarjetas de Guthrie***

Para definir las condiciones óptimas de purificación de miRNAs a partir de tarjetas de Guthrie, ensayamos 11 protocolos de extracción diferentes. De éstos, únicamente los protocolos 1, 2, 3, 4 y 9 resultaron en concentraciones de miRNAs totales superiores a 1 ng/ $\mu$ l (Figura 1a) y tres de ellos, los protocolos 3, 4 y 9 enriquecieron la fracción correspondiente a miRNAs (Figura 1b). Para los análisis subsiguientes usamos el protocolo 4 que produjo las concentraciones más elevadas de miRNAs a menor costo.

Para confirmar la utilidad del protocolo escogido realizamos un ensayo con una muestra de cada condición de estudio. La figura 2a muestra el electroferograma de RNAs pequeños obtenidos mediante el protocolo 4 de tarjetas de Guthrie de neonatos con normopeso, peso bajo y macrosomía al nacimiento. Como control negativo usamos una muestra de papel filtro sin sangre. La mezcla de reacción para este ensayo contuvo un estándar interno de RNA de 4 nt de longitud. Como se puede observar en la figura, las muestras de sangre de las tres condiciones de peso al nacimiento presentan un pico de fluorescencia en la región de 20 a 40 nt, correspondiente a miRNAs, el cual no se observó en el control negativo. En todas las muestras analizadas, incluyendo el control negativo, se observó la presencia del estándar de 4 nt, lo que indica la validez del experimento.

Para determinar los porcentajes de miRNAs respecto al RNA total en la muestra, identificamos la región de 20 a 40 nt, en la cual se calcula un porcentaje basal del 13.3%, en el caso del control negativo éste se ajusta a 0. Existe una

variación entre las muestras, no dependiente del protocolo. Por lo tanto, se consideraron como muestras con miRNAs de calidad amplificable solamente aquellas con un porcentaje de miRNAs mayor de 35% del RNA total presente en la muestra (Figura 2b).

### ***Diseño de oligonucleótidos para retro-transcripción***

Los miRNAs son sintetizados en las células en forma de transcritos primarios largos (~100 nt) que forman una estructura tipo horquilla o “stem-loop” (pri-miRNAs). Los pri-miRNAs son procesados por diversas enzimas hasta obtener un transcrito más corto (~70 nt) que aún mantiene la estructura secundaria, denominado pre-miRNA. Ésta molécula es exportada del núcleo al citoplasma en donde un procesamiento posterior elimina la horquilla, lo que origina el miRNA maduro [14]. La diferencia en la estructura secundaria entre pri-miRNAs, pre-miRNAs y miRNAs maduros permite diseñar oligonucleótidos que, mediante impedimento estérico, sean capaces de discriminar entre las formas maduras e inmaduras de las moléculas. Por lo tanto, el diseño de los oligonucleótidos para retro-transcripción incluyó una estructura secundaria tipo “stem-loop”.

Para confirmar la formación de esta estructura secundaria, modelamos in silico las estructuras de oligonucleótidos específicos para los miRNAs hsa-miR-375, hsa-miR-454-3p y hsa-miR-33b (Figura 3). Los valores de  $\Delta G$  estimados mediante el análisis informático fueron -16.21 kcal/mol para hsa-miR-375, -16.52 kcal/mol para hsa-miR-454-3p y -15.67 kcal/mol para hsa-miR-33b. Estos valores

nos permitieron deducir una alta probabilidad de formación espontánea de las estructuras secundarias deseadas.

Para comprobar la utilidad de los oligonucleótidos en la cuantificación de la expresión de miRNAs específicos, realizamos pruebas de amplificación mediante RT-qPCR para los tres miRNAs en dos tarjetas de Guthrie de neonatos con normopeso. Los tres miRNAs analizados mostraron curvas de amplificación eficientes, mientras que los controles negativos de mezcla sin muestra no mostraron amplificación (Figura 4).

#### ***Análisis de la expresión de hsa-miR-375, hsa-miR-33b y hsa-miR-454-3p en neonatos con normopeso, bajo peso y macrosomía***

Cuantificamos la expresión de los miRNAs hsa-miR-375, hsa-miR-33b y hsa-miR-454-3p en muestras de neonatos con normopeso (n = 20), bajo peso (n = 20) y macrosomía (n = 20) al nacimiento mediante RT-qPCR, y analizamos los resultados obtenidos mediante ANOVA de una vía. La expresión de hsa-miR-375 no mostró diferencias significativas entre los grupos [ $F(2,71)=1.929$ ,  $p=0.153$ ] (Figura 5a), por lo que lo usamos como gen normalizador para el análisis de los miRNAs restantes.

Encontramos una diferencia significativa en la expresión de hsa-miR-33b entre los grupos de peso [ $F(2,71)=20.57$ ,  $p<0.001$ ] (Figura 5b), aún con los datos sin normalizar. El análisis post-hoc usando la prueba HSD de Tukey indicó que hsa-miR-33b se sobreexpresó significativamente en macrosómicos en comparación con los grupos de normopeso y de peso bajo ( $p<0.001$ ). Por el contrario, la expresión de este miRNA en neonatos con normopeso y peso bajo no

diferió de forma significativa ( $p=0.51$ ). En conjunto, estos resultados indican que existe una sobre-expresión de hsa-miR-33b en neonatos con macrosomía al nacimiento, pero no en neonatos con peso bajo.

Al analizar la expresión de hsa-miR-454-3p encontramos diferencias significativas entre las distintas condiciones de peso al nacimiento [ $F(2,71)=23.58$ ,  $p<0.001$ ] (Figura 5c), aún con los datos sin normalizar. El análisis post-hoc usando la prueba de HSD de Tukey indicó que la expresión de hsa-miR-454-3p en neonatos con peso bajo es significativamente mayor comparada con el grupo de peso normal ( $p<0.001$ ) y el grupo de macrosomía ( $p<0.001$ ). En cambio, la expresión de este miRNA entre neonatos de normopeso y macrosomía no difiere de forma significativa ( $p=0.45$ ). Colectivamente, estos resultados exponen una sobre-expresión de hsa-miR-454-3p en neonatos con peso bajo al nacimiento, pero no en neonatos con macrosomía.

### ***Predicción de genes blanco de hsa-miR-33b y hsa-miR-454-3p y vías metabólicas asociadas***

La sobre-expresión de hsa-miR-33b y hsa-miR-454-3p en neonatos con peso bajo y macrosomía natal, dos condiciones que predisponen a enfermedades metabólicas, sugieren que dichos miRNAs podrían participar en la programación fetal de enfermedades adultas. Por lo tanto, decidimos explorar los posibles mecanismos por los que hsa-miR-33b y hsa-miR-454-3p podrían ejercer su acción. Lo anterior mediante la predicción de sus posibles genes blanco utilizando cuatro herramientas bioinformáticas. En conjunto, los cuatro algoritmos dieron

como resultado 26 posibles genes blanco para hsa-miR-33b (Figura 6a; Tabla 1) y 17 posibles genes blanco para hsa-miR-454-3p (Figura 6b; Tabla 2).

Utilizamos la herramienta Mala Cards para identificar los procesos patológicos asociados a los 26 genes blanco reconocidos para hsa-miR-33b y a los 17 genes blanco reconocidos para hsa-miR-454-3p. En total, encontramos 86 enfermedades relacionadas a por lo menos dos de los genes reconocidos para hsa-miR-33b (Material suplementario tabla 2) y 54 enfermedades relacionadas a por lo menos dos de los genes reconocidos para hsa-miR-454-3p (Material suplementario tabla 3).

La enfermedad asociada a un mayor número de los 26 genes blanco hipotéticos de hsa-miR-33b fue endotelitis (14 genes=53%), seguida de distintos tipos de cáncer y enfermedades neuronales. Entre las enfermedades metabólicas relacionadas con genes blanco hipotéticos de hsa-miR-33b encontramos hipertensión, resistencia a insulina y desórdenes en el metabolismo de lípidos. En el caso de hsa-miR-454-3p, la enfermedad asociada a un mayor número de los 17 posibles genes blanco fue prostatitis (8 genes=47%), seguida de diversos tipos de cáncer y alteraciones tiroideas, obesidad e hipertensión.

Adicionalmente, un total de 531 genes blanco hipotéticos para hsa-miR-33b y 801 genes blanco hipotéticos para hsa-miR-454-3p se adscribieron a vías metabólicas utilizando la herramienta de mapeo de la Enciclopedia Kyoto de Genes y Genomas (KEGG Mapper) (Material suplementario tablas 4 y 5). Dicho análisis mostró la participación de estos genes en vías de señalización como MAPK, PI3K-Akt y FoxO.

El enriquecimiento realizado con la herramienta AmiGO de Gene Ontology (GO) resultó en una lista de procesos biológicos asociados a la lista de hipotéticos genes blanco de hsa-miR-33b y hsa-miR-454-3p. Para reducir y agrupar los términos redundantes utilizamos la herramienta REVIGO. Después de la agrupación de términos, se obtuvieron 175 procesos asociados a los genes blanco de hsa-miR-33b (Figura 6c) y 257 procesos para los genes blanco de hsa-miR-454-3p (Figura 6d). Entre los procesos identificados para los genes blanco hipotéticos de hsa-miR-33b se encuentra el desarrollo del sistema circulatorio, lo cual podría explicar su participación en enfermedades como endotelitis e hipertensión. Procesos como neurogénesis, señalización, transmisión sináptica, regulación de catabolismo de lípidos y homeostasis de glucosa también fueron identificados.

Los procesos identificados para los genes blanco hipotéticos de hsa-miR-454-3p incluyen proliferación y diferenciación celular, lo cual podría explicar su asociación con el desarrollo de cáncer.

## DISCUSIÓN

En este estudio logramos optimizar una técnica para el análisis de la expresión de miRNAs obtenidos a partir de tarjetas de Guthrie de tamiz neonatal. Además, presentamos la primera evidencia de alteraciones en la expresión de miRNAs en neonatos humanos con peso anormal al nacimiento. Nuestro estudio muestra sobre-expresión significativa de hsa-miR-33b en neonatos macrosómicos y de hsa-miR-454-3p en neonatos con peso bajo.

### ***Uso de tarjetas de Guthrie para análisis de miRNAs neonatales***

Las tarjetas de Guthrie se utilizan para el tamizaje neonatal durante la primera semana de vida; en la prueba básica se busca la detección de fenilcetonuria e hipotiroidismo congénito . Adicionalmente, las muestras de tamizaje neonatal se han usado para análisis de polimorfismos de un sólo nucleótido, estudios epigenéticos y de expresión génica [25–27]. Sin embargo, hasta ahora no se ha reportado el uso de tarjetas de Guthrie para el análisis de miRNAs y los ensayos metodológicos para la purificación de miRNAs a partir de sangre seca son escasos [28].

Nosotros optimizamos un protocolo de purificación de RNA total que, entre otras modificaciones, sustituye los reactivos de un *kit* comercial (miRvana, Ambion, California, U.S.A.) por reactivos de uso común (etanol, isopropanol) y resulta en un enriquecimiento de la fracción de miRNAs aunada a una disminución del costo por ensayo.

Para cuantificar la expresión de algunos miRNAs en las muestras obtenidas por nuestro protocolo de purificación, usamos la técnica de “stem-loop” RT-qPCR

utilizando oligonucleótidos tipo “stem-loop” descritos en la técnica original [29] pero reemplazando la sonda TaqMan por una sonda universal (UPL-21) [30]. Esto nos permitió realizar ensayos para varios miRNAs con una misma sonda, con una considerable disminución del costo. Nuestro protocolo representó un ahorro del 75% comparado con el uso del *kit* para microRNAs TaqMan.

La sencillez del protocolo desarrollado, en conjunto con la amplia cobertura del tamiz neonatal, abre nuevas posibilidades para investigar el papel de los miRNAs en la programación fetal de enfermedades adultas.

### ***Expresión de miRNAs en neonatos con distinto peso corporal***

El miRNA hsa-miR-375 se ha relacionado al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 [22]. Por ello analizamos la expresión de hsa-miR-375 en neonatos con distintas condiciones de peso al nacimiento. El miRNA amplificó en todas las muestras analizadas pero contrariamente a lo esperado, no mostró diferencia significativa entre los tres grupos de neonatos incluidos en el estudio; lo que sugiere que este miRNA no es un predictor neonatal adecuado de diabetes adulta.

La ausencia de diferencias en la expresión de hsa-miR-375 entre neonatos con normopeso y neonatos con bajo peso o macrosomía, dos condiciones predisponentes a DM2, puede tener varias explicaciones.

Se sabe que los niveles de expresión de este miRNA tienen un componente racial [31] y aún de género [32]. Asimismo, se sabe que la expresión de hsa-miR-375 es regulada por el grado de metilación de su promotor [33,34]. Estas variables deberán analizarse antes de descartar la utilidad de hsa-miR-375 como predictor neonatal del desarrollo de DM2 adulta.

Dado que la expresión de hsa-miR-375 fue estable en todas las muestras analizadas y puesto que no existen genes normalizadores para análisis de miRNAs en neonatos, lo utilizamos como normalizador para el resto de los miRNAs en este estudio.

También cuantificamos la expresión de hsa-miR-33b, que contribuye a la regulación del metabolismo de ácidos grasos y la señalización por insulina [35]. Nuestros resultados mostraron un aumento en los niveles de expresión de hsa-miR-33b en neonatos macrosómicos, comparados con los neonatos con normopeso y peso bajo.

hsa-miR-33b es parte de una familia conservada de miRNAs que incluye a hsa-miR-33a y hsa-miR-33b, y que se encuentra en los intrones de los genes SREBP; los cuales son una familia de factores de transcripción requeridos para la síntesis de colesterol y ácidos grasos [36]. Se ha observado que los estímulos metabólicos que activan la expresión de estos genes, también regulan la expresión de ambos hsa-miR-33 [20].

Estudios en líneas celulares y modelos animales han encontrado que hsa-miR-33b y hsa-miR-33a suprimen la expresión de ABCA1, una proteína crucial para la biogénesis de lipoproteínas de alta densidad en hígado y asociada a la regulación de secreción de insulina en el páncreas [41].

La supresión en la expresión de ABCA1 disminuye también los niveles de HDL [37]. Tanto la obesidad como la diabetes están relacionadas con alteraciones en las concentraciones de lipoproteínas, incluyendo una disminución en la concentración de HDL [38]. Durante el desarrollo embrionario, hay altos requerimientos de colesterol para división y crecimiento celular [39], por lo que

alteraciones en la homeostasis de lípidos y colesterol en etapas tempranas pueden representar un factor de riesgo importante para enfermedades cardiometabólicas [40].

Otros blancos reportados para hsa-miR-33b se encuentran en vías de oxidación de ácidos grasos (CROT, CPT1a, HADHB, AMPK $\alpha$ ), señalización de insulina (IRS2 y SIRT6) [35] y gluconeogénesis (PCK1, G6PC, SRC1, ROR $\alpha$ , CREB1 PGC1 $\alpha$ , SRC2) [20].

De acuerdo a nuestros análisis bioinformáticos, los genes blanco hipotéticos de hsa-miR-33b participan en vías relacionadas a cáncer y desarrollo neuronal, lo cual es consistente con las enfermedades encontradas en la búsqueda que realizamos en Mala Cards. Los genes blanco para hsa-miR-33b se asocian también a diferenciación y proliferación celular y apoptosis; tres procesos de alta relevancia en la etapa neonatal.

Asimismo, los genes blanco para hsa-miR-33b reportados en la literatura concuerdan con los resultados del enriquecimiento realizado en GO, en el cual se encuentran procesos representativos de oxidación de ácidos grasos, catabolismo de lípidos y homeostasis de glucosa.

La comprensión de los mecanismos en los que participa hsa-miR-33b en etapas tempranas del crecimiento podría ayudar a discernir las alteraciones en las concentraciones de lípidos que se observan en niños macrosómicos desde el nacimiento, y por lo mismo su participación en el desarrollo de enfermedades como ECs y DM2.

La cuantificación de la expresión de hsa-miR-454-3p mostró que este miRNA se sobreexpresa en neonatos con peso bajo, respecto a neonatos con normopeso o macrosomía.

Existen pocos estudios sobre la expresión de hsa-miR-454-3p y sus posibles funciones. Uno de estos estudios lo propone como un potencial regulador del desarrollo neuronal, específicamente en el desarrollo postnatal, ya que éste es un período crítico para la ontogenia cerebral en procesos como maduración sináptica y mielinización [43]. Es de notar que en nuestro análisis bioinformático de los posibles genes blanco de este miRNA se encuentran representadas las vías de sinapsis colinérgica y glutamatérgica.

También se ha reportado la expresión de hsa-miR-454-3p en monocitos de neonatos en respuesta a estímulos pro-inflamatorios al compararlos con monocitos adultos, lo cual lo relaciona con la regulación post-transcripcional de reacciones pro-inflamatorias [24].

Los resultados de este estudio podrían dar un primer atisbo de los posibles mecanismos que explicarían la propensión de los niños nacidos de peso bajo a tener mayor carga de enfermedades infecciosas y problemas de aprendizaje a lo largo de su vida [3].

De acuerdo al análisis bioinformático realizado, los genes blanco para hsa-miR-454-3p participan en vías relacionadas a cáncer y metabolismo general. Es de notar la asociación de los genes blanco de este miRNA con la vía PI3K-Akt, la cual es parte importante de la señalización para síntesis de proteínas, metabolismo y señalización de insulina.

Además, el enriquecimiento realizado en GO resulta en procesos típicos del desarrollo embrionario como desarrollo de sistemas y biogénesis; lo cual nos indica que hsa-miR-454-3p puede ser un regulador de importancia durante las primeras etapas de la vida.

Las diferencias en la expresión que observamos en este miRNA nos permiten concluir que existen alteraciones en esta etapa temprana asociadas a otras enfermedades, además de las comúnmente relacionadas con enfermedades metabólicas.

Las diferencias en la expresión de hsa-miR-454-3p en neonatos con diferentes pesos natales nos permiten concluir que este miRNA tiene potencial como biomarcador temprano, no sólo para enfermedades metabólicas sino para otras enfermedades. Este descubrimiento abre posibilidades para la investigación del desarrollo de enfermedades no metabólicas desde el nacimiento, pero es necesario investigar más acerca de los posibles mecanismos mediante los cuales hsa-miR-454-3p lleva a cabo su función regulatoria.

### ***Perspectivas***

El presente trabajo sienta las bases para posteriores estudios sobre la relación de los miRNAs en programación fetal, así como el uso de muestras de tamiz neonatal para investigación de RNAs pequeños.

Son necesarios más análisis para determinar si las alteraciones en la expresión de miRNAs observadas en este estudio se encuentran presentes en otras etapas del desarrollo y de la vida de los individuos.

Específicamente para la programación fetal de enfermedades metabólicas, se ha propuesto una distribución en U para el riesgo de desarrollar DM2 futura en niños nacidos con peso bajo y peso alto [44]; aún cuando el resultado es el mismo, los mecanismos son desconocidos. La diferencia encontrada en la expresión de miRNAs durante la etapa neonatal nos da un pequeño atisbo de las posibles vías que pueden estar participando.

Utilizar únicamente el peso al nacimiento como indicador del desarrollo fetal deja de lado otros factores importantes que no necesariamente se reflejan en el tamaño del recién nacido. El concepto de desarrollo fetal óptimo abarca tanto la salud del feto como de la madre antes y durante el embarazo; así como exposiciones a condiciones nutricionales y ambientales adversas [3]; por lo que es fundamental realizar estudios que incluyan datos adicionales que puedan reflejar otros aspectos del estado del neonato.

Finalmente, es importante realizar la validación experimental de los genes blanco para los miRNAs analizados, ya que esto permitiría conocer a profundidad los mecanismos y las vías mediante los cuales se lleva a cabo la programación fetal de enfermedades adultas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***Tarjetas de tamiz neonatal***

Las tarjetas Guthrie de tamiz neonatal fueron donadas por el Laboratorio Estatal de Salud Pública de San Luis Potosí. Los criterios para definir los grupos de peso fueron los siguientes: peso bajo al nacimiento:  $\leq 2500$  g; normopeso: 2501 g - 4299 g; y macrosomía:  $\geq 4300$  g; de acuerdo a los criterios de la Organización Mundial de la Salud. Cada grupo constó de 20 muestras, todas ellas de neonatos nacidos a término (37-41 semanas de gestación).

### ***Purificación de RNA a partir de tarjetas Guthrie***

Aislamos RNA total de tarjetas Guthrie utilizando 11 métodos (Material suplementario tabla 1) con modificaciones a los protocolos del kit miRvana (Ambion, California, U.S.A.) y al reportado por Patnaik y cols. [28]. En general, añadimos 300 $\mu$ l de amortiguador TE a un tubo Eppendorf conteniendo la muestra de la tarjeta Guthrie de aproximadamente 1cm de diámetro, y agitamos a 2000rpm a 4°C por 30 minutos en un vórtex Genie 2 (Fisher Scientific, Massachusetts, U.S.A.). Después agregamos Trizol (Ambion, California, U.S.A.) y cloroformo o una mezcla de fenol-cloroformo, y agitamos el tubo en vórtex. Continuamos con una centrifugación para separar la fase acuosa, la cual colectamos (aproximadamente 600 $\mu$ l) y diluimos con diferentes volúmenes de etanol a temperatura ambiente. Homogeneizamos la mezcla por vórtex o por inversión y transferimos 700 $\mu$ l de ésta a una columna de fibra de vidrio (Kit miRvana) que fue centrifugada a 10,000rpm durante 15 segundos; repetimos la centrifugación hasta filtrar todo el líquido. En 3 protocolos continuamos con métodos para concentrar

RNAs pequeños, y en los otros 8 continuamos con métodos para purificación de RNA total. Además, probamos diferentes soluciones de lavado. Finalmente, descartamos el líquido filtrado y centrifugamos la columna a 10,000rpm por 1 minuto para eliminar el líquido sobrante en el filtro. Transferimos la columna a un tubo limpio y eluimos con 100µl de agua libre de nucleasas, previamente calentada a 95°C. Realizamos una última centrifugación a máxima velocidad por 30 segundos. Almacenamos una alícuota del líquido filtrado a -20°C y el resto a -80°C para almacenamiento a largo plazo.

### ***Análisis cuantitativo y cualitativo de miRNAs totales***

Realizamos el análisis cuantitativo y cualitativo de miRNAs de todas las muestras utilizando el ensayo Small RNA (Agilent Technologies, California, U.S.A.) en el 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, California, U.S.A.). El 2100 Bioanalyzer es un equipo de electroforesis capilar que permite separar las muestras de acuerdo a su peso molecular. La intensidad de fluorescencia en cada muestra es representada en un electroferograma que permite conocer la cantidad de RNA en un tamaño dado. El ensayo que elegimos analiza el RNA en un rango que va desde 6 hasta 150 nucleótidos y determina la fracción de miRNAs presente en la muestra. Realizamos el ensayo Small RNA de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

### ***Diseño de oligonucleótidos***

Los oligonucleótidos usados en los ensayos de RT-qPCR se diseñaron con el programa “miRNA design tool” [30]. Las secuencias de los miRNAs maduros

fueron obtenidas de la versión 20 de miRBase [45]. La secuencia de hsa-miR-375 usada fue 5'- UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA-3', para el cual utilizamos las siguientes secuencias de oligonucleótidos: 5'-

GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCAGAGCCAACTCACGC-3' (retro-transcripción) y 5'-TGGTTTTTGTTCGTTCCGGCT-3' (específico). La

secuencia de hsa-miR-454-3p usada fue 5'-UAGUGCAAUAUUGCUUAUAGGGU-3', para el cual utilizamos las siguientes secuencias: 5'-

GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCAGAGCCAAACACCCTA-3' (retro-transcripción) y 5'-GGTGTGGTAGTGCAATATTGCTTA-3' (específico). La

secuencia de hsa-miR-33b usada fue 5'-GUGCAUUGCUGUUGCAUUGC-3', para el cual utilizamos las siguientes secuencias: 5'-

GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCAGAGCCAACGCAATG-3' (retro-transcripción) y 5'-GTTTGGGTGCATTGCTGTTG-3' (específico). El

oligonucleótido reverso universal fue el mismo para todos los miRNAs porque se une a la secuencia tipo "stem-loop" diseñada para todos los oligonucleótidos de retro-transcripción, de acuerdo al método de Czimmerer y cols. [30]. La secuencia utilizada fue: 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'.

Realizamos los análisis virtuales para formación de la estructura secundaria en los oligonucleótidos tipo "stem-loop" utilizando la herramienta "OligoAnalyzer 3.1" (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>).

### ***Análisis de miRNAs específicos mediante RT-qPCR***

Los miRNAs fueron transcritos a cDNA a través de una reacción de transcripción reversa específica para cada miRNA, utilizando un oligonucleótido tipo "stem-loop"

específico y la transcriptasa reversa M-MLV (Promega, Wisconsin, U.S.A.).

Utilizamos un volumen fijo de RNA (2µl) para todas las muestras y la concentración final del oligonucleótido fue de 50nM. Realizamos las reacciones en un termociclador Touchgene Gradient (Techne, Staffordshire, UK) de acuerdo al protocolo descrito por Rong-Mei y cols. [46]. Las reacciones se incubaron a 16°C por 30 minutos, seguido por 60 ciclos de retrotranscripción de 30°C por 30 segundos, 42°C por 30 segundos y 50°C por 1 segundo. Finalmente, se incubaron a 85°C durante 5 minutos.

La cuantificación de miRNAs la realizamos mediante qPCR utilizando el termociclador LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics, Basel, CH), los oligonucleótidos diseñados, la sonda Universal Probe Library #21 (Roche Diagnostics, Basel, CH) y la mezcla QuantiTect Probe PCR Master Mix (Qiagen, California, U.S.A.).

### ***Predicción de genes blanco y vías metabólicas asociadas***

Realizamos la predicción de genes blanco para hsa-miR-33b utilizando las herramientas Diana MicroT [47,48], miRanda [49], miRDB [50,51] y PicTar [52]. Ya que PicTar no distingue entre las diferentes formas de hsa-miR-454 (3p y 5p), para la predicción de blancos para este miRNA decidimos intercambiar esta herramienta por miRNAMap [53]. Graficamos los genes blanco respaldados por las 4 herramientas en Venny [54] y los utilizamos para buscar las relaciones con enfermedades en Mala Cards [55]. Se presentan las enfermedades asociadas a mínimo 2 genes blanco ([http://bioinformatics.psb.ugent.be/cgi-bin/liste/Venn/calculate\\_venn.html](http://bioinformatics.psb.ugent.be/cgi-bin/liste/Venn/calculate_venn.html)).

Utilizamos los genes blanco hipotéticos para hsa-miR-33b y hsa-miR-454-3p predichos por al menos 2 herramientas, para ubicarlos en sus vías metabólicas asociadas utilizando la herramienta Mapper de la Enciclopedia de Kyoto para Genes y Genomas (KEGG) [56,57]. Se reportan las vías asociadas a un mínimo de 5 genes. Usamos los mismos genes para realizar un enriquecimiento de genes en GO, usando la herramienta AmiGO versión 2 [58]. Utilizando la herramienta REVIGO [59] agrupamos y graficamos los términos similares resultantes del enriquecimiento en GO que presentaron una  $p < 0.01$ .

### ***Análisis estadístico***

Para determinar si existía diferencia en la expresión de miRNAs entre los diferentes grupos, realizamos un análisis de varianza (ANOVA de una vía,  $p < 0.05$ ). Para este análisis los datos resultantes de los ensayos de qPCR (Cq) fueron transformados a logaritmo base 10 y normalizados en relación a la expresión de hsa-miR-375 utilizando el método ddCT. Para confirmar las diferencias entre grupos utilizamos la prueba post-hoc HSD de Tukey (intervalo de confianza 95%). Realizamos los análisis estadísticos utilizando R [60].

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo fue elaborado en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria de la División de Biología Molecular del IPICYT con apoyo financiero de FOMIX-SLP (FMSLP-2012-C01-195024). Las muestras de tamiz neonatal fueron donadas por el Laboratorio Estatal de Salud Pública de San Luis Potosí. SPRG contó con una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-279196). Agradecemos a los doctores Rubén López Revilla y Lina Riego Ruiz (IPICYT) sus valiosos comentarios, al Dr. Pedro Luna Arias (CINVESTAV) y al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (IPICYT) por permitirnos el uso de sus equipos.

## REFERENCIAS

1. Langley-Evans SC, McMullen S (2010) Developmental origins of adult disease. *Med Princ Pract* 19: 87–98.
2. Boekelheide K, Blumberg B, Chapin RE, Cote I, Graziano JH, et al. (2012) Predicting Later-Life Outcomes of Early-Life Exposures. *Environ Health Perspect* 120: 1353–1361.
3. WHO (2006).  
. Informe técnico. Available:  
<http://apps.who.int/iris/handle/10665/43495>. Accessed 26 July 2014.
4. UNICEF (2004). Low Birthweight: Country, Regional and Global Estimates.  
Available: [http://www.unicef.org/spanish/publications/index\\_24840.html](http://www.unicef.org/spanish/publications/index_24840.html). Accessed 26 July 2014.
5. Osmond C, Barker DJ (2000) Fetal, infant, and childhood growth are predictors of coronary heart disease, diabetes, and hypertension in adult men and women. *Environ Health Perspect* 108: 545–553.
6. Eriksson JG, Forsén T, Tuomilehto J, Jaddoe VWV, Osmond C, et al. (2002) Effects of size at birth and childhood growth on the insulin resistance syndrome in elderly individuals. *Diabetologia* 45: 342–348.
7. Pa  
. Available:  
[http://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/9\\_1.pdf](http://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/9_1.pdf). Accessed 26 July 2014.
8. Ramadhani MK, Grobbee DE, Bots ML, Castro Cabezas M, Vos LE, et al. (2006) Lower birth weight predicts metabolic syndrome in young adults: the

- Atherosclerosis Risk in Young Adults (ARYA)-study. *Atherosclerosis* 184: 21–27.
9. De Castro F, Allen-Leigh B, D en Antrop, Katz G, Salvador-Carulla L, et al. (2013) Indicadores de bienestar y desarrollo infantil en México. *Salud Pública México* 55: 267–275.
  10. -  
- . Available:  
[http://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/10\\_1.pdf](http://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/10_1.pdf). Accessed 26 July 2014.
  11. Surkan PJ, Hsieh C-C, Johansson ALV, Dickman PW, Cnattingius S (2004) Reasons for increasing trends in large for gestational age births. *Obstet Gynecol* 104: 720–726.
  12. INEGI (2010) “Estadísticas a propósito del Día del Niño”. Available:  
<http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2013/ni%C3%B1o0.pdf>. Accessed 26 July 2014.
  13. Meigs JB (2003) The metabolic syndrome. *BMJ* 327: 61–62.
  14. Faller M, Guo F (2008) MicroRNA biogenesis: there’s more than one way to skin a cat. *Biochim Biophys Acta* 1779: 663–667.
  15. Inui M, Martello G, Piccolo S (2010) MicroRNA control of signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 252–263.
  16. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, et al. (2008) Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci* 105: 10513–10518.
  17. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, et al. (2010) The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 56: 1733–1741.

18. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, et al. (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435: 834–838.
19. McCabe ER (1991) Utility of PCR for DNA analysis from dried blood spots on filter paper blotters. *PCR Methods Appl* 1: 99–106.
20. Ramirez CM, Goedeke L, Rotllan N, Yoon J-H, Cirera-Salinas D, et al. (2013) MicroRNA 33 Regulates Glucose Metabolism. *Mol Cell Biol* 33: 2891–2902.
21. Goedeke L, Vales-Lara FM, Fenstermaker M, Cirera-Salinas D, Chamorro-Jorganes A, et al. (2013) A Regulatory Role for MicroRNA 33\* in Controlling Lipid Metabolism Gene Expression. *Mol Cell Biol* 33: 2339–2352.
22. Li X (2014) miR-375, a microRNA related to diabetes. *Gene* 533: 1–4.
23. Erener S, Mojibian M, Fox JK, Denroche HC, Kieffer TJ (2013) Circulating miR-375 as a biomarker of  $\beta$ -cell death and diabetes in mice. *Endocrinology* 154: 603–608.
24. Huang H-C, Yu H-R, Huang L-T, Huang H-C, Chen R-F, et al. (2012) miRNA-125b regulates TNF- $\alpha$  production in CD14<sup>+</sup> neonatal monocytes via post-transcriptional regulation. *J Leukoc Biol* 92: 171–182.
25. St Julien KR, Jelliffe-Pawlowski LL, Shaw GM, Stevenson DK, O’Brodivich HM, et al. (2013) High quality genome-wide genotyping from archived dried blood spots without DNA amplification. *PLoS One* 8: e64710.
26. Khoo SK, Dykema K, Vadlapatla NM, LaHaie D, Valle S, et al. (2011) Acquiring genome-wide gene expression profiles in Guthrie card blood spots using microarrays. *Pathol Int* 61: 1–6.
27. Beyan H, Down TA, Ramagopalan SV, Uvebrant K, Nilsson A, et al. (2012) Guthrie card methylomics identifies temporally stable epialleles that are present at birth in humans. *Genome Res* 22: 2138–2145.

28. Patnaik SK, Mallick R, Yendamuri S (2010) Detection of MicroRNAs in Dried Serum Blots. *Anal Biochem* 407: 147–149.
29. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, et al. (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 33: e179.
30. Czimmerer Z, Hulvely J, Simandi Z, Varallyay E, Havelda Z, et al. (2013) A Versatile Method to Design Stem-Loop Primer-Based Quantitative PCR Assays for Detecting Small Regulatory RNA Molecules. *PLoS ONE* 8: e55168.
31. Chang X, Li S, Li J, Yin L, Zhou T, et al. (2014) Ethnic Differences in MicroRNA-375 Expression Level and DNA Methylation Status in Type 2 Diabetes of Han and Kazak Populations. *J Diabetes Res* 2014. Article ID 761938, 7 pages, 2014.
32. Cheng J, Wang L, Xu L, Wang H, Liu P, et al. (2013) Gender-dependent miR-375 promoter methylation and the risk of type 2 diabetes. *Exp Ther Med* 5: 1687–1692.
33. Sun K, Chang X, Yin L, Li J, Zhou T, et al. (2014) Expression and DNA methylation status of microRNA-375 in patients with type 2 diabetes mellitus. *Mol Med Rep* 9: 967–972.
34. Wang X, Chang X, Li J, Yin L, Sun K (2014) DNA methylation of microRNA-375 in impaired glucose tolerance. *Exp Ther Med* 8: 775–780.
35. Dávalos A, Goedeke L, Smibert P, Ramírez CM, Warriar NP, et al. (2011) miR-33a/b contribute to the regulation of fatty acid metabolism and insulin signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 9232–9237.
36. Espenshade PJ (2006) SREBPs: sterol-regulated transcription factors. *J Cell Sci* 119: 973–976.
37. Cao R, Bai Y, Sun L, Zheng J, Zu M, et al. (2014) Xuezhikang Therapy Increases miR-33 Expression in Patients with Low HDL-C Levels. *Dis Markers* 2014. Article

ID 781780, 5 pages, 2014.

38. Merzouk H, Bouchenak M, Loukidi B, Madani S, Prost J, et al. (2000) Fetal macrosomia related to maternal poorly controlled type 1 diabetes strongly impairs serum lipoprotein concentrations and composition. *J Clin Pathol* 53: 917–923.
39. Cirera-Salinas D, Pauta M, Allen RM, Salerno AG, Ramirez CM, et al. (2012) Mir-33 regulates cell proliferation and cell cycle progression. *Cell Cycle* 11: 922–933.
40. Rottiers V, Näär AM (2012) MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 239–250.
41. Kang MH, Zhang L-H, Wijesekara N, de Haan W, Butland S, et al. (2013) Regulation of ABCA1 protein expression and function in hepatic and pancreatic islet cells by miR-145. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33: 2724–2732.
42. Ro S, Park C, Young D, Sanders KM, Yan W (2007) Tissue-dependent paired expression of miRNAs. *Nucleic Acids Res* 35: 5944–5953.
43. Somel M, Liu X, Tang L, Yan Z, Hu H, et al. (2011) MicroRNA-Driven Developmental Remodeling in the Brain Distinguishes Humans from Other Primates. *PLoS Biol* 9 (12): e1001214.
44. Pettitt DJ, Jovanovic L (2001) Birth weight as a predictor of type 2 diabetes mellitus: The U-shaped curve. *Curr Diab Rep* 1: 78–81.
45. Kozomara A, Griffiths-Jones S (2014) miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res* 42: D68–D73.
46. Rong-Mei W, Wood M, Thrush A, Walton E, Varkonyi-Gasic E (2007) Real-Time PCR Quantification of Plant miRNAs Using Universal ProbeLibrary Technology. Available:

<http://lifescience.roche.com/wcsstore/RASCatalogAssetStore/Articles/BIOCHEMIC>

A\_2\_07\_p12-15.pdf. Accessed 6 August 2013.

47. Maragkakis M, Alexiou P, Papadopoulos GL, Reczko M, Dalamagas T, et al. (2009) Accurate microRNA target prediction correlates with protein repression levels. *BMC Bioinformatics* 10: 295.
48. Maragkakis M, Reczko M, Simossis VA, Alexiou P, Papadopoulos GL, et al. (2009) DIANA-microT web server: elucidating microRNA functions through target prediction. *Nucleic Acids Res* 37: W273–276.
49. Betel D, Wilson M, Gabow A, Marks DS, Sander C (2008) The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res* 36: D149–D153.
50. Wang X (2008) miRDB: A microRNA target prediction and functional annotation database with a wiki interface. *RNA* 14: 1012–1017.
51. Wang X, El Naqa IM (2008) Prediction of both conserved and nonconserved microRNA targets in animals. *Bioinforma Oxf Engl* 24: 325–332.
52. Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, et al. (2005) Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 37: 495–500.
53. Hsu S-D, Chu C-H, Tsou A-P, Chen S-J, Chen H-C, et al. (2008) miRNAMap 2.0: genomic maps of microRNAs in metazoan genomes. *Nucleic Acids Res* 36: D165–169.
54. Oliveros J (2007) VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn diagrams. BioinfoGP CNB-CSIC. Available: <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>. Accessed 20 July 2014.
55. Rappaport N, Nativ N, Stelzer G, Twik M, Guan-Golan Y, et al. (2013) MalaCards: an integrated compendium for diseases and their annotation. *Database J Biol Databases Curation* 2013. Vol. 2013, Article ID bat018.

56. Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, et al. (2014) Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Res* 42: D199–205.
57. Kanehisa M, Goto S (2000) KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 28: 27–30.
58. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, et al. (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 25: 25–29.
59. Supek F, Bošnjak M, Škunca N, Šmuc T (2011) REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms. *PLoS ONE* 6: e21800.
60. R Development Core Team (n.d.) R Development Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

## PIES DE LAS FIGURAS

**Figura 1. Comparación de protocolos de purificación de miRNAs.** **A**, muestras de sangre seca preservadas en tarjetas de tamizaje neonatal se procesaron por los protocolos señalados, como se describe en la sección de Materiales y métodos, y la concentración de miRNAs recuperada de cada muestra se determinó en el 2100 Bioanalyzer. **B**, el análisis electroforético de los 11 protocolos de purificación muestra la recuperación de RNA (bandas color rojo) y su tamaño aproximado en nucleótidos (nt). **C**, electroferogramas típicos de los productos obtenidos con los protocolos 4 y 7. Se resalta la zona correspondiente a miRNAs (20 a 40 nt).

**Figura 2. Extracción de miRNAs.** **A**, tarjetas de tamizaje neonatal de individuos con normopeso, bajo peso y macrosomía se procesaron mediante el protocolo 4 para confirmar su utilidad en los diferentes grupos de estudio. Como control negativo se usó papel filtro sin sangre. **B**, todas las muestras procesadas por este protocolo mostraron un porcentaje de miRNAs superior al 35% respecto al RNA total.

**Figura 3. Estructuras secundarias de oligonucleótidos tipo “stem-loop” para retrotranscripción.** Representación gráfica de las estructuras secundarias predichas para los oligonucleótidos diseñados para los ensayos de retrotranscripción. La formación de la estructura tipo “stem-loop” permite distinguir formas maduras del miRNA respectivo.

**Figura 4. Pruebas de amplificación.** Muestras de RNA total obtenidas de tarjetas de tamizaje neonatal fueron ensayadas mediante RT-qPCR para tres miRNAs diferentes. Se presentan las curvas de amplificación de dos muestras por duplicado para cada miRNA. El control negativo (mezcla de amplificación sin muestra) para cada ensayo se observa como la línea roja que se mantiene sin amplificación en todos los casos.

**Figura 5. Diagramas de caja para muestras de diferentes pesos al nacimiento.** Distribución de los Cq obtenidos mediante RT-qPCR para muestras de tamizaje neonatal de con normopeso, peso bajo y macrosomía. Se presentan los datos para hsa-miR-375 **(A)**, y para hsa-miR-33b y hsa-miR-454-3p normalizados respecto a hsa-miR-375 **(B)** y sin normalizar **(C)**.

**Figura 6. Genes blanco y procesos asociados.** Genes blanco para hsa-miR-33b **(A)** y hsa-miR-454-3p **(B)** predichos por cuatro herramientas bioinformáticas diferentes. Los gráficos de dispersión para los procesos asociados se obtuvieron considerando un mínimo de dos genes blanco, tanto para hsa-miR-33b **(C)** como para hsa-miR-454-3p **(D)**.

## TABLAS

Tabla 1. Genes blanco para hsa-miR-33b

<b>Gen</b>	<b>Nombre oficial</b>	<b>Ubicación</b>
ABCA1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1	9q31.1
YWHAH	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein	22q12.3
MAP3K7	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7	6q15
B3GALT2	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 2	1q31
SLC25A25	Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 25	9q34.11
ATP1B1	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, beta 1 polypeptide	1q24
SATB2	SATB homeobox 2	2q33
ZNF281	Zinc finger protein 281	1q32.1
CLPX	Caseinolytic mitochondrial matrix peptidase chaperone subunit	15q22.31
EN2	Engrailed homeobox 2	7q36
SLC26A7	Solute carrier family 26 (anion exchanger), member 7	8q23

<b>Gen</b>	<b>Nombre oficial</b>	<b>Ubicación</b>
GRIA3	Glutamate receptor, ionotropic, AMPA 3	Xq25
NAA15	N(alpha)-acetyltransferase 15, NatA auxiliary subunit	4q31.1
SHANK2	SH3 and multiple ankyrin repeat domains 2	11q13.2
RAP2A	RAP2A, member of RAS oncogene family	13q34
GDI2	GDP dissociation inhibitor 2	10p15
EPHA8	EPH receptor A8	1p36.12
KPNA4	Karyopherin alpha 4 (importin alpha 3)	3q25.33
PDGFRA	Platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide	4q12
ST18	Suppression of tumorigenicity 18, zinc finger	8q11.23
MLLT3	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia	9p22
CDK5R1	Cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35)	17q11.2
HADHB	Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase/enoyl-CoA hydratase (trifunctional protein), beta subunit	2p23
MORF4L1	Mortality factor 4 like 1	15q24

<b>Gen</b>	<b>Nombre oficial</b>	<b>Ubicación</b>
BCL11A	B-cell CLL/lymphoma 11A (zinc finger protein)	2p16.1
PRICKLE2	Prickle homolog 2 (Drosophila)	3p14.1

Tabla 2. Genes blanco para hsa-miR-454-3p

<b>Gen</b>	<b>Nombre oficial</b>	<b>Ubicación</b>
SMARCD2	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 2	17q23.3
TSHZ1	Teashirt zinc finger homeobox 1	18q22.3
WHSC1L1	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1-like 1	8p11.2
RAB5A	RAB5A, member RAS oncogene family	3p24-p22
PAN3	PAN3 poly(A) specific ribonuclease subunit	13q12.2
HIVEP2	Human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 2	6q23-q24
FRZB	Frizzled-related protein	2q32.1
STIM2	Stromal interaction molecule 2	4p15.2
MET	MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase	7q31
SLAIN1	SLAIN motif family, member 1	13q22.3
MIER1	Mesoderm induction early response 1, transcriptional regulator	1p31.3
LRP12	Low density lipoprotein receptor-related protein 12	8q22.2

<b>Gen</b>	<b>Nombre oficial</b>	<b>Ubicación</b>
EIF2C4	Argonaute RISC catalytic component 4	1p34
PTPRG	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, G	3p21-p14
PHF20	PHD finger protein 20	20q11.22- q11.23
JARID2	Jumonji, AT rich interactive domain 2	6p24-p23
LCOR	Ligand dependent nuclear receptor corepressor	10q24

Figura 1

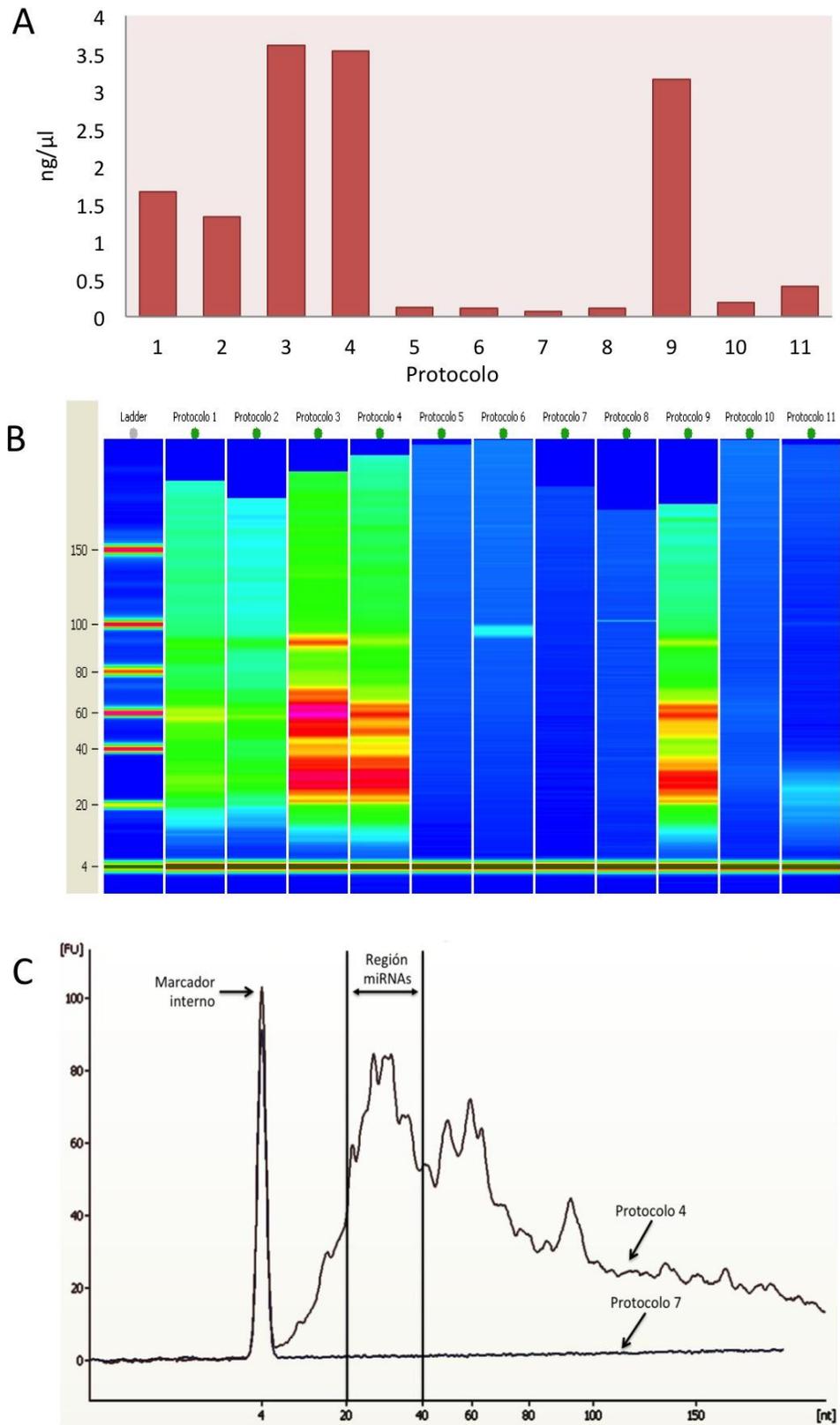


Figura 2

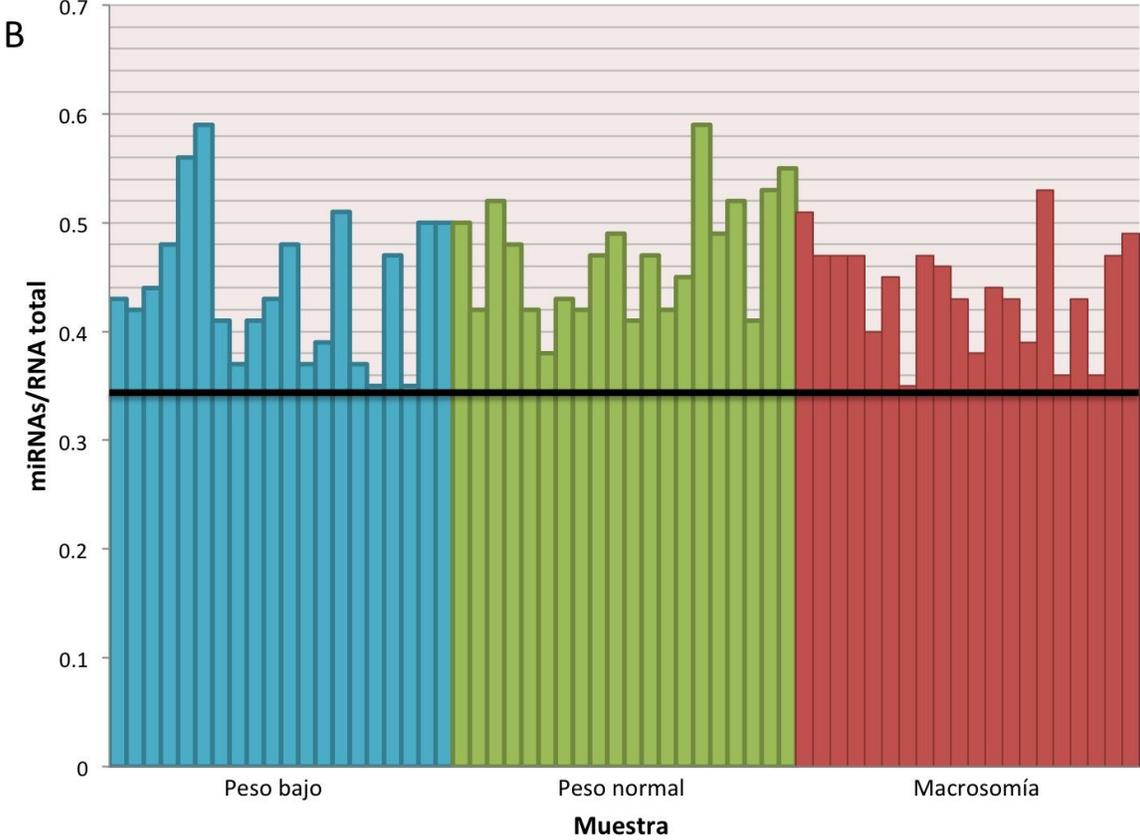
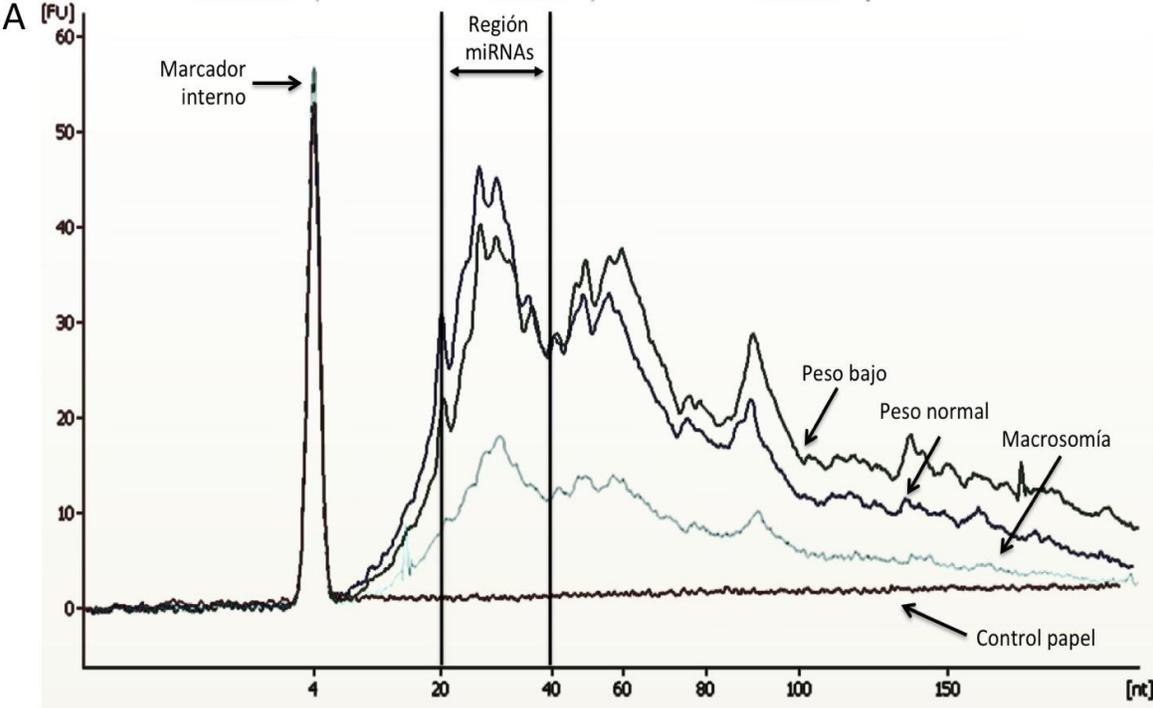


Figura 3

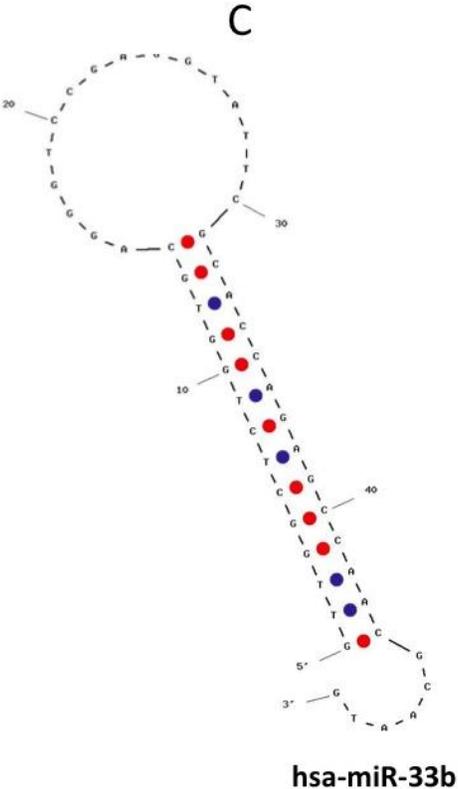
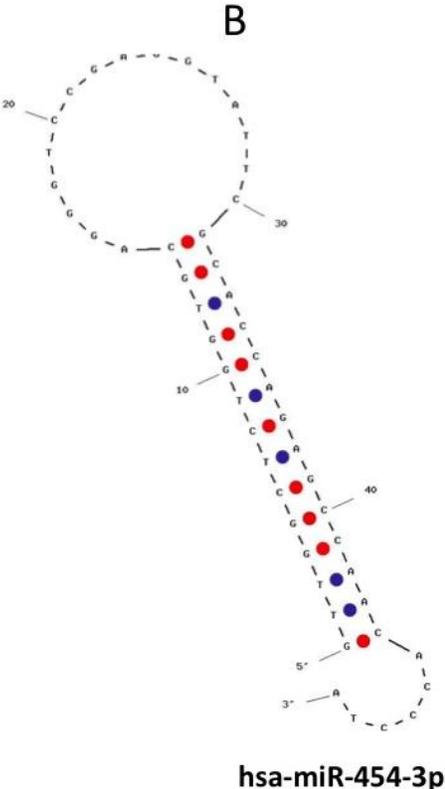
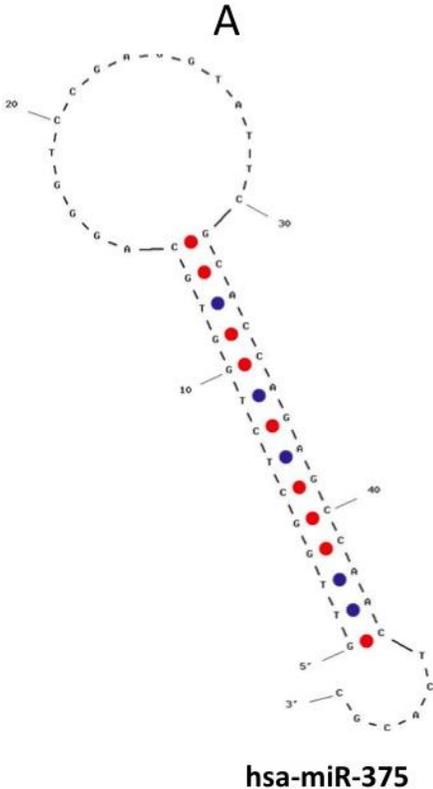


Figura 4

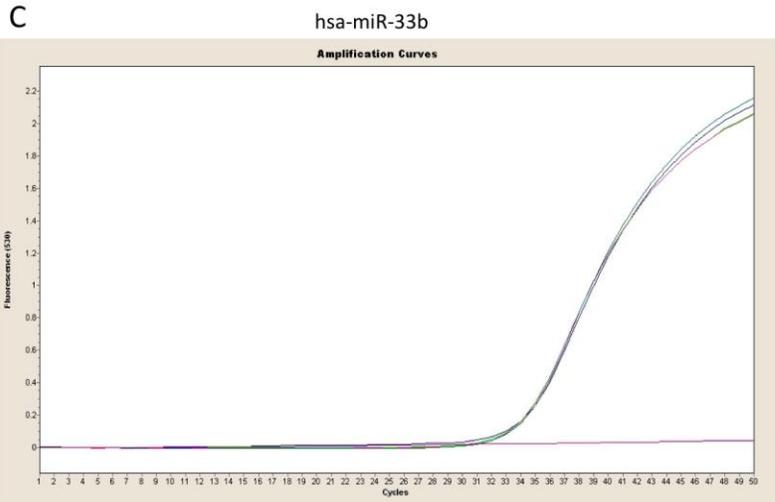
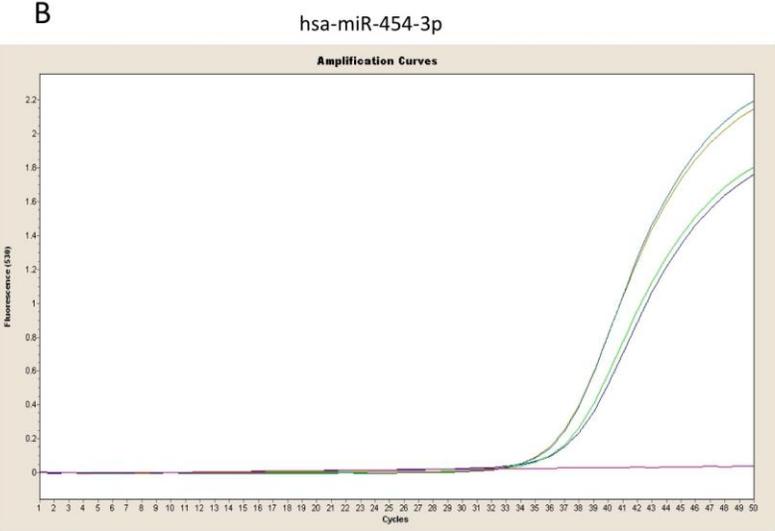
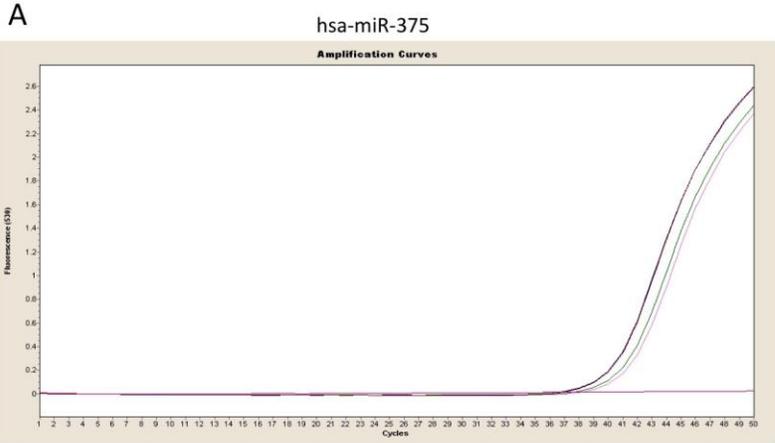


Figura 5

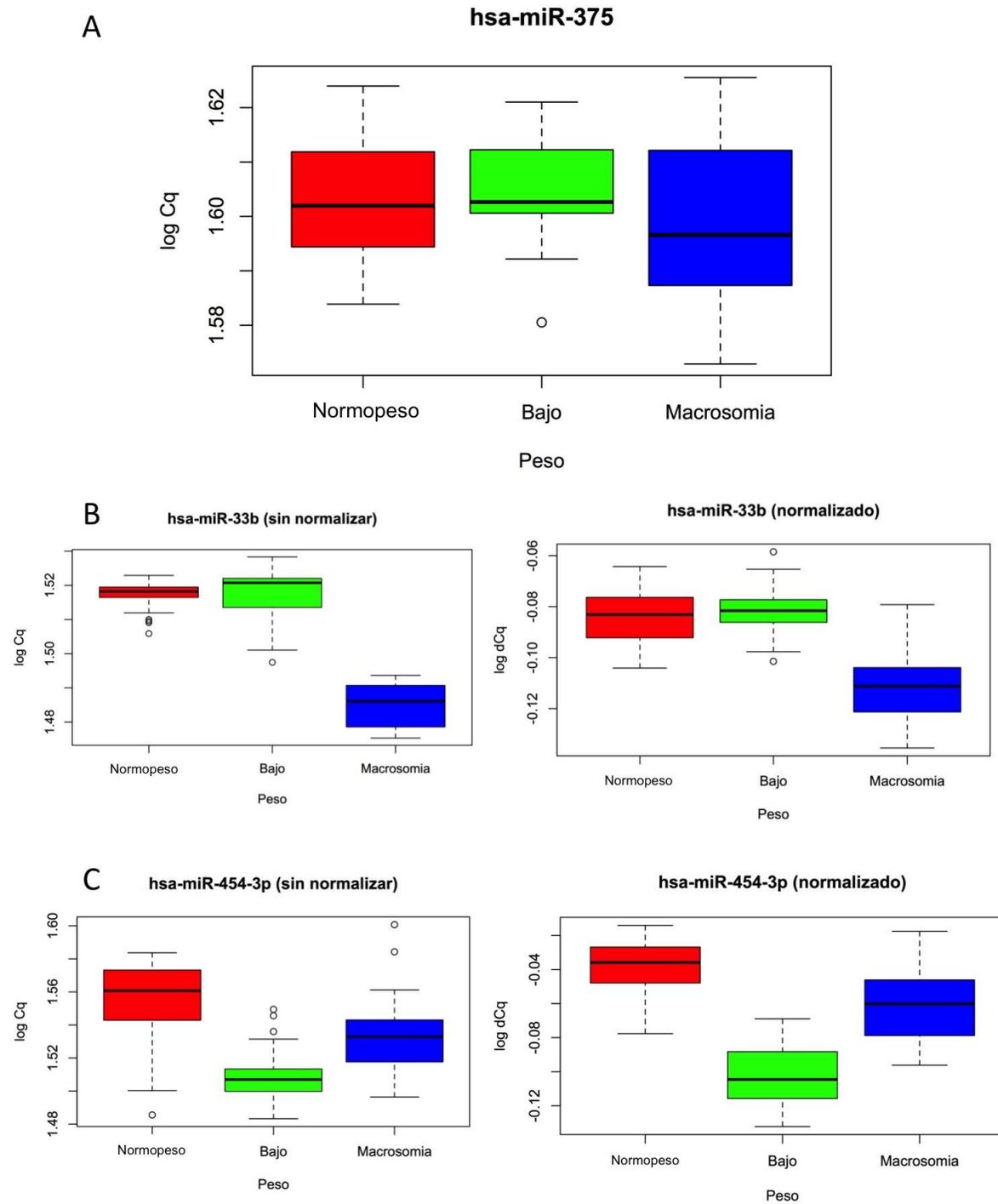
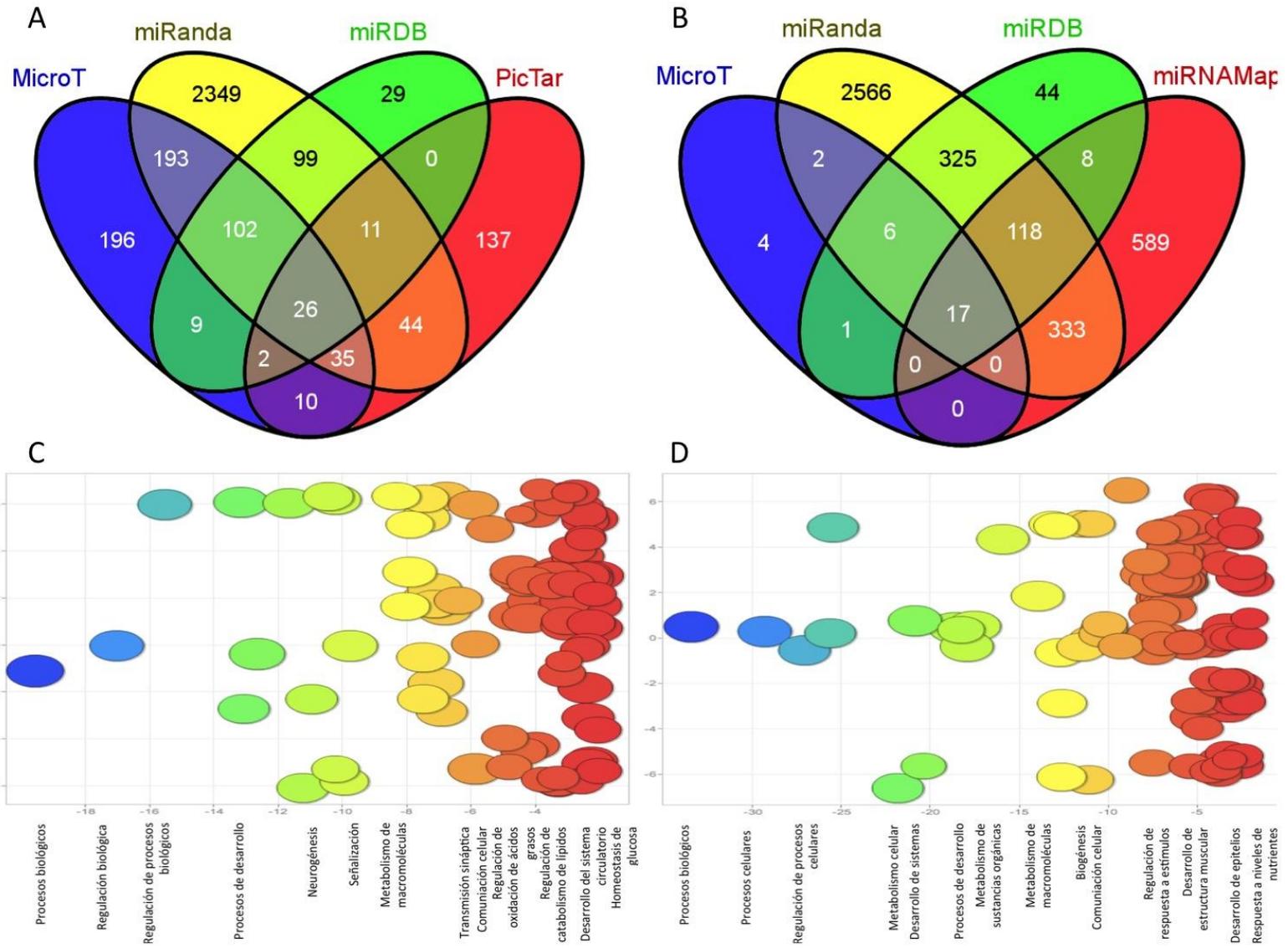


Figura 6



## MATERIAL SUPLEMENTARIO

Material suplementario tabla 1. Protocolos de purificación de RNA

Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo 4	Protocolo 5	Protocolo 6	Protocolo 7	Protocolo 8	Protocolo 9	Protocolo 10	Protocolo 11
Muestra + 300µl de buffer TE	Muestra + 300µl de buffer TE	Muestra + 300µl de buffer TE	Muestra + 300µl de buffer TE	Muestra + 300µl de buffer TE						
Vórtex (2000rpm/4º C/30min)	Vórtex (2000rpm/4º C/30min)	Vórtex (2000rpm/4º C/30min)	Vórtex (2000rpm/4º C/30min)	Vórtex (2000rpm/4º C/30min)						
1ml Trizol + 200µl de cloroformo	1.2ml fenol cloroformo	1.2ml fenol cloroformo		30µl miRNA Homogenate Additive	1ml Trizol + 200µl de cloroformo	1.2ml fenol cloroformo	1ml Trizol + 200µl de cloroformo			
Vórtex (2000rpm/TA/ 5min)		Vórtex /inversión	Vórtex (2000rpm/TA/ 5min)	Vórtex (2000rpm/TA/ 5min)	Vórtex (2000rpm/TA/ 5min)					
Reposar 2 min		Reposar en hielo 10min	Reposar 2 min	Reposar 2 min	Reposar 2 min					
						300µl fenol cloroformo	300µl fenol cloroformo			
						Vórtex (2000rpm/TA/ 1min)	Vórtex (2000rpm/TA/ 1min)			
Centrifugar (14000g/4ºC/ 15min)	Centrifugar (vel.máx/TA/ 5min)	Centrifugar (vel.máx/TA/ 5min)	Centrifugar (14000g/4ºC/ 15min)	Centrifugar (14000g/4ºC/ 15min)	Centrifugar (14000g/4ºC/ 15min)					
Recuperar fase acuosa	Recuperar fase acuosa	Recuperar fase acuosa	Recuperar fase acuosa	Recuperar fase acuosa						
Dilución con etanol 100% TA (1:1)	Dilución con etanol 100% TA (1.25:1)	Dilución con etanol 100% TA (1.25:1)	Dilución con etanol 100% TA (0.3:1)	Dilución con etanol 100% TA (0.3:1)	Dilución con etanol 100% TA (1:1)					
Vórtex /inversión	Vórtex /inversión	Vórtex /inversión	Vórtex /inversión	Vórtex /inversión						
700 µl mezcla en filtro	700 µl mezcla en filtro	700 µl mezcla en filtro	700 µl mezcla en filtro	700 µl mezcla en filtro						
Centrifugar (10000rpm/T A/15s)	Centrifugar (10000rpm/T A/15s)	Centrifugar (10000rpm/T A/15s)	Centrifugar (10000rpm/T A/15s)	Centrifugar (10000rpm/T A/15s)						
								Recolectar líquido	Recolectar líquido	Recolectar líquido



<b>Protocolo 1</b>	<b>Protocolo 2</b>	<b>Protocolo 3</b>	<b>Protocolo 4</b>	<b>Protocolo 5</b>	<b>Protocolo 6</b>	<b>Protocolo 7</b>	<b>Protocolo 8</b>	<b>Protocolo 9</b>	<b>Protocolo 10</b>	<b>Protocolo 11</b>
100µl agua DEPC (95°C)										
Centrifugar (vel.máx/TA/ 30s)										
Recolectar líquido filtrado										
Almacenar										

Material suplementario tabla 2. Enfermedades asociadas a genes blanco para hsa-miR-33b

No. de genes	Nombre de la enfermedad	Mala Cards ID	Genes compartidos
14	Endotelitis	END072	□
14	Neuronitis	NRN002	□
13	Cáncer de mama	BRS047	□
12	Cerebritis	CRB009	□
12	Prostatitis	PRS047	□
11	Pancreatitis	PNC044	□
10	Malaria	MLR004	□
10	Mieloma	MYL007	□
10	Mieloma múltiple	MLT019	
9	Cáncer colorrectal	CLR023	□
8	Cáncer de próstata	PRS040	□
8	Hepatitis	HPT021	□
7	HIV-1	HV1006	□
7	Esquizofrenia	SCH015	□
7	Retinitis	RTN023	□
7	Enfermedad de Alzheimer	ALZ001	□
7	Leucemia	LKM002	□
6	Isquemia	ISC004	□
6	Tuberculosis	TBR010	□
6	Tiroiditis	THY032	□
6	Carcinoma de células escamosas	SQM006	□
5	Cáncer de pulmón	LNG032	□
5	Enfermedad de Parkinson	PRK002	□
5	Adenocarcinoma	ADN016	□
5	Retraso mental	MNT147	□

No. de genes	Nombre de la enfermedad	Mala Cards ID	Genes compartidos
4	Hipoxia	HYP266	☐
4	Hipertensión	HYP075	☐
4	Cáncer colorrectal y de mama	BRS089	☐
4	Desorden bipolar	BPL003	☐
4	Leucemia mieloide	MYL006	☐
3	Carcinoma hepatocelular	HPT023	☐
3	Melanoma	MLN008	
3	Artritis	ART022	☐
3	Esclerosis lateral	LTR001	☐
3	Esclerosis lateral amiotrófica	AMY001	
3	Neuropatía	NRP001	☐
3	Enfermedad de las arterias coronarias	CRN211	☐
3	Cervicitis	CRV039	☐
3	Esofagitis	ESP024	☐
3	Neumonía	PNM007	☐
3	Cáncer de páncreas	PNC035	☐
3	Sarcoma	SRC014	☐
3	Leucemia linfocítica crónica	CHR090	☐
3	Labio leporino	CLF001	☐
3	Laberintitis	LBY004	☐
3	Neuroblastoma	NRB001	☐
3	Leucemia linfoblástica	LYM026	☐
3	Leucemia aguda	ACT073	
2	Lipodistrofia	LPD010	☐
2	Resistencia a insulina	INS005	
2	Artritis reumatoide	RHM011	☐
2	Fibrosis quística	CYS001	☐

No. de genes	Nombre de la enfermedad	Mala Cards ID	Genes compartidos
2	Diabetes mellitus	DBT009	☐
2	Síndrome antifosfolípido	ANT006	
2	Obesidad	OBS005	☐
2	Degeneración macular asociada con la edad	AGR001	☐
2	Ateroesclerosis	ATH003	☐
2	Preeclampsia	PRC016	
2	Eclampsia	ECL001	
2	Cardiopatía isquémica	ISC006	☐
2	Cáncer de mama esporádico	SPR009	☐
2	Enfermedad de Graves	GRV001	☐
2	Herpes simple	HRP006	☐
2	Sarcoma de Kaposi	KPS001	☐
2	Enfermedad inflamatoria intestinal	INF037	☐
2	Epididimitis	EPD046	☐
2	Laringitis	LRY019	☐
2	Influenza	INF038	☐
2	Coroiditis	CHR008	☐
2	Amigdalitis	TNS005	☐
2	Paladar hendido	CLF002	☐
2	Trastorno Autista	ATS001	☐
2	Trastorno Autista	ATS007	
2	Meduloblastoma	MDL005	☐
2	Discapacidad intelectual	INT063	☐
2	Lisencefalia	LSS002	☐
2	Síndrome de Down	DWN001	☐
2	Policitemia	PLY018	☐
2	Leucemia mieloide aguda	ACT019	

No. de genes	Nombre de la enfermedad	Mala Cards ID	Genes compartidos
2	Leucemia infantil	CHL061	
2	Leucemia linfoide aguda	ACT020	
2	Policitemia vera	PLY001	
2	Leucemia mieloide crónica	CHR065	
2	Astrocitoma	AST007	□
2	Linfoma de Hodgkin	HDG007	□
2	Retinoblastoma	RTN024	□

Material suplementario tabla 3. Enfermedades asociadas a genes blanco para hsa-miR-454-3p

<b>No. de genes</b>	<b>Nombre de la enfermedad</b>	<b>Mala Cards ID</b>	<b>Genes compartidos</b>
8	Prostatitis	PRS047	□
7	Cáncer de mama	BRS047	□
7	Neuritis	NRN002	□
6	Tiroiditis	THY032	□
6	Cáncer de próstata	PRS040	□
5	Leucemia	LKM002	□
5	Mieloma	MYL007	□
5	Mieloma múltiple	MLT019	□
5	Endotelitis	END072	□
5	Cerebritis	CRB009	□
4	Enfermedad de Alzheimer	ALZ001	□
4	Leucemia mieloide	MYL006	□
4	Cáncer de pulmón	LNG032	□
4	Esquizofrenia	SCH015	□
4	Hepatitis	HPT021	□
3	Hepatitis C	HPT001	□
3	Adenocarcinoma	ADN016	□
3	Carcinoma hepatocelular	HPT023	□
3	Malaria	MLR004	□
3	Melanoma	MLN008	□
3	Leucemia mieloide crónica	CHR065	□
3	Cáncer colorectal	CLR023	□
3	Carcinoma de células renales	RNL014	□
3	Meduloblastoma	MDL005	□
2	Discapacidad intelectual	INT063	□

2	Leucemia mieloide aguda	ACT019	☐
2	Virus de hepatitis C	HPT073	☐
2	Adenocarcinoma de pulmón	LNG029	☐
2	Esclerosis lateral	LTR001	
2	Cáncer de nódulos linfáticos	LYM020	
2	Fibrosis quística	CYS001	
2	Esclerosis tubosa	TBR001	
2	Cáncer de ovario	OVR042	
2	Esclerosis lateral amiotrófica	AMY001	
2	Tuberculosis	TBR010	
2	Hepatitis B	HPT016	
2	Enfermedad de Parkinson	PRK002	
2	Obesidad	OBS005	☐
2	Fibrosarcoma	FBR017	☐
2	Sarcoma	SRC014	
2	Osteoartritis	OST012	
2	Retinitis	RTN023	
2	Artritis	ART022	
2	Cáncer de cerebro	BRN028	☐
2	Enfermedad de arterias coronarias	CRN211	☐
2	Carcinoma de células escamosas	SQM006	
2	Carcinoma de células escamosas orales	ORL015	
2	Neuroblastoma	NRB001	☐
2	Nasofaringitis	NSP002	☐
2	Meduloblastoma de células grandes	LRG003	☐
2	Retinoblastoma	RTN024	☐
2	Rabdomiosarcoma	RHB003	
2	Esclerosis múltiple	MLT020	

2	Hipertensión	HYP075	□
---	--------------	--------	---

Material suplementario tabla 4. Vías metabólicas obtenidas en KEGG para hsa-miR-33b

<b>Identificador KEGG</b>	<b>Nombre de vía metabólica</b>	<b>Genes</b>
ko05206	MicroRNAs en cáncer	CDK6, E2F3, HMGA2, IRS1, IRS2, KIF23, MMP16, PDGFRA, PIM1, PRKCE
ko04360	Orientación de axones	CDC42, EPHA7, EPHA8, FYN, LRRC4, NTN1, NTN4, ROBO1, ROBO2, ROCK2
ko04010	Vía de señalización MAPK	CACNA1C, CDC42, MAP3K1, MAP3K3, MAP3K7, MAP4K3, MAP4K4, PDGFRA, PPM1B
ko04022	Vía de señalización cGMP-PKG	ADCY9, ADRA2A, CACNA1C, IRS1, IRS2, KCNMA1, PRKCE, ROCK2
ko05166	Infección por HTLV-I	ADCY9, CD3G, CTNNB1, E2F3, MAP3K1, MAP3K3, PDGFRA, XPO1
ko04080	Interacción neuroactiva ligando-receptor	ADRA2A, CALCRL, GABRP, GHR, GRIA3, GRIK2, GRIN2A, S1PR1
ko05200	Vías en cáncer	CDC42, CDK6, CTNNB1, E2F3, HIF1A, PDGFRA
ko04270	Contracción vascular del músculo liso	ADCY9, CACNA1C, CALCRL, KCNMA1, PRKCE, ROCK2
ko04724	Sinapsis glutamatérgica	ADCY9, CACNA1C, GRIA3, GRIK2, GRIN2A, KCNJ3
ko04921	Vía de señalización de oxitocina	ADCY9, CACNA1C, CAMK4, KCNJ3, RCAN1, ROCK2
ko05205	Proteoglicanos en cáncer	CDC42, CTNNB1, DDX5, HIF1A, IL12B, ROCK2
ko01100	Vías metabólicas	ALG6, B3GALT2, FUT9, HADHB, NDUFA5, PLB1
ko04725	Sinapsis colinérgica	ADCY9, CACNA1C, CAMK4, FYN, KCNJ3, KCNQ5
ko04020	Vía de señalización de calcio	ADCY9, CACNA1C, CAMK4, GRIN2A, PDGFRA
ko04723	Señalización endocanabinoide retrógrada	ADCY9, CACNA1C, GABRP, GRIA3, KCNJ3
ko04520	Unión adherente	CDC42, CTNNB1, FYN, MAP3K7, YES1
ko04060	Interacción receptor citosina-citosina	CCL2, GHR, IL12B, PDGFRA, TNFRSF9

ko04911	Secreción de insulina	ADCY9, CACNA1C, KCNMA1, KCNN2, PCLO
ko05162	Sarampión	CD3G, CDK6, FYN, IL12B, MAP3K7
ko04660	Vía de señalización de receptor de células T	CD3G, CDC42, FYN, MAP3K7, PTPRC
ko04722	Vía de señalización de neurotrofina	CAMK4, CDC42, IRS1, MAP3K1, MAP3K3
ko04144	Endocitosis	CDC42, EEA1, PDGFRA, RAB5A, TSG101
ko04015	Vía de señalización RAP1	ADCY9, CDC42, CTNNB1, GRIN2A, PDGFRA
ko05010	Enfermedad de Alzheimer	CACNA1C, CDK5R1, GRIN2A, MME, NDUFA5
ko04713	Ritmo circadiano	ADCY9, CACNA1C, GRIA3, GRIN2A, KCNJ3
ko04912	Vía de señalización GnRH	ADCY9, CACNA1C, CDC42, MAP3K1, MAP3K3
ko04510	Adhesión focal	CDC42, CTNNB1, FYN, PDGFRA, ROCK2

Material suplementario tabla 5. Vías metabólicas obtenidas en KEGG para hsa-miR-454-3p

<b>Identificador KEGG</b>	<b>Nombre de vía metabólica</b>	<b>Genes</b>
ko01100	Vías metabólicas	AGL, C1GALT1, CMPK1, DPYD, HADHA, HADHB, LCLAT1, PAFAH1B1, PCCA, PIGA, POLA1, PTGES3, SC5DL, SCP2, SDHA, TBXAS1, UXS1
ko05200	Vías en cáncer	CASP8, CCDC6, FZD6, HIF1A, IGF1, MET, PDGFRA, PTEN, RALA, RALBP1, SLC2A1, TGFA, TGFB2, TGFBR2, WNT1
ko04144	Endocitosis	ARAP2, CAV1, CAV2, CLTC, EPS15, ERBB3, LDLR, MET, PARD3, PDGFRA, RAB5A, TGFB2, TGFBR2, TSG101
ko05166	Infección por HTLV-I	ATM, CREB1, CREM, FOSL1, FZD6, IL15, MYB, NRP1, PDGFRA, SLC2A1, TGFB2, TGFBR2, WNT1
ko04151	Vía de señalización PI3K-Akt	BCL2L11, CREB1, CREB5, IGF1, ITGA11, ITGB8, MET, MYB, PDGFRA, PTEN, RELN, TEK, TSC1
ko05206	MicroRNAs en cáncer	ATM, BCL2L11, BMPR2, DICER1, ERBB3, MDM4, MET, PDGFRA, PTEN, RECK, TGFB2, ZFPM2
ko05205	Proteoglicanos en cáncer	CAV1, CAV2, ERBB3, FZD6, HIF1A, IGF1, ITPR1, MET, ROCK2, SDC4, TGFB2, WNT1
ko05202	Desregulación transcripcional en cáncer	ATM, CEBPE, ERG, GRIA3, HHEX, IGF1, MET, PBX3, RUNX2, SIX4, TGFBR2
ko05016	Enfermedad de Huntington	APAF1, CASP8, CLTC, CREB1, CREB5, ITPR1, PPARGC1A, SDHA, SOD2, TAF4
ko04510	Adhesión focal	CAV1, CAV2, IGF1, ITGA11, ITGB8, MET, PDGFRA, PTEN, RELN, ROCK2
ko04120	Proteólisis mediada por ubiquitina	BIRC6, CUL5, HERC3, SKP1, TRIM37, UBE2J1, UBE2W, UBE3B, UBE4B
ko04010	Vía de señalización MAPK	MAP3K12, MAP3K2, MAP3K5, PDGFRA, RASA1, STK3, TGFB2, TGFBR2, ZAK
ko04068	Vía de señalización FoxO	ATM, BCL2L11, IGF1, PTEN, RAG1, S1PR1, SOD2, TGFB2, TGFBR2
ko04390	Vía de señalización Hippo	BMPR2, FRMD6, FZD6, INADL, PARD3, STK3, TGFB2, TGFBR2,

		WNT1
ko04360	Orientación de axones	DPYSL2, EPHA4, MET, NRP1, RASA1, ROBO1, ROBO2, ROCK2
ko04060	Interacción receptor citosina-citosina	ACVR1, ACVR2A, BMPR2, IL15, MET, PDGFRA, TGFB2, TGFB2
ko04014	Vía de señalización Ras	IGF1, MET, PDGFRA, RAB5A, RALA, RALBP1, RASA1, TEK
ko04350	Vía de señalización TGF-Beta	ACVR1, ACVR2A, BMPR2, NOG, SKP1, TGFB2, TGFB2
ko05161	Hepatitis B	APAF1, CASP8, CREB1, CREB5, EGR3, PTEN, TGFB2
ko04015	Vía de señalización Rap1	IGF1, MET, PARD3, PDGFRA, RALA, RAPGEF4, TEK
ko04080	Interacción neuroactiva ligando-receptor	GLRB, GRIA3, NMUR2, PARD3, PTGER2, S1PR1, TSHR
ko04115	Vía de señalización p53	APAF1, ATM, CASP8, IGF1, MDM4, PTEN
ko05410	Cardiomiopatía hipertrófica	IGF1, ITGA11, ITGB8, RYR2, SGCB, TGFB2
ko04141	Procesamiento de proteínas en retículo endoplásmico	LMAN1, MAP3K5, PLAA, SKP1, UBE2J1, UBE4B
ko05152	Tuberculosis	APAF1, CASP8, CREB1, RAB5A, RFXAP, TGFB2
ko04380	Diferenciación de osteoclastos	CREB1, CTSK, CYLD, FOSL1, TGFB2, TGFB2
ko04152	Vía de señalización AMPK	CREB1, CREB5, IGF1, PPARGC1A, RAB14, TSC1
ko05215	Cáncer de próstata	CREB1, CREB5, IGF1, PDGFRA, PTEN, TGFA
ko04911	Secreción de insulina	CREB1, CREB5, RAPGEF4, RYR2, SLC2A1, SNAP25
ko05414	Cardiomiopatía dilatada	IGF1, ITGA11, ITGB8, RYR2, SGCB, TGFB2
ko04810	Regulación de citoesqueleto de actina	ARPC2, ITGA11, ITGB8, PDGFRA, PIKFYVE, ROCK2
ko04668	Vía de señalización TNF	CASP8, CREB1, CREB5, DNM1L, IL15, MAP3K5
ko04142	Lisosoma	AP1G1, CLTC, CTSK, GNPTAB, LIPA, PSAP
ko04261	Señalización adrenérgica en cardiomiocitos	CREB1, CREB5, CREM, RAPGEF4, RYR2
ko05412	Cardiomiopatía arritmogénica	GJA1, ITGA11, ITGB8, RYR2, SGCB

	de ventrículo derecho	
ko05211	Carcinoma de células renales	HIF1A, MET, SLC2A1, TGFA, TGFB2
ko05212	Cáncer de páncreas	RALA, RALBP1, TGFA, TGFB2, TGFBR2
ko04020	Vía de señalización de calcio	ERBB3, ITPR1, PDGFRA, RYR2, STIM2
ko04919	Vía de señalización de hormona tiroidea	HIF1A, MED12, NCOA1, SLC16A10, SLC2A1
ko04066	Vía de señalización HIF-1	HIF1A, IGF1, PDK1, SLC2A1, TEK
ko04022	Vía de señalización cGMP-PKG	CREB1, CREB5, ITPR1, MEF2A, ROCK2
ko04918	Síntesis de hormona tiroidea	CREB1, CREB5, ITPR1, LRP2, TSHR
ko05100	Invasión bacteriana de células epiteliales	ARPC2, CAV1, CAV2, CLTC, MET
ko03040	Spliceosoma	CHERP, DDX23, RBM17, RBM25, SNRPE
ko04310	Vía de señalización Wnt	FOSL1, FZD6, ROCK2, SKP1, WNT1