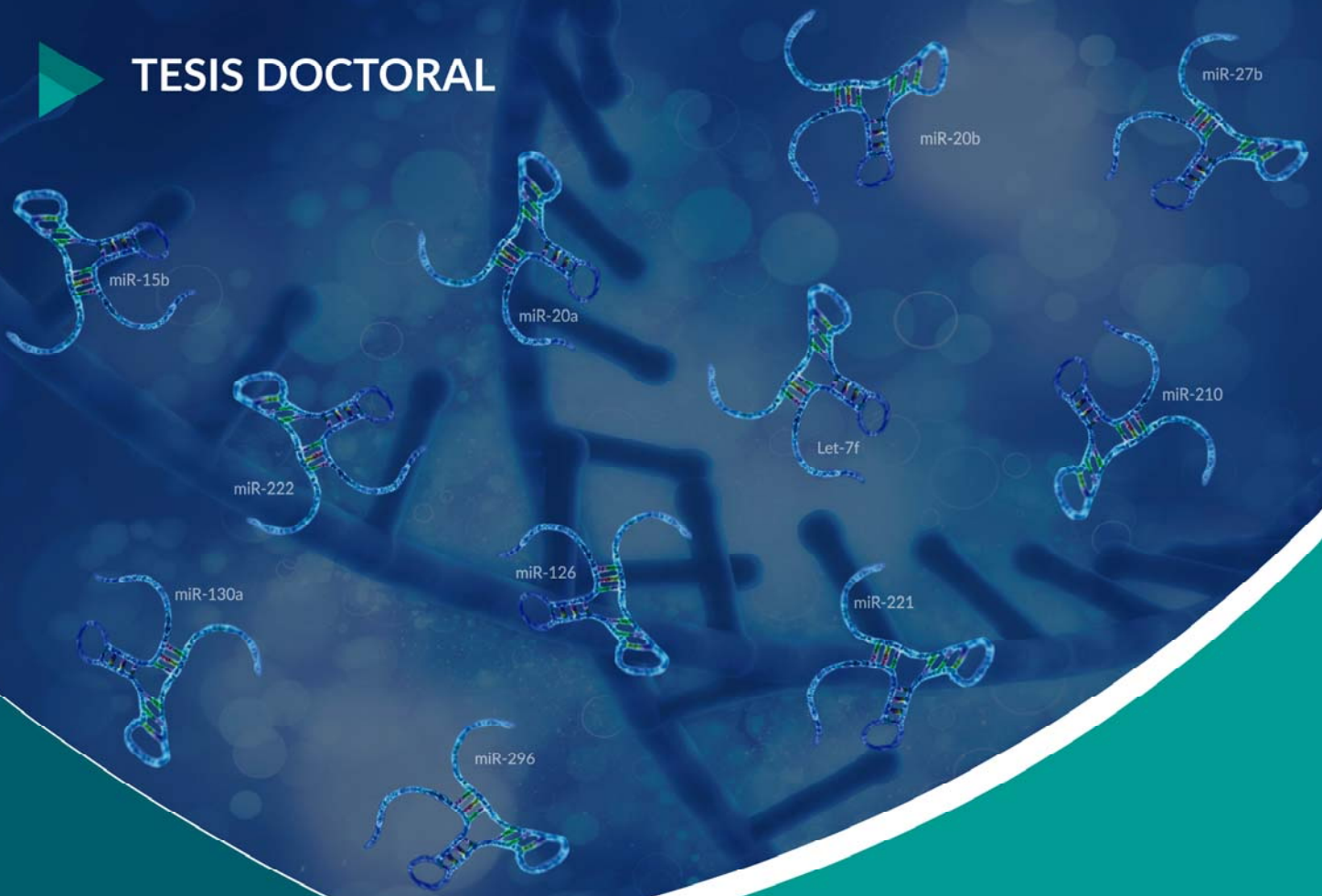


TESIS DOCTORAL



MiARNs ANGIOGÉNICOS EN LA
REGULACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO Y SU RELACIÓN
CON EL DESARROLLO DE LA RESISTENCIA A LA
INSULINA ASOCIADA A LA OBESIDAD

ADRIANA MARIEL GENTILE

Doctorado en Biología celular y molecular
Facultad de Ciencias
Universidad de Málaga. España. 2018

Directora: Rajaa El Bekay Rizky
Co-director: Francisco Javier Bermúdez Silva
Tutor: Francisco Miguel Cánovas Ramos

Universidad de Málaga

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular y Bioquímica



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

**MIARNs ANGIOGÉNICOS EN LA REGULACIÓN DEL
TEJIDO ADIPOSO Y SU RELACIÓN CON EL
DESARROLLO DE LA RESISTENCIA A LA INSULINA
ASOCIADA A LA OBESIDAD**

Memoria de tesis presentada por la licenciada en Bioquímica y máster en Biología Celular y Molecular, Adriana Mariel Gentile, para optar al grado de Doctor Internacional por la Universidad de Málaga, España.


Tesis doctoral

Málaga, 2018



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Adriana Mariel Gentile

 <http://orcid.org/0000-0002-2296-9117>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



El trabajo de investigación que se expone en la presente tesis ha sido realizado en el Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA) por la licenciada en Bioquímica y máster en Biología Celular y Molecular Adriana Mariel Gentile durante los años 2013-2018 bajo la dirección de:

Dra. Rajaa El Bekay Rizky.

Dr. Francisco Javier Bermúdez Silva.

Este trabajo fue co-financiado por “*The European Union through the European Regional Development Fund (FEDER)*” y financiado por el Instituto Carlos III, Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (PI12/02355) y por la Consejería de Economía y Conocimiento (CTS-7895/2011, 08181/2011).



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Dña. **Rajaa El Bekay Rizky**, Dra. en Biología.

Autorizo a Adriana Mariel Gentile, licenciada en Bioquímica y máster en Biología Celular y Molecular, para que lleve a cabo la lectura de la tesis doctoral titulada: *“MiARNs angiogénicos en la regulación del tejido adiposo y su relación con el desarrollo de la resistencia a la insulina asociada a la obesidad”*, que ha sido realizada en el laboratorio de investigación del Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), bajo mi dirección y que considero que tiene el contenido y el rigor científico necesario para ser sometida a juicio del tribunal que ha nombrado la Universidad de Málaga para optar al grado de Doctor Internacional.

Y para que así conste, firmo la presente autorización en Málaga a 12 de febrero de 2018.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

D. Francisco Javier Bermúdez Silva, Dr. en Biología.

Autorizo a Adriana Mariel Gentile, licenciada en Bioquímica y máster en Biología Celular y Molecular, para que lleve a cabo la lectura de la tesis doctoral titulada: *“MiARNs angiogénicos en la regulación del tejido adiposo y su relación con el desarrollo de la resistencia a la insulina asociada a la obesidad”*, que ha sido realizada en el laboratorio de investigación del Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), bajo mi co-dirección y que considero que tiene el contenido y el rigor científico necesario para ser sometida a juicio del tribunal que ha nombrado la Universidad de Málaga para optar al grado de Doctor Internacional.

Y para que así conste, firmo la presente autorización en Málaga a 12 de febrero de 2018.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Dr. **Francisco Miguel Cánovas Ramos**, profesor en Bioquímica y Biología Molecular y coordinador del Programa de Doctorado en Biología Celular y Molecular de la Universidad de Málaga.

Autorizo a Adriana Mariel Gentile, licenciada en Bioquímica y máster en Biología Celular y Molecular, para que lleve a cabo la lectura de la tesis doctoral titulada: ***“MiARNs angiogénicos en la regulación del tejido adiposo y su relación con el desarrollo de la resistencia a la insulina asociada a la obesidad”***, que ha sido realizada en el laboratorio de investigación del Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), bajo mi tutoría y que considero que tiene el contenido y el rigor científico necesario para ser sometida a juicio del tribunal que ha nombrado la Universidad de Málaga para optar al grado de Doctor Internacional.

Y para que así conste, firmo la presente autorización en Málaga a 12 de febrero de 2018.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Justo cuando la oruga pensó que llegaba su final . . .
se transformó en Mariposa



*Y en su vuelo recitaba: “yo soy la dueña de mi destino, soy la capitana de mi alma”.
(Invictus, William E. Henley).*

*Por eso ... aunque mi piel se arrugue y mi pelo se vuelva blanco, mi fuerza y mi
convicción no tendrán edad.*

Detrás de cada línea de llegada, veré una de partida.

Detrás de cada logro, veré otro desafío.

Mientras esté viva, me sentiré viva.

Seguiré ... aunque todos esperen que abandone.

No dejaré que se oxide el hierro que hay en mí.

Cuando con los años no pueda correr, trotaré.

Cuando no pueda trotar, caminaré...

¡Pero nunca me detendré!

(No te detengas, Madre Teresa de Calcuta).

Dedicado a mis hijos e hijas:

Ariel, Hebelén, Carolina y Agustín.

Y a mis nietos y nietas:

Nahuel, Agustina, Diego y... Valentina (te esperamos).

Porque son mi razón de vivir y por ellos, esto ha sido posible.

¡Los amo con todo mi corazón!



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Agradecimientos

Y pasaron cinco años ... desde aquel día que me entrevistaría con la persona de “nombre extraño” ... Rajaa ... no lo había oído nunca ... será hombre o mujer? :)

Y con el “sí puedes formar parte de nuestro equipo” comencé esta hermosa carrera investigadora, guiada por ¡la mejor!, “mi Rajaa”. Verte amar lo que haces, con profesionalidad, con un cúmulo de ideas y con el rigor científico siempre por delante me has permitido aprender cada día. GRACIAS por confiar en mí, por tu guía y dedicación, por dejarme hacer sin poner límites, pero siempre bajo tu atenta mirada. Eso demuestra que eres “una maestra”. GRACIAS por preocuparte y apoyarme en los días más difíciles, por disfrutar con mis alegrías, por hacer posible lo que parecía imposible, por tus risas siempre a flor de piel, ¡por tu cada día más rico cuscús!, por permitirme conocer a tu maravillosa familia, por ser como eres: con ese enorme corazón, ¡mil veces gracias!

Y que decir de los integrantes del equipo... mis compis Leticia y Said. GRACIAS por enseñarme todo lo que habéis aprendido, por las risas y algún que otro cotilleo, (jaja), por los buenos y muchos momentos compartidos... la semanita en la Complutense de Madrid para obtener nuestro certificado para experimentar con animales (certificado B), los congresos de la EASD, las habitaciones compartidas, las barbacoas, los asados, las confidencias, las clases de inglés, algún concierto universitario (jeje) y sobre todo por vuestra amistad que tiene un valor incalculable.

Y más tarde, ya con el certificado B en la mano, ¡a trabajar con ratones se ha dicho! Para eso necesitábamos aprender de los expertos: ¡el codirector y su pequeño GRAN equipo! GRACIAS Javier, porque con tus consejos, guía y esas revisiones minuciosas que te caracterizan, me permitieron conseguir un trabajo impecable (contigo aprendí que se deben contar una y más veces todas las rayitas, puntos y triangulitos, jeje). GRACIAS Yanina y Vanesa por todo vuestro apoyo, por estar siempre dispuestas a enseñar y colaborar, por vuestra profesionalidad ¡formamos un equipazo! Gracias, por compartir esos interminables almuerzos de fin de semana y los del Cuartel de la Guardia Civil... con pasada bajo el arco de seguridad incluida... (jaja) Yanina, ¡eres tremenda!

GRACIAS a todos mis compañeros del Hospital Clínico: Wilfredo, un experto en células y Mercedes, una experta en papers: GRACIAS, he aprendido mucho de vosotros y he disfrutado de vuestra compañía. Gracias también a: “las chicas de onco”, Mamem, Manuel, Fernando, Inma, Isabel, Maribel, Daniel, María Fernanda, Bernardo, Carmen, Lourdes, Jaime y “los chicos de Pepe Lozano”, porque me brindaron su apoyo, compartimos charlas y horas de trabajo. GRACIAS Alicia ¡por estar siempre! para todo y para todos, siempre sonriente y dispuesta. GRACIAS a mi querida Ángela... ¡ay!, ¡cuánto he aprendido contigo y cuanto cariño me has dado!

GRACIAS a todos mis compañeros del Hospital Civil, donde he finalizado este recorrido. Deciros que desde el primer día he sentido que estaba en casa. GRACIAS por ofrecerme vuestra ayuda, por contar conmigo, por hacerme partícipe, por permitirme aprender de vosotros y también por “el discurso de fin de año” (jaja): Gema, Lina, Paqui, Eva, Sara, Sonsoles, Carolina, Elehazara, Juanmi, Eduardo, Conchi, Cristina, María Jesús, Ailec, Laura, Begoña, María José, Tahia, Isaac, Rosa, Pablo, Maite, Miguel, Guillermo, Lourdes, Curro, José Antonio, Jesús, Pepe, Raquel, Ana, Rubén, Francis, Mari Carmen, Tatiana, Álvaro, Pedro, Carlos. GRACIAS a Isabel, por tu simpatía, tu ejemplo de trabajo y por inundar nuestra sala 4 con el típico aroma americano. GRACIAS a Rosa, la profe de Sevilla, por tu actitud positiva, por tu trabajo incansable, por tu cariño, por permitirnos entrar en el mundo de las nano partículas y compartir toda tu experiencia. GRACIAS a los médicos de endocrino: Gabriel, Marisol, Sergio, Natalia, Curra, Victoria, Nuria por enseñarnos a ver las cosas desde otro punto de vista en esas reuniones de los martes.

GRACIAS a mis compañeros del Servicio de Salud Mental: Fermín, Lucía, Nico, Carolina, José, Esperanza. En especial, GRACIAS a Yolanda, por confiar en mí y permitirme entrar en el mundo de la salud mental y aprender cada día un poco más. GRACIAS también a David por colaborar en las correcciones con tu impecable inglés nativo.

Un GRACIAS enorme a mi tutora Kika porque has sido quien me ha puesto en la línea de partida. Gracias por aceptar la tutoría, por confiar en mí y por estar siempre dispuesta.

*GRACIAS también a mi tutor actual, Francisco Cánovas, por tu actitud generosa, tu profesionalidad y sobre todo por la manera con la que te diriges hacia nosotros en tu calidad de coordinador del Programa de Doctorado: “Queridos alumnos de doctorado”.
¡Me encanta!*

I want to express my gratitude to my colleagues at Stockholm’s University: Barbara Cannon, Jan Nedergaard, Natasa Petrovic and all people that belong to The Arrhenius Laboratories F3. It was an enormous pleasure to share a six month stay at The University with your companion. My experience couldn’t have been the same without your support. I have learn a lot from all of you. THANK YOU!

GRACIAS a mis hermanos Luis y Alejandra, y sus respectivas familias, porque han estado siempre presentes en este largo camino, soportando mis ausencias y celebrando mis alegrías. GRACIAS a familiares, amigos y familia política de Argentina, España, Italia y Estados Unidos por el apoyo. GRACIAS a mi yerno y mis nueras y sus familias por apoyarme siempre.

Y finalmente, un GRACIAS muy especial y en mayúscula para mis primos Juan Carlos, Aurora y toda su familia: ¡mis queridos Baster! porque son incondicionales, porque siempre están, porque cuento con ellos cada vez que los necesito, porque gracias a ellos y “las interminables gestiones con apostillado de la Haya incluido” este recorrido pudo empezar.

Con el apoyo de todos vosotros... transcurrieron cinco maravillosos años.

¡GRACIAS!



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE

I. ABSTRACT	1
II. INTRODUCCIÓN	21
II.1. Obesidad.....	23
II.1.1 Epidemiología	23
II.2. Tejido adiposo.....	24
II.2.1. Generalidades.....	24
II.2.2. Expansión del tejido adiposo y lipotoxicidad.....	28
II.3. Adipogénesis	30
II.3.1. Principales factores reguladores de la adipogénesis.....	31
II.4. Angiogénesis.....	37
II.4.1. Regulación de angiogénesis en tejido diposo.....	37
II.4.2. Función de la vasculatura del tejido adiposo.....	39
II.4.3. Principales factores angiogénicos.....	40
II.5. Apoptosis.....	41
II.5.1. Principales factores apoptóticos.....	42
II.6. Insulina y el Receptor de Insulina (RI).....	43
II.6.1. Vías de señalización de la insulina.....	46
II.6.2. Resistencia a la insulina.....	47
II.7. MiARNs.....	49
II.7.1. Generalidades.....	49
II.7.2. Definición y biosíntesis.....	50
II.7.3. Función.....	53
II.7.4. MiARNs reguladores de adipogénesis, angiogénesis y apoptosis.....	54
II.8. Regulación transcripcional. Metilación.....	55

III. HIPÓTESIS	59
IV. OBJETIVOS	63
V. DISEÑO EXPERIMENTAL	67
V.1. Perfil de expresión de miR-15b, miR-20a, miR-20b, miR-27b, miR-126, miR-130a, miR210, miR-221, miR-222, miR-296 y Let-7f en TA de pacientes normo pesos y obesos con y sin DMT2.....	69
V.2. Predicción de genes diana de los miARNs estudiados.....	70
V.3. Perfil de expresión de genes diana de los miARNs estudiados en tejido adiposo humano	70
V.4. Estudio in vitro	71
a) De los mecanismos moleculares de miARNs en procesos biológicos en línea celular de ratón.....	71
b) Perfil de expresión de genes diana de los miARNs estudiados, en FVE proveniente de TA humano.....	71
V.5. Estudio in vivo de los mecanismos moleculares de miARNs en procesos biológicos.....	72
V.6. Estudio epigenético: Metilación del ADN de genes relacionados con las vías de angiogénesis, adipogénesis, apoptosis y señalización de la insulina en TA humano.....	72
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	73
VI.1. Colección de tejido adiposo y células de la Fracción Vascular Estromal	75
VI.1.1. Pacientes humanos.....	75
VI.1.2. Aislamiento y Expansión de la Fracción Vascular Estromal del Tejido Adiposo Visceral y Subcutáneo.....	76
VI.1.3. Ratones C57BL/6J.....	77

VI.2. Estudio <i>in vitro</i>	78
VI.2.1. Transfección de células 3T3-L1 con imitador e inhibidor de mmu- miR-221-3p y mmu-miR-222-3p.....	78
VI.2.2. Células 3T3-L1.....	79
VI.2.3. DharmaFECT3 siRNA Transfection Reagent.....	79
VI.2.4. Imitador e Inhibidor de mmu-miR-221 y mmu-miR-222.....	80
VI.2.5. Diferenciación adipogénica de la Fracción Vascular Estromal	80
VI.3. Estudio <i>in vivo</i>	81
VI.3.1. Obtención del modelo de ratón con obesidad inducida por la dieta.....	82
VI.3.2. Test de tolerancia a la glucosa.....	83
VI.3.3. Test de tolerancia a la insulina.....	84
VI.3.4. Transfección de ratones con imitador y control de miR-221 y miR- 222	84
VI.3.5. Extracción de miARNs de ratones tratados con imitador y control de miR-221 y miR-222	85
VI.4. Análisis de la expresión génica	85
VI.4.1. Criterio de elección de los miARNs del estudio	86
VI.4.2. Extracción de miARNs.....	86
VI.4.3. Extracción de ARNm	87
VI.4.4. Cuantificación y Pureza del miARN y ARNm obtenido.....	87
VI.4.5. Control de integridad de ARNm.....	89
VI.4.6. RT-qPCR para miARNs.....	89
VI.4.7. Transcripción inversa. Obtención del ADNc.....	92
VI.5. Estándares MIQUE.....	93
VI.6. Búsqueda y/o análisis del gen de referencia.....	94

VI.7. Análisis bioinformático de genes diana de miARNs.....	94
VI.8. Estudio epigenético. Metilación del ADN.....	98
VI.9. Análisis estadísticos	99
VII. PROTOCOLOS.....	101
VII.1. Protocolos de la expresión génica de biomoléculas.....	103
VII.1.1. Extracción de miARNs.....	103
VII.1.2. Extracción ARNm.....	105
VII.1.2.1. Protocolo extracción ARN desde TA humano y murino.....	105
VII.1.2.2. Protocolo extracción de ARN desde células 3T3-L1 y FVE	107
VII.1.3. Cuantificación y pureza del ARN.....	108
VII.1.4. Transcripción inversa. Obtención de ADNc.....	109
VII.1.5. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.....	111
VII.2. Lista de control de estándares MIQUE.....	114
VII.3. Búsqueda y/o análisis del gen de referencia.....	116
VII.4. Protocolos del análisis bioinformático.....	116
VII.4.1. Búsqueda de genes diana con miRTarBase.....	116
VII.4.2. Clasificación de genes diana con PANTHER.....	117
VII.4.3. Clasificación de genes diana con DAVID.....	118
VII.4.4. Análisis de enriquecimiento con GeneCodis.....	119
VII.4.5. Predicción genes diana con miRWalk.....	120
VII.4.6. Visualización de redes de interacción con Cytoscape.....	121
VII.5. Protocolos del estudio <i>in vitro</i>	123
VII.5.1. Recepción de las Células 3T3-L1.....	123
VII.5.2. Descongelamiento de las células 3T3-L1.....	123

VII.5.3. Activación de las células 3T3-1.....	124
VII.5.4. Cambio de medio de cultivo (Frasco o Placa 6 pocillos).....	124
VII.5.5. Extracción de células con Tripsina.....	125
VII.5.6. Cuantificación de células 3T3-L1.....	125
VII.5.7. Subcultivos.....	126
VII.5.8. Expansión de células 3T3-L1.....	126
VII.5.9. Diferenciación adipogénica de células 3T3-L1.....	126
VII.5.10. Estimulación de células 3T3-L1 con inhibidores e imitadores de miR- 221 y miR-222.....	127
VII.5.11. Criopreservación.....	128
VII.5.12. Preparación medios de cultivo para 3T3-L1.....	129
VII.6. Protocolos del estudio <i>in vivo</i>	130
VII.6.1. Generación de ratones DIO.....	130
VII.6.2. Test de tolerancia a la glucosa.....	131
VII.6.3. Test de tolerancia a la insulina.....	131
VII.6.4. Control de la ingesta de alimentos.....	132
VII.6.5. Transfección de ratones con imitadores y Control de miARNs.....	132
VIII. RESULTADOS.....	133
VIII.1. Características antropométricas y bioquímicas de los sujetos del estudio.....	135
VIII.2. Búsqueda y/o análisis de genes de referencia.....	137
VIII.2.1. En humanos.....	138
VIII.2.2. En ratones.....	142
VIII.3. Perfil de expresión de miARNs adipogénicos, angiogénicos y apoptóticos	

en TA de pacientes normo pesos y obesos con y sin DMT2.....	145
VIII.4. Predicción de genes diana de miR-15b, miR-20a, miR-20b, miR-27b, miR-126, miR-130a, miR210, miR-221, miR-222, miR-296 y Let-7f.....	152
VIII.4.1. Búsqueda de genes diana. miRTarBase.....	152
VIII.4.2. Búsqueda de genes diana regulados por dos o más miARNs.....	153
VIII.4.3. Búsqueda de procesos biológicos en los que participan los genes diana regulados por dos o más miARNs. PANTHER.....	153
VIII.4.4. Búsqueda de genes diana regulados por miR221 y miR-222.....	159
VIII.4.5. Búsqueda de procesos y rutas biológicas en los que participan los genes diana regulados por miR-221 y miR-222. PANTHER y DAVID.....	160
VIII.4.6. Análisis de enriquecimiento de los genes diana regulados por miR-221 y miR-222. GeneCodis3.....	166
VIII.4.7. Visualización de la red de interacción de los genes diana regulados por miR-221 y miR-222, los miARNs reguladores y las rutas biológicas involucradas. Cytoscape.....	166
VIII.4.8. Predicción de genes diana de miR-221 y miR-222 que no han sido validados	170
VIII.4.8.1. Búsqueda genes diana de miR-221 y miR-222 involucrados en los procesos de adipogénesis, angiogénesis y apoptosis. miRWalk.....	170
VIII.4.8.2. Búsqueda de genes diana de miR-221-3p y miR-222-3p involucrados en los procesos de adipogénesis, angiogénesis y apoptosis.....	170
VIII.4.9. Predicción genes diana de miR-20b, miR-296 y Let-7f.....	171

VIII.5. Perfil de expresión de genes diana de miARNs en TA humano.....	172
VIII.5.1. Perfil de expresión de los 120 genes diana regulados por miR-221 miR-222 en tejido adiposo humano.....	173
VIII.5.2. Perfil de expresión de genes diana regulados por miR-20b, miR- 296 y Let-7f en tejido adiposo humano.....	179
VIII.6. Estudio <i>in vitro</i>	187
VIII.6.1. Criterios de elección de los genes diana de miR-221 y miR-222 a analizar y relacionados con los procesos de adipogénesis, angiogénesis, apoptosis y señalización de insulina.....	187
VIII.6.2. Efecto de la imitación e inhibición de miR-221 y miR-222 sobre la expresión génica.....	188
VIII.6.2.1. Efecto de la imitación e inhibición de miR-221 sobre la expresión de Vegfa, Vegfb, Vegfc, Dvl2 y Ets1.....	188
VIII.6.2.2 Efecto de la imitación e inhibición de miR-222 sobre la expresión de Vegfa, Vegfb, Vegfc, Dvl2 y Ets1.....	191
VIII.6.2.3. Efecto de la imitación e inhibición de miR-221 y miR-222 sobre la expresión de Il1rap y Bcl2.....	194
VIII.6.2.4. Efecto de la imitación e inhibición de miR-221 y miR-222 sobre la expresión de Fabp4 y Ppar α	197
VIII.6.2.5. Efecto de la imitación e inhibición de miR-221 y miR-222 sobre la expresión de Irs1.....	200
VIII.7. Estudio <i>in vivo</i>	202
VIII.7.1. Perfil de expresión de miR-221 y miR-222 en TAV y TAS de ratones DIO.....	202
VIII.7.2. Perfil de expresión de ARNm de genes angiogénicos en TAV	

y TAS de ratones DIO tratados con imitador de miR-221 y miR-222.....	203
VIII.7.3. Perfil de expresión de ARNm de genes apoptóticos en TAV y TAS de ratones DIO tratados con imitador de miR-221 y miR-222	205
VIII.7.4. Perfil de expresión de mRNA de genes adipogénicos en TAV y TAS de ratones DIO tratados con imitador de miR-221 y miR- 222	207
VIII.7.5. Perfil de expresión de mRNA de genes de señalización de Insulina en TAV y TAS de ratones DIO tratados con imitador de miR-221 y miR-222	208
VIII.8. Estudio epigenético	209
IX. DISCUSIÓN.....	219
X. CONCLUSION.....	231
XI. PERSPECTIVAS	235
XII. BIBLIOGRAFÍA	239
XIII. ARTÍCULOS QUE AVALAN LA TESIS.....	255

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas

1. MiARNs involucrados en adipogénesis, apoptosis y angiogénesis.....	54
2. Características antropométricas y bioquímicas de sujetos Normo pesos y Obesos, con y sin DMT2 y Obesos con RI.....	135
3. Características antropométricas y bioquímicas de sujetos Normo pesos y Obesos, con alto y bajo grado de RI.....	136
4. Características antropométricas y bioquímicas de sujetos Normo pesos y Obesos, con y sin DMT2 y sin RI.....	137
5. Genes analizados como candidatos a Gen de Referencia en células de la FVE.....	139
6. Estadística descriptiva de los cinco candidatos a Genes de Referencia en células de la FVE.....	139
7. Estadística descriptiva del candidato a gen de referencia para miARNs de TA humano.....	140
8. Gen analizado como candidato a Gen de Referencia para ARNm de TA humano...	141
9. Estadística descriptiva del candidato a gen de referencia para ARNm de TA humano.....	141
10. Genes analizados como candidatos a Gen de Referencia para ARNm en células murinas 3T3-L1.....	142
11. Estadística descriptiva de los candidatos a Gen de Referencia para ARNm en células murinas 3T3-L1.....	142
12. Genes analizados como candidatos a Gen de Referencia para miARNs en TA murino.....	143
13. Estadística descriptiva de los dos candidatos a Gen de Referencia para miARNs en TA murino.....	143
14. Gen analizado como candidatos a Gen de Referencia para ARNm en TA Murino.....	144
15. Estadística descriptiva de los dos candidatos a Gen de Referencia para ARNm en TA murino.....	144
16. Análisis de la expresión génica de miARNs mediante análisis Multivariante.....	145
17. Análisis de la expresión génica de miARNs mediante pruebas univariadas	152
18. Genes diana de miR-15b, miR-20a, miR-20b, miR-27b, miR-126, miR-130a, miR210, miR-221, miR-222, miR-296 y Let-7f.....	153



19. Genes diana de miR-15b, miR-20a, miR-20b, miR-27b, miR-126, miR-130a, miR-210, miR-221, miR-222, miR-296 y Let-7f regulados por dos o más miARNs.....	154-156
20. Procesos biológicos en los que participan los genes diana regulados por dos o más miARNs.....	156
21. Genes diana de miR-15b, miR-20a, miR-20b, miR-27b, miR-126, miR-130a, miR-210, miR-221, miR-222, miR-296 y Let-7 f regulados por miR-221 y miR-222, juntos o con más miARNs.....	160
22. Rutas biológicas en las que participan los genes diana regulados miR-221 y miR-222. PANTHER.....	165
23. Rutas y procesos biológicos en los que participan los genes diana regulados miR-221 y miR-222. DAVID.....	166
24. Rutas y genes del análisis de enriquecimiento de los genes diana regulados por miR-221 y miR-222. GeneCodis3.....	168
25. Genes diana de miR-221-3p y miR-222-3p involucrados en los procesos de adipogénesis, angiogénesis y apoptosis.....	171
26. Perfil de expresión genes diana en tejido adiposo visceral	173
27. Perfil de expresión genes diana en Tejido adiposo subcutáneo.....	174
28. Análisis de enriquecimiento genes expresados en tejido adiposo humano.....	175
29. Análisis de enriquecimiento comparativo entre TAV y TAS.....	177
30. Genes diana de miR-221 y miR-222 seleccionados para el estudio <i>in vitro</i>	188
31. Correspondencia sondas-genes.....	216
32. Función génica de genes asociados a sondas diferencialmente metiladas de los miARNs del estudio.....	217

Figuras

Fig.1. Morfología del TA y adipocitos.....	27
Fig.2. Adipogénesis.....	31
Fig.3. Cascada transcripcional adipogénica.....	34
Fig.4. Factores involucrados en la regulación de la angiogénesis en tejido adiposo.....	38
Fig.5. Función de la vasculatura del tejido adiposo.....	40
Fig.6. Estructura del receptor de Insulina: dominios funcionales del receptor.....	45
Fig.7. Activación de la vía de las MAPK por acción de la insulina.....	46
Fig.8. Activación de la vía de la PI3K/Akt por la insulina.....	47
Fig.9. Vías inflamatorias activadas durante la obesidad y su interacción con la señalización de la insulina.....	49
Fig.10. Biogénesis y función de miARNs.....	52
Fig.11. Regulación de la angiogénesis por miARNs.....	55
Fig.12. Metilación del ADN.....	57
Fig.13. Células 3T3-L1.....	79
Fig.14. Figura representativa de la medida de la concentración de ARN.....	88
Fig.15. Figura representativa de la medida de la concentración de miARN.....	88
Fig.16. RT-qPCR miARNs.....	90
Fig.17. Diseño de la placa para expresión génica de miARNs.....	92
Fig.18. Búsqueda de genes diana con miRTarBase.....	117
Fig.19. Clasificación de genes diana con PANTHER.....	118
Fig.20. Clasificación de genes diana con DAVID.....	119
Fig.21. Análisis de enriquecimiento con GeneCodis.....	120
Fig.22. Visualización de redes de interacción con Cytoscape.....	121
Fig.23. Visualización de redes de interacción con Cytoscape. Etapa2.....	122
Fig.24. Visualización de redes de interacción con Cytoscape. Etapa3.....	122
Fig.25. Perfil de expresión de miARNs en tejido adiposo humano de pacientes normo- pesos y obesos con y sin DMT2 (A - K).....	146-151
Fig.26. Procesos biológicos en los que participan los genes diana regulados por dos o más miARNs.....	157-158
Fig.27. Procesos biológicos en los que participan los genes diana regulados miR-221 y miR-222.....	161-162
Fig.28. Rutas biológicas en las que participan los genes diana regulados miR-221 y miR-222.....	163-164

Fig.29. Análisis de enriquecimiento de los genes diana regulados por miR-221 y miR-222. GeneCodis3.....	167
Fig.30. Red de interacción entre genes diana regulados por miR-221 y miR-222, miARNs, y rutas biológicas. Cytoscape.....	169
Fig.31. Procesos biológicos en los que están involucrados los genes diana de miR-20b, miR-296 y Let-7f.....	172
Fig.32. Red de interacción de la expresión génica en TAV y TAS.....	175
Fig.33. Análisis de enriquecimiento genes expresados en tejido adiposo humano.....	176
Fig.34. Análisis de enriquecimiento comparativo entre TAV y TAS. GeneCodis3.....	178
Fig.35. Diagrama de flujo del análisis bioinformático y la expresión génica de los genes diana de los 11 miARNs.....	178
Fig.36. Genes diana expresados diferencialmente en TAS humano.....	181
Fig.37. Genes diana expresados diferencialmente en el TAV humano.....	183
Fig.38. Genes diana expresados diferencialmente en TAS y TAV humano.....	185
Fig.39. Niveles de expresión de ARNm de los marcadores de angiogénesis Vegfa, Vegfb, Vegfc, Dvl2, Ets1 en células 3T3-L1 transfectadas con imitador e inhibidor de mir-221.....	189-191
Fig.40. Niveles de expresión de ARNm de los marcadores de angiogénesis Vegfa, Vegfb, Vegfc, Dvl2, Ets1. en células 3T3-L1 transfectadas con imitador e inhibidor de mir-222.....	192-194
Fig.41. Niveles de expresión de ARNm de los marcadores de apoptosis Bcl2 e Il1rap en células 3T3-L1 transfectadas con imitador e inhibidor de miR-221 y miR- 222.....	195-197
Fig.42. Niveles de expresión de ARNm de los marcadores de adipogénesis Ppar γ y Fabp4, en células 3T3-L1 transfectadas con imitador e inhibidor de miR-221 y miR-222.	198-200
Fig.43. Nivel de expresión de ARNm del receptor de señalización de insulina Irs1....	201
Fig.44. Perfil de expresión de miR-221 y miR-222 en TAV y TAS de ratones DIO..	202
Fig 45. Nivel de expresión de ARNm de Vegfa en TAV y TAS murino.....	204
Fig.46. Nivel de expresión de ARNm de Vegfb en TAV y TAS murino.....	204
Fig 47. Nivel de expresión de ARNm de Vegfc en TAV y TAS murino.....	205
Fig.48. Nivel de expresión de ARNm de Ets1 en TAV y TAS murino.....	205
Fig.49. Nivel de expresión de ARNm de Bcl2 en TAVy TAS murino.....	206
Fig.50. Nivel de expresión de ARNm de Il1rap en TAV y TAS murino.....	207

Fig.51. Nivel de expresión de ARNm de Ppar γ en TAV y TAS murino.....	208
Fig.52. Nivel de expresión de ARNm del receptor de señalización de insulina Irs1 en TAV y TAS murino.....	209
Fig.53. Mapa de calor entre componente principal y variables fenotípicas en TAV....	210
Fig.54. Mapa de calor entre componente principal y variables fenotípicas en TAS.....	211
Fig.55. Mapa de calor entre SV y las variables fenotípicas en TAV.....	212
Fig.56. Mapa de calor entre SV y variables fenotípicas en TAS.....	213
Fig.57. Histogramas de distribución de valores p (A - B).....	214
Fig.58. Mapa de calor de las sondas diferencialmente metiladas.....	215
Fig.59. Diagrama de Metilación génica.....	216



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE DE ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL TEXTO Y EN LAS FIGURAS

ADNc: ADN complementario

ARNss: ARN simple hebra

ARNds: ARN doble hebra

ARNnc: ARN no codificantes

BCL2: Proteínas 2 de linfoma de célula B

CASP: Caspasas

C/EBP: Proteínas de unión al potenciador CCAAT

DGCR8: Región crítica 8 del síndrome de Di- George

DR: Receptores de muerte

DMT2: Diabetes mellitus tipo 2

FABP4: Proteínas de unión a ácidos grasos

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

HIF: Factor Inducible por Hipoxia

IMC: Índice de masa corporal

IRS: Receptor de insulina

MAPK: Cinasas activadas por mitógenos

miARN: micro ácido ribonucleico

ND: Normopeso diabético

NGS: Secuenciación de nueva generación

NS: Normopeso sano

nt: Nucleótidos

OD: Obeso diabético

OMS: Organización mundial de la salud

ORI: Obeso resistente a la insulina

OS: Obeso sin alteraciones metabólicas

PPAR γ : Receptor Activado por Proliferador de Peroxisoma tipo gamma

PPRES: Elementos de Respuesta de Proliferador de Peroxisomas

PIGF: Factor de crecimiento placentario
PI3K: Fosfatidilinositol 3-cinasa
POLII: ARN polimerasa II
Poli-A: Poli-adeninas
qPCR: PCR cuantitativa
RI: Resistencia a la Insulina
Ser/Thr: Serina/treonina
SnoRN: ARN nucleolar
SREBP: Proteínas de unión al Elemento Regulador de esteroides
TA: Tejido adiposo
TAB: Tejido adiposo blanco
TAM: Tejido adiposo marrón
TARBP: Proteína de unión a TARA
TAS: Tejido adiposo subcutáneo
TAV: Tejido adiposo visceral
TG: Triglicéridos
TTG: Test de tolerancia a la glucosa
TTI: Test de tolerancia a la insulina
Tyr: Receptor en residuos de tirosina
VEGF: Factor de crecimiento Endotelial Vascular
3'UTR: Región 3 'no traducida

I. ABSTRACT



According to the World Health Organization (WHO), obesity has reached epidemic proportions worldwide and is a serious problem of public health. The increase in body mass index (BMI) leads to the onset of other diseases such as hypertension, heart disease, diabetes and some types of cancer. In 2012, more than 40 million children were overweight and every year, at least 2.6 million adults die due to obesity or being overweight. Obesity is the abnormal or excessive accumulation of fat that can be harmful to health. It is characterized by an increase in adipose tissue (AT), and is the result of a state of positive energy balance. An excess of AT is associated with an increased risk of insulin resistance (IR) and type II diabetes mellitus (T2DM). The relationship between these complications is well established, however, the mechanisms behind it are not fully defined (Gorán, MI *et al.*, 2012). In AT, gene expression and histological studies have contributed to the understanding that this tissue is a more active endocrine organ than what was thought a few years ago. AT is an endocrine organ with cellular heterogeneity; composed of adipocytes, stem cells, pre-adipocytes, macrophages, neutrophils, lymphocytes and endothelial cells (Esteves-Rafols M *et al.*, 2014). AT is the most plastic tissue of all multicellular organisms and is constantly remodelled along with weight gain and loss (Lemoine A *et al.*, 2013).

Understanding the changes that occur during the expansion / reduction of AT and the mechanisms of its associated pathologies can be crucial in the prevention of obesity. The processes involved in this expansion are adipogenesis, apoptosis and angiogenesis. Adipogenesis is always accompanied by angiogenesis (Alligier M *et al.*, 2012). In obesity, AT expansion and function are altered, thus fat excess is deposited ectopically in other tissues which leads to metabolic alterations such as IR and T2DM. The vasculature is an important factor for AT expansion / reduction processes. Angiogenesis is the ability to increase its own vasculature and is essential for AT plasticity (Christiaens V *et al.*,

2010). There are several experimental evidences in mice indicating that AT growth may be limited by deficiency in its vasculature. When there is a rapid expansion of the AT, as occurs with high fat diets, the vascular network growth is altered, creating a state of hypoxia, which can promote inflammation and IR (Corvera S *et al.*, 2014). Other studies have shown how AT mass can be regulated through its vasculature (Tinahones FJ *et al.*, 2012). Other authors have described that a decrease in angiogenesis leads to a decrease in AT mass (Rupnick M *et al.*, 2002; Kim H *et al.*, 2010). Thus, knowing the regulation of genes associated with angiogenesis is relevant and could be susceptible to pharmacological therapy (Tinahones FJ *et al.*, 2012; Srinivasan S *et al.*, 2013; Sung H-K *et al.*, 2013). There are subjects with long-standing obesity and morbid obesity who can be considered metabolically healthy despite a high degree of obesity, while others with normal-weight develop metabolic syndrome (Medina-Gomez G *et al.*, 2009). This paradigm is being explained by AT expandability hypothesis, which suggested that once adipocytes reached a threshold capacity for storage, they begin to promote IR with lipotoxicity and adipokine release. Thus it is clear that the capacity for AT expansion is an important factor in the development of metabolic complications associated with obesity. However, the mechanism by which obesity leads to the development of metabolic complications still needs to be elucidated.

The regulation of gene expression includes a wide range of mechanisms that are used by cells to increase or decrease the production of specific gene products (protein or RNA) and is informally termed as gene regulation. The gene expression regulation can be carried out at the transcriptional and post-transcriptional level. In fact, gene expression can be modulated at different stages; from transcriptional initiation, to RNA processing, and to post-translational protein modification. In the past decade, miRNAs have emerged as key regulators of metabolic homeostasis. It has been described that tissues that play

pivotal roles in metabolism; such as beta-cells, liver, skeletal, heart muscle and AT, are well controlled by miRNAs through post-transcriptional regulation. MiRNAs consist of approx. 22 nucleotides and regulate gene expression by binding to their complementary sites within the 3'-untranslated regions (3' UTRs) of target mRNAs (Lagos-Quintana M *et al.*, 2001) resulting in mRNA translational repression or transcript degradation. The degree of miRNA target base-pairing complementarity determines the fate of the target transcript. Perfect complementarity leads to target cleavage and degradation. In contrast, imperfect complementarity triggers mRNA silencing by distinct mechanisms which may involve translational repression, slicer-independent mRNA degradation and / or sequestration in cytoplasmic processing bodies (Srinivasan S *et al.*, 2013; Vienberg S *et al.*, 2017). The important contribution of miRNAs to the organization and development of the regulatory program for gene expression is well known. When these molecules are over or down-expressed, they can alter this regulation and cause diseases. Several studies have shown the vital role of various miRNAs in the control of glucose homeostasis (Zampetaki A *et al.*, 2012, Ramírez CM *et al.*, 2013), in insulin pathways (Kim W *et al.*, 2012) and in the development and maintenance of pancreatic islets (Poy MN *et al.*, 2009). Other studies have shown their intervention during adipocyte differentiation and maturation (Son YH *et al.*, 2014) as well as during the development and / or control of obesity (Viesti A Collares R *et al.*, 2014) and its associated IR (Chen H *et al.*, 2014). Recent studies have described that these small non-coding RNAs regulate angiogenesis (Suarez Y *et al.*, 2009). The miRNAs represent an attractive therapeutic target because it has been observed that a miRNA can regulate many target genes and thus influence the signalling pathway. The miRNAs can be detected in serum, plasma, urine and saliva, in its stable, reproducible and consistent forms between individuals of the same species. This fact makes them susceptible to be used as biomarkers for the diagnosis of diseases

(Rico-Rosillo MG *et al.*, 2014). Other authors have shown its potential applicability for the treatment of diseases associated with aberrant pathological angiogenesis (cancer), or defective angiogenesis (peripheral vascular disease). MiRNAs constitute a fundamental regulatory network for the regulation of gene expression and contribute to maintaining the cellular function necessary for an adequate angiogenic response (Suárez Y *et al.*, 2009).

DNA methylation is a form of epigenetic control of gene expression in eukaryotes. DNA methylation occurs at the 5' position of the cytosine residues within CpG dinucleotides. During the last decades, several discoveries about DNA methylation have been made. Epigenetic modulation of gene activity occurs in response to non-genetic factors, such as body weight status, physical activity, dietary factors, and environmental toxins (Paul B *et al.*, 2015). The underlying mechanisms include, among others, chromatin remodelling and expression and activity of small non-coding RNAs (Paul B *et al.*, 2015). This background allowed us to propose the following hypothesis: Transcriptomic and post-transcriptional changes related to DNA methylation and miRNAs could be angiogenic regulators and may play an important role in the regulation of AT functionality and expansion. Thus, angiogenesis could be related to obesity and IR.

In order to demonstrate the hypothesis, we had the following objectives:

1. To determine the expression profile of miRNAs involved in the regulation of AT functionality. Our interest was focused on adipogenic, angiogenic and apoptotic processes in AT from normal weight and obese subjects, with and without T2DM. Anthropometric and biochemical characteristics of the study group are shown in Table 2. Subsequently, miRNAs were extracted, purified and quantified. Then, miR-15b, miR-20a, miR-20b, miR-27b, miR-126, miR-130a, miR-210, miR-221, miR-222, miR-296 and Let-7f were analysed through miRNAs reverse transcription and quantitative PCR (qPCR). Also, the

identification and validation of reference genes and finally a statistical analysis of data were carried out.

2. To carry out bioinformatic analysis for predicting miRNAs target genes. Bioinformatics tools for prediction, biological classification, enrichment and visualization of interaction networks were used as follows. The miRTarBase database was used to identify the predicted target genes for differentially expressed miRNAs (miR-15b, miR-20a, miR-20b, miR-27b, miR-126, miR-130a, miR-210, miR-221, miR-222, miR-296 and Let-7f). Then, a manual search of target genes regulated by two or more miRNAs was carried out in an excel file. Subsequently, a search for target genes regulated by miRNAs was done in the same way for the following groups: (a) target genes regulated by miR-221 and miR-222 and (b) target genes regulated by miR-20b, miR-296 and Let-7f. The PANTHER and DAVID tools were used to classify the biological functions related to miRNA target genes. The miRWalk database was used to find miRNA target genes that have not been validated. The GenCodis tool was used to perform enrichment analysis of miRNA target genes. Finally, the visualization of interaction networks between miRNAs, target genes, biological functions, pathologies, etc., was carried out with Cytoscape.

3. To analyse the mRNA expression profile of miRNAs target genes in VAT, SAT and Stromal Vascular Fraction (SVF). VAT and SAT samples were collected from patients. Anthropometric and biochemical characteristics of the study group is shown in Table 3 and 4. Subsequently, the mRNAs were extracted. Then, several procedures were carried out such as, mRNA quantification, mRNA purity determination, mRNAs reverse transcription, gene expression by microarrays and qPCR, the identification and validation of reference gene, a statistical analysis of data and finally, the visualization of interaction

networks between miRNAs, target genes, biological functions, pathologies, etc., was carried out with Cytoscape.

4. To carry out *in vitro* study to analyse the effect of inhibition and over-expression of miR-221 and miR-222 on the expression of genes involved in angiogenesis, adipogenesis, apoptosis and insulin signalling. The 3T3-L1 pre-adipocyte cell culture line, derived from mouse embryos, was differentiated into adipocytes. Subsequently, they were transfected with mimic or inhibitor of miR-221 and miR-222. After 48 hours of treatment, mRNA was extracted. Then, various procedures were carried out such as, mRNA quantification, mRNA purity determination, mRNAs reverse transcription, gene expression by qPCR, identification and reference gene validation and finally, a statistical analysis of data.

5. An *in vivo* study was carried out to analyse the effect of mimic of miR-221-3p and miR-222-3p on the expression of genes involved in angiogenesis, adipogenesis, apoptosis and insulin signalling. Male C57BL/6J mice were fed a high-fat diet for 8 weeks to obtain a diet-induced obesity (DIO) mouse model. Then, mice were treated with mimic or control subcutaneous injection three times a week, for another 8 weeks. After that, the mice were sacrificed by cervical dislocation and VAT and SAT samples were obtained, frozen with liquid nitrogen and stored at -80°C until processing. Then, various procedures related to miRNA, such as, miRNAs quantification, miRNA purity determination, miRNAs reverse transcription, gene expression by qPCR, identification and reference gene validation and finally, a statistical analysis of data were carried out. On the other hand, procedures analysing mRNA were carried out, including mRNAs quantification, mRNA purity determination, mRNAs reverse transcription, gene expression by qPCR, identification and reference gene validation and finally, a statistical analysis of data.

6. Epigenetic study: DNA methylation in human AT. Samples of VAT and SAT were collected from patients classified into four groups (a) healthy normo-weight (b) healthy

obese (c) diabetic normo-weight and (d) diabetic obese. Subsequently, DNA was extracted. Then, DNA-methylation microarray was carried out with Illumina EPIC 850k. Raw methylation data was loaded and pre-processed using the Illumina GenomeStudio software. A control probe was used to normalize the data. Subsequently, a decomposition of singular values (SVD) detected a possible confusion effect. When necessary, Substitute Variable Analysis (SVA) was used (Leek JT *et al.*, 2007; Lee S *et al.*, 2017).

A general linear multivariate model, simultaneously including the expression of all the miRNAs studied showed the existence of statistically significant differences when all variables was considered as a whole and are expressed by model intercept (Wilks' $\lambda=0,022$, $F= 24,209$, $p= 0,000$). In addition, an interaction between obesity and tissue was observed, albeit, this interaction did not reach statistical significance (Wilks' $\lambda=0,125$, $F= 3,832$, $p= 0,056$), which indicates that the differences between NW and OB may differ according AT depots (Fig.25). Thus, differences in the expression levels of each miRNA separately were analysed through univariate probes. Fig. 25 and Table 17 show that miR-27b ($p= 0,017$), miR-126 ($p=0,032$), miR130a ($p=0,020$), miR-221 ($p= 0,024$) and Let-7f ($p=0,011$) expression levels were significantly higher in obese compared to normo-weight subjects. However, no significant differences in miR-15b, miR-20a, miR-20b, miR-210, miR-222 and miR-296 expression levels were observed between these two groups. Moreover, Fig. 25 and Table 17 show that the expression of miR-27b ($p=0.004$), miR-126 ($p=0.026$), miR-130a ($p=0.010$), miR-210 ($p=0.000$), miR-221 ($p=0.036$), miR-222 ($p=0.019$), and Let-7f ($p=0.012$) vary according to AT depot, consisting of a completely different behaviour between normo-weight and obese subjects in VAT and SAT. In addition, an interaction between obesity and tissue was observed and significantly affected the expression of miR-15b ($p=0.030$), miR-20a ($p=0.011$), miR-20b ($p=0.020$), miR-27b ($p=0.029$), miR-126 ($p=0.048$), miR-130a ($p=0.033$), miR-210 ($p=0.006$), miR-

221 ($p=0.041$), miR-296 ($p=0.023$), and Let-7f ($p=0.009$), which indicates that the differences between normo-weight and obese subjects were not the same in VAT and SAT. On the other hand, Fig. 25 and Table 17 show that both diabetes ($p=0.038$) and the interaction between diabetes and the type of tissue ($p=0.024$) significantly affected the expression of miR-210.

Bioinformatic analysis highlighted 5759 putative target genes for miR-15b, miR-20a, miR-20b, miR-27b, miR-126, miR-130a, miR-210, miR-221, miR-222, miR-296 and Let-7f (Table 18). A later analysis highlighted that 1415 of them could be regulated by two or more miRNAs (Table 19). These target genes were input into the PANTHER and DAVID databases to highlight the biological processes in which they are involved (Fig. 26 and Table 20). Then, a new bioinformatic analysis was carried out and a new list of predicted target genes highlighted 120 genes that could be regulated by miR-221 and miR-222 (Table 21). These target genes were input into the PANTHER and DAVID databases to highlight the biological process and signalling pathways in which they are involved (Fig. 27,28 and Tables 22, 23). Similarly, the list with 120 target genes that could be regulated by miR-221 and miR-222 were loaded into GeneCodis3 software to highlight gene enrichment (Fig.29 and Table 24). On the other hand, bioinformatic analysis retrieved 7,038 putative target genes for miR-20b, miR-296, and Let-7f. We then prioritized 98 TGs (Data in Gentile AM *et al.*, 2018, *manuscript under review in Obesity; Jun 2018*). Finally, an interaction network between miRNAs, target genes regulated by miR-221 and miR-222 and biological pathways, was created using Cytoscape software (Fig.30). On the other hand, mRNA expression levels of 120 target genes regulated by miR-221 and miR-222 in human AT were analysed. An Array was used in 4 patient groups whose biochemical and anthropological characteristics are shown in Table 2. The analysis highlights that 56 target genes were differentially expressed in VAT and/or SAT

as shown in Tables 26 and 27. Subsequently, an interaction network between differentially expressed target genes and their relationship with obesity, IR and T2DM was created using Cytoscape software (Fig. 32). This network is composed of gray nodes for each regulated target gene and white nodes for obesity, IR and T2DM. The type of regulation is represented by the different link lines as follows: up regulation: continuous red line; down regulation: dotted green line. In addition, to know the relevance of the biological processes involved, the 56 differentially expressed genes were introduced into the GeneCodis tool, as described in materials and methods, for an enrichment analysis. The results show enrichment in the regulation of cell proliferation, cell cycle, induction of apoptosis, signal transduction and phosphorylation (Fig. 33 and Table 28). The relevance of the biological processes involved in each AT, genes differentially expressed in VAT and SAT were entered in separate lists in the GeneCodis tool, as described in materials and methods, for a comparative enrichment analysis. The results reveal an enrichment in the regulation of cell proliferation in VAT, induction of apoptosis, signalling mediated by phosphatidylinositol, regulation of cyclin-dependent protein kinase activity, negative regulation of epithelial cell proliferation, phase G1 of the cycle mitotic cell and positive regulation of the movement of cellular components, mainly. While SAT reveals cell cycle enrichment, positive regulation of protein catabolic processes, heart development, DNA-dependent transcription, response to laminar fluid cut-off, negative regulation of translation involved in gene silencing by miRNA, mainly (Fig. 34 and Table 29).

On the other hands, Fig. 36, 37 and 38 show target genes expression regulated by miR-20b, miR-296 and Let-7f in human VAT and SAT.

In order to investigate the regulatory mechanism of miR-221 and miR-222, an *in vitro* study was carried out as described above. The expression levels were normalized with

beta actin and compared with undifferentiated 3T3-L1 cells as a negative control. The data were obtained in duplicate and expressed as mean \pm SEM. The statistical analysis was performed using the Student's t-test.

Fig. 39 and 40 show mRNA expression levels of the angiogenesis markers (*Vegfa*, *Vegfb*, *Vegfc*, *Dvl2*, *Ets1*) in 3T3-L1 cells transfected with a mimetic molecule or an inhibitory molecule of miR-221 and miR-222, respectively. The data suggest that mRNA expression level *Dvl2* was down expressed in presence of mimic and inhibitor of miR-221. Whilst mRNA expression levels *Vegfa*, *Vegfb*, *Vegfc*, *Dvl2* and *Ets1* were not differentially expressed in the presence of mimic and miR-222 inhibitor.

Fig. 41 shows mRNA expression levels of the apoptotic markers (*Bcl2*, *Il1rap*) in 3T3-L1 cells transfected with a mimic or an inhibitor molecule of miR-221 or miR-222. The data suggest that mRNA expression level *Il1rap* was down expressed in the presence of mimic miR-221.

Fig. 42 shows mRNA expression levels of the adipogenic markers (*Fabp4*, *Ppar γ*) in 3T3-L1 cells transfected with a mimetic molecule or an inhibitory molecule of miR-221 or miR-222. The data suggests that mRNA expression levels of *Fabp4* was down expressed in the presence of miR-221 inhibitor and over expressed in the presence of mimic miR-222. On the other hand, mRNA expression levels of *Ppar γ* was over-expressed in the presence of mimic miR-222.

Fig. 43 shows mRNA expression levels of *Irs1* in 3T3-L1 cells transfected with a mimetic molecule or an inhibitory molecule of miR-221 or miR-222. The data suggests that both the mimic and miR-222 inhibitor have not affected *Irs1* mRNA expression levels.

In order to investigate the regulatory mechanism of miR-221 and miR-222, an *in vivo* study was carried out as described above. The gene expression analysis was performed on VAT and SAT of DIO mice transfected with mimic or control of miR-221 and miR-

222. Gene expression level was normalized to cyclophilin. The data were obtained in duplicate and expressed as mean \pm SEM. The statistical analysis was performed using Student's t-test. Gene expression levels of angiogenesis-related factors in VAT and SAT of DIO mice treated with miR-221 and miR-222 mimics were analysed (*Vegfa*, *Vegfb*, *Vegfc*, *Dvl2*, *Ets1*). In VAT, *Vegfa* and *Vegfb* gene expression showed statistical significant differences between treated and untreated mice with mimic miR-222 (Fig. 45 and 46). *Vegfb* gene expression showed statistical significant differences between treated and untreated with miR-221 mimic (Fig.46). Gene expression levels of apoptosis-related factors in VAT and SAT of DIO mice treated with mimic miR-221 and miR-222 were analysed (*Bcl2*, *Il1rap*). In VAT, *Il1rap* gene expression showed statistical significant differences between treated and untreated with mimic miR-222 (Fig.50). Gene expression levels of adipogenesis-related factors in VAT and SAT of DIO mice treated with mimic miR-221 and miR-222 were analysed (*Fabp4*, *Ppar γ*). In VAT, *Ppar γ* gene expression showed statistical significant differences between treated and untreated mice with mimic miR-221 (Fig.51). Gene expression levels of insulin signalling-related factors in VAT and SAT of DIO mice treated with mimic miR-221 and miR-222 were analysed (*Irs1*). In SAT, *Irs1* gene expression showed statistical significant differences between treated and untreated mice with miR-221 mimic (Fig.52).

In order to identify differentially methylated sequences in VAT and SAT related to obesity, IR and T2DM, a set of samples were selected as detailed above. DNA methylation microarray (Illumina EPIC) was carried out to study the DNA methylation status in the study groups. Thus, the epigenetic study shows 5 hypermethylated genes: *CPS1*, related to metabolic pathways and amino acid biosynthesis; *ELMO1*, related to *VEGF* signalling path; *STEAP3*, related to glucose transport and insulin receptor; *IQCE*,

related to signalling of G protein coupled receptors and *MGDA1*, related to adhesion and neuronal migration.

The present study shows for the first time an influence of obesity and T2DM on the expression of miR-15b, miR-20a, miR-20b, miR-27b, miR-126, miR-130, miR-210, miR-221, miR-222, miR-296 and *Let-7f* in VAT and SAT in humans. Accordingly, some target genes of these miRNAs were also regulated differentially in obesity and T2DM, depending on the deposition of AT. These target genes are related to different biological processes relevant to the physiology of AT that reinforce the putative role of these miRNAs in the regulation of TA function and the maintenance of metabolic homeostasis. Although it has been shown that the expression of miRNAs in AT is related to fat deposits, with the parameters of morphology of AT, obesity and glucose metabolism (Viesti A Collares R *et al.*, 2014; Klöting N *et al.*, 2009; Chen L *et al.*, 2014; Peng Y *et al.*, 2014), to our knowledge, to date there are no studies describing the expression levels of miR-15b, miR-20a, miR-20b, miR-27b, miR-126, miR-130a, miR-210, miR-221, miR-222, miR-296 and *Let-7f* in VAT and SAT in relation to obesity and T2DM.

Our results suggest the possible relationship between miR-27b, miR-126, miR-130a, miR-221 and *Let-7f* and obesity. However, the mechanisms that regulate this relationship are not clear. Some of these miRNAs have been related to adipogenesis (Kong X *et al.*, 2015; Deiuliis JA *et al.*, 2016), obesity (Arner E *et al.*, 2012; Meerson A *et al.*, 2013; Peng J *et al.*, 2017) and some to metabolic alterations (Shi C *et al.*, 2016). We found that a miR-221 target gene, *ETS1*, is up-regulated in VAT. On the other hand, and as other authors have described (Meerson A *et al.*, 2013) we found that *ETS1* is downregulated in SAT of obese diabetic subjects.

ETS1 is a transcription factor that regulates the expression of a broad spectrum of genes, including cytokines and chemokines, and it has been proposed that the inflammation

associated with obesity may also play a significant role in the development of T2DM (Meerson A *et al.*, 2013). Furthermore, according to our functional enrichment analysis (Table 24), *ETS1* participates in the regulation of cell proliferation and angiogenesis and, as already described, participates in the *VEGF* signalling pathway (Singh S *et al.*, 2002). These mechanisms could suggest that an increase in the expression of miR-221 leads to a decrease in the vascularization of the AT and consequently an increase in hypoxia and inflammation, as suggested by other authors (Meerson A *et al.*, 2013). In our studies with cells and murine AT, we have not detected changes in the expression of this gene.

Our results also suggest the possible relationship between miR-210 and T2DM and that an interaction between T2DM and tissue may influence their level of expression. According to our suggestion, there are studies that show that the expression level of miR-210 in SAT of subjects with overweight and obesity has been related to changes in body weight (Giardina S *et al.*, 2018) and during T2DM, as a plasma biomarker of the progression of the disease (Delic D *et al.*, 2016).

Our results suggest, in addition, the possible relationship between miR-15b, miR-20a, miR-20b, miR-27b, miR-126, miR130a, miR-221, miR-296 and Let-7f and an interaction between obesity and type of AT. According to this suggestion, it has been described that some of these miRNAs are related to adipocyte differentiation (Aval SF *et al.*, 2018; Chou WW *et al.*, 2013), obesity (Arner E *et al.*, 2012; Shi C *et al.*, 2016; Brennan E *et al.*, 2017), hypocaloric diet and exercise or diet high in fat (Kristensen MM *et al.*, 2017; Liu W *et al.*, 2017), in the regulation of AT functionality both in SAT and in VAT (Meale SJ *et al.*, 2014) and as biomarkers in relation to BMI and diet types (Munetsuna E *et al.*, 2017; Marques-Rocha JL *et al.*, 2016). However, the mechanisms that regulate this relationship are not fully clarified.

We show how some miRNAs target genes were differentially expressed in SAT and VAT in relation to obesity and T2DM and that these genes are involved in angiogenesis, response to hypoxia or apoptosis, which play an important role in the regulation of AT functionality. In this way, we show that *BCL2L11* is regulated upward in the VAT of obese subjects and downward in the same tissue in diabetic subjects. These results were in agreement with others performed on mice (Singh R *et al.*, 2009). We showed in the enrichment analysis that *BCL2L11* is involved in the apoptosis pathway. On the other hand, we show that *PTEN* is down regulated in VAT of diabetic patients. This gene was identified as a participant in response to hypoxia in our enrichment analysis. Meanwhile, other authors associate it with proliferation and apoptosis (Zhou L *et al.*, 2016). These results suggest that an increase in the expression of miR-221, miR-222, miR-20 a, miR-20b in VAT could lead to a down-regulation of target genes related to apoptosis and response to hypoxia. These mechanisms could lead to a dysfunction of the AT and consequently T2DM induced by obesity.

On the other hand, there are studies that relate the expression of Let-7f with a protective effect in the regulation of inflammation associated with T2DM (Brennan E *et al.*, 2017). Other authors show Let-7f and miR-20b as biomarkers related to obesity and weight loss (Hsieh CH *et al.*, 2011), with IR (Flowers E *et al.*, 2015) and with T2DM (Frost RJ *et al.*, 2011; Villard A *et al.*, 2015; Zampetaki A *et al.*, 2010). We show for the first time a possible connection between obesity, T2DM and the expression of miR-20b, miR-296 and Let-7f in the human VAT and SAT. In parallel, we show that miRNAs target genes, which are mainly involved in the regulation of the *VEGF* and *WNT* pathways, had a differential expression profile that depends on obesity, T2DM and AT depots. Consistent with these results, it has been described that miR-20b, miR-296 and let-7f are involved in the regulation of the *WNT* signalling pathway and angiogenesis through the regulation of

multiple target genes belonging to these pathways (Egea V *et al.*, 2012; Wang W *et al.*, 2012; Dhari W *et al.*, 2017). Our results show specifically that SAT, *CDKN1A*, *NAT10* and *SSSCA1* seem to be related to obesity, whereas *CDKN1A*, *ECE1*, *KDR*, *NAT10*, *NOS3* and *PPP2R1B* seem to be rather related to T2DM, suggesting that miR-20b, miR-296 and Let-7f could be related to obesity and T2DM through the regulation of VEGF pathways, WNT signalling, FGF signalling and MAPK cascade, which are the pathways mainly regulated by these target genes. According to these results it has been described that *PPP2R1B*, *MYC* and *TNF* are involved in the WNT signalling pathway, while *VEGFA*, *HIF1A* and *STAT3* are well described as the key regulators of angiogenesis and the VEGF signalling pathway (Suraweera N *et al.*, 2006; Lapeire L *et al.*, 2014; Xu J *et al.*, 2016; Engin A *et al.*, 2017; Yang R *et al.*, 2018; Feng J *et al.*, 2014; Liao ZJ *et al.*, 2008). In addition, *MPP3* is well known to play a pivotal role in restructuring the extracellular matrix of epithelial cells (Murakami S *et al.*, 2014), *NAT10*, *PPP2R1B* and *WDR20* are key regulators of apoptosis pathways (Feng J *et al.*, 2014; Liu X *et al.*, 2016; Takahashi M *et al.*, 2016) and *RET* is a regulator of cell proliferation (Alao JP *et al.*, 2014; Franz H *et al.*, 2015).

On the other hand, our results show specifically that, in VAT, the target genes *CDKN1A*, *GLUL*, *GPI*, *IL1B*, *MPP3*, *STAT3*, *VEGFA* and *ZNF274* seem to be predominantly related to obesity, whereas *CDKN1A*, *CX3CL1*, *GLUL*, *GPI*, *PPP2R1B*, *VEGFA*, *WDR20* and *ZNF274* seem to be particularly related to T2DM. These results suggest that miR-20b, miR-296 and Let-7f could be related to obesity and T2DM through the regulation of VEGF pathways, WNT signalling, inflammation, apoptosis and interleukins, which are the pathways mainly regulated by these target genes. According to our suggestion, these pathways, which are interrelated, have been well described to play an important role in weight gain and the appearance of obesity associated with T2DM. Explicitly, it has been

described that CDKN1A, MYC is related to obesity (Boqué N *et al.*, 2009; Deisenroth C *et al.*, 2014), while CX3CL1, ECE1, STAT3 TNF, GLUL and IL1B are related to obesity and inflammation associated with T2DM (Alexander R *et al.*, 2011; Shah R *et al.*, 2015; Nandispati KC *et al.*, 2017). Other studies have described that HIF1A, KDR, VEGFA, GPI and NOS3 were mainly associated with IR and angiogenesis associated with obesity (Song MG *et al.*, 2016; García Fuentes E *et al.*, 2015; Georgescu A *et al.*, 2011), and it has been described that ZNF274 is related to obesity and IR (Ahrens M *et al.*, 2013). To the best of our knowledge, this is the first comprehensive study to apply multivariate analysis to investigate the interaction between these two AT, visceral and subcutaneous, and three miRNA molecules (miR-20b, miR-296 and Let-7f) and to evaluate in silico their potential target genes. In this way, we were able to prioritize six target genes (CDKN1A, CX3CL1, HIF1A, PPP2R1B, STAT3 and VEGFA), which were significantly different in their expression profile both in VAT and in SAT in patients with obesity and T2DM, which suggest that these three miRNAs molecules could play an important role in the metabolic homeostasis of obesity and T2DM at the AT level, which could be mediated by six different genes.

On the other hand, miR-221 could be regulating IL1RAP when it is over-expressed in adipocytes of the 3T3-L1 cell line. IL1RAP is described as an inflammatory cytokine. The IL-1 family of cytokines has an important role in the endocrinology and regulation of responses associated with inflammatory stress (Banerjee M *et al.*, 2012), related to apoptosis (Barreyro L *et al.*, 2012) and described as an obesity biomarker (Bozaoglu K *et al.*, 2014). In addition, we showed in our *in vivo* study that an over-expression of miR-222 could also be regulating IL1RAP in the VAT of obese mice without T2DM. On the other hand, in the Arrays we have found that this gene is down-regulated ($p = 0.028$) in the VAT of obese patients with T2DM when compared with obese patients without

T2DM. In this way, we can suggest that miR-221 and miR-222 could be regulating the functionality of AT through IL1RAP in relation to obesity and DMT2.

In the study with DIO mice treated with miR-221 and miR-222 mimic, we were able to determine that these miRNAs were overexpressed both in the VAT and in the SAT and that some genes involved in some angiogenesis regulatory pathways, apoptosis, adipogenesis and insulin signalling could be regulated by these miRNAs. In agreement with our results, it is described that miR-221 and miR-222 are related to metabolic syndrome, insulin sensitivity and BMI (Deiuliis JA *et al.*, 2016). As well as, related to the angiogenic capacity and the regulation of genes involved in this pathway (Song MG *et al.*, 2016; Hagberg CE *et al.*, 2010).

To the best of our knowledge, there are no studies showing regulation of *FABP4* by miR-221 and miR-222. However, our results are not clear. Although the overexpression of miR-221 and miR-222 in 3T3-L1 cells seems to show a regulation of *Fabp4*, further studies will be necessary to confirm this fact, since at the *Fabp4* expression level in AT of DIO mice was undetectable. FABP4, known for its role in the transport of fatty acids, is involved in the terminal phase of adipogenic differentiation (Brey C *et al.*, 2009; Makowsky L *et al.*, 2005) and is predominantly expressed in macrophages and adipose tissue, where it regulates lipolysis and the storage of fatty acids. In addition, it is an important inflammation mediator (Floresta G *et al.*, 2017). On the other hand, *Ppar γ* expression level in 3T3-L1 cells seems to be regulated by miR-222, whereas, in VAT from our mice, this seems to be regulated by miR-221. PPAR γ is involved in the early phase of adipogenesis by its activation with C / EBP α (Ali AT *et al.*, 2013). Therefore, we believe that more studies are necessary to confirm.

Finally, the results of the epigenetic study show changes in methylation levels, at the SAT level in target genes of some of the miRNAs studied in this work. Thus, our find added

new data on the fact that the epigenetic regulation through the methylation of the genes involved in processes related with adipose tissue as such as metabolic pathways, interleukin and VEGF signalling pathways, glucose transport, etc. could also be a crucial mechanism in the regulation of the functionality of the adipose tissue in relation to the obesity. In agreement with our results, other authors have presented evidence that DNA methylation is a key mechanism of epigenetic regulation to suppress the expression of some of the methylated genes in this study: *CPS1*, *ELMO1*, *STEAP3* (Liu H *et al.*, 2011; Whitaker JW *et al.*, 2015; Paliwal A *et al.*, 2013). To our knowledge, there are no previous studies showing the methylation of *CPS1*, *ELMO1*, *IQCE*, *MDGA1* and *STEAP3* at the level of AT related to obesity. This fact indicates the originality of our study. However, we believe that it would need to be expanded to determine if the observed changes correspond to changes in the methylation levels of the promoters of these genes and if they translate into changes in the expression levels of the target genes. An integration of miRNA, DNA methylation and gene expression profiles can help to extract new biological knowledge by establishing associations between epigenetic interactions and clinical outcomes, as highlighted by Shivakumar M *et al.*, 2017. In addition, to know the susceptibility or resistance to the development of obesity and IR, could be determined if epigenetic changes are induced through the diet (acquired epigenetic phenotype) or hereditary genetic modifications.

II. INTRODUCCIÓN



II.1.- Obesidad.

II.1.1. Epidemiología.

Según los últimos datos emitidos por la Organización mundial de la salud (OMS) la obesidad ha alcanzado proporciones epidémicas a nivel mundial y constituye un grave problema de salud pública. Este informe estima que la obesidad es el quinto factor de riesgo de muerte y que 2,8 millones de personas mueren cada año por enfermedades relacionadas con la obesidad. Las últimas estimaciones de este organismo mundial indican que en 2016 el 39% de las personas > 18 años tenían sobrepeso y el 13% eran obesos y que 41 millones de niños tenían sobrepeso u obesidad. La OMS advierte que con el aumento del índice de masa corporal (IMC) aumenta también el riesgo de padecer otras enfermedades graves como hipertensión, cardiopatías, diabetes y algunos tipos de cánceres. En España, el estudio ENRICA (Estudio de Nutrición y Riesgo Cardiovascular) recogió información desde junio de 2008 hasta octubre de 2010 sobre más de 12.000 personas en todas las comunidades de España. La prevalencia de sobrepeso fue de 39.4% y la obesidad abdominal de 22,9% (Rodríguez-Artalejo F y col., 2011). Por otro lado, el estudio Di@betes cuyo objetivo fue comparar la prevalencia de obesidad según el área geográfica, muestra a Andalucía (37%) frente al resto de España (26 6%) (Valdés S y col., 2014).

La obesidad se caracteriza por un aumento de tejido adiposo (TA) como resultado de un estado de balance energético positivo y por un estado inflamatorio crónico de bajo grado, que se considera factor clave para el desarrollo de comorbilidades relacionadas con la obesidad. Dependiendo del grado y la duración de la ganancia de peso, la obesidad puede causar progresivamente y/o exacerbar un amplio espectro de comorbilidades (Golia E y col., 2014). El exceso de TA está acompañado de un aumento en el riesgo de RI (RI) y diabetes mellitus tipo II (DMT2) (Kyrou I y col., 2014). La relación entre dichas

complicaciones está bien establecida, sin embargo, los mecanismos que la explican no están totalmente definidos (Gorán MI y col., 2012).

II.2 Tejido adiposo.

II.2.1 Generalidades

El TA tiene un origen mesenquimal y está formado por adipocitos, que son células que acumulan lípidos en su citoplasma y cuyo tamaño oscila entre 10 y 200 micras.

Los adipocitos tienen, entre otras, tres funciones principales: a) son sensibles a la insulina, (b) almacenan lípidos y (c) secretan hormonas, algunas de las cuales actúan en tejidos distantes. La interrupción de cualquiera de estas funciones de los adipocitos resulta en un estado de enfermedad metabólica que aumenta el riesgo para padecer, por ejemplo, DMT2. Hay diferentes tipos de adipocitos que se pueden clasificar en tres tipos principales basados, en parte, por el color del TA: blanco, marrón y beige (Fig.1). La función global de los adipocitos blancos es almacenar energía, mientras que la función de los adipocitos marrones es disipar la energía en un proceso de producción de calor denominado termogénesis. La función y el origen de las células beige, descritas recientemente, es menos claro y es objeto de intensa investigación (Harms M y col., 2013). El TA blanco (TAB), es el más abundante del organismo humano adulto y por lo tanto el mayor reservorio energético, en forma de Triglicéridos (TG). Los adipocitos maduros del TAB tienen el perfil de expresión necesario para la síntesis de triacilglicerol, captación de glucosa, lipogénesis y lipólisis. Este fenotipo permite que cuando el aporte energético es excesivo y/o el gasto energético disminuye, el exceso de energía se deposite en forma de TG, en cambio, cuando la situación es de escasez de ingesta energética y/o un aumento del gasto energético el TAB moviliza los depósitos de lípidos liberando ácidos grasos y glicerol que son transportados por la sangre hacia los

tejidos, donde son oxidados para obtener energía (Esteves-Rafols M y col., 2014). En las últimas décadas ha cambiado radicalmente el concepto de TAB, considerándose, hoy en día, un órgano endocrino que secreta numerosos factores con funciones autocrinas, paracrinas y endocrinas, y que tiene un papel importante en procesos fisiológicos como el desarrollo y crecimiento del adipocito y la homeostasis energética. Pero también, participa en otros procesos metabólicos como angiogénesis, respuesta inmunitaria, etc., por lo tanto, debe mantener su funcionalidad y ésta se ve afectada con la obesidad (Medina-Gomez G y col., 2009). Distintos estudios muestran perfiles de expresión diferentes para adipocitos maduros provenientes del TA marrón (TAM) o TAB por lo que se asume especificidad de tejido. Además, actualmente se ha visto que la función endocrina no es exclusiva de TAB ya que muchos factores reguladores de procesos fisiológicos son sintetizados también por TAM (Esteves-Rafols M y col., 2014). Por otra parte, tampoco podemos hablar del TAB como un solo tejido, porque las diferentes localizaciones de éste, muestran un perfil metabólico diferente, con comportamiento y consecuencias fisiológicas también algo distintas. Por ello, debemos diferenciar entre TA Subcutáneo (TAS) y TA visceral (TAV). Desde que, en 1947, el Profesor Jean Vague, un médico francés de la Universidad de Marsella, informó por primera vez en una revista médica francesa, observaciones clínicas que los pacientes con hipertensión, las enfermedades cardiovasculares, la gota y la diabetes no eran necesariamente más obesos que los pacientes sin estas complicaciones (Vague J, 1947), hasta hoy, muchos estudios se han realizado sobre este tema. Él introdujo el término “obesidad androide” o “tipo manzana” para referirse al TA acumulado preferentemente en la zona del tronco superior del cuerpo y sugirió que se trataba de una forma de obesidad estrechamente asociada a la diabetes y enfermedades del corazón. También propuso el término “obesidad ginoide” o “tipo pera” para referirse a la acumulación preferencial de

TA en las caderas y los muslos, por lo general se describe como la obesidad femenina, una forma mucho menos asociada con complicaciones. Décadas más tarde, su primera contribución fue finalmente reconocida, ya que cientos de estudios apoyan ahora la idea de que la topografía de la grasa corporal está correlacionada con homeostasis de la glucosa y RI (Hayashi T y col., 2003); Tchernof A y col., 2013). El TAS, en condiciones normales, representa el 80% del TA, mientras que el TAV representa menos del 20%. El TAV está constituido por adipocitos de un tamaño más reducido, con menor capacidad de almacenamiento, más vascularizado, con una mayor inervación simpática y con gran número de receptores β_3 adrenérgicos, lo que facilita una mayor actividad metabólica (Esteves-Rafols M y col., 2014). Se han observado notables diferencias morfológicas entre estos compartimentos de TA. En concreto, los lóbulos de grasa de la capa de TAS superficial se organizan de manera regular, mientras que los de la capa subcutánea profunda y compartimientos internos, especialmente el epiplón mayor, son grandes, irregulares y menos organizados. La vascularización, el flujo de sangre, y la inervación también pueden ser muy diferentes entre los distintos compartimentos (Ibrahim MM y col., 2010). Actualmente se sabe que las distintas localizaciones de TAB tienen características metabólicas y endocrinas diferentes, por ejemplo, el TAV tiene un perfil de secreción de adipocinas relacionado con la inflamación y DMT2, mientras que el TAS muestra una menor secreción de adipocinas proinflamatorias. De esta forma, el riesgo a padecer distintas enfermedades está relacionado con la distribución de los depósitos de grasa, aunque algunas veces, pueden contribuir factores genéticos (Esteves-Rafols M y col., 2014). También, hay que tener en cuenta que además del adipocito, las células del estroma vascular tienen importancia en el TAB y se ha demostrado que en sujetos obesos el 60% (TAS) y 80% (TAV) no está formado por adipocitos maduros, sino por células del estroma vascular, y se estima que tanto pre-adipocitos como macrófagos están en un

10% cada uno, lo que demuestra su importancia en el estado de inflamación. El equilibrio entre estos diferentes tipos celulares, así como su perfil de expresión, están estrechamente relacionados con el mantenimiento de homeostasis energética. El incremento del tamaño de los adipocitos y, el número y tipo de linfocitos y macrófagos infiltrados en éste está estrechamente relacionado con las enfermedades del síndrome metabólico. El estudio de la regulación de la proliferación y diferenciación de pre-adipocitos, células madre, así como la comprensión de la interrelación entre los diferentes tipos celulares, nos van a aportar nuevas dianas para actuar frente a estas patologías (Esteves-Rafols M y col., 2014).

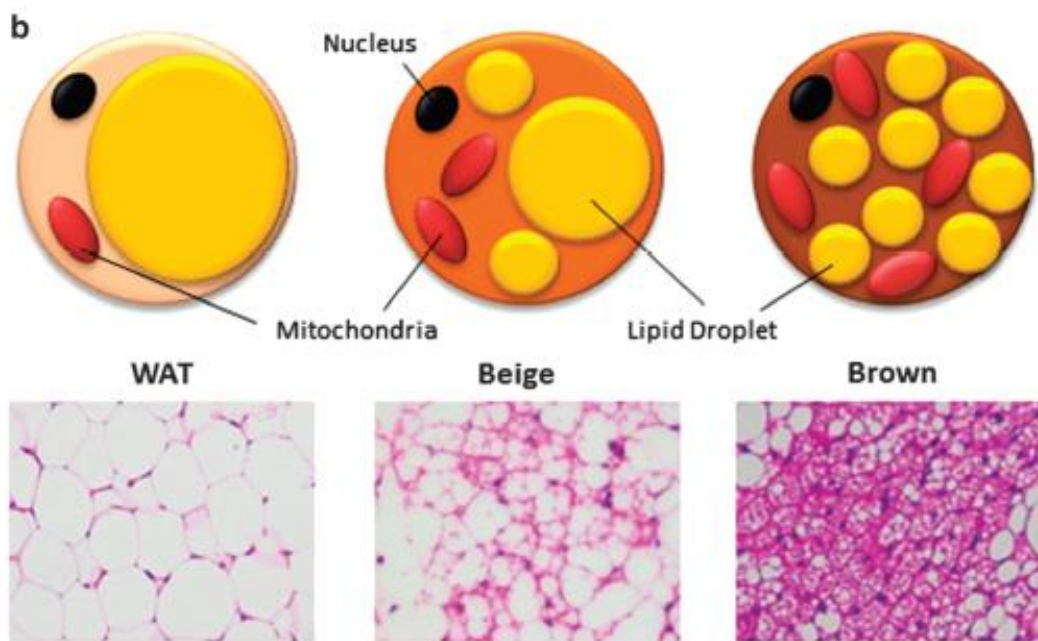


Fig1. Morfología del TA y adipocitos. Diferencia morfológica entre adipocitos del TA blanco (TAB), beige y marrón (Brown) son mostrados en figura y con cortes histológicos teñidos con hematoxilina/eosina (Kwok KH y col., 2016)

II.2.2 Expansión del tejido adiposo y lipotoxicidad

El crecimiento del TA en respuesta al aumento de la demanda de almacenamiento de lípidos se puede producir mediante hiperplasia (aumento del número) o hipertrofia (aumento del tamaño) de los adipocitos. Durante el crecimiento, la adiposidad aumenta principalmente a través de hiperplasia y en la edad adulta por hipertrofia, es decir que la capacidad de los pre-adipocitos para llegar a ser maduros funcionalmente disminuye con la edad y esto se ha demostrado porque la expresión del regulador clave de la adipogénesis, PPAR γ (Receptor Activado por Proliferador de peroxisoma tipo gamma), es menor en adultos. PPAR γ es un receptor nuclear que regula los genes asociados con el crecimiento y la diferenciación de TA mediante la coordinación de la expresión de cientos de genes responsables de la creación del fenotipo del adipocito maduro. Se ha visto que la disminución de su expresión podría facilitar la acumulación de grasa en otros tejidos y contribuir así al desarrollo de enfermedades metabólicas y a la RI (Medina-Gomez G y col., 2007). La expansión del TA es muy importante a la hora de acumular grasa, así, es posible estar obeso sin presentar complicaciones metabólicas, siempre y cuando uno sea capaz de aumentar el TA. Estudios recientes han demostrado que un defecto genético en la expansión del TA puede acelerar el proceso de RI (Medina-Gomez G y col., 2009). Es decir, un paciente obeso que tiene saturada la capacidad de almacenar lípidos en el TA, acumula esa grasa en otros órganos y desarrolla dislipemia y RI, mientras que un paciente obeso que sí puede aumentar su capacidad de almacenar lípidos en su TA no desarrolla dislipemia ni RI. También se ha podido observar que el aumento de masa del TAS disminuye el riesgo de RI, mientras que el aumento de masa del TAV lo acrecenta (Corvera S y col., 2014). La expansión del TAS tiene efecto protector ya que permite el depósito de TG allí, y no en otros tejidos viscerales de forma ectópica. El exceso de acumulación de TA intraabdominal, a menudo llamada obesidad visceral, es parte de un

fenotipo que incluye disfunción de la expansión del TA y el almacenamiento ectópico de TG estrechamente relacionado con la agrupación de factores de riesgo cardiometabólico. La hipertrigliceridemia, aumento de la disponibilidad de ácidos grasos libres, liberación de citoquinas proinflamatorias del TA, RI, inflamación del hígado, aumento de la síntesis y secreción hepática de VLDL, reducción de la depuración de las lipoproteínas ricas en triglicéridos, presencia de partículas de LDL pequeñas y densas, y reducción de los niveles de colesterol HDL son de las muchas alteraciones metabólicas estrechamente relacionados con esta condición. La edad, el género, la genética y el origen étnico son factores etiológicos generales que contribuyen a la variación en la acumulación de TA visceral. Características fisiológicas de los tejidos adiposos abdominales como el tamaño y el número de los adipocitos, la capacidad de respuesta lipolítica, la capacidad de almacenamiento de lípidos, y la producción de citoquinas inflamatorias están correlacionadas e incluso catalogadas como posibles determinantes del aumento del riesgo cardiometabólico asociados a la obesidad visceral. En la práctica clínica, la medición de la circunferencia de cintura, además del índice de masa corporal podría ser útil para la identificación y gestión de un subgrupo de pacientes obesos con alto riesgo cardiometabólico (Tchernof A y col., 2013). Según Tinahones Madueño F J, 2016), existen cuatro factores con influencia directa sobre la capacidad de expansión del TA y su funcionalidad y que utilizadas como diana podrían ayudar a explicar la existencia de sujetos obesos metabólicamente sanos: (a) Capacidad lipogénica del TA, (b) Capacidad adipogénica por neoformación a partir de células progenitoras, (c) Vías apoptóticas y anti-apoptóticas y (d) Capacidad angiogénica.

II.3 Adipogénesis.

La adipogénesis es el proceso de diferenciación de pre-adipocito a adipocito maduro y puede describirse en cuatro etapas. Primeramente, se detiene la proliferación mediante inhibición por contacto, indicando así que se ha llegado a la confluencia y a partir de ese momento el pre-adipocito queda comprometido a diferenciarse en adipocito (determinación). Posteriormente se produce una expansión clonal inducida por señales hormonales, es decir, se dan divisiones mitóticas para sincronizar el ciclo celular. La tercera etapa comienza cuando se detiene la división celular y empiezan a expresarse algunos genes característicos de adipocitos, iniciándose así la acumulación de lípidos. La cuarta y última etapa es la diferenciación terminal en la que se induce la transcripción de genes típicos de adipocito maduro. La coordinación de estos estadios está controlada por una compleja cascada transcripcional de factores reguladores en la que participan fundamentalmente el receptor nuclear PPAR α y varios miembros de la familia C/EBP (Proteínas de unión al potenciador CCAAT) para la diferenciación del adipocito blanco, mientras que otros factores son los encargados de la diferenciación del beige y marrón (Fig.2) (Esteves-Rafols M y col., 2014; Rodriguez A y col., 2015). Los pre-adipocitos son células pequeñas que estimuladas adecuadamente se diferencian en adipocitos maduros. Como ya se dijo, la masa de TA en el adulto está determinada por el número de adipocitos, reflejo del equilibrio entre proliferación, diferenciación y apoptosis y por el incremento del tamaño de estos, que depende del balance entre lipogénesis y lipólisis. La capacidad de los pre-adipocitos para proliferar y diferenciarse, así como para sufrir apoptosis difiere según la localización del tejido, lo que puede explicar las diferencias que se encuentran en la deposición de grasa en humanos obesos. Hay estudios que demuestran que durante la infancia y adolescencia se fija el número de adipocitos y se

mantiene prácticamente constante en la edad adulta, encontrándose que solo un 10% del total de adipocitos son regenerados cada año (Esteves-Rafols M y col., 2014).

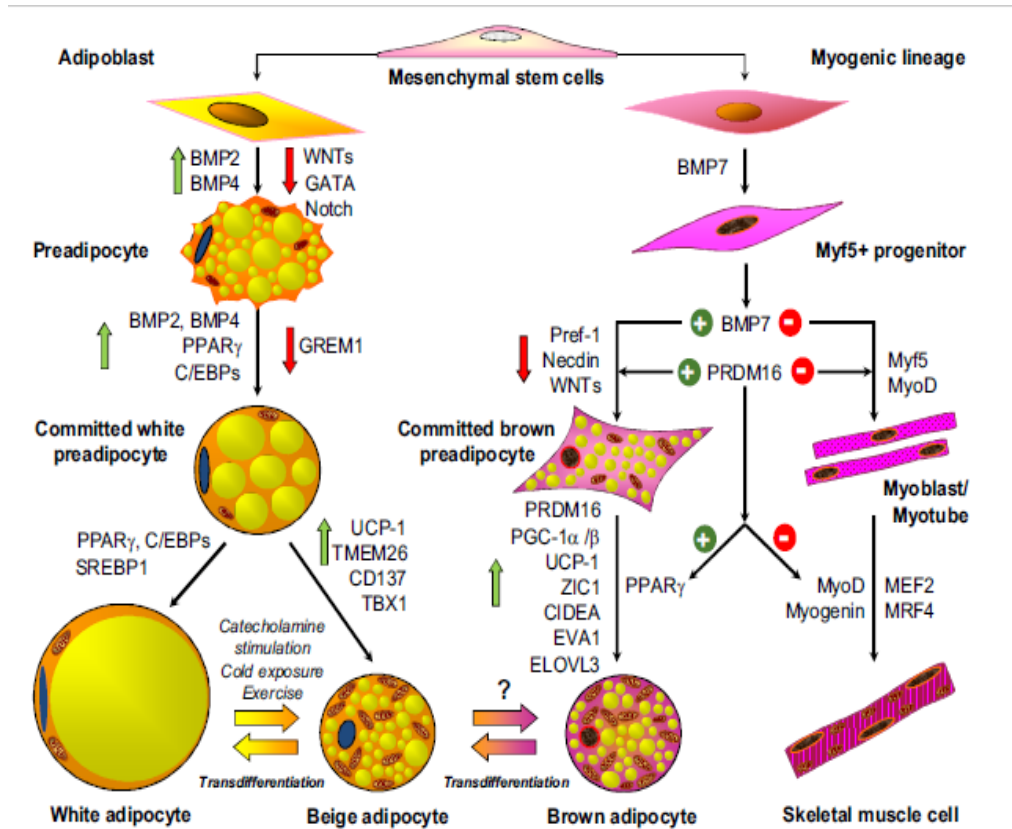


Fig.2. Adipogénesis. La diferenciación del adipocito es un complejo proceso orquestado por múltiples factores (Rodríguez A y col., 2015).

II.3.1. Principales factores reguladores de la adipogénesis del tejido adiposo blanco

Los principales factores reguladores de la adipogénesis son el receptor nuclear activado por proliferador de peroxisomas tipo gamma (PPAR γ) y las proteínas de unión al potenciador (C/EBP).

Los PPAR son receptores nucleares que funcionan como factores de transcripción activados por ligando que regulan la expresión de genes. Intervienen en diferentes vías biológicas tales como diferenciación celular, desarrollo y metabolismo (de lípidos, proteínas e hidratos de carbono). Son requeridos en la génesis, diferenciación, y

migración celular, así como también para equilibrar la proliferación y muerte celular. Asimismo, participan en el control de la inflamación. Todos los PPARs heterodimerizan con el receptor retinoide X (RXR) y se unen a regiones específicas en el ADN de los genes diana (Brey CW y col., 2009). Estas secuencias de ADN se denominan PPREs (elementos de respuesta de proliferador de peroxisomas) y regulan la transcripción génica (Mandard S y col., 2013). Se han identificado tres tipos: PPAR alfa, delta y gamma. PPAR α es esencial para el desarrollo del TA y el control de la sensibilidad a la insulina. Existen dos isoformas; PPAR α 1 y PPAR α 2. La isoforma 1 se expresa en varios tejidos y tipos celulares, incluyendo TAB y TAM, músculo esquelético, hígado, células beta del páncreas, macrófagos, colon, hueso y placenta. La isoforma 2 es una variante de splicing restringida al TAB y marrón bajo determinadas condiciones fisiológicas. Se ha demostrado que PPAR α es necesario para la diferenciación de los adipocitos y también para el mantenimiento de la diferenciación. Cuando se silencia PPAR α en adipocitos 3T3-L1 ya diferenciados, se induce des diferenciación con pérdida de lípidos y disminución de la expresión de los marcadores de adipocitos maduros (Esteves-Rafols M y col., 2014). La marcada expresión de PPAR γ en TA obedece a su función protectora, aumentando la adipogénesis genera más sitio para el depósito de grasa evitando así que ésta se deposite ectópicamente. Alteración en la función de PPAR γ conduce a enfermedad metabólica. Las proteínas de unión al potenciador CCAAT (C/EBP), son una familia de factores de transcripción que incluye 5 miembros: C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ , C/EBP ϵ y CHOP. Durante la diferenciación, estos factores se expresan de forma secuencial, se necesita la expresión temprana de C/EBP β y C/EBP δ para promover la expresión de C/EBP α y C/EBP ϵ los cuales son necesarios para la diferenciación total de los adipocitos. La expresión de C/EBP β en los primeros estadios de diferenciación parece ser muy importante ya que experimentos con animales deficientes en este factor han mostrado una

masa reducida de TA (Esteves-Rafols M y col., 2014). El modelo actual de diferenciación de adipocitos (Fig.3), sugiere que durante todo el proceso de diferenciación hay interacciones moleculares esenciales que se producen entre los miembros de C/EBP y PPAR γ . C/EBP β y C/EBP δ inducen la expresión de C/EBP α y C/EBP γ y estos inducen la expresión de PPAR γ , el cual forma un hetero dímero con el RXR y regula el programa adipogénico que es requerido para promover la diferenciación de las células grasas. A su vez, PPAR γ y C/EBP α inducen cada uno la expresión del otro en una retroalimentación positiva que permite mantener el estado diferenciado de las células (Ali AT y col., 2013). Estudios recientes muestran que cualquier nivel anormal de PPAR γ 1 y PPAR γ 2 conlleva a no formar TAB y a formar poca cantidad de TAM. Mutaciones genéticas de PPAR γ ocurridas en mamíferos son asociadas con lipodistrofias. Resultados parecidos se han encontrado cuando la función de C/EBP está dañada (Ali AT y col., 2013). Se ha demostrado que PPAR γ es a la vez necesario y suficiente para la diferenciación de los adipocitos pues con su sobre expresión se pudo rescatar la diferenciación de adipocitos de células con deficiencia de C/EBP. Lo contrario no se ha demostrado. Actualmente se plantea la posibilidad de que C/EBP puede regular directamente la adipogénesis, pero de manera cooperativa con PPAR γ , ya que se ha visto que co-ocupa muchos de los promotores de genes diana de PPAR γ (Ali AT y col., 2013). Además de estos dos factores adipogénicos fundamentales descritos, hay muchos otros que también participan en este proceso. A continuación, se describirán dos debido a su relevancia en los adipocitos: SREBPs y FABPs

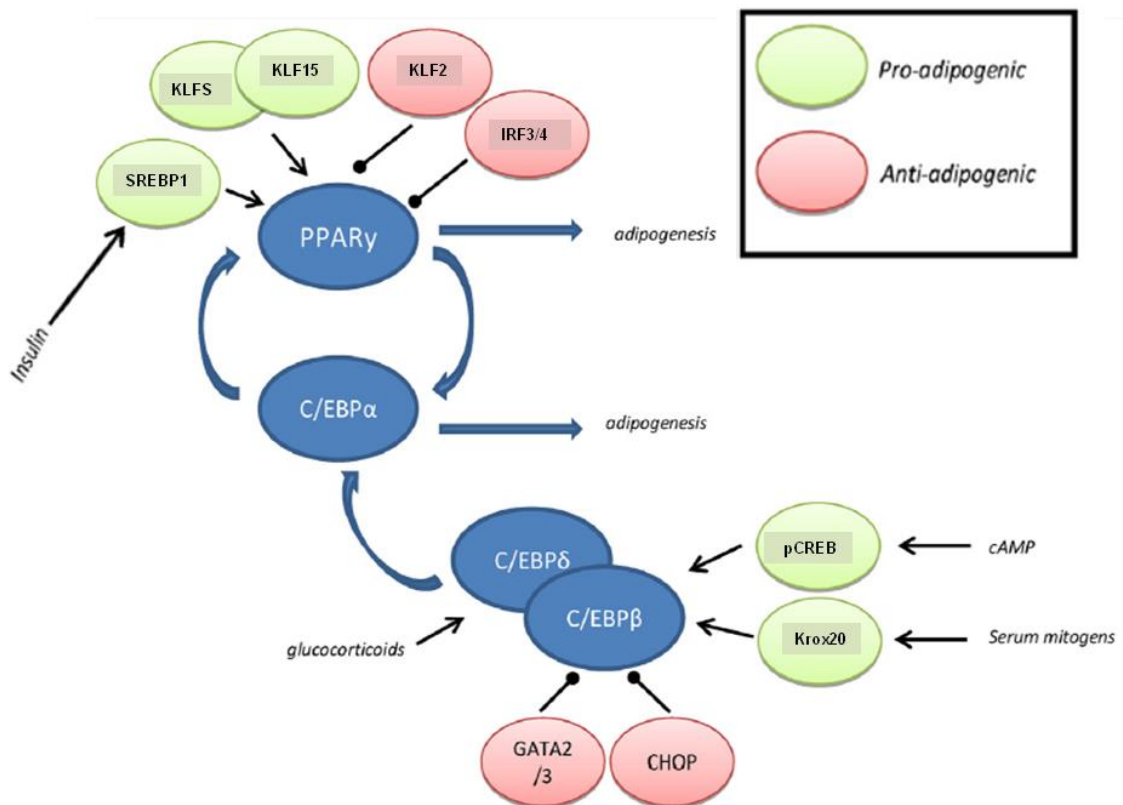


Fig.3.- Cascada transcripcional adipogénica. Ciertos inductores activan varios factores de transcripción que convergen en PPAR γ . PPAR γ induce posteriormente la expresión de C/EBP y en conjunto, estos factores supervisan la terminación de la adipogénesis (Ali AT y col., 2013).

SREBPs, proteínas de unión al elemento regulador de esteroides (SREBPs) regulan la homeostasis de los lípidos mediante el control de la expresión de una serie de enzimas necesarias para el colesterol endógeno, ácidos grasos, triacilglicerol y síntesis de fosfolípidos. La proteína SREBP es esencialmente una proteína de limpieza responsable de la regulación de la composición de los lípidos de las membranas celulares, lo que contribuye a homeostasis de lípidos general. Hay tres isoformas conocidas: SREBP-1a, SREBP-1c y SREBP-2. Sin embargo, cada una de las isoformas de SREBP posee regulación exclusiva y propiedades de activación que facilitan la regulación coordinada del metabolismo de los lípidos y se encuentra como un precursor unido a la membrana en el retículo endoplásmico. Los lípidos de membrana (esteroides y ácidos grasos poliinsaturados) controlan la actividad de SREBP a través de mecanismos de

retroalimentación. Mientras que SREBP-1a y SREBP-1c inducen selectivamente la expresión de genes implicados en la biosíntesis de ácidos grasos, SREBP-1c, además, participa en la diferenciación de adipocitos. Hay estudios que han demostrado que la expresión de SREBP-1c aumenta en respuesta a la insulina, en los adipocitos 3T3-L1 y, a su vez supuestamente controla la regulación de la adipogénesis. Por analogía, la expresión ectópica de un dominante negativo de SREBP-1c impide la diferenciación de pre-adipocitos y facilita la actividad PPAR a través de la producción de un ligando endógeno (Brey CW y col., 2009). Elevados valores plasmáticos de colesterol-LDL producidos por una dieta rica en colesterol (≥ 100 mg/dl) se correlaciona inversamente con los niveles de colesterol del Retículo endotelial (colesterol endógeno) lo que se traduce en biosíntesis de colesterol por activación de SREBP (Horton JD y col., 2002).

Las proteínas de unión a ácidos grasos (fatty acid binding proteins) (FABP) constituyen una familia de proteínas intracelulares de 14-15 kDa, capaces de unirse con gran afinidad a ácidos grasos, implicadas en el transporte intracelular de éstos hacia enzimas y compartimientos celulares, y en la modulación del metabolismo lipídico intracelular y de la expresión génica. La proteína de unión a ácidos grasos de adipocitos (Adipocyte fatty-acid binding protein) (FABP4 o aP2), es una de las proteínas intracelulares mejor caracterizada, responsable del transporte lipídico. Representa el 5% del total de proteínas intracelulares del adipocito maduro. Su principal función parece ser como chaperona citoplasmática de ácidos grasos de cadena larga, los cuales son transportados a los compartimientos subcelulares para el metabolismo o la secreción después de lipólisis. Resulta bien conocido que existe cierto paralelismo entre la biología de los adipocitos y los macrófagos, ya que diversos genes clave de las células adipocitarias se expresan también en macrófagos, donde desempeñan un papel significativo. Éste es el caso de FABP4 que fue inicialmente descrita en TA, pero que se expresa también en macrófagos

de ratón y humanos (Uysal K y col., 2000). Por otra parte, en ratones FABP4^{-/-}/apoE^{-/-} se observa una importante disminución en el tamaño de las lesiones ateroscleróticas. La FABP4 del macrófago tiene una función clave en ese aspecto, ya que, en los macrófagos aislados de estos animales, se observa una reducción en la expresión de citocinas proinflamatorias y menor acumulación de colesterol intracelular (Makowsky L y col., 2005). FABP4 también se encuentra circulante en el plasma, y en los últimos años diversos trabajos se han centrado en estudiar su función en circulación. Sin embargo, aún no se ha determinado, ni la vía de secreción ni la función plasmática de FABP4. Varios grupos han demostrado que la concentración de FABP4 plasmática se asocia con la distribución de grasa corporal y está incrementada en pacientes con obesidad, síndrome metabólico, DMT2, hÍper lipemia familiar combinada o síndromes de lipodistrofia (Cabré A y col., 2010). Otros estudios muestran correlación de FABP4 y RI y han postulado FABP4 como marcador productor de la aparición de alteraciones metabólicas (Xu A y col., 2007). Los niveles de FABP4 también han sido asociados a la presencia de enfermedad cardiovascular (Aragón G y col., 2011). No obstante, el papel causal de FABP4 en estos procesos no ha sido establecido. Existen evidencias de que FABP4 circulante es capaz de mediar indirectamente la RI, la dislipemia alergógena y promover la infamación, y ha sido asociada al grosor de la íntima-media de las carótidas y al volumen de placa de ateroma medido por sonografía intravascular. Además, un estudio reciente presenta un impacto directo de FABP4 circulante en las células del músculo miocárdico produciendo una disminución de la contractibilidad de los cardiomiocitos, sugiriendo que FABP4 circulante puede tener un efecto directo sobre las células y los tejidos periféricos. La hipótesis del estudio es que las concentraciones elevadas de FABP4 en plasma observadas en los pacientes con obesidad, Síndrome Metabólico y DMT2

pueden estar implicadas en favorecer el daño vascular que aparece en estas condiciones (Aragonés G y col., 2011).

II.4 Angiogénesis

Hay varias líneas de investigación que sugieren que el crecimiento del TA podría estar limitado por su vasculatura y de allí que la angiogénesis del TA y su modulación están siendo estudiadas en profundidad. El crecimiento y la función de los tejidos dependen de su vascularización para funcionar y crecer. El TA es sumamente plástico, se expande frecuentemente durante la vida siendo constantemente remodelado, junto con el aumento de peso por lo que requiere nueva vasculatura que en este tejido ocurre a través de angiogénesis. La pérdida de peso se asocia con regresión de los vasos sanguíneos, situación que ha sido poco estudiada y por ello para el tratamiento de la obesidad se da un enfoque hacia dicho potencial de modulación. Factores genéticos y del desarrollo involucrados en el patrón vascular pueden definir el patrón del tamaño y la expansibilidad del depósito de grasa en diversos tejidos adiposos que también están asociados. Por ello actualmente se estudian los moduladores de angiogénesis en relación con la obesidad (Lemoine A y col., 2013).

II.4.1.- Regulación de angiogénesis en tejido adiposo

La hipoxia conduce a la expresión de factores promotores de angiogénesis. La disminución de O₂ provoca la unión del factor inducible por hipoxia (HIF) α y β y este hetero dímero se une a la proteína p300 formando un complejo que transloca al núcleo y promueve la transcripción de numerosos genes, entre ellos aquellos involucrados en la angiogénesis como VEGF (Factor de crecimiento endotelial vascular), FGF (Factor de crecimiento de fibroblastos), angiopoyetinas etc. (Rodríguez Quesada A, 2004). Se ha

observado que el TA de roedores se vuelve hipóxico en respuesta a la obesidad producida por una dieta alta en grasa y ha sido documentado en varias ocasiones, incluso se han medido por medio de microelectrodos la tensión de O₂ directamente en el TA. Cuando este experimento se realizó en TA humano los microelectrodos revelaron una hipoxia leve y en un solo estudio mostró un aumento de oxigenación. Se ha observado entonces, que la expansión del TA en respuesta a una dieta alta en grasa no se acompañaba de un correspondiente flujo sanguíneo por lo que una pequeña hipoxia puede ser insuficiente para provocar la expansión angiogénica compensatoria (Corvera S y col., 2014). Por tanto, el estudio de moduladores de angiogénesis relacionada con la expansión del TA es necesario.

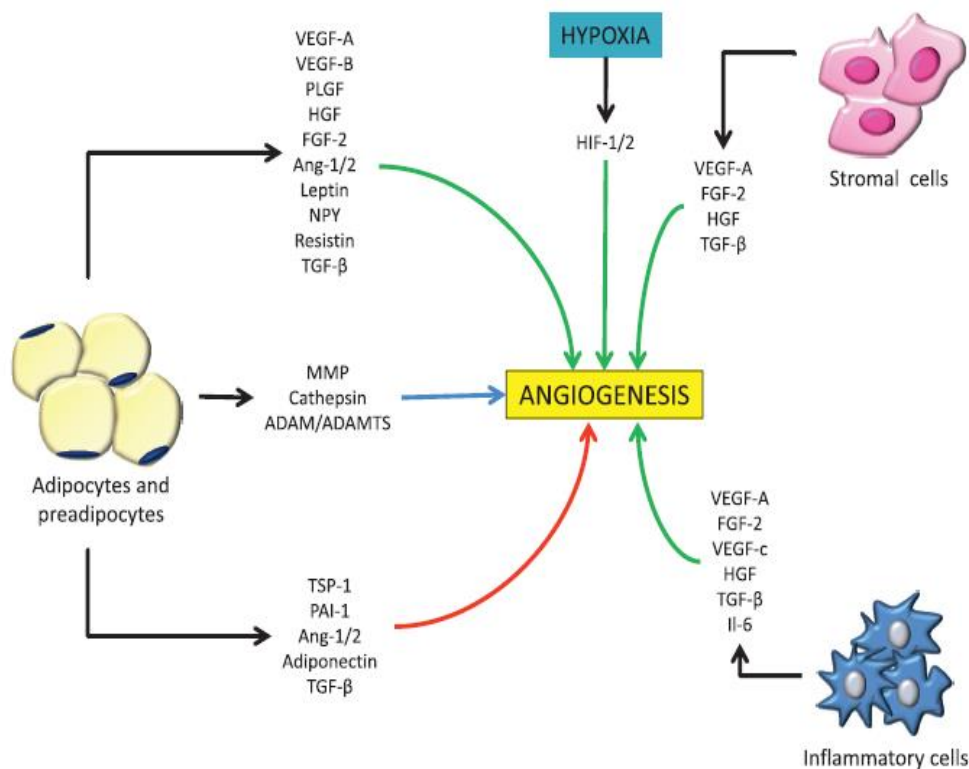


Fig.4: Factores involucrados en la regulación de angiogénesis en tejido adiposo. La figura muestra los diversos elementos que constituyen el TA: pre-adipocitos, adipocitos, células estromales y células inflamatorias. Se muestra como estas células y los factores que ellas secretan están involucrados en la angiogénesis del TA. La línea roja indica inhibidores, las verdes activadores y la azul, sistema de metaloproteinasas de la matriz (Lemoine A y col., 2013).

En la Fig.4, podemos observar que no solo los adipocitos intervienen en la angiogénesis, sino que el resto de los elementos que constituyen el TA están implicados. Pre-adipocitos, células estromales e inflamatorias y adipocitos secretan factores angiogénicos que permiten mantener de manera adecuada la capacidad angiogénica de este tejido.

II.4.2.- Función de la vasculatura del tejido adiposo.

El rol clave de la vasculatura en la modulación de la adipogénesis y desarrollo de la obesidad está siendo ampliamente reconocida y entendida. En el crecimiento del TA, los vasos sanguíneos contribuyen a la adipogénesis por varios mecanismos, como puede verse en la Fig.5. Los vasos sanguíneos suministran nutrientes y O₂, igual que en el resto de los tejidos, pero una perfusión vascular incrementada en TAM puede aumentar la tasa metabólica, incrementando el gasto energético. Los vasos sanguíneos suministran plasma que está enriquecido de factores de crecimiento y citoquinas que ponen en movimiento señales de crecimiento y supervivencia. Proporcionan, además, células madre circulantes derivadas de médula ósea, que son capaces de diferenciarse en pre-adipocitos y adipocitos, y células vasculares. Facilitan la infiltración de monocitos, neutrófilos y células inflamatorias en el TA, que son observadas en individuos obesos. Un estudio reciente muestra que células de la pared vascular, incluyendo pericitos, tienen características de células madre y pueden diferenciarse en pre-adipocitos y adipocitos. La hipervascularización del TA puede también contribuir substancialmente a angiogénesis patológicas en otros tejidos y órganos. La vasculatura del TA puede tener un rol causal en la expansión y encogimiento del TA, es decir, en la determinación del crecimiento, regresión y función fisiológica, por control del número de micro vasos y por remodelación de los ya existentes. Por ejemplo, la remodelación vascular puede alterar la perfusión

sanguínea, la cual puede controlar el número y tamaño de adipocitos conduciendo a la expansión/disminución del depósito adiposo (Cao Y y col., 2010).

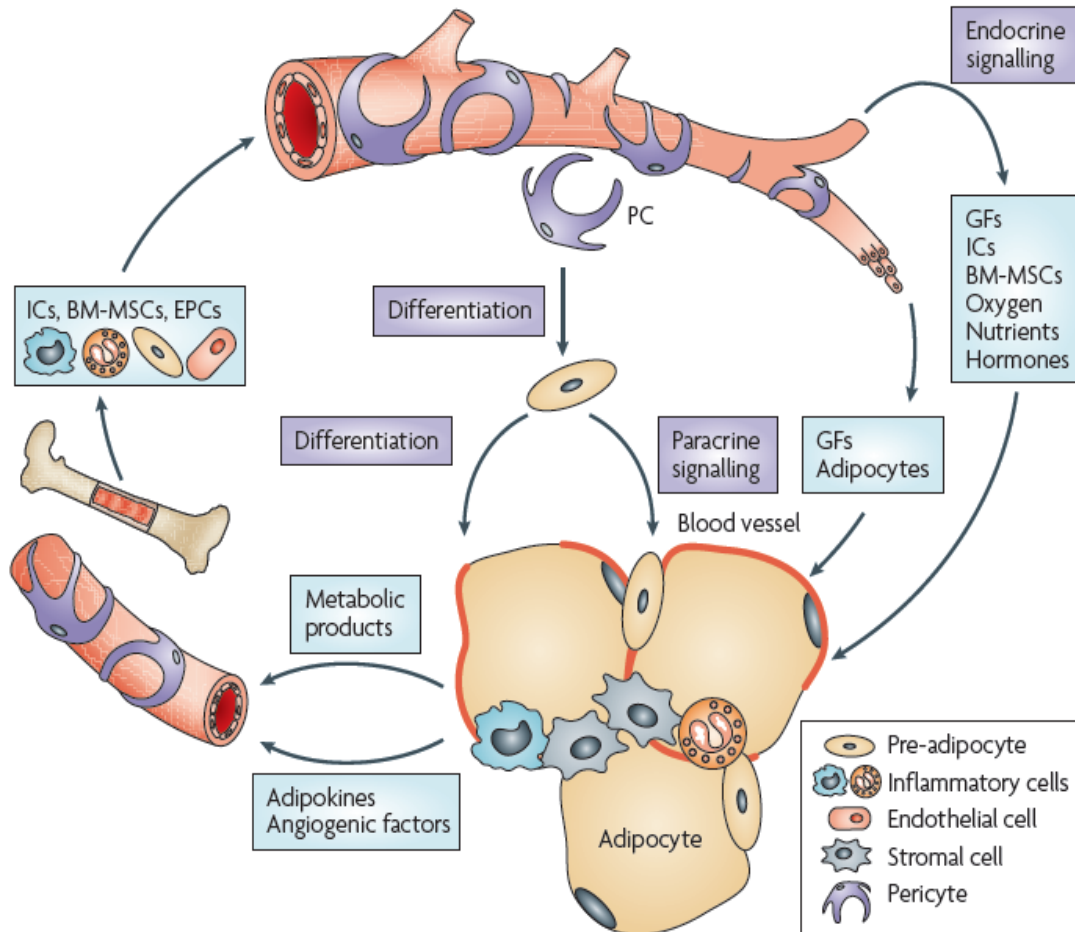


Fig.5. Función de la vasculatura del tejido adiposo. Los vasos sanguíneos en el TA proporcionan oxígeno, nutrientes, factores de crecimiento, células inflamatorias y células madres mesenquimales de médula ósea para mantener las funciones homeostáticas y la expansión del TA. Células madres mesenquimales y células progenitoras endoteliales participan activamente en adipogénesis y angiogénesis (Cao Y y col., 2010).

II.4.3.- Principales factores angiogénicos.

De la gran variedad de factores angiogénicos descritos hasta ahora, solo se mencionará el VEGF y sus isoformas.

VEGF: Es un factor positivo de angiogénesis y pertenece a una familia de proteínas que resultan del splicing alternativo de un único gen VEGF de 8 exones y que incluye VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E (homólogo viral), PlGF (Factor de crecimiento placentario).

VEGF-A (17-23 kDa) es el principal factor angiogénico; estimula la proliferación y migración de las células endoteliales. VEGF-B (21 kDa) es idéntico al VEGF-A en un 43% y también promueve la angiogénesis ya que está implicado en la degradación de la matriz extracelular vía regulación de la activación del plasminógeno. VEGF-C presenta un 30% de homología con VEGF-A y juega un importante papel tanto en angiogénesis como en linfoangiogénesis. VEGF-D es idéntico al VEGF-C en un 48% y también promueve el crecimiento de los vasos linfáticos.

El VEGF-A tiene como función principal en la angiogénesis, favorecer la división y migración celular y tras la unión a su receptor, VEGFR-1 (Flt-1) o VEGFR-2 (KDR/Flk-1) que son receptores transmembrana con actividad tirosin-quinasa, activar la vía de señalización conducente a aumentar la concentración de Ca^{2+} intracelular y promover la permeabilidad vascular. Se ha visto que la interacción de VEGFA/VEGFR depende de un gradiente de VEGF conducido por hipoxia. Así mismo, varios estudios han demostrado que la interacción entre angiogénesis y adipogénesis, mediada por el VEGFA, es un proceso esencial para la diferenciación de los adipocitos en la obesidad (Lijnen HR y col., 2008).

II.5 Apoptosis

La apoptosis es una forma de muerte celular programada que se desencadena a partir de señales celulares controladas genéticamente, es fundamental en el desarrollo de órganos y sistemas. Su función más importante es la destrucción de las células dañadas genéticamente, lo que evita que su reproducción provoque el desarrollo de cualquier tipo de enfermedad. Si una célula dañada no realiza la apoptosis puede continuar dividiéndose sin restricción alguna, derivando en un tumor e incluso en cáncer. Otra importante función de la apoptosis es el mantenimiento de homeostasis. Este tipo de muerte celular sigue un

proceso regular y muy riguroso, el exceso o defecto de apoptosis puede desencadenar múltiples patologías con diferentes niveles de gravedad. Hay dos familias proteicas mayormente involucradas en este proceso, las caspasas (CASP) y las proteínas 2 de linfoma de célula B (BCL2). La apoptosis puede seguir dos vías, la extrínseca que implica receptores de muerte (DR) como DR3, DR4 y DR5 y es controlada exclusivamente por CASP y la intrínseca que ocurre sin la participación de receptores de membrana. Actualmente se estudia la relación entre la inflamación del TA y la apoptosis (Tinahones FJ y col., 2013).

Investigaciones recientes tratan de esclarecer si la apoptosis podría determinar la aparición de obesidad y RI analizando el TA (TAV y TAS) de sujetos con distintos grados de obesidad y diferentes niveles de RI (incluyendo DMT2), encontrando que un aumento de la masa grasa corporal está asociada con la expresión de CASP 3 y 7 y BCL2, así como que éste estado pro-apoptótico se correlaciona con la vía de señalización de la insulina, sugiriendo su posible contribución al desarrollo de RI (Tinahones FJ y col., 2013).

II.5.1. Principales factores apoptóticos.

Se mencionarán solo dos: CASP y BCL2.

CASP, es un grupo de enzimas que se sintetizan como pro-enzimas y se distribuyen en el citoplasma, el espacio intermembrana mitocondrial o la matriz nuclear. Participan en la vía extrínseca de la apoptosis, que se inicia por ligandos extracelulares que se unen a su correspondiente DR. Aunque el procesamiento mediado por CASP puede resultar en la inactivación del sustrato, también puede generar moléculas de señalización activas, que participan en procesos ordenados tales como apoptosis e inflamación. Las CASP implicadas en la apoptosis han sido subclasificados por su mecanismo de acción y son

CASP iniciadoras, la 8 y 9, o CASP efectoras, la 3, 6 y 7. Las CASP iniciadoras son activadas por dimerización, la cual se produce por eventos de señalización. Estas CASP iniciadoras luego escinden a las CASP efectoras, que se producen como dímeros, lo que provoca un cambio conformacional que la activa. Una vez activada, una única CASP efectora puede escindir y activar otras CASP efectoras, lo que conduce a un bucle de retroalimentación acelerado de activación de la CASP (Mcilwain DR y col., 2013).

BCL2, familia de Proteínas que regulan los procesos de permeabilidad mitocondrial, son conocidas por tener miembros tanto pro como anti-apoptóticos. Cuando la apoptosis se realiza por la vía intrínseca, después de la exposición a ciertos estímulos, el equilibrio entre proteínas de la familia BCL2, determina la elección entre supervivencia y muerte celular mediante la liberación de citocromo c de la mitocondria al citosol (Gulliksen PS y col., 2003).

II.6. Insulina y el Receptor de Insulina

La insulina es una hormona liberada por las células β en los islotes pancreáticos de Langerhans en respuesta a niveles elevados de nutrientes en sangre, controlando funciones energéticas críticas como el metabolismo de glucosa y lípidos. El apropiado almacenamiento y liberación de energía durante los estados de alimentación y ayuno son esenciales para la supervivencia y son controlados principalmente por la acción de la insulina. Su principal función es la de mantener la concentración de glucosa en sangre en un rango normal, entre 70-100 mg/dl, favoreciendo la entrada de este nutriente en músculo y TA, y en hígado se favorece su almacenamiento y se inhibe su síntesis. Además, regula el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas y promueve la división y el crecimiento celular a través de sus efectos mitogénicos. Las acciones de la Insulina son mediadas por cascadas de señalización intracelular, en las que la

fosforilación inicial del receptor en residuos de tirosina (Tyr) lleva a una serie de eventos de fosforilación/desfosforilación de cinasas de Tyr y serina/treonina (Ser/Thr), que son las responsables de transmitir la señal de la insulina para regular los eventos metabólicos intracelulares (Olivares Reyes J y col., 2008).

La insulina inicia sus acciones biológicas por su unión a receptores específicos localizados en la membrana celular. El receptor de insulina (Fig.6) es una glicoproteína que pertenece a la familia de receptores para factores de crecimiento con actividad intrínseca de cinasas de Tyr, los cuales al ser estimulados por su ligando se auto fosforilan en residuos de Tyr. Es un hetero tetrámero compuesto por dos subunidades α , extracelulares, que tienen sitios de unión a la insulina y dos subunidades β que tienen una porción extracelular, una transmembranal y otra porción intracelular donde se localiza el dominio con actividad cinasa de Tyr. Cuando la insulina se une al receptor de insulina se produce un cambio conformacional y se activa la porción β produciéndose auto fosforilación del receptor. Esto provoca que varias proteínas intracelulares se unan al receptor y también son fosforiladas, incluyendo los sustratos del receptor de insulina 1 y 2 (IRS-1 e IRS-2), que son las proteínas mejor caracterizadas que participan en la señalización de insulina. Estas proteínas activan varias vías de señalización implicadas en la regulación de eventos celulares importantes tales como la captación de glucosa y el metabolismo, la síntesis de proteínas, la expresión génica, la supervivencia celular, el crecimiento, el desarrollo, y la diferenciación (Hirabara SM y col., 2012).

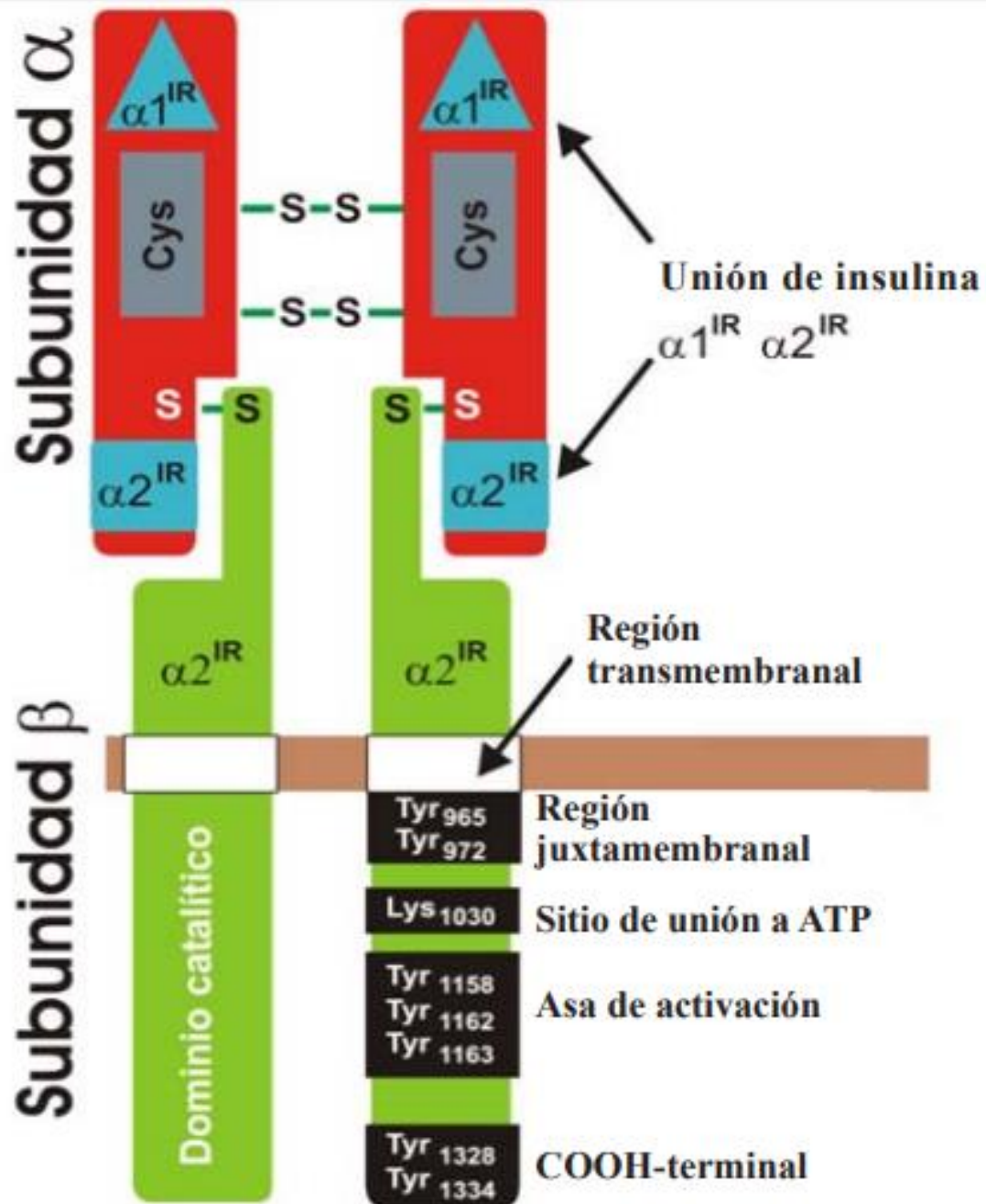


Fig.6. Estructura del receptor de Insulina: dominios funcionales del receptor. El receptor de insulina es un heterotetramero que consiste en dos subunidades α extracelulares unidas a dos subunidades β por puentes disulfuro. Las subunidades α contienen las regiones de unión a insulina $\alpha 1^{RI}$ y $\alpha 2^{RI}$ en adición a una región rica en cisteínas (Cys). La subunidad β contiene una porción extracelular, una transmembranal y una intracelular. En su porción intracelular se localiza un dominio catalítico de cinasa de tirosina con un sitio de unión a ATP y sitios de fosforilación en tirosina que se localizan en las regiones juxtamembranal (Tyr⁹⁶⁵, Tyr⁹⁷²), asa de activación (Tyr¹¹⁵⁸, Tyr¹¹⁶², Tyr¹¹⁶³) y carboxilo terminal (Tyr¹³²⁸, Tyr¹³³⁴) (Olivares Reyes J y col., 2008).

II.6.1.- Vías de señalización de la Insulina

Una vez que la insulina interacciona con su receptor y éste es activado, se inicia el encendido de cascadas de señalización que dependen de un orquestado número de interacciones proteicas. Dos vías principales de transducción son activadas por acción de la insulina: la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Fig.7) y la vía de la fosfatidilinositol3-cinasa (PI3K) (Fig.8). Ambas vías regulan la mayoría de las acciones de la insulina asociadas a la regulación del metabolismo energético, de la expresión genética y de efectos mitogénicos (Olivares Reyes J y col., 2008).

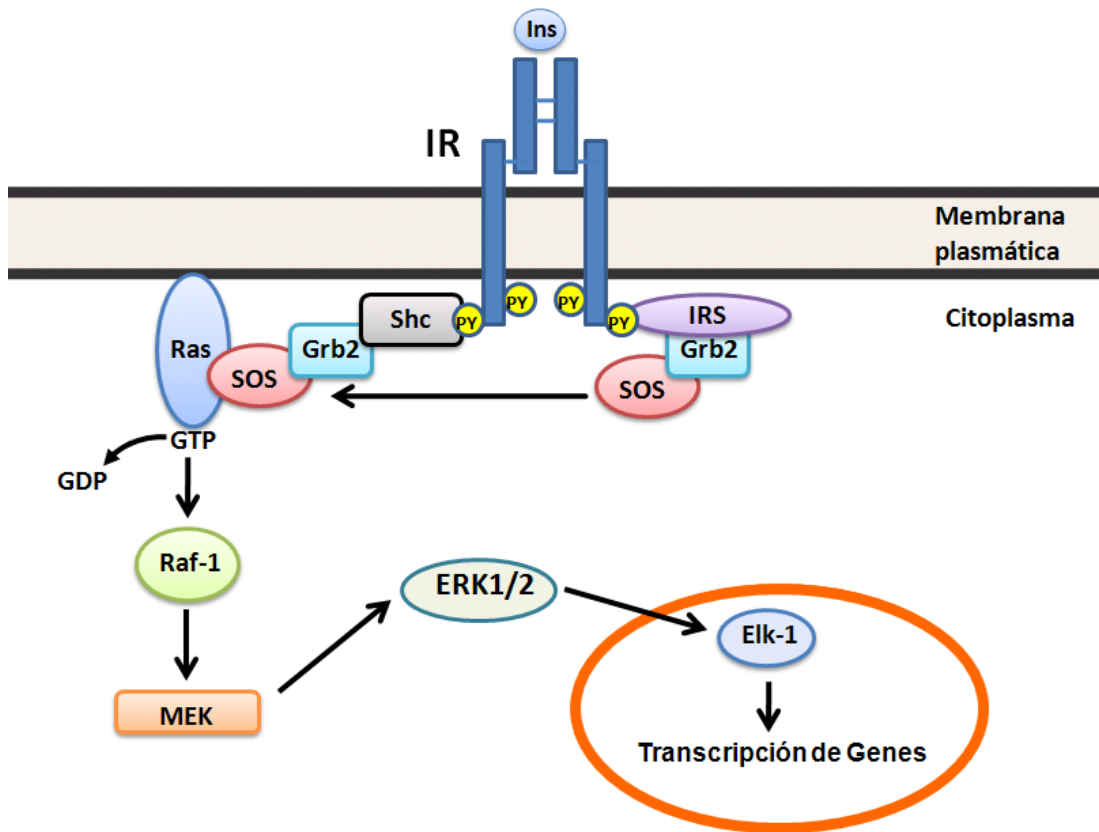


Fig.7. Activación de la vía de las MAPK por acción de la insulina. La insulina activa la vía de las MAPK a través de dos mecanismos: en el primero, la activación del IR promueve la asociación de la proteína Shc, la cual une al complejo Grb2/SOS; SOS activa a Ras, la cual inicia el encendido de la cascada de las MAPK. GTP-Ras une y activa a Raf-1 que subsecuentemente lleva a la fosforilación y activación de MEK y de las ERK1/2. Alternativamente existe una vía independiente de Shc, pero dependiente de la activación del IRS por la que la insulina es capaz de activar a las MAPKs. En esta, una vez activo IRS, une al complejo Grb2/SOS y a partir de este punto la secuencia de activación de proteínas es la misma que se describió para Shc (Olivares Reyes J y col., 2008).

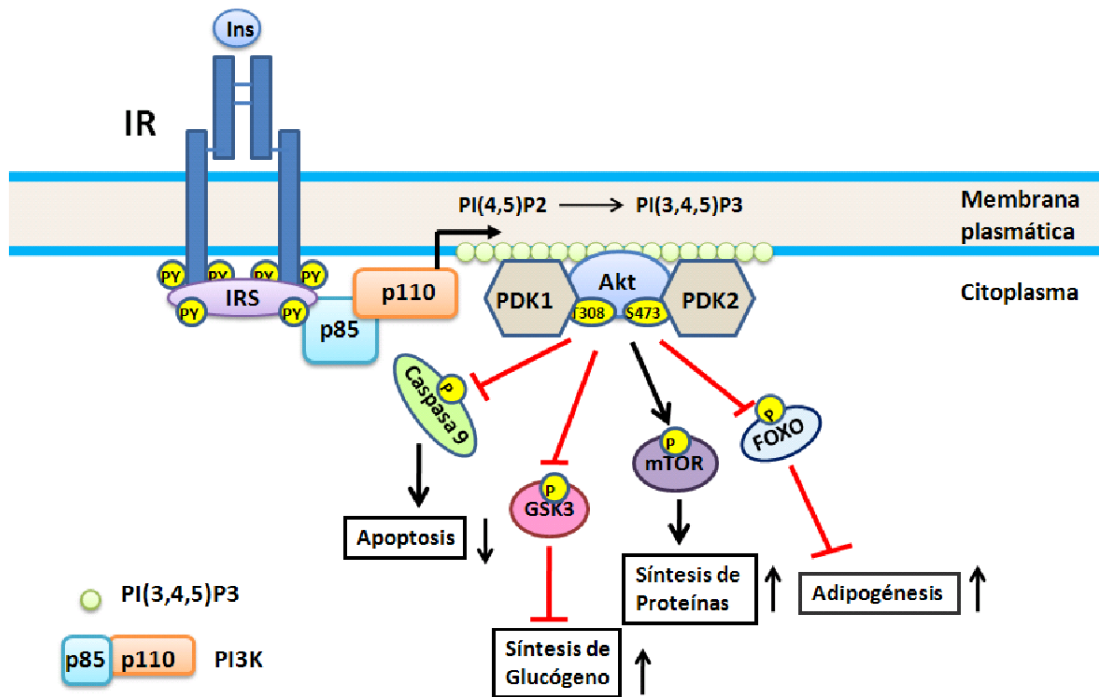


Fig.8. Activación de la vía de la PI3K/Akt por la insulina. Esta vía representa el principal mecanismo por el que la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo. El RI activo y autofosforilado, activa a IRS la cual contiene varios sitios de fosforilación en residuos de Tyr (Y), que al ser fosforilados por el RI, se convierten en sitios de unión y activación de proteínas que contienen dominios SH2 como PI3K. La PI3K consta de una subunidad reguladora (p85) y de una subunidad catalítica (p110). La interacción entre p85/IRS-1 da por resultado la activación de p110 y a consecuencia de ello, p110 tiene acceso a su sustrato PI (4,5) P2, el cual es fosforilado en la posición 3 del inositol, generando PI (3,4,5) P3, que sirve como sitio de unión para cinasas de Ser como PDK1 y Akt. El complejo proteico PDK2 activa a Akt, induciendo una primera fosforilación en la Ser473 que es seguida por una fosforilación en la Thr308, esta última inducida por PDK1. Akt regula varios de los efectos metabólicos de la insulina a través de regular la activación de diferentes sustratos que propagan la respuesta, como mTor, FOXO, GSK3 y caspasa 9 (Olivares Reyes J y col., 2008).

II.6.2.- Resistencia a la Insulina

RI se produce cuando los tejidos sensibles a la insulina, principalmente músculo esquelético, TA e hígado, pierden la capacidad de responder adecuadamente a la hormona. Se asocia con varias enfermedades crónicas, especialmente las relacionadas con la obesidad, tales como DMT2, síndrome metabólico, dislipidemias, enfermedades cardiovasculares, cáncer y enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, los mecanismos exactos involucrados en la RI no están, todavía, plenamente entendidos. Se han propuesto varios factores para participar en el desarrollo de la RI, incluyendo el aumento de nivel en plasma de ácidos grasos libres, la inflamación crónica subclínica, el

estrés oxidativo y nitrativo, expresión de genes alterados, y la disfunción mitocondrial. Dado que los ácidos grasos libres son elevados en la obesidad y las enfermedades relacionadas, se han propuesto estos metabolitos como posibles responsables de la alteración en la acción de la insulina, pero los mecanismos no se conocen por completo todavía. Una alta disponibilidad de ácidos grasos saturados de cadena larga, especialmente, resulta en el establecimiento de RI en hígado, músculo esquelético y TA. Varias hipótesis se han propuesto para explicar la RI inducida por ácidos grasos saturados, incluyendo ciclo de Randle, el estrés oxidativo, la modulación de la transcripción de genes, la inflamación, la acumulación de derivados de lípidos intracelulares (diacilglicerol y ceramidas), y la disfunción mitocondrial. Un estado crónico de inflamación en los tejidos que responden a la insulina es un importante contribuyente a la RI en la obesidad y las enfermedades relacionadas. Por lo tanto, relacionar la inflamación y la RI ha sido sugerido por varios autores (Fig.9). Sin embargo, el mecanismo exacto, así como los mediadores implicados en esta interacción no está aun completamente definido (Hirabara SM y col., 2012). La RI tiene como mecanismo compensador la hiperproducción de insulina (hiperinsulinismo), estado que puede ser compatible con una glucemia plasmática normal. Sólo cuando la hiperinsulinemia compensadora resulte insuficiente para mantener la homeostasis, aparecerá intolerancia a la glucosa y posteriormente DMT2.

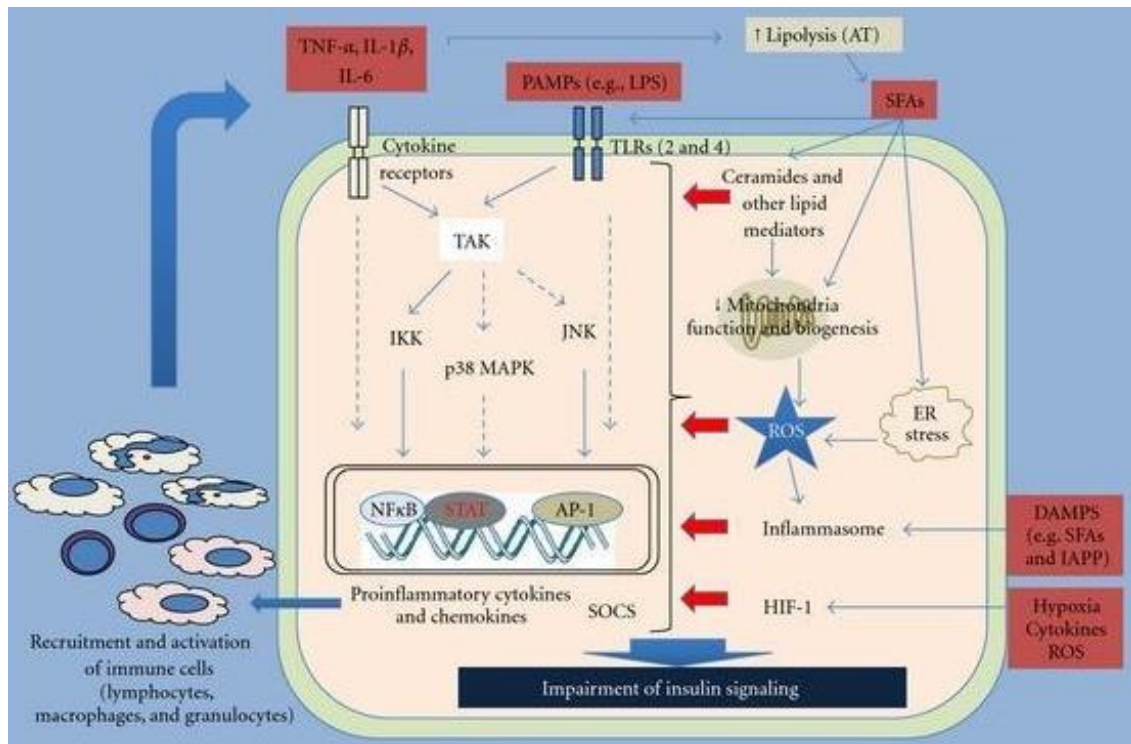


Fig.9. Vías inflamatorias activadas durante la obesidad y su interacción con la señalización de la insulina. Diferentes señales actúan directamente a través de la membrana (por ejemplo, receptores tipo toll (TLR) y receptores de citocina) y proteínas intracelulares (inflammasomas) o indirectamente por su efecto en organelas celulares tales como mitocondrias y retículo endosomal y generación de metabolitos (por ejemplo, ceramidas y otros mediadores lipídicos) para activar las vías inflamatorias. Factor de transcripción como factor nuclear κ B (NF κ B), proteína activadora-1 (AP-1) y transductor de señal y activador de la transcripción (STAT) se activa aguas abajo de estas vías y conduce a la expresión de proteínas que inhiben la señalización de insulina e induce un estado proinflamatorio mediante el reclutamiento y la activación de células inmunes. TA, tejido adiposo; DAMPS, daños asociados patrones moleculares; ER, retículo endoplásmico; HIF-1, factor de hipoxia-1; IAPP, polipéptido amiloide de islote; PAMPS, patrones moleculares asociado a patógeno; ROS, especies de oxígeno reactivas; SFA, ácidos grasos saturados; SOCS, supresor de la señalización de citoquinas; TAK, factor de crecimiento transformante β -quinasa activado (Hirabara SM y col., 2012)

II.7. MiARNs

II.7.1. Generalidades

En los últimos años, las nuevas tecnologías como la secuenciación de nueva generación (NGS, por su nombre en inglés Next-Generation Sequencing) han demostrado que la mayor parte del genoma se transcribe en ARNs. Sin embargo, sólo 1-2% del genoma humano codifica proteínas, dividiendo a los ARNs en codificantes y no codificantes (ARNnc). En el pasado, los ARNnc fueron considerados como "basura evolutiva", pero cada vez más evidencias sugieren un enorme impacto en varios mecanismos moleculares.

Además, la cantidad de ARNnc en un organismo se correlaciona con su complejidad. Esto sugiere una tremenda influencia de ARNnc en el desarrollo y la organización de animales de mayor estructura (Beerman J y col., 2016). Los ARNnc se dividen en dos subclases según un umbral de tamaño, > 200 nucleótidos (nt) los ARNs largos y los de menos de 200 nt los ARNs cortos. De los pequeños ARNnc de menos de 200 nt, los miARNs son el grupo más conocido y se han estudiado ya ampliamente. Su acción principal es la regulación negativa de la expresión génica al unirse a un ARNm diana y la inducción de su degradación o inhibición de su traducción. La expresión de estas moléculas no codificantes parece estar estrictamente regulada en condiciones fisiológicas, así como en varias enfermedades humanas. Es evidente que las moléculas de ARN presentan muchas más funciones en lugar de ser una simple plantilla para la síntesis de proteínas. Teniendo en cuenta la capacidad del ARN para formar estructuras tridimensionales e interactuar con el ADN, las proteínas y otras moléculas de ARN, se supone que las transcripciones no codificantes son tan versátiles como las proteínas, lo que les permite orquestar la mayoría de los procesos celulares (Beerman J y col., 2016).

II.7.2. Definición y Biosíntesis

Los MiARNs se definen como ARNnc de cadena sencilla de aproximadamente 20 -25 nucleótidos de longitud que se expresan endógenamente y regulan la expresión génica en el nivel post-transcripcional. Desde su primera descripción en el gusano *Caenorhabditis elegans* (Lee R y col., 1993), miles de miARNs han sido identificados en moscas, plantas y mamíferos (Pasquinelli A y col., 2000). La estructura conservada y la biogénesis de esta especie de ARN aprovecha la clave para comprender la modulación de la expresión génica por miARNs. Genes que codifican miARNs se encuentran a lo largo del genoma, y una gran proporción se encuentra organizado dentro grupos que comprenden múltiples

miARNs (cluster, en inglés). Hasta cierto punto, los miARNs se codifican dentro o solapados a genes que codifican, o no codifican, proteínas que relacionan su expresión con la transcripción y el procesamiento de tales genes de acogida. Sin embargo, los miARNs también pueden surgir de unidades transcripcionales autónomas (Beerman J y col., 2016). Durante la biogénesis, los miARNs pasan un proceso de varios pasos incluyendo transcripción, maduración nuclear, exportación y procesamiento citoplasmático antes de evolucionar en un ARN funcional (Fig.10). La mayoría de los genes miARN se transcriben por la acción de la ARN polimerasa II (Pol II), que conduce a precursores largos, los pri-miARN, caracterizados por tener una caperuza en 5' y una cola de poli-adeninas (Poli-A) en 3' (Kim V y col., 2005). Posteriormente, el proceso para producir miARNs maduros implica dos etapas. Primero, por medio de un complejo nuclear, llamado microprocesador, la proteína DGCR8 (región crítica 8 del síndrome de Di-George) reconoce la zona de unión de ARNs-ARNss (ARN doble hebra-ARN simple hebra) y posiciona a la ribonucleasa de tipo ARNasa III Droscha a una distancia de 11nt (una vuelta de hélice) desde la zona de unión la cual procesa los transcritos pri-miARN, produciendo precursores en horquilla (pre-miARN) que consisten en aproximadamente 70 nt. En la segunda etapa, el pre-miARN, se transloca desde el núcleo hasta el citoplasma mediado por la Exportina-5 y RAN-GTP (Beerman J y col., 2016). A continuación, la endonucleasa Dicer (de tipo ARNasa III) que interactúa con TARBP (proteína de unión a TAR) escinde el precursor cerca del bucle terminal que libera el ARNs (Beerman J y col., 2016; (Beerman J y col., 2016; Sontheimer EJ y col., 2005). Este dúplex se asocia inmediatamente con proteínas Ago (Argonauta) que ensamblan el complejo silenciador inducido por miARN (miRISC) (Bartel DP y col., 2009). El miARN maduro (hebra de guía) se retiene en el complejo, mientras que la otra hebra del dúplex, más inestable, se degrada. La selección de la cadena guía varía espacial y temporalmente

y depende de las propiedades del precursor o de otros factores de procesamiento (Beerman J y col., 2016). No todos los miARNs conocidos cumplen esta ruta clásica o canónica de la biogénesis. En una ruta alternativa, la vía no canónica, los miARNs derivan de intrones de horquilla corta, denominados mirtrons. La primera etapa de procesamiento por Drosha es sustituida por la maquinaria de empalme. Este evento de escisión genera un intermedio que se des ramifica antes de que se forme la estructura de horquilla. Los pre-miARNs resultantes se procesan de acuerdo con la vía de biogénesis canónica (Fig.10). Además, los pre-miARNs pueden derivar de pequeños ARN nucleolar (snoRNAs) o precursores de ARNt (Beerman J y col., 2016).

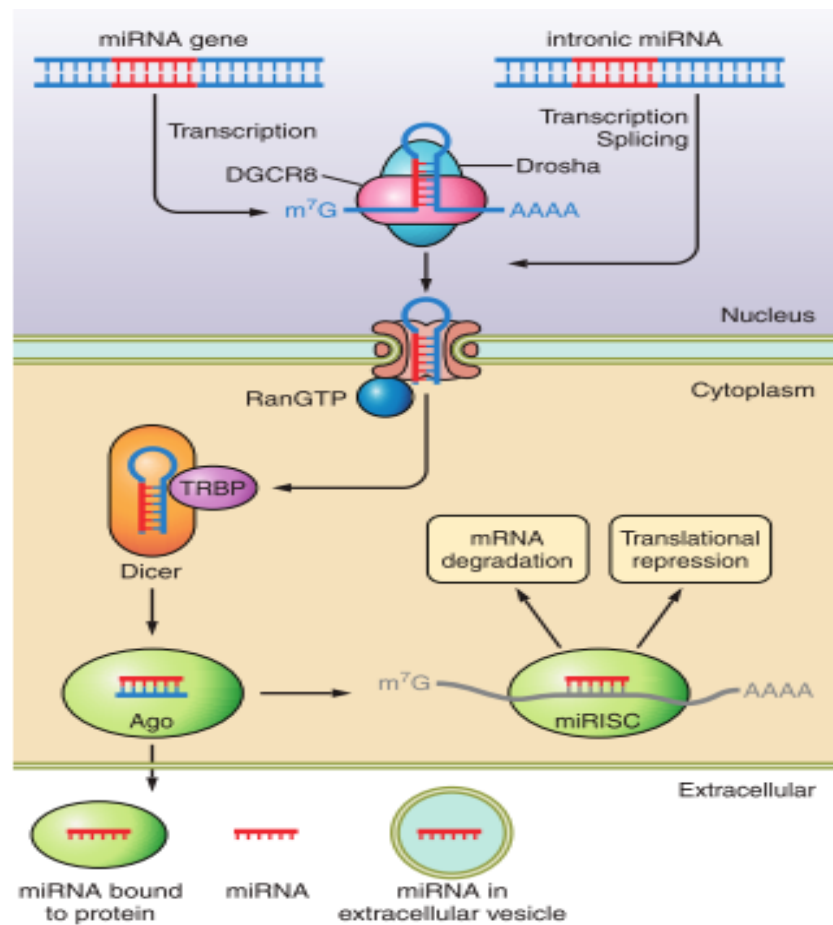


Fig.10. Biogénesis y función de miARNs. Los miARNs son transcritos como precursores largos o derivan de intrones y maduran por un procesamiento endonucleolítico. Los miARNs maduros son incorporados al complejo de silenciamiento RISC y regulan la expresión de transcritos diana por degradación o represión translacional. Los miARNs pueden ser secretados en el espacio extracelular, ser estabilizados en vesículas o unirse a proteínas (miARN circulantes) (Beerman J y col., 2016).

II.7.3. Función

La principal función de los miARNs es suprimir la expresión génica a nivel post-transcripcional mediante una unión específica con su ARN diana. El reconocimiento está mediado principalmente por el emparejamiento de Watson-Crick de la región semilla del miARN y los nts coincidentes dentro de la región 3' no traducida (3' UTR) del ARN diana (Bartel DP y col., 2009). Un miARN es capaz de regular la expresión de ARNs mediante el reconocimiento y la orientación de otras porciones de ARNm. La fuerza de la unión miARN-ARNm depende de la complementariedad total o parcial que determina principalmente la naturaleza de la represión. El número, la posición y la accesibilidad de los sitios diana, las regiones flanqueantes y las estructuras secundarias, así como las alteraciones de las secuencias en el ARN diana son otros determinantes (Beerman J y col., 2016). Además, hay evidencias que los miARNs también inducen la traducción al alza (Vasudevan S y col., 2007). Otra función es que ciertos miARNs son necesarios en el núcleo, donde al acumularse influyen en la biogénesis de otros miARNs (Beerman J y col., 2016). Hasta ahora, poco se sabe de los mecanismos subyacentes y deben ser aclarados con más detalle. Otro aspecto a tener en cuenta es que los miARNs no solo cumplen funciones dentro de la célula, si no que están presentes fuera de ella, en sangre, plasma, leche materna, orina y otros fluidos corporales. Los miARNs circulantes son estables y resistentes a la actividad de ARNasas, ya que están asociados con portadores proteicos o incorporados en vesículas o micropartículas. Los miARNs circulantes funcionan como moléculas de señalización que transfieren información genética entre células o tejidos y por tanto están siendo ampliamente investigados como marcadores de diagnóstico (Beerman J y col., 2016).

II.7.4. MiARNs reguladores de adipogénesis, angiogénesis y apoptosis.

Actualmente, es evidente que los miARNs son capaces de regular la expresión de al menos un tercio del genoma humano y desempeñan un papel crítico en diversos procesos biológicos, incluida la diferenciación celular, la apoptosis y la angiogénesis, entre otros. Los 11 miARNs objeto de esta tesis, miR-15b, miR-20a, miR-20b, miR-27b, miR-126, miR-130a, miR-210, miR-221, miR-222, miR-296 y Let-f, han sido descritos participando en los procesos antes mencionados y se muestran en la Tabla 1 y en la Fig. 11.

Tabla 1. MiARNs involucrados en adipogénesis, apoptosis y angiogénesis.

miRNA	Biological process		
	Adipogenesis	Apoptosis	Angiogenesis
15b		Liangiu C. et al. 2015	Katoh M. y col., 2013
20a		Weng H. et al 2014	Katoh M. y col., 2013
20b			Cuevas A. et al. 2014; Katoh M. y col., 2013
27b	Ma J. et al. 2013		Staszal T. y col., 2011; Katoh M. y col., 2013
126	Kulyté A. et al. 2014		Anan S. y col., 2011; Staszal T. y col., 2011
130a	Hamann D. y col., 2015		Staszal T. y col., 2011; Pan Y. et al 2015
210	Liang W.C. et al. 2013; Hamann D. y col., 2015		Staszal T. y col., 2011
221	Hamann D. y col., 2015	Zhang C.Z. y col., 2010	Staszal T. y col., 2011; Chistiakov D.A. y col., 2015
222	Hamann D. y col., 2015		Staszal T. y col., 2011; Chistiakov D.A. y col., 2015
296	Meale S.J. et al. 2014		Anan S. y col., 2011
let-7f	Ma J. et al. 2013		Staszal T. y col., 2011; Katoh M. y col., 2013

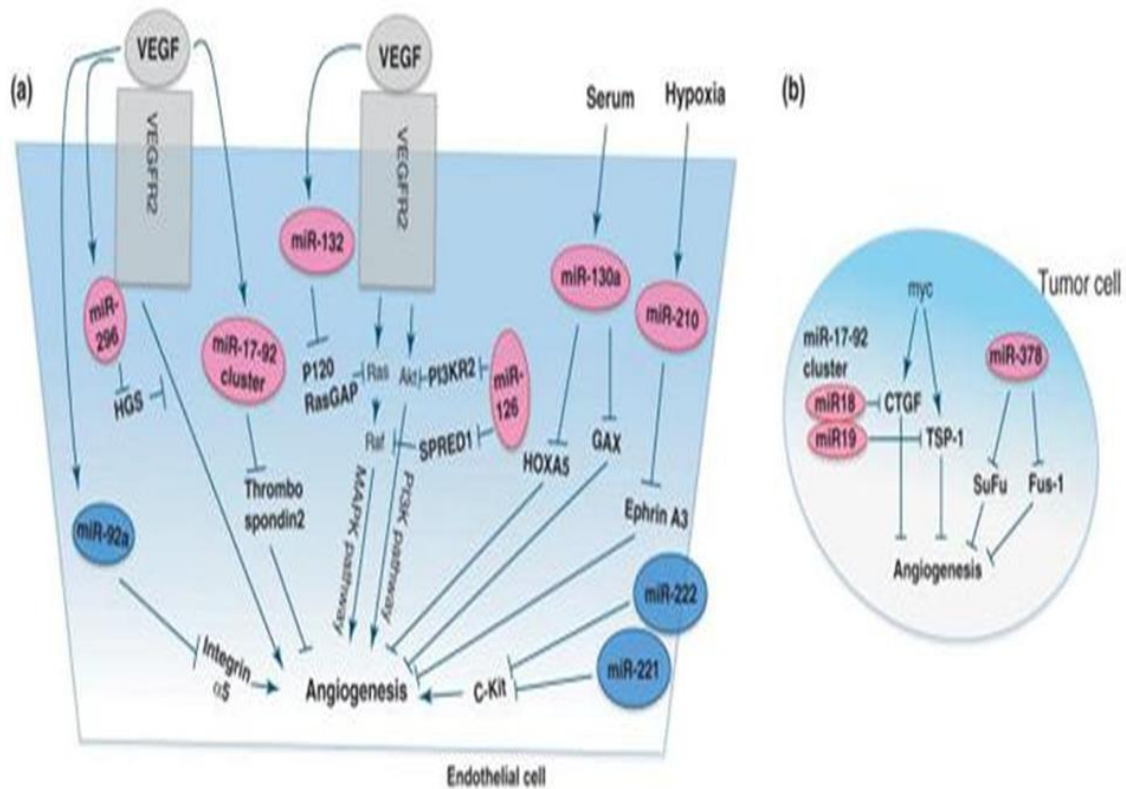


Fig. 11. Regulación de angiogénesis por miARNs. Múltiples miARNs regulan las respuestas angiogénicas a factores de crecimiento o hipoxia. (a) Los miARNs endoteliales que promueven la angiogénesis incluyen miR-296, miR-132, miR-126, el grupo miR-17-92, miR-130a y miR-210. Por el contrario, los miARNs endoteliales que inhiben la angiogénesis son miR-92a, miR-221 y miR-222. (b) El grupo miR-17-92 y miR-378 en células tumorales promueven la angiogénesis al reprimir factores anti angiogénicos. Se indican supuestos objetivos y reguladores para cada miARN. La vía del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) puede ser regulada en múltiples niveles por miARNs (a). miR-126 promueve la señalización de VEGF al reprimir SPRED1, un regulador negativo de la vía de MAPK, y al reprimir PI3KR2, un regulador negativo de la ruta de PI3K. miR-132 reprime la expresión de p120RasGAP, que es un regulador negativo de Ras y por lo tanto induce la neovascularización. MiR-296 reprime la expresión de HGS, que regula la clasificación intracelular de VEGFR2 activado a los lisosomas (Chang S y col., 2011).

II.8. Regulación transcripcional. Metilación.

Varios mecanismos existen para controlar la expresión génica en eucariotas, habiendo emergido en los últimos años la regulación epigenética de la expresión génica como uno de los potenciales responsables implicados en la respuesta génica a factores no genéticos y medioambientales, como el estado del peso corporal, la actividad física, factores dietéticos, y toxinas ambientales (Paul B y col., 2015). La epigenética comprende aquellas modificaciones genéticas que no alteran la estructura primaria del ADN. Entre las modificaciones epigenéticas, las más conocidas son la metilación del ADN (Fig.12) y la

remodelación de la cromatina (Ji H y col., 2016). La metilación del ADN regula la actividad transcripcional y está implicada en la regulación de la expresión de una gran variedad de genes. La metilación del ADN supone la adición de un grupo metilo en la posición 5' de las citosinas que forman parte de los dinucleótidos CpG. Estos dinucleótidos no se distribuyen igualmente en todo el genoma, el 60% se concentra en las regiones promotoras de los genes. En general, las citosinas de estas islas CpG no están metiladas en aquellos genes que se expresan de forma constitutiva, mientras que en los genes regulados se encuentran metiladas o no de manera específica en función del tejido, correlacionando con el nivel de transcripción del gen. De esta forma, la expresión de determinados genes estará regulada en función de la presencia o ausencia de metilación en su promotor.

Son cada vez más las evidencias que apuntan a que los mecanismos epigenéticos quizás participen en el desarrollo de diferentes enfermedades (Sales V y col., 2017; Park J y col., 2017), siendo estos procesos epigenéticos, así como los factores que los regulan, puntos clave en la prevención de enfermedades metabólicas entre ellas la DMT2 (Bansal A y col., 2017; De Rosa S y col., 2018).

La DMT2 se desarrolla debido a la RI y la alteración de la secreción de insulina, sobre todo en sujetos genéticamente predispuestos y expuestos a factores de riesgo genéticos, como la obesidad (Rönn T y col., 2015). Una mejor comprensión de los mecanismos moleculares, particularmente aquellos implicados en los procesos de regulación epigenética, que participan en el desarrollo de RI asociada con la obesidad podría ser beneficioso frente al aumento a nivel global de casos de obesidad y diabetes (Crujeiras A y col., 2015). Del mismo modo, su potencial como diana terapéutica podría ser efectivo en la batalla contra esta pandemia.



Fig. 12. Metilación del ADN. Ilustración de una molécula de ADN que está metilada en sus dos citosinas del centro.

https://es.wikipedia.org/wiki/Metilaci%C3%B3n_del_ADN#/media/File:DNA_methylation.jpg



III. HIPÓTESIS



Los cambios transcriptómico y post- transcripcional, principalmente relacionados con la metilación del ADN y los miARNs, y que son reguladores de angiogénesis, podrían desempeñar una función importante en la regulación de la funcionalidad y la expansión del TA, por lo que la angiogénesis podría estar relacionada con obesidad y RI.

Actualmente, se sabe que la alteración de la expresión de miARNs está asociada con la obesidad. Sin embargo, un análisis exhaustivo de los miARNs, sus genes diana y su asociación con la obesidad y la T2D aún deben investigarse bien. MiR-15b, miR-20a, miR-20b, miR-27b, miR-126, miR-130a, miR210, miR-221, miR-222, miR-296 y Let-7f han sido descritos por ser reguladores importantes de angiogénesis y tienen como diana a genes reguladores de las vías de angiogénesis, adipogénesis, apoptosis, y señalización de insulina en muchos tejidos. Sin embargo, poco se ha estudiado su papel en el tejido adiposo. Por ello, pensamos que estos miARNs podrían tener un papel importante en la regulación de la funcionalidad del tejido adiposo y por lo tanto podrían tener una relación con la obesidad y la RI.

En los últimos años, la regulación epigenética de la expresión génica ha surgido como uno de los potenciales implicados en la respuesta génica a factores no genéticos y medioambientales, como el estado del peso corporal, la actividad física, factores dietéticos, y toxinas ambientales. De entre ellos, la metilación ha sido descrita como un factor que podría afectar a la expresión de genes en diversos tejidos. Sin embargo, pocos estudios han relacionado la metilación con genes reguladores de las vías de angiogénesis, adipogénesis, apoptosis, y señalización de insulina en TA humano. Por ello, pensamos que la metilación podría tener un papel importante en la regulación de la funcionalidad del tejido adiposo y por lo tanto podría tener una relación con la obesidad y RI.



IV. OBJETIVOS



1. Determinar el perfil de expresión de miR-15b, miR-20a, miR-20b, miR-27b, miR-126, miR-130a, miR210, miR-221, miR-222, miR-296 y Let-7f en el TAV y TAS procedentes de sujetos normo pesos y obesos con y sin DMT2.

2. Realizar un estudio bio-informático de predicción de genes diana de los miARNs estudiados.

3. Analizar el Perfil de expresión de genes diana de los miARNs en TAV, TAS y FVE, procedentes de sujetos normo pesos y obesos, sin alteraciones metabólicas, diabéticos o con RI.

4. Con el fin de determinar el papel de los miARNs estudiados en los apartados anteriores, en la regulación de los procesos más importantes de la funcionalidad del TA: angiogénesis, adipogénesis, apoptosis y señalización de insulina:

a) Analizar el efecto *in vitro* de la inhibición y mimetización de estos miARNs sobre la expresión de genes mediadores de cada proceso en la línea celular de preadipocitos de ratón 3T3-L1 y sobre la capacidad de diferenciación de las células del estroma vascular procedentes de TAV y TAS a adipocitos.

b) Analizar el efecto *in vivo* de la mimetización de miARNs sobre la expresión de los genes mediadores de cada uno de estos procesos en TA de ratón de la cepa C57BL/6J en un modelo de obesidad inducida por dieta alta en grasa.

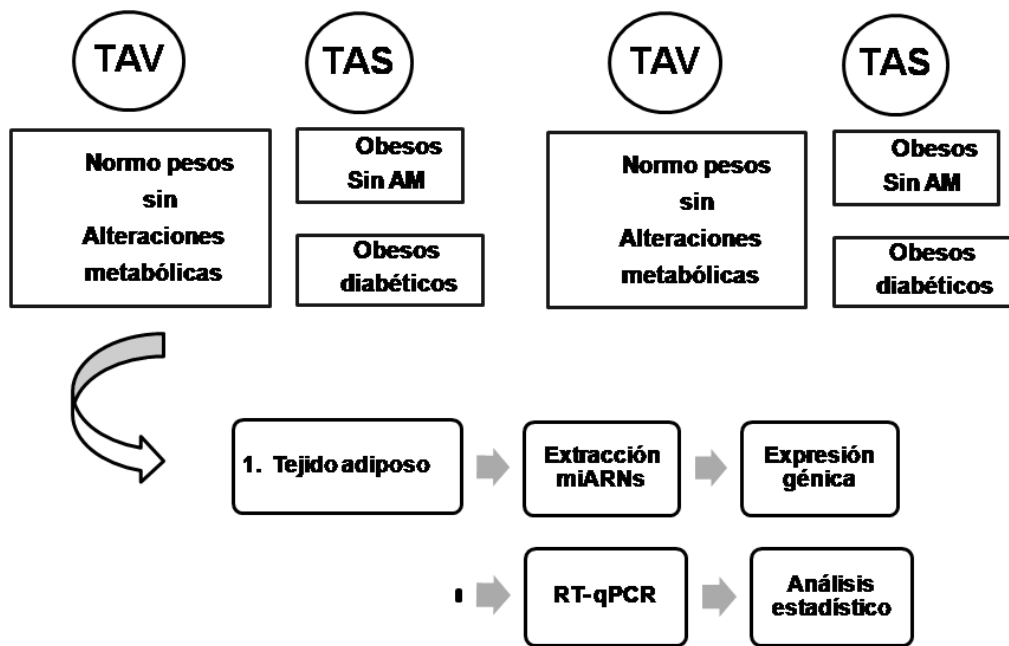
5. Analizar la metilación del ADN de genes relacionados con las vías de angiogénesis, adipogénesis, apoptosis y señalización de insulina en TA humano, visceral y subcutáneo, procedentes de sujetos normo pesos y obesos con y sin DMT2.



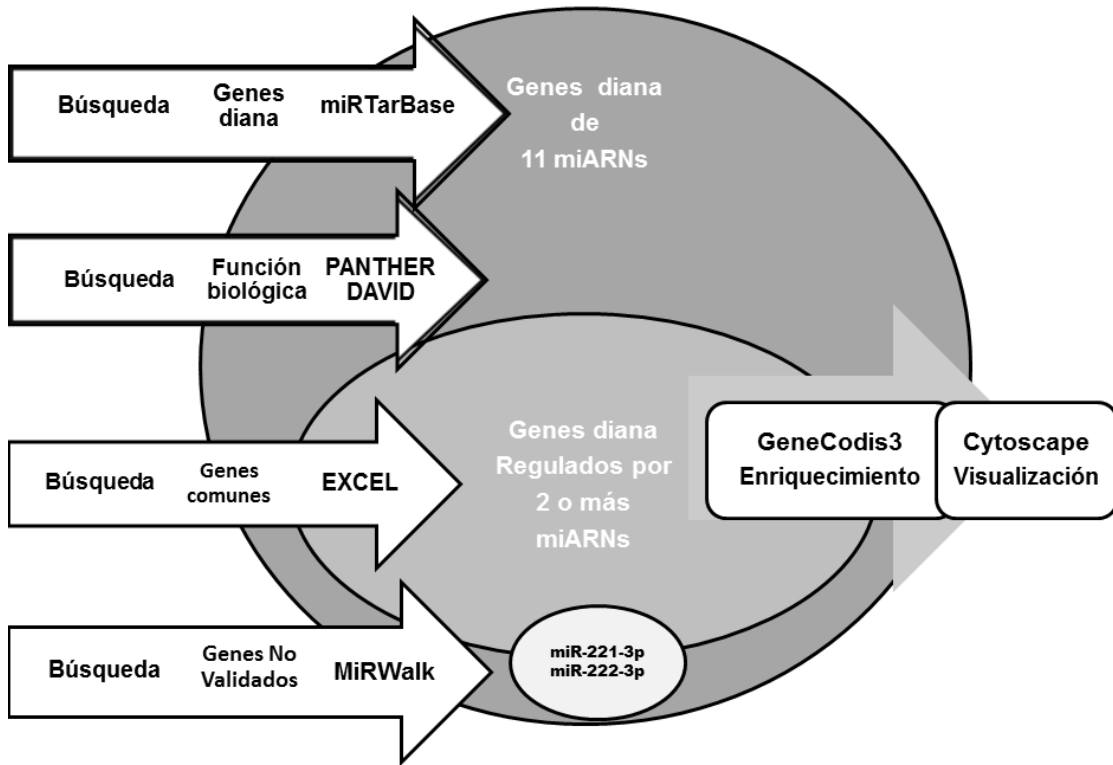
V. DISEÑO EXPERIMENTAL



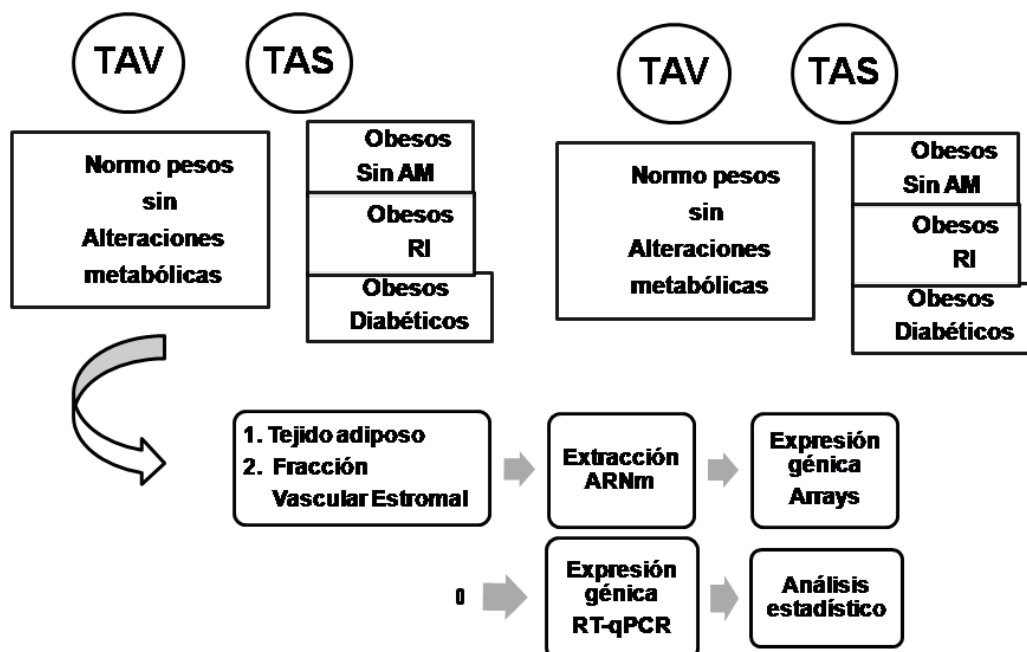
V.1. Perfil de expresión de miR-15b, miR-20a, miR-20b, miR-27b, miR-126, miR-130a, miR210, miR-221, miR-222, miR-296 y Let-7f en TA de pacientes normo pesos y obesos con y sin DMT2.



V.2. Predicción de genes diana de los miARNs estudiados.

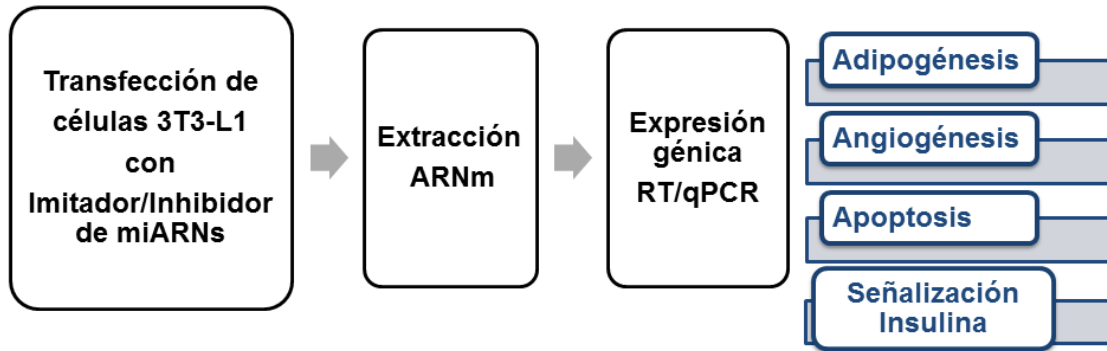


V.3. Perfil de expresión de genes diana de los miARNs estudiados, en TA humano

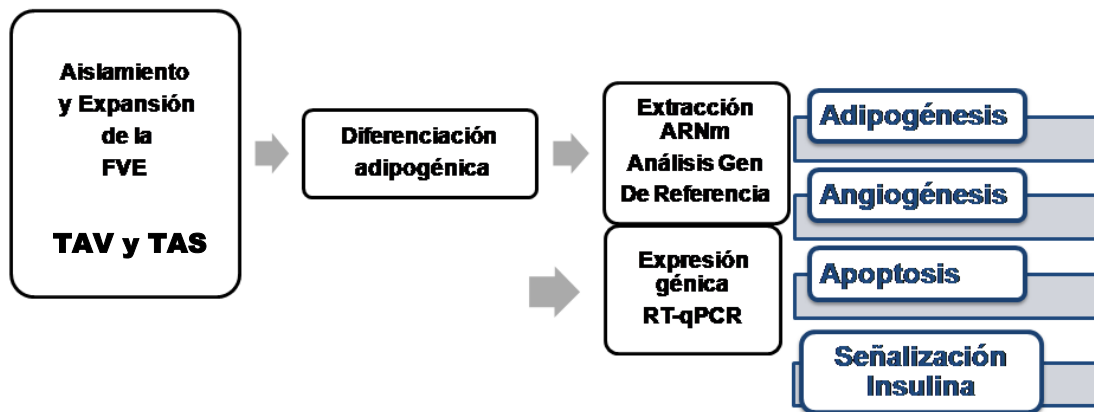


V.4. Estudio *in vitro*

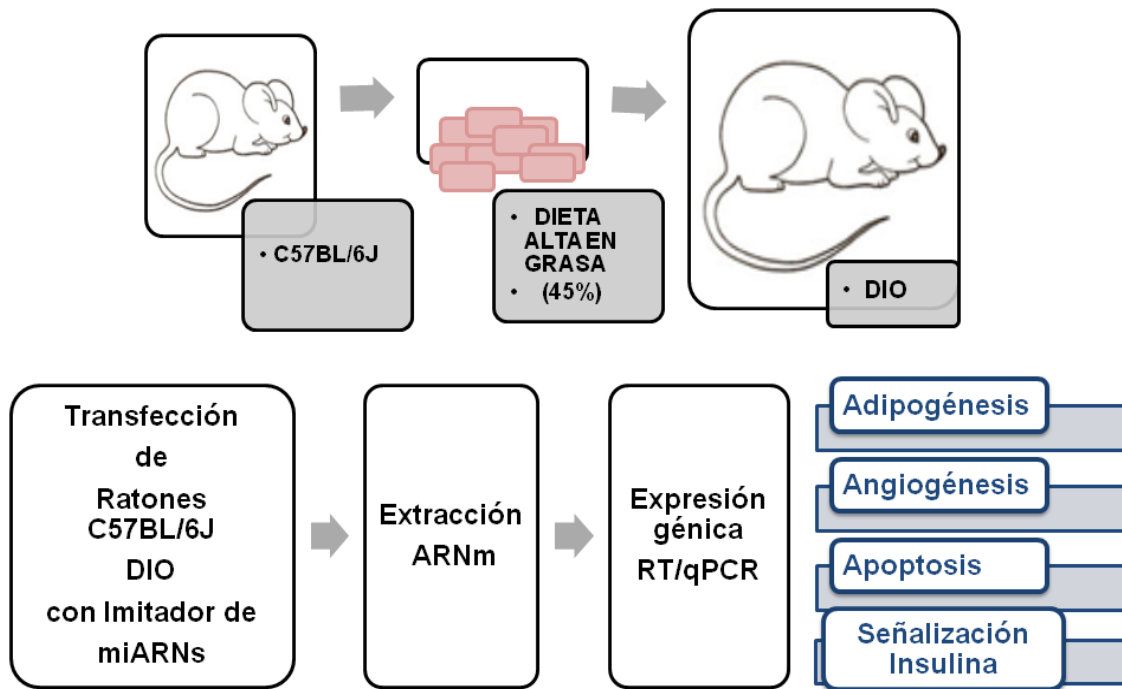
a) De los mecanismos moleculares de miARNs en procesos biológicos en línea celular de ratón.



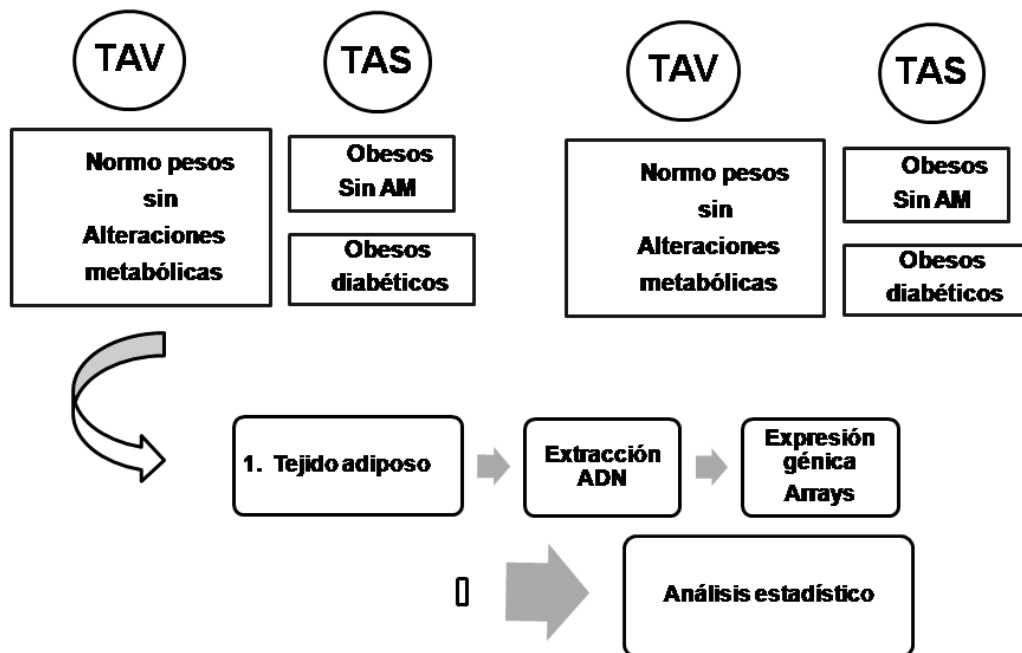
b) Perfil de expresión de genes diana de los miARNs estudiados, en FVE proveniente de TA humano.



V.5. Estudio *in vivo* de los mecanismos moleculares de miARNs en procesos biológicos.



V.6. Estudio epigenético: Metilación del ADN de genes relacionados con las vías de angiogénesis, adipogénesis, apoptosis y señalización de la insulina en TA humano



VI. MATERIALES Y MÉTODOS



VI.1. Colección de tejido adiposo y células del estroma vascular

VI.1.1. Pacientes humanos

Un total de 90 sujetos fueron reclutados del Hospital Universitario Virgen de la Victoria y Hospital Universitario Regional (Hospital Civil) de Málaga, España.

Las muestras de TA fueron extraídas desde pacientes sometidos a cirugía bariátrica (obesos) o cirugía por hernia de hiato o colelitiasis (no obesos). El comité ético (Subcomisión de investigación clínica del Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Málaga) aprobó el estudio y se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes.

Las muestras de TAV y TAS procedentes de los donantes intervenidos quirúrgicamente se transportaron desde el quirófano de los respectivos hospitales hacia el laboratorio de investigación de IBIMA (Málaga, España) en solución salina balanceada de Hank's (Sigma, H9269) suplementada con estreptomina (300 µg/mL) (Sigma; P-0781), penicilina (300 U/mL) (Sigma; P-0781) y anfotericina B (1.5 µg/mL) (Sigma, A-2942). Bajo las condiciones de esterilidad proporcionadas por la cabina de flujo laminar de clase II, las biopsias de tejido adiposo se depositaron en placas de 100 mm (Corning, 430167) y se lavaron con PBS (Sigma, D-1408) para eliminar restos celulares no deseados.

Los sujetos del estudio fueron clasificados como sigue: (a) Normo pesos sin alteraciones metabólicas (NS), (b) Normo pesos Diabéticos (ND), (c) Obesos sin alteraciones metabólicas (OS), (d) Obesos Diabéticos (OD), (e) Obesos Resistentes a la Insulina (ORI), (f) Normo pesos con bajo grado de RI (N/B-RI), (g) Normo pesos con alto grado de RI (N/A-RI), (h) Obesos con bajo grado de RI (O/B-RI), (i) Obesos con alto grado de RI (O/A-RI).

El criterio utilizado para incluir a los pacientes en los grupos de Normo pesos y Obesos fue el Índice de Masa Corporal (IMC). El grupo de Normo pesos con IMC entre 18.5 y 24.9 y el grupo de Obesos con $IMC \geq 30$.

El criterio diagnóstico para incluir a los pacientes diabéticos fue el recomendado por la OMS: a) Glucosa sanguínea al azar, mayor o igual a 200 mg/dl. b) Hemoglobina glucosilada (HbA1c) mayor o igual a 6,5%. c) Glucosa sanguínea posterior a una sobrecarga de 75g de glucosa, mayor o igual a 200 mg/dl. d) Alteración de la glucosa basal después de al menos 8 horas de ayuno, con valores de glucosa mayor o igual a 110 mg/dl.

El criterio para incluir a los sujetos RI fue el índice HOMA-IR (Mattheus D y col., 1985). Los grupos Normo pesos y Obesos con bajo grado de Resistencia a la insulina con $HOMA-IR \leq 3.5$ y los grupos Normo pesos y Obesos con alto grado de Resistencia a la insulina con $HOMA-IR \geq 7$. El punto de corte para HOMA-IR se estableció en 3.5, utilizando los criterios del percentil 90 en una población española (Gayoso-Diz P y col., 2013).

Los criterios de exclusión fueron: a) Pacientes con tratamiento para DMT2 y/o enfermedad cardiovascular durante los seis meses anteriores a la inclusión en el estudio. (b) Pacientes con evidencia aguda o crónica de enfermedad inflamatoria. (c) Pacientes que se negaron a participar en el estudio.

VI.1.2. Aislamiento y Expansión de la Fracción Vascular Estromal del Tejido Adiposo Visceral y Subcutáneo

El aislamiento de la FVE del VAT y SAT se llevó a cabo utilizando un procedimiento modificado de Zuk PA y col., 2001. Las muestras una vez lavadas dos veces con PBS, se fragmentaron y luego se realizó una digestión enzimática en una solución que contiene

Colagenasa tipo II y Albúmina Sérica Bovina (BSA) durante 20 min a 37 ° C en un baño de agua con agitación. La suspensión celular resultante se centrifugó a 500xg durante 10 min. Los adipocitos flotantes se descartaron y el precipitado que contiene la FVE se filtró a través de una malla de 100 µm, y se centrifugó a 400xg durante 5 min. Los pellets de células se resuspendieron en un tampón hipotónico para lisar los eritrocitos durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó de nuevo a 400xg durante 5 min. Los pellets celulares se suspendieron en el medio de expansión DMEM / F12 suplementado con 10% de suero bovino fetal, 100 µg / ml de estreptomicina, 100 U / ml de penicilina, 2 mM de L-glutamina y 1 µg / ml de anfotericina B. Las células fueron entonces sembradas en matraces de cultivo de tejidos e incubados a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ durante aproximadamente 8 días hasta que se alcanzó el 90% de la confluencia. Todos los reactivos se compraron en Sigma (St. Louis, MO, EE. UU.)

VI.1.3. Ratones C57BL/6J

Ratones machos de la cepa C57BL/6J, de 8 semanas de edad, comprados en Charles River (Francia) fueron aclimatados en el animalario de IBIMA durante una semana antes de los experimentos. Posteriormente, fueron alimentados con dieta alta en grasa durante 8 semanas para obtener ratones DIO (por su sigla en inglés, Diet Induced Obesity: obesidad inducida por dieta), sin diabetes ni RI. Para ello se realizan Test de tolerancia a la glucosa (TTG) e insulina (TTI). Luego, los ratones fueron divididos en tres grupos y tratados con imitador de miR-221 (n=8), imitador de miR-222 (n=8) o control de miARN (n=8). Paralelamente, ratones de control fueron alimentados con dieta normal que contiene 10% de grasa saturada (n=10) (D12450B Research Diets Inc, New Brunswick, New Jersey, USA). Una vez concluido el experimento los ratones fueron sacrificados por dislocación

cervical y las muestras de TAV y TAS fueron obtenidas inmediatamente después, congeladas con nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta su procesamiento.

VI.2. Estudio *in vitro*.

- a) Los mecanismos moleculares de regulación post-transcripcional génica, mediados por mmu-miR-221-3p y mmu-miR-222-3p, en adipogénesis, angiogénesis, apoptosis y señalización de insulina, fueron analizados sobre-expresando e inhibiendo células murinas 3T3-L1 con imitadores e inhibidores de cada uno de los miARNs.
- b) La Fracción Vascular Estromal de TAV y TAS humano fue diferenciada a adipocitos para analizar genes de referencia adecuados.

VI.2.1. Transfección de células 3T3-L1 con imitador e inhibidor de mmu-miR-221-3p y mmu-miR-222-3p

Células de la línea celular 3T3-L1 (ATCC®- CL-173TM) se sembraron en placas de seis pozos y fueron expandidas en medio DMEM/F12 (SIGMA) suplementado con 10% de FCS bajo condiciones estándares de cultivo (37°C en atmósfera húmeda con 5 % de CO₂). Una vez que las células alcanzaron la confluencia, el medio de expansión se reemplazó por medio de inducción adipogénica compuesto por el medio de expansión suplementado con 0,5 mM de IsoButil Metil Xantina (IBMX), 1,0 µM de dexametasona y 1,67 µM de insulina durante dos días, después de los cuales, éste medio se sustituyó por medio DMEM/F12 suplementado con 10% de FCS y 1,67 µM de insulina durante otros cinco días. Transcurridos estos siete días se sometió a los adipocitos a estimulación/inhibición con imitador/inhibidor de mmu-miR-221-3p o mmu-miR-222-3p.

VI.2.2. Células 3T3-L1

Las células 3T3-L1 (ATCC. Manassas, VA 20108 USA) son células embrionarias, de tipo fibroblastos, de ratón *Mus musculus* con capacidad de diferenciarse en adipocitos en respuesta a una mezcla de insulina, dexametasona e IBMX. La denominación 3T3 proviene de la abreviatura del protocolo de incubación de estas células, que es una transferencia cada 3 días. L1 es una sub-cepa continua de 3T3 (albinos suizos) desarrollado a través de un aislamiento clonal. Las células tienen propiedades adherentes e inhibición por contacto (Fig. 13).

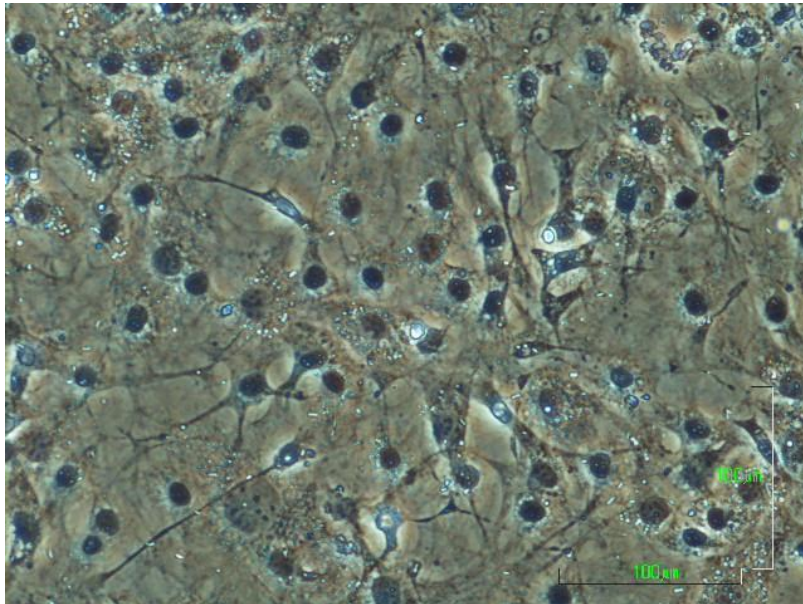


Fig. 13. Células 3T3-L1.

VI.2.3. DharmaFECT™3 siRNA Transfection Reagent

El reactivo DharmaFECT™3 siRNA Transfection Reagent (Thermocientific) tiene una alta eficacia en la administración de miARNs con un impacto mínimo sobre la viabilidad celular en una amplia gama de tipos de células.

VI.2.4. Imitador e Inhibidor de mmu-miR-221 y mmu-miR-222

Los imitadores de miARN de miScript (Qiagen), son ARN de doble cadena sintetizados químicamente que imitan a los miARNs endógenos maduros después de la transfección en las células. Estos productos están disponibles en grado de cultivo celular (> 90% de pureza). Los inhibidores de miScript (Qiagen) son también adecuados para el mismo experimento.

Se utilizó miScript miRNA: Mimic-mmu-miR-221-3p (MSY0000669); Mimic-mmu-miR-222-3p (MSY0000670); Anti-mmu-miR-221-3p (MIN0000669); Anti-mmu-miR-222-3p (MIN0000670); AllStars Neg. Control siRNA (Nº Cat. 1027281) según el siguiente diseño experimental:

- (A) Medio adipogénico
- (B) Medio adipogénico + 5 nM miR-221 imitador
- (C) Medio adipogénico + 50nM miR-221 inhibidor.

Se realizaron cinco réplicas (n=5). El experimento fue ejecutado en pase temprano P1 – P3. Transcurridas 48 hs posteriores a la estimulación se extrajo el ARNm.

Al principio del experimento se realizaron los siguientes controles: Control Mimic, Control Inhibidor, Control Agente de Transfección y Control de Adipogénesis con células sin diferenciar. Los resultados fueron comparados con respecto a las condiciones del Control medio adipogénico no encontrando ninguna diferencia significativa. Por lo que todos los resultados se han referido a este último.

VI.2.5. Diferenciación adipogénica de la Fracción Vascular Estromal

La diferenciación adipogénica se llevó a cabo como se describió anteriormente (Roca-Rodriguez MM y col., 2015; Oliva-Olivera W y col., 2015). Las células fueron inducidas a diferenciar entre los pasajes dos y tres. Las células de la FVE de ambos tejidos fueron

sembradas en placas de 12 y 96 pocillos a una densidad de 10.000 células por cm² en medio preadipocito humano (DMEM / medio de Ham F-12 (1: 1, vol / vol), 20 mM HEPES pH 7.4 suplementado con Suero Bovino Fetal (FBS) (10%), Penicilina (1%) Estreptomicina (1%). El medio preadipocito fue reemplazado cada 2-3 días después de alcanzar la confluencia del 90% y luego reemplazado por medio adipogénico el día 21. Durante los primeros tres días, el medio de inducción fue DMEM / Medio de Ham F-12 (1: 1, vol / vol), HEPES (20 mM) pH 7,4 suplementado con FBS (10%), Biotina (33 μM) (Sigma, B 4501), Pantotenato (17 μM) (Sigma, P5155), Insulina humana (10 μM) (Sigma, I9278), Dexametasona (1 μM) (Sigma, D8893), IBMX (0.5μM) (Sigma, I5879), Pioglitazona (10 μM) (Sigma, E 6910), Rosiglitazona (0,5 μM) (Sigma, R 2408), Penicilina / Estreptomicina 1% y 1 μg / ml de Anfotericina B. Luego, el medio fue reemplazado por medio adipogénico: medio DMEM / Hams F-12 (1: 1, vol / vol), HEPES (20 mM) pH 7,4 suplementado con FBS (10%), Insulina humana (10 μM), Dexametasona (1μM), Pioglitazona (10μM), Rosiglitazona (0.5μM). Después de una semana de diferenciación adipocítica, las células se recogieron y procesaron para la extracción de ARNm y qPCR.

La confirmación del estado adipogénico se llevó a cabo mediante la tinción de los depósitos intracelulares de lípidos con solución Rojo Nilo (3 % en PBS), preparada a partir de una solución stock AdipoRed (Lonza, PT-7009), y solución de Oil Red O (30 % en PBS) (Alfa Aesar, A12989), preparada a partir de una solución stock de Oil Red O al 0.5 % en isopropanol, respectivamente.

VI.3. Estudio *in vivo*.

Estudio en ratones DIO, de los mecanismos post-transcripcionales en los que están implicados miR-221 y miR-222. Todos los procedimientos fueron aprobados por el

Comité Ético de Experimentación de la Universidad de Málaga (CEUMA), con expediente N°: 2014-0002-A.

El modelo de ratón DIO se ha convertido en una de las herramientas más importantes para comprender la interacción de dietas de alto contenido graso y el desarrollo de la obesidad ya que imita de cerca la alta disponibilidad de alimentos ricos en grasa en la sociedad moderna en las últimas dos décadas, que son los principales contribuyentes a la tendencia de obesidad en humanos (Wang CY y col., 2012).

VI.3.1. Obtención del modelo de ratón con obesidad inducida por la dieta

Como la obesidad es una patología multifuncional que implica alteraciones del peso corporal, del TA, del metabolismo de la glucosa, RI y marcadores inflamatorios, el diseño preexperimental conducente a las mediciones y métodos utilizados para evaluar los parámetros necesarios para llevar a cabo nuestro objetivo es crucial para obtener resultados exitosos (Wang CY y col., 2012). Para evitar el sesgo en los experimentos conducentes a la obtención del modelo de ratón DIO, se debe tener en cuenta lo siguiente:

1. Durante todo el proceso las condiciones del alojamiento, alimentación y tratamiento debe ser constante a lo largo de todo el experimento. La alteración de alguno de estos factores puede afectar el peso corporal y/o su metabolismo.
2. Como en muchos mamíferos, los ratones C57BL/6J en jaulas también establecen jerarquías sociales que dictan la distribución de alimentos, agua, reposo, lugares y apareamiento. Diferentes números de ratones en jaulas resultará en diferentes comportamientos sociales y tendrá un impacto en el desarrollo de la obesidad (Wang CY y col., 2012). Por lo tanto, es conveniente alojar los ratones en jaulas individuales.
3. La comida debe ser proporcionada de forma controlada, ya que con una prolongada exposición al aire los ácidos grasos se oxidan. El alimento debe conservarse bien cerrado

a 4°C hasta su uso. Administrar el alimento con granos grandes, no fragmentado ya que las partículas pequeñas pueden causar error en la medición de la ingesta de alimentos. Se debe poner más alimento del necesario y no agregar alimento fresco entre medidas, ya que podría dar lugar a diferencias entre grupos. Los grupos de dieta con alto contenido de grasa generalmente ingerirán más cantidad de alimentos comparado con grupos control (Wang CY y col., 20012).

VI.3.2. Test de tolerancia a la glucosa

La prueba exacta de tolerancia a la glucosa (TTG) depende de la preparación de los ratones. Para imitar de cerca la prueba en humanos, los ratones se deben mantener con un ayuno de 8 a 12 hs durante su fase de reposo. De esta forma las lecturas basales de glucosa y el nivel de glucosa después de la prueba de tolerancia podrán ser interpretados. La glucosa es administrada por inyección intraperitoneal. Esta vía es más consistente con la dosis y los resultados. También ahorra tiempo si la prueba se realiza con muchos ratones. Sin embargo, no es fisiológico y no puede compararse totalmente con el TTG humana ya que omite los efectos de la glucosa en el tracto gastrointestinal (Wang CY y col., 20012). La glucosa debe administrarse a una concentración de 2 g / kg (glucosa / peso corporal) si la glucosa se medirá antes que los ratones se conviertan en diabéticos. Esta concentración resultará en un valor de glucosa ilegible en el glucómetro si los ratones se convierten en diabéticos, en cuyo caso, debe administrarse a razón de 1g/Kg (glucosa/peso corporal).

El rango de valores de glucosa que lee el glucómetro es 20-600 mg/ dl. Si el glucómetro indica el valor "Hi" significa que es > 600 mg/dl. En este caso se debe recoger la sangre en un tubo capilar y diluirlo 2 veces con solución fisiológica estéril. El nivel real de

glucosa rara vez llega a 1.200 mg / dl y la dilución 2 × normalmente es suficiente para mostrar el nivel exacto (Wang CY y col., 20012).

VI.3.3. Test de tolerancia a la insulina

La prueba de tolerancia a la insulina (TTI) consiste en medir la hipoglucemia que se produce al someter al ratón a una sobrecarga de insulina. Para ello se mide la glucosa basal y luego se inyecta a cada ratón 0,75 mU/g es decir; 0,01 ml/g de Insulina 75 mU/ml. Posteriormente se sigue igual procedimiento del realizado en el TTG.

VI.3.4. Transfección de ratones con imitador y control de miR-221 y miR-222.

Ratones DIO fueron transfectados con Control e imitador de miR-221 y miR-222 (Riboxx) y se utilizó como vehículo de entrega *in vivo*-jetPEI® (Polyplus-transfection® SA, NY 10020 USA). Los ratones fueron sometidos a Inyección subcutánea de 500 µl tres veces por semana durante 8 semanas.

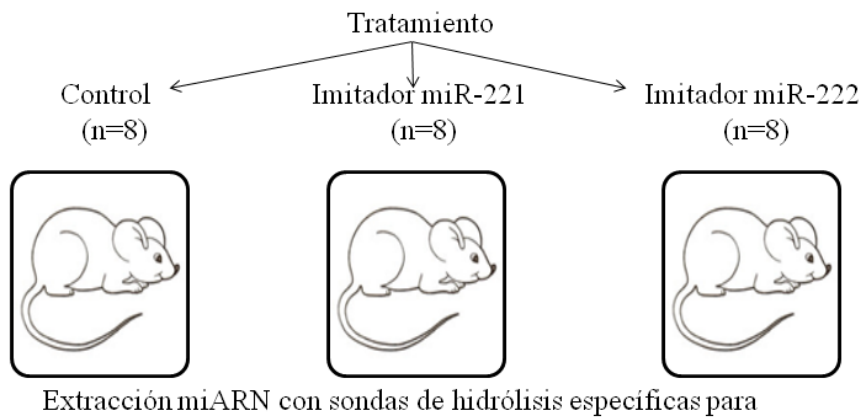
In vivo-jetPEI® (Polyplus transfection®, Illkirch, Francia) es un potente reactivo basado en un polímero utilizado para suministrar cualquier ácido nucleico a cualquier modelo animal. El protocolo es similar a una transfección clásica: el ácido nucleico y el reactivo se mezclan y se administra al animal. *In vivo*-jetPEI® forma complejos estables con el ácido nucleico, protegiéndolo de la degradación y facilitando así el suministro *in vivo*.

El imitador de miARN *in vivo* (CONMIR®, Riboxx GmbH, Radebeul, Alemania) es un híbrido de la secuencia de microARN madura y su secuencia complementaria, ensamblado en un dúplex de ARN para la imitación (mimic) del gen *in vivo*. El imitador tiene la tecnología RNAi-cap, que le da mayor potencia y una estabilidad en suero de 72 hs ya que es resistente a las nucleasas séricas. El producto es entregado libre de sal y endotoxinas como producto de grado clínico (CLINIgrade). El Control negativo no tiene

homología con ningún gen de mamífero conocida, entra en RISC y no tiene efectos en las células estudiadas. Su secuencia no es proporcionada por el fabricante.

VI.3.5. Extracción de miARNs de ratones tratados con imitador y control de miR-221 y miR-222

El diseño experimental seguido para la extracción de miARN desde los ratones tratados se muestra en el siguiente esquema:



(TAV y TAS) #	(TAV y TAS) ##	(TAV y TAS) ###
snoRNA142	snoRNA142	snoRNA142
miR-221	miR-221	miR-222
miR-222		

$\Delta Ct_{TAV \circ TAS} = (C_{miR-221}) - (C_{Endógeno}) \rightarrow Control_{TAV \circ TAS}$
 $\Delta Ct_{TAV \circ TAS} = (C_{miR-222}) - (C_{Endógeno}) \rightarrow Control_{TAV \circ TAS}$

$\Delta Ct_{TAV \circ TAS} = (I_{miR-221}) - (C_{Endógeno}) \rightarrow Imitador_{TAV \circ TAS}$
 ### $\Delta Ct_{TAV \circ TAS} = (I_{miR-222}) - (C_{Endógeno}) \rightarrow Imitador_{TAV \circ TAS}$

VI.4. Análisis de la expresión génica

Para el análisis de la expresión génica se llevaron a cabo una serie de procedimientos, los cuales, fueron realizados prestando gran atención a la manipulación y limpieza de las

muestras, materiales y áreas de trabajo, para evitar la contaminación con enzimas que degradan el ARN (ARNasas). Para ello, en todo momento la preparación de soluciones y el lavado de los materiales utilizados fueron tratados con inhibidores de estas enzimas y la limpieza del área de trabajo con etanol 70%.

VI.4.1. Criterio de elección de los miARNs del estudio

Según nuestro mejor conocimiento, hasta la fecha de la elección de los miARNs para el presente estudio, no había publicaciones con datos a nivel de TA, relacionando estos miARNs con la obesidad y la DMT2. Por este motivo, nuestro criterio de elección de los miARNs fue enfocado, principalmente, en su relación con la regulación de los procesos y funciones principales del TA como son Angiogénesis, Adipogénesis y Apoptosis y se muestra en Tabla 1 y Figura 11.

VI.4.2 Extracción de miARNs

Los microARNs fueron extraídos desde fragmentos de TA (0.08 ± 0.02 g) (humano y murino) usando *mirVana*TM miRNA Isolation Kit (Ambion by Life Technologies, California, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

En esta técnica el aislamiento de ARN altamente enriquecido de pequeños ARNs (≤ 200 nt) se obtiene mediante dos diferentes concentraciones de etanol. Primero se llevan las muestras a una concentración al 25% de etanol y cuando esta mezcla de lisado/etanol se hace pasar a través de un filtro de fibra de vidrio los ARNs ≥ 200 nt se inmovilizan y los pequeños ARNs se recogen en el filtrado. Luego, la concentración de etanol se aumenta al 55% y se pasa por un segundo filtro de fibra de vidrio donde los pequeños ARNs quedan inmovilizados y luego de varios lavados se eluyen en agua libre de ARNasas.

VI.4.3. Extracción de ARNm

a) El ARN mensajero fue extraído desde fragmentos de TA (humano y murino) usando RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit, Cat No/ID: 74804 (Qiagen. Hilden, Germany), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Esta técnica permite una purificación eficiente del ARN total desde pequeñas cantidades de material de partida mediante la combinación de una lisis con guanidina-isotiocianato (QIAzol) que es un agente caotrópico (favorece la disolución en agua de compuestos insolubles) y una veloz centrifugación de una membrana de sílice contenida en pequeñas columnas (Silica technology). Esta técnica proporciona, además, un paso opcional para eliminar el ADN aumentando así la pureza del producto obtenido. El peso exacto del tejido es necesario ya que en el proceso de homogeneización se debe ajustar el volumen del buffer al peso del tejido.

b) La extracción de ARNm, desde células 3T3-L1 o desde la FVE, se realizó utilizando STAT-60™. (AMS Biotechnology, Oxfordshire, UK). Este reactivo se provee listo para su uso y permite una extracción de ARNm, desde tejidos o células, en un solo paso. La composición incluye fenol y tiocianato de guanidina en una solución monofásica. La muestra biológica es homogeneizada con STAT-60™ y con el agregado de cloroformo se logra una separación en dos fases, la fase acuosa contiene el ARN y la fase orgánica el ADN y las proteínas. Por medio de isopropanol se precipita el ARN desde la fase acuosa. Luego, el precipitado es lavado con etanol y solubilizado con agua libre de ARNasa.

VI.4.4. Cuantificación y Pureza del miARN y ARNm obtenido

La cuantificación y pureza del miARN y ARNm se realizó en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Fig. 14 y 15). Para la cuantificación, 2 µl de muestra de miARN o ARNm fue medida contra un blanco de agua destilada y una concentración de miARN o

ARNm en ng/μl fue obtenida para cada muestra. La pureza del miARN o ARNm obtenido, fue comprobada midiendo la absorbancia a 260 nm, 280 nm y 230 nm y obteniendo las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230. Valores > 1,8 indican libre de contaminación con proteínas, la primera relación y libre de contaminación con alcoholes, la segunda.

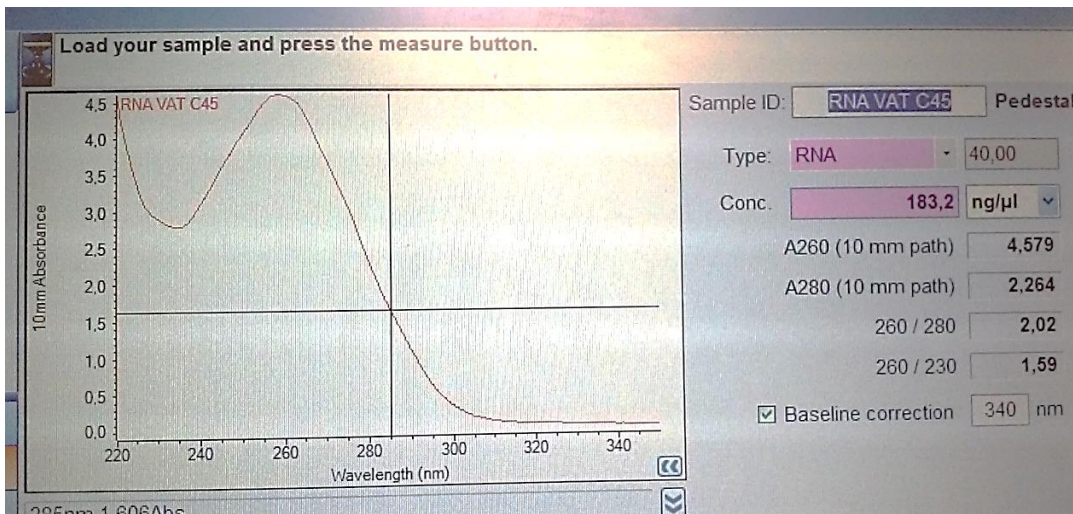


Fig.14. Figura representativa de la medida de la concentración de ARN en Nanodrop.

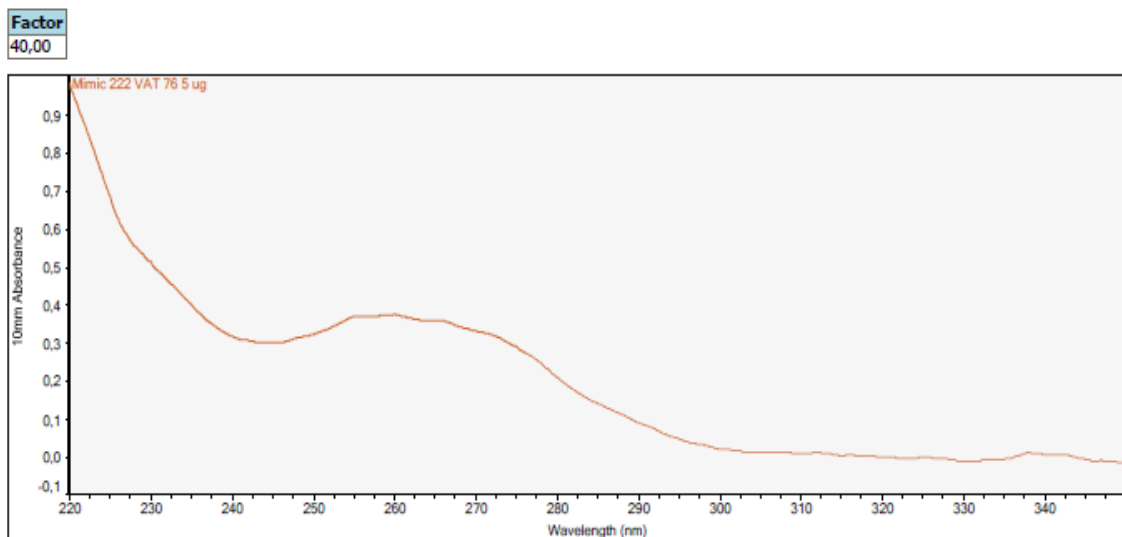


Fig.15. Figura representativa de la medida de la concentración de miARN en Nanodrop.

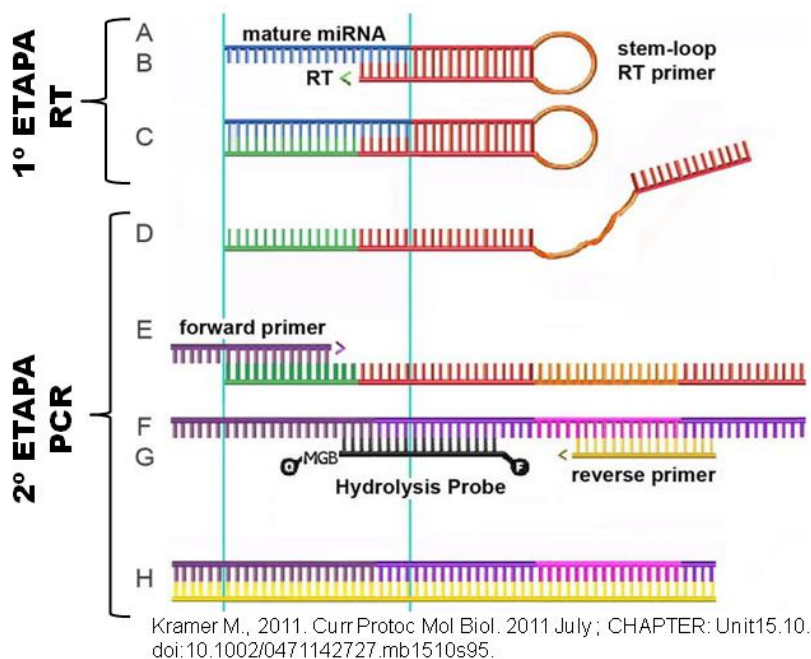
VI.4.5. Control de integridad del ARN

El Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) permitió el análisis de muestras de ARN total por electroforesis capilar. El ARN se separó según el tamaño del fragmento y los resultados se devolvieron como electroferogramas e imágenes virtuales de gel. Un índice para la calidad del ARN, el llamado RIN (número de integridad del ARN), se deriva del perfil electroforético. La escala de RIN oscila entre 1 y 10. Un RIN de 10 denota un excelente ARN, mientras que un valor RIN de 1 indica una degradación masiva. Para el cálculo de RIN, el algoritmo no se basa únicamente en la relación 28S/18S-rARN, sino que tiene en cuenta todo el perfil electroforético.

VI.4.6. RT-qPCR para miARNs

La obtención de ADN complementario (ADNc) a partir de miARNs y su posterior expresión génica mediante PCR cuantitativa (qPCR) se ha realizado con el KIT TaqMan® MicroRNA Assays (Applied Biosystem), Thermo Fisher Scientific. Este método es específico ya que detecta solo miARNs maduros y discrimina con tan solo una base. También es sensible ya que puede detectar miARNs en tan sólo 1 a 10 ng de ARN total. Puede utilizarse para medir miARNs individuales en tejidos o células cultivadas. Es decir, que la intención del uso de este Kit es la de convertir a ADNc y amplificar solo el miARN de interés. Cualquier método estándar de PCR requiere una plantilla que supera en dos veces el largo de cualquier miARN. Además, los miARNs son demasiado cortos para alojar un par de cebadores adecuados y una sonda. El método que utiliza este Kit realiza la prueba en dos etapas (Fig.16). La primera etapa corresponde a la RT, donde mediante un cebador que contiene una estructura tallo-bucle (stem-looped) altamente estable permite alargar el ADNc diana. La segunda etapa es la amplificación por PCR, la cual utiliza un cebador directo (forward primer) que incluye cinco nucleótidos

adicionales que optimizan la Temperatura de fusión (T_m) obteniendo un oligo final con una T_m de $60 \pm 1^\circ\text{C}$, un cebador inverso universal que es complementario a una secuencia dentro de la imprimación tallo-bucle de la RT, y una sonda de hidrólisis para la detección y cuantificación específica de productos de PCR, que tiene, además, un marcador del surco menor (MGB) que le permite aumentar su especificidad.



RT-qPCR microARNs

Fig.16. RT-qPCR miARNs. La obtención de ADN complementario (ADNc) a partir de miARNs y su posterior expresión génica mediante PCR cuantitativa (qPCR) se ha realizado en dos etapas como sigue: Etapa 1(RT), (A) El miARN maduro, de color azul y el cebador + tallo-bucle, de color rojo. Las puntas de flechas abiertas indican las direcciones de polimerización y las dos líneas de color azul claro que se extienden desde A hasta H, muestran el límite de la secuencia del miARN maduro dentro de los productos de RT y qPCR. (B) El cebador + tallo-bucle reconoce 6 nucleótidos 5' con 6 nucleótidos 3' del miARN maduro. La transcriptasa inversa (RT) comienza a polimerizar. (C) La primera cadena de ADNc, después de la polimerización. Etapa 2 (PCR), (D) La desnaturalización, y separación de la doble cadena. (E) Cebador directo con el añadido de 5 nucleótidos. (F) La segunda cadena de ADNc. (G) La sonda de hidrólisis y el cebador inverso. (H) El producto de la PCR definido por las terminaciones 5' de los cebadores directo e inverso.

En la etapa de transcripción inversa, el ADNc es inversamente transcrito a partir de muestras de ARN total utilizando cebadores específicos de miARN TaqMan® MiARN

Assays (Applied Biosystem) (hsa-miR-221 Ref. 000524; hsa-miR-222 Ref. 002276; snoRNA142 Ref. 001231; U6 snRNA Ref. 001973) y reactivos del Kit TaqMan® Micro RNA Reverse Transcription (Applied Biosystem) (Ref. 4366597).

En la etapa de PCR, los productos de PCR se amplificaron a partir de las muestras de ADNc utilizando el KIT TaqMan® MicroRNA Assays junto con TaqMan® Universal PCR Máster Mix (Applied Biosystem). La mezcla de esta Máster Mix contiene ADN Polimerasa, AmpErase® UNG (Uracil ADN glucosilasa), enzima que elimina cualquier uracilo, incorporada en el ADN de una o de doble cadena protegiendo contra la posterior re-amplificación de productos de PCR que contienen dU para minimizar la contaminación por arrastre; dNTPs con dU, una referencia pasiva en colorante ROX™ y buffer. Cada muestra se realizó por duplicado y un control negativo fue incluido en todas las reacciones. En una placa de 96 pocillos (Fig.17) se muestra la distribución de los distintos genes:

- Pocillos A1-A8/B1-B8 contienen *primers* de genes constitutivos para normalizar la reacción de qPCR.
- Pocillos C1-C8/D1-D-8, E1-E-8/F1-F-8', G1-G8 /H1-H8. Cada grupo contienen *primers* de genes de la misma ruta biológica que se quiere analizar.
- Pocillos G9/H9, G10/H10, G11/H11 y G12/H12. Cada grupo contienen diferentes controles negativos de cada una de las reacciones de PCR.
- Pocillos de A1/H1: muestra1, de A2/H2: muestra2, de A3/H3: muestra3, de A4/H4: muestra4, de A5/H5: muestra5, de A6/H6: muestra6, de A7/H7: muestra7, de A8/H8: muestra8.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8				
B	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8				
C	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8				
D	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8				
E	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8				
F	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8				
G	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
H	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12

Fig.17. Diseño de la placa para expresión génica de miARNs. Cada muestra se introduce por duplicado en los pocillos y un control negativo se incluye en todas las reacciones. La distribución sigue el siguiente orden: Pocillos A1-A8/B1-B8 contienen *primers* de genes constitutivos para normalizar la reacción de qPCR. Los Pocillos C1-C8/D1-D8, E1-E-8/F1-F8, G1-G8 /H1-H8 forman grupos que contienen *primers* de genes de la misma ruta biológica que se quiere analizar. Los Pocillos G9/H9, G10/H10, G11/H11 y G12/H12 forman grupos que contienen diferentes controles negativos de cada una de las reacciones de PCR. Los pocillos de A1/H1: muestra1, de A2/H2: muestra2, de A3/H3: muestra 3, de A4/H4: muestra4, de A5/H5: muestra5, de A6/H6: muestra6, de A7/H7: muestra7, de A8/H8: muestra8.

La expresión génica se midió por PCR a tiempo real con 7500 FAST REAL-TIME PCR System (Applied Biosystem), 7500 software V.2.0.6 siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Un ciclo umbral (valor Cq) se obtuvo para cada curva de amplificación que luego fué ajustado para que todas las placas tengan la misma línea de base. Los datos se exportaron a una Tabla Excel.

La Figura 17 corresponde al diseño de una placa de muestras humanas donde no existe un calibrador. El resultado se obtiene mediante la fórmula $2^{-\Delta Cq}$. En cambio, cuando la muestra se puede controlar, como es el caso de las células, si se ha usado un calibrador. En este caso, el resultado se ha obtenido mediante la fórmula $2^{-\Delta\Delta Cq}$.

VI.4.7. Transcripción inversa. Obtención de ADNc

La transcripción inversa (RT, por sus siglas del inglés: reverse transcription) es una técnica utilizada para obtener ADN a partir de ARN. El ARN es una molécula monocatenaria que, por acción de una enzima, de tipo ADN-polimerasa, puede convertirse en una molécula de ADN de doble hélice. El ARN sirve de molde para que la enzima Transcriptasa inversa catalice la RT. La enzima copia la secuencia

complementaria del ARN creando una cadena sencilla, el ADNc, basado en la correspondencia de bases A-T, U-A, G-C, C-G.

El ADNc se obtuvo por transcripción del ARNm con la enzima transcriptasa inversa de Roche (Transcriptor Reverse Transcriptase. Roche Diagnostic, Barcelona, España) que está diseñada para transcribir el ARN desde varias fuentes, usando termocicladores convencionales e instrumentos de PCR a tiempo real. Las moléculas de ADNc se obtienen a partir de moléculas de ARNm maduro, por tanto, el ADNc no contiene los intrones que poseen los genes eucariotas. Así, las secuencias de ADNc corresponden únicamente a secuencias codificadoras de proteínas (Portal de Medicina Molecular de FIBAO. <http://medmol.es/glosario/94/>).

VI.5. Estándares MIQUE

Desde hace algunos años la qPCR se ha convertido en una herramienta imprescindible para el análisis de la expresión génica. La falta de consenso sobre la nomenclatura y la mejor manera de realizar e interpretar esta técnica se ve reflejada en las publicaciones. Muchas de ellas, utilizan nomenclatura confusa o carecen de detalles que son necesarios para que el lector pueda evaluar críticamente la calidad de los resultados presentados o repetir los experimentos. Por esta razón, todos los datos experimentales del presente trabajo tratan de cumplir con la nomenclatura y la información mínima requerida para la publicación de experimentos de qPCR según los estándares MIQUE, del inglés, Minimum Information for Publications of Quantitative Real-Time PCR Experiments (Bustin SA y col., 2000).

VI.6. Búsqueda y/o análisis del gen de referencia

El análisis de datos de expresión génica puede verse afectado por errores internos debidos a variaciones en la calidad, el contenido y la estabilidad del ARN, la eficacia de la reacción, y la carga de la muestra (Nouaille S y col., 2017), como así también por la variabilidad debida a los diferentes tejidos usados en el experimento. Para contrarrestar estos errores es necesario el uso de genes de referencia (Farrokhi A y col., 2012). Dado que no hay ningún gen de referencia universal para todos los procesos biológicos (Klie M y col., 2011), es muy importante identificar y validar genes de referencia fiables para el análisis de los resultados de qPCR para cada grupo experimental (Bustin SA y col., 2000). En este estudio se usó la herramienta BestKeeper para este fin.

BestKeeper: Es una herramienta basada en Excel que usa correlaciones por pares y determina los estándares más adecuados, de dos o más candidatos, y los combina en un índice (Pfaffl MW y col., 2004). El software de BestKeeper ha sido descargado desde: <http://www.gene-quantification.de/bestkeeper.html> y se utilizó de acuerdo con las instrucciones del desarrollador.

VI.7. Análisis bio-informático de genes diana de miARNs

La identificación de los genes diana es un paso esencial hacia la comprensión de la función reguladora de los miARNs. Los métodos de búsqueda se pueden clasificar en: a) métodos de primera generación, que se basan en tres propiedades características, la complementariedad de secuencia miARN-ARNm, la termodinámica del híbrido miARN-ARNm y la conservación de secuencias blanco entre las especies. Entre ellos se encuentran: miRanda, DIANA-microT, RNAhybrid, MicroInspector, TargetScan and TargetScanS.

b) métodos de segunda generación, que se basan en la conservación interespecífica de las dianas, es decir, tienen en cuenta que coincida exactamente la región semilla del extremo 5' del miARN con el sitio diana, pero también tienen en cuenta la existencia de otros sitios con emparejamiento imperfecto. Las dianas 3'UTR imperfectas son seleccionadas en función de la energía libre de plegado, como máximo 2/3 de la energía libre que presenta una diana perfecta miARN: ARN. Un ejemplo de este tipo es PicTar (Li L y col., 2010).

Actualmente se sabe que los miARNs pueden estar regulando la expresión génica de su gen objetivo por otros sitios diferentes, 5'UTR, promotor y sitios que codifican aminoácidos (CDS). Una herramienta que permite la búsqueda de interacción miARN: ARNm en distintos sitios es miRWalk. Este software, en el módulo "predicted target", busca las coincidencias más largas de todas las interacciones de las secuencias descargadas desde 8 Bases de datos (DianamT, miRanda, miRDB, miRWalk, Pictar4, Pictar5, PITA, RNA22, RNA hybrid, TargetScan/TargetScanS), luego son clasificados todos los resultados en las 4 regiones de codificación de proteínas (Promotor, 5'UTR, CDS y 3'UTR) y genes mitocondriales. Finalmente calcula la probabilidad de unión (distribución de Poisson). Mientras que el módulo "validated target" recopila los genes dianas validados desde los títulos de "abstract" publicados en PubMed (Dweep H y col., 2011).

Las Bases de Datos y herramientas bio-informáticas utilizadas fueron las siguientes:

a. MirTarBase 6.0: Es una base de datos libre a la que puede accederse desde su sitio

web (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>) y

cuya última actualización data de Setiembre de

2015. Ha acumulado más de 360.000

interacciones miARN target (MTI), que se recogen desde publicaciones que han sido



validadas experimentalmente mediante ensayos publicados tales como qPCR, western blot, microarrays, experimentos de NGS o marcado isotópico (pSILAC). Esta Base de Datos ha sido utilizada para obtener los genes diana de cada uno de los miARNs objeto de este estudio.

b. El Sistema de Clasificación PANTHER (Análisis de Proteínas a través de



Relaciones Evolutivas): Es un sistema que fue diseñado para clasificar las proteínas y sus genes

para facilitar el análisis de alto rendimiento. Las proteínas se han clasificado según Familia y subfamilia. Las familias son grupos de proteínas evolutivamente relacionadas y las subfamilias son proteínas relacionadas que también tienen la misma función. Esta herramienta permite clasificar una lista de proteínas o genes de diversas maneras y así obtener una mayor información acerca de sus funciones y relaciones.

Función molecular: agrupa las proteínas según la función por sí misma o con proteínas interactuando directamente a un nivel bioquímico.

Proceso biológico: agrupa las proteínas según su función en el contexto de una red más grande de proteínas que interactúan para llevar a cabo un proceso a nivel de la célula u organismo.

Ruta: agrupa las proteínas de manera similar al proceso biológico, pero en la ruta. También especifica explícitamente las relaciones entre las moléculas que interactúan.

Las clasificaciones PANTHER son el resultado de una recopilación humana, así como de sofisticados algoritmos bio-informáticos (Mi H y col., 2013; Thomas PD y col., 2003).

La versión 11.1 (publicada el 24-10-2016) contiene 13.096 familias de proteínas, divididas en 78.442 subfamilias de proteínas funcionalmente distintas.

PANTHER es una base de datos libre a la que se puede acceder desde su sitio web (<http://www.pantherdb.org>).

c. La Base de Datos de Anotaciones, Visualización y Descubrimiento Integrado



(DAVID) v6.8: Es una Base de Datos que proporciona un

conjunto completo de herramientas de anotación funcional que permite ver el significado biológico detrás de una gran lista de genes. DAVID es una plataforma libre a la que se puede acceder desde su sitio web (<https://david.ncifcrf.gov/>). Además de una clasificación funcional, esta Base de Datos permite otras funciones tales como descubrir grupos de genes relacionados, visualizar genes en mapa de rutas, mostrar lista de proteínas que interactúan, etc.

d. Cytoscape v.3.4.0.: Es una plataforma de software de código abierto para visualizar



redes de interacción molecular y rutas biológicas e integrar estas redes con anotaciones, perfiles de expresión génica y otros datos estadísticos. Existe un

conjunto básico de funciones para la integración de datos, análisis y visualización. Las características adicionales están disponibles como aplicaciones (Plugins), que son de acceso libre.

Cytoscape es una plataforma libre a la que se puede acceder desde su sitio web (<http://www.cytoscape.org/>).

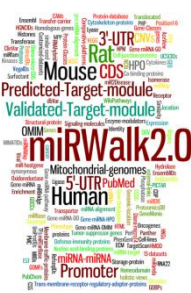
e. **GENECODIS:** Es una herramienta basada en la web que integra diferentes fuentes de



información para buscar anotaciones que frecuentemente coocurren en un conjunto de genes y clasificarlos por significación estadística.

El análisis de las anotaciones simultáneas proporciona información significativa para la interpretación biológica de los experimentos de alto rendimiento y puede superar los resultados de los métodos estándares para el análisis funcional de las listas de genes. GENECODIS está disponible públicamente en <http://genecodis.dacya.ucm.es/> (Carmona-Saez P y col., 2007).

f. **MiRWalk 2.0:** Es una base de datos de libre acceso, mediante la cual, se pueden



predecir genes diana de miARNs que están validados, como así también, se pueden predecir genes diana de miARNs que aún no han sido validados. Además, puede predecir genes diana en distintos sitios de unión miARN-objetivo, como 3'UTR, 5'UTR, CDS y PROMOTOR.

Otra particularidad es que se pueden buscar genes diana por rutas o procesos biológicos. MiRWalk está disponible públicamente en <http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/index.html> (Dweep H y col., 2011).

VI.8. Estudio epigenético. Metilación del ADN

Un total de 44 muestras de TA humano, de 4 grupos de sujetos: NS (n=6), ND (n=6), OS (5) y OD (n=5), de cada tipo de tejido, TAV y TAS fueron enviadas en hielo seco desde el Hospital Regional de Málaga (Hospital Civil) al Laboratorio Dreamgenics, Asturias, España) con el objeto de identificar las



secuencias metiladas diferencialmente en TAV y TAS en relación con la obesidad y la DMT2. Para ello se realizó un Array de metilación de ADN de 850.000 sondas (Illumina EPIC850K), validado para el análisis del perfil de metilación del ADN del Genoma humano (Moran S y col., 2016). Las características antropométricas y bioquímicas de los pacientes, objeto de este estudio, se muestran en la Tabla 4 del apartado VIII.1 del capítulo de Resultados.

VI.9. Análisis estadísticos

Los resultados fueron expresados como valores medios \pm error estándar de la media (ESM). El test de Shapiro-Wilk fue utilizado para determinar la normalidad en la distribución de las variables continuas. Un modelo lineal general multivariante fue utilizado para analizar el efecto de varias variables juntas. Las comparaciones entre más de dos grupos se ejecutaron mediante pruebas paramétricas (ANOVA o Test t Student) o no paramétricas (U Mann-Whitney). Todo el análisis estadístico fue ejecutado usando SPSS (versión 22.0 SPSS Inc., Chicago, IL). Valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.



VII – PROTOCOLOS



VII.1. Protocolos de expresión génica de biomoléculas

VII.1.1. Extracción de miARNs

(*mirVana*TM miRNA Isolation Kit, Ambion by Life Technologies)

Materiales y reactivos provistos por el KIT

- * Buffer de Lisis
- * Aditivo de homogeneizado
- * Tubos colectores
- * Filtros de fibra de vidrio
- * Soluciones de Lavado N°1 y N°2

Protocolo

El primer paso es la preparación de las soluciones de lavado, para ello agregar 21 ml de etanol 100% a la solución de lavado N°1 y 40 ml de etanol 100% a la solución de lavado N°2. Luego se debe pesar la muestra de tejido ($0,08 \pm 0,01g$) ya que en el proceso de homogeneización se debe ajustar el volumen del buffer al peso del tejido. Al tubo con el tejido pesado agregar 800µl del buffer de lisis y homogeneizar con un rotor-homogeneizador, por períodos cortos a velocidad máxima y en hielo, para que no se caliente la muestra. Antes y después de homogeneizar cada muestra debe lavarse la punta del rotor. Para ello se preparan tres recipientes conteniendo cada uno: Lejía al 50%, Agua y Agua, en ese orden. Agregar 80 µl de aditivo al homogeneizado. Mezclar por inversión e incubar en hielo 10 minutos. Para la extracción orgánica agregar 800 µl de solución ácido fenólico: cloroformo, cogido del fondo del frasco, ya que este reactivo tiene un buffer acuoso en la parte superior. Vortear 40" a velocidad máxima y centrifugar a Temperatura Ambiente (TAmb) / 11.000xg (rcf)/5min. En este paso se deben separar la fase acuosa de la orgánica y la interfase debe ser compacta. Si este resultado no se obtiene, luego de la primera centrifugación, esta se debe repeti en las mismas condiciones. Luego,

transferir la fase acuosa (superior) a un tubo limpio sin coger la fase inferior (aproximadamente 1000 μ l). Posteriormente, para el aislamiento y enriquecimiento en pequeños ARNs, a la fase acuosa recogida en el paso anterior, agregar 333 μ l de etanol 100%, mezclar por inversión y luego, pipetear 700 μ l de la mezcla Lisado/etanol en un tubo con filtro de fibra de vidrio, centrifugar 15" / 10.000xg / T_{Amb} y recoger el filtrado en un tubo limpio. Repetir el procedimiento si hay más volumen, pasándolo por el mismo filtro y recogiendo el filtrado. Al filtrado total recogido en el paso anterior agregar 750 μ l de etanol 100% y mezclar vigorosamente con la mano. Pipetear la mezcla en un nuevo tubo con filtro, en porciones de 700 μ l, centrifugar 15" / 10.000g / T_{Amb} y desechar el filtrado. Repetir este paso tantas veces como sea necesario hasta pasar todo el volumen por el mismo filtro (en general, tres veces). A continuación, se realizan lavados. - Al filtro del paso anterior, agregar 700 μ l de la solución de lavado N°1 y centrifugar 15" / 10.000xg / T_{Amb} y luego desechar el filtrado. Al mismo filtro agregar 500 μ l de solución de lavado N°2 y centrifugar 15" / 10.000xg / T_{Amb}. Desechar el filtrado. Repetir el paso anterior, al mismo filtro agregar 500 μ l de solución de lavado N°2 y centrifugar 15"/10.000xg/T_{Amb}. Desechar el filtrado. El ensamblaje tubo / filtro debe centrifugarse para eliminar el fluido residual del filtro, para ello, centrifugar 1' / 10.000xg / T_{Amb}. Para la elución de los miARN, poner el filtro en un tubo nuevo y limpio y luego agregar 100 μ l de agua libre de ARNasas, precalentada a 95°C, centrifugar 30" / 10.000xg / T_{Amb}, quitar el filtro y quedarse con el filtrado. Guardar a -80 °C.

VII.1.2. Extracción ARN

VII.1.2.1. Protocolo extracción ARN desde TA humano y murino

(RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit)

Materiales y reactivos provistos por el KIT RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit.

- * Columnas (Mini Spin Columns).
- * Tubos de colección de 1,5 ml y 2 ml.
- * Reactivo de Lisis (QIAzol Lysis Reagent)
- * Tampones de lavado (RW1 y RPE)
- * Agua libre de ARNasa

Materiales y reactivos provistos por el KIT ARNse-Free ADNse Set (50). Cat. N° 79254. (Qiagen. Hilden, Germany)

- * ADNasa, libre de ARNasa liofilizada
- * Tampón RDD
- * Agua libre de ARNasa

Materiales y reactivos no provistos por el KIT.

- * Etanol 70%.
- * Cloroformo

PROTOCOLO

El primer paso es la preparación de las soluciones de trabajo. Para ello, agregar al Buffer RPE, 4 volúmenes de etanol puro (96- 100%) a la solución concentrada para preparar el frasco completo. Otra opción es preparar solo lo que se va a usar en cada prueba experimental. En cada uso 0,8 ml (etanol 96%) + 0,2 ml (RPE) /1 ml de muestra.

Para preparar 50 ml de etanol 70%, agregamos 35 ml de etanol absoluto en un matraz o probeta y completamos hasta 50ml con agua miliQ. Trasvasar la solución a un frasco estéril y cubrir la tapa con papel “parafilm”, para evitar evaporación del alcohol.

Para preparar la solución para la digestión del ADN (Mix), agregar 70 µl de solución tampón (RDD) / muestra. Luego, agregar 10 µl de ADNasa / muestra. Mezclar por inversión muy suave para no inactivar la enzima y mantener en hielo hasta su uso.

Antes de empezar, limpiar la campana de extracción y todos los materiales a utilizar, gradilla conteniendo los tubos y columnas necesarios para todo el experimento, puntas y pipetas de 10/100/1000 µl, con alcohol al 70%, luego encender la luz ultravioleta durante 15'. También será necesario tener un homogeneizador, cloroformo, etanol puro y al 70%, como así también, tres recipientes conteniendo uno agua + lejía (50%) y los otros dos, agua libre de ARNasas para el lavado de la punta del disruptor y papel tissue para el secado y un recipiente con hielo. El siguiente paso es pesar las muestras de tejido. Para ello, preparar un recipiente con hielo seco y una placa de Petri, pinza y bisturí estériles. Pesar la muestra de tejido ($0,10 \pm 0,02$ g) en un tubo de 2 ml rotulado. Luego, agregar 1000µl del buffer de lisis y homogeneizar con un rotor-homogeneizador, por períodos cortos a velocidad máxima y en hielo, para que no se caliente la muestra. Antes y después de homogeneizar cada muestra debe lavarse la punta del rotor. Incubar 5' a T_{Amb}. Para la extracción orgánica, agregar 200 µl de cloroformo y agitar manualmente en forma vigorosa 15''. Incubar 3' a T_{Amb}. y luego centrifugar 15' / 4°C / 12.000 xg. En este paso se deben separar la fase acuosa de la orgánica y la interfase debe ser compacta. Transvasar a un tubo de 2 ml limpio alrededor de 700 µl del sobrenadante acuoso, evitando arrastrar parte de la interfase. Agregar 700 µl de etanol 70% y agitar vigorosamente unos segundos. Se obtiene así, una mezcla: sobrenadante + etanol. Transvasar 700 µl de la mezcla del paso anterior a una columna, centrifugar 15'' / 4 °C / 8000 xg y descartar el filtrado. Transvasar el resto de la mezcla sobrenadante + etanol, que sobró en el paso anterior, a la misma columna, centrifugar 15''/4 °C/8000 xg y descartar el filtrado. A continuación, se lava la columna para eliminar el ADN, agregar a la columna del paso

anterior 350 μ l de la solución de lavado RW1, centrifugar 15'' / 4 °C / 8000xg, descartar el filtrado. Agregar 80 μ l del Mix (ADNasa + RDD) preparado anteriormente, incubar 15' / T_{Amb}. Agregar 350 μ l de la solución de lavado RW1, centrifugar 15'' / 4 °C / 8000xg y descartar el filtrado y el tubo colector. Colocar la columna en un tubo colector de 2 ml nuevo. Para el segundo lavado, agregar a cada columna, 1000 μ l de RPE preparado anteriormente (RPE + etanol absoluto), "en dos veces", porque la capacidad de la columna es hasta 700 μ l, de la siguiente forma: agregar a la columna 500 μ l de la solución de lavado RPE, centrifugar 15''/4 °C/8000 xg y descartar el filtrado. Agregar a la columna 500 μ l de la solución de lavado RPE, centrifugar 2' / 4°C/8000xg y descartar el filtrado. Seguidamente, centrifugar las columnas "con la tapa abierta" 1' / 4 °C / 13.000g, para secar las columnas. Descartar el tubo colector y poner las columnas en tubo colector de 1,5 ml rotulado. La elución del ARNm se realiza agregando en el centro de la columna 30 μ l de agua libre de ARNasa, centrifugar 1' / 4°C/8000xg y desechar la columna. Tapar el tubo y mantener en hielo hasta su cuantificación.

VII.1.2.2. Protocolo extracción de ARN desde células 3T3-L1 y FVE

(STAT60)

El primer paso es la preparación y limpieza de la campana de extracción y los materiales. Limpiar la campana con alcohol al 70% y luz ultravioleta durante 15'. Preparar una gradilla conteniendo tubos de 1,5 ml y 2 ml (1 de c/u por muestra), un vortex, pipetas y puntas de 100/1000 μ l, recipiente con hielo, cloroformo, etanol al 75%, isopropanol, agua libre de ARNasas, PBS frío y el reactivo STAT60, mantenido en todo momento en frío y protegido de la luz, porque es fotosensible, por ello trabajar sin luz. Descongelar a T_{Amb} las células almacenadas en ARNlater a -80°C. Homogeneizar agregando 500 μ l PBS frío,

centrifugar 5'-500xg y desechar sobrenadante. Luego, añadir 1000 μ l de STAT60, resuspender varias veces y transferir a un tubo limpio de 1,5 ml. Mantener 5' a Tamb (o 10' en frio) y agregar 200 μ l de cloroformo (Sigma, C2432) y agitar vigorosamente 15" para extraer el ARN. Mantener 3' a T Amb., centrifugar 15' – 12000xg - 4°C y transferir la fase acuosa (aproximadamente 600 μ l) a un tubo de 2 ml limpio. Guardar la fracción proteica a -20°C. Para precipitar el ARN, agregar 500 μ l de isopropanol frio (Sigma, I9516) y mezclar por inversión, mantener 30' - 4°C, centrifugar 10' – 12000xg - 4°C y desechar el sobrenadante. Lavar agregando 1000 μ l de etanol (Sigma, 51976) al 75%, vortear y centrifugar 7500 xg - 5' - 4°C, desechar sobrenadante y marcar el sitio del pellet. Secar el pellet colocando el tubo boca abajo 5' - 10', luego, resuspender el pellet en 30 μ l de agua libre de ARNasas (Sigma, W4502) fría e incubar en termo block 10' - 60°C - 300 rpm. Luego, cuantificar en Nanodrop y guardar a -80 °C.

VII.1.3. Cuantificación y pureza del ARN

La concentración de ARN es medida en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Massachusset, MA, USA) de la siguiente forma: PC → Icono " ND100 ", click en "ácidos nucleicos", luego, limpiar el sistema óptico del Nanodrop con papel tissue. Poner 2 μ l de agua para el proceso de inicialización y clic en OK. Elegir el ácido nucleico (ADN o ARN), limpiar el sistema óptico del Nanodrop con papel "tissue" siempre, entre cada medida. Cargar con 2 μ l de agua y clic en BLANK. Cargar con 2 μ l de muestra y clic en "MEASURE". Todas las muestras son medidas por duplicado. Los resultados que se obtienen son: la concentración del ARN en ng/ μ l, la relación 260/280 que nos da información acerca de la impureza con proteínas y debe tener un valor > 1.8, la relación 260/230 que nos da información acerca de la impureza con solventes orgánicos, como por ejemplo el etanol y debe tener un valor > 1.8.

VII.1.4. Transcripción inversa. Obtención de ADNc

a). Desde miARNs

En la etapa de transcripción inversa, el ADNc es inversamente transcrito a partir de muestras de ARN total utilizando cebadores específicos de miARN TaqMan® MicroARN Assays (Applied Biosystem) y reactivos del Kit TaqMan® Micro ARN Reverse Transcription (Applied Biosystem).

Materiales y reactivos provistos por el KIT TaqMan® Micro ARN Reverse Transcription.

- * dNTP mix (100M)
- * Enzima MultiScribe™ RT (50U/μl)
- * RT buffer (10X)
- * ARNasa inhibidor (20U/μl)

Materiales y reactivos provistos por el KIT TaqMan® MicroARN Assays

- * Cebadores RT (5X)

Protocolo

La transcripción inversa se realizó respetando la proporción 5μl ARN: 7μl RT-Máster Mix: 3 μl RT-cebadores. Los 5 μl de ARN deben contener 5ng de ARN.

Primero, descongelar los reactivos en hielo. Luego, preparar la Máster mix para RT en un tubo de la siguiente manera:

- dNTP mix 0,15 μl
- RT enzima (50U/μl..... 1,00 μl
- RT buffer (10X) 1,50 μl
- ARNasa inhibidor (20U/μl) 0,19 μl
- Agua (libre de nucleasas) 4,16 μl
- Volumen total de Máster Mix... 7,00 μl

Estos volúmenes representan la cantidad necesaria para una muestra, se debe multiplicar cada volumen por el número de muestras más uno. Mezclar muy bien mediante pipeteo y centrifugar poco tiempo para que caiga el reactivo de las paredes y mantener en hielo hasta su utilización. Para preparar la mezcla de reacción, mezclar generosamente pipeteando 5 μ l de ARN (diluido o no, según sea necesario) con 7 μ l RT Máster mix y centrifugar poco tiempo. A la mezcla anterior agregar 3 μ l de primer RT, mezclar por pipeteo, tapar los tubos y centrifugar brevemente. Luego, incubar en hielo durante 5'. Llevar la mezcla anterior a termociclador utilizando el siguiente programa de 65' totales: 30' / 16°C; 30' / 42°C; 5' / 85°C. Poner volumen final = 15 μ l y mantenimiento 4°C. Finalmente, guardar a -20°C.

b). Desde ARN

La síntesis del ADNc se realizó con el kit Transcriptor Reverse Transcriptase. (Roche, Diagnostic, Barcelona, España), en un termociclador (MBS Satellite 0,2G Thermal cycler, Thermo Scientific, California, USA). Este paso de ARN a ADNc se hizo en dos etapas, la primera para unir los cebadores al ARN y para ello se añadió un volumen de ARN que contenía 1 μ g (2 μ g / 4 μ g) ajustando el volumen a 13.5 μ l (27 μ l / 54 μ l) con agua libre de ARNasas. Luego, 1 μ l (2 μ l / 4 μ l) deoxinucleótidos de secuencia azarosa (random primers). Esta mezcla se colocó en termociclador con el siguiente programa de temperaturas: 65 °C / 10'; 4 °C / 5'. La segunda etapa, para extenderlos, se usó la enzima transcriptasa inversa (Roche Diagnostic). Se preparó una mezcla cuya composición por cada muestra se describe abajo

Reactivos (para cada muestra)	Volumen (μ l)	Volumen (μ l)	Volumen (μ l)
	ARN: 1 μ g	ARN: 2 μ g	ARN: 4 μ g
Tampón de reacción 5x	4	8	16
dNTP (10 mM)	1	2	4
Inhibidor	0,25	0,5	1
Enzima	0,25	0,5	1

y se realizó en el siguiente programa de temperaturas, tras añadirlo al tubo incubado en la primera etapa: 25 °C / 10'; 42 °C / 60'; 70 °C / 30'. Una vez sintetizado el ADNc se guardó a -20°C hasta su utilización.

VII.1.5. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (miARNs)

En la etapa de PCR, los productos de PCR se amplificaron a partir de las muestras de ADNc (miARNs) utilizando el KIT TaqMan® MicroARN Assays junto con TaqMan® Universal PCR Máster Mix o con Brilliant III Ultra-Fast SYBRGreen QPCR Máster Mix (Agilent Technologies, INC. Santa Clara, CA 95051, EE. UU. Ref. 600882) (humanos) o Brilliant III Ultra-Fast QPCR Máster Mix (ratones)

TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem).

La mezcla contiene ADN Polimerasa, AmpErase® UNG (Uracil ADN glucosilasa), enzima que elimina cualquier uracilo incorporada en el ADN de una o de doble cadena protegiendo contra la posterior re-amplificación de productos de PCR que contienen dU para minimizar la contaminación por arrastre, dNTPs con dU, una referencia pasiva en colorante ROX™ y buffer.

Brilliant III Ultra-Fast QPCR Master Mix (2X) (Agilent Technologies).

Contiene una forma mutada de ADN polimerasa Taq que ha sido específicamente diseñado para una replicación más rápida, un mecanismo de arranque en caliente que mejora la especificidad de amplificación, manteniendo el tiempo de ejecución del protocolo de PCR a un mínimo, dNTPs, Mg²⁺ y buffer.

Materiales y reactivos provistos por el KIT TaqMan® MicroARN Assays

TaqMan Assay (pre formulado conteniendo: cebador directo e indirecto y sonda MGB para un volumen final de reacción de 20 µl).

Protocolo

Descongelar en hielo las muestras de ADNc y el reactivo TaqMan Assay. En un tubo tubo preparar la mezcla de reacción como sigue:

- Máster Mix..... 10,00 µl
- Agua (libre de nucleasas) 7,67 µl
- TaqMan ARN Assay..... 1,00 µl
- ADNc (producto RT) 1,33 µl
- Volumen total pocillo 20,00 µl

Mezclar por pipeteo y centrifugar brevemente. Luego, transferir 20µl/pocillo a una placa de 96 pocillos de PCR, taparla con papel “film” protector y centrifugar brevemente (hasta 3800 rpm y detener). Para preparar la mezcla de reacción de los controles negativos se reemplazó el ADNc por agua libre de ARNasas. La expresión génica se midió por qPCR con 7500 FAST REAL-TIME PCR System (Applied Biosystem), 7500 software V2.0.6, en las muestras humanas (Protocolo 1) y con Agilent Technologies Stratagene Mx3005P, MxPro QPCR Software, en nuestras murinas y humanas (Protocolo 2). En ambos casos se siguió el protocolo recomendado por el fabricante. Un ciclo umbral (valor Cq) se

obtuvo para cada curva de amplificación y un valor ΔCq se calculó restando el valor de Cq del control endógeno.

Protocolo SYBRGreen

- H₂O..... 7,3 μ l
- Máster Mix 10,0 μ l
- Cebador directo 30 μ M 0,2 μ l
- Cebador inverso 30 μ M 0,2 μ l
- Colorante (1:500) 0,3 μ l
- Volumen/pocillo 18,0 μ l
- ADNc/pocillo 2,0 μ l
- Volumen final/pocillo 20,0 μ l

Protocolo 1 (Applied Biosystem)

Seleccionar el modo de carrera estándar, ajustar el volumen total de la muestra a 20 μ l y las condiciones del termociclador como sigue: 2'/50°C, para activar UNG; 10' / 95°C para la activación enzimática y 40 ciclos 15"/ 95°C - 60"/ 60°C (Desnaturalización; Anillamiento/Extensión) de PCR.

Protocolo 2 (Agilent Technologies)

Seleccionar el modo de carrera estándar, ajustar el volumen total de la muestra a 20 μ l y las condiciones del termociclador como sigue: 3'/95°C, para la activación enzimática; y 40 ciclos 15"/ 95°C- 20"/60°C (Desnaturalización; Anillamiento/Extensión) de PCR.

VII.2. Lista de control de estándares MIQUE

INFORMACIÓN	* E / D	SI/NO/NA
DISEÑO EXPERIMENTAL		
Definición de los grupos control y experimental	E	SI
Número dentro de cada grupo (n)	E	SI
Ensayo llevado a cabo por el grupo/laboratorio del investigador?	D	SI
Reconocimiento de las contribuciones de los autores	D	SI
MUESTRA		
Descripción	E	SI
Volúmen /masa de la muestra procesada	D	SI
Micro o Macrodissección	E	SI
Procedimiento del procesado	E	SI
Si se congela, como y con qué rapidez	E	SI
Si se fija, con qué y con qué rapidez	E	NA
Condición y duración de almacenamiento (especialmente para muestras FPPE)	E	SI
EXTRACCIÓN de Acidos Nucleicos		
Procedimiento y/o instrumento	E	SI
Nombre del Kit y detalle de alguna modificación	E	SI
Reactivos adicionales usados	D	SI
Detalle de tratamiento para ADNsa o ARNsa	E	SI
Evaluación de contaminación (ADN o ARN)	E	SI
Cuantificación de Ácido nucleico	E	SI
Instrumento y método	E	SI
Pureza (A260/A280)	D	SI
Producción	D	SI
Integridad ARN: método/instrumento	E	SI
RIN/RQI or Cq de los transcritos 3' and 5'	E	SI
Huellas de electroforesis	D	NO
Pruebas de inhibición (diluciones Cq, pico, o de otro tipo)	E	NO
TRANSCRIPCIÓN INVERSA		
Condiciones de la reacción	E	SI
Cantidad de ARN y volúmen de la reacción	E	SI
Descripción del cebador y concentración	E	SI
Transcriptasa inversa y concentración	E	SI
Condiciones del termociclador: temperatura y tiempo	E	SI
Fabricante de los reactivos y número de catálogo	D	SI
Cqs con y sin transcripción inversa	D	NO
Condiciones de almacenamiento del ADNc	D	SI
INFORMACIÓN DIANA qPCR		
Símbolo del gen	E	SI
Número de acceso	E	SI
Localización del amplicón	D	NO
Tamaño del amplicón	E	SI
Búsqueda de especificidad "in sílico"	E	SI
Pseudogenes, retropseudogenes u otros homólogos?	D	NO
Alineamiento de la secuencia	D	NO
Análisis de la estructura secundaria del amplicón	D	NO

Localización de cada cebador para exón o intrón (si corresponde)	E	NA
Las variantes de corte y empalme están dirigidas ?	E	NA
OLIGONUCLEÓTIDOS de qPCR		
Secuencia de cebadores	E	SI
Número de identificación de cebador de RT	D	SI
Secuencia de sonda	D	SI
Localización e identificación de alguna modificación	E	NA
Fabricante de oligonucleótidos	D	SI
Método de purificación	D	NA
PROTOCOLO DE qPCR		
Condiciones completas de la reacción	E	SI
Volúmen de la reacción y cantidad de ADNc/ADN	E	SI
Concentración de cebador, Mg ²⁺ y dNTP	E	SI
Identificación y concentración de la polimerasa	E	SI
Identificación del buffer/Kit y fabricante	E	SI
Composición química exacta del buffer	D	NO
Aditivos (SYBR Green I, DMSO, etc.)	E	NA
Fabricante y número de catálogo de placas/tubos	D	SI
Condiciones del termociclador	E	SI
Configuración de la reacción manual/robótica	D	SI
Fabricante del instrumento de qPCR	E	SI
VALIDACIÓN de qPCR		
Evidencia de optimización (por gradientes)	D	NA
Especificidad (gel, secuencia, fusión, o digestión)	E	NA
Para SYBR Green I, Cq los blancos	E	SI
Curvas de calibración con pendiente e intersección	E	NA
Eficiencia de la PCR calculada desde la pendiente	E	NA
CIs for PCR efficiency or SE	D	NA
r ² de la curva de calibración	E	NA
rango de linealidad	E	NA
Cq variation at LOD	E	NA
CIs throughout range	D	NA
Evidence for LOD	E	NA
If multiplex, efficiency and LOD of each assay	E	NA
ANÁLISIS DE DATOS		
Programa para el análisis de datos (fuente y versión)	E	SI
Método de determinación de Cq	E	SI
identificación y disposición de valores atípicos	E	NA
Results for NTCs	E	SI
Justificación del número y elección de genes de referencia	E	SI
Descripción del método de normalización	E	SI
Número y concordancia de las réplicas biológicas	D	SI
Número y etapas de repeticiones técnicas (qPCR y transcripción inversa)	E	SI
Repetibilidad (variación intrínseca)	E	SI
Reproducibilidad (variación interensayos, CV)	D	NO
Potencia del análisis	D	NO
Métodos estadísticos para resultados significativos	E	SI
Software (fuente y versión)	E	SI

* E/D (Escencial/Deseable)

VII.3. Búsqueda y/o análisis del gen de referencia

BestKeeper

BestKeeper es un Excel que usa correlaciones por pares para determinar los estándares más adecuados de dos o más candidatos y lo combina dentro de un índice llamado Bestkeeper (BK).

Protocolo

Introducir en la pestaña "intro" del Excel-BestKeeper los nombres de los genes candidatos. Luego, introducir en la pestaña "HKG vs. BK" los valores de Cq en crudo de cada uno de los genes candidatos. Inmediatamente se obtiene un análisis descriptivo con los valores de la media geométrica, media aritmética, valor mínimo, valor máximo, desviación estándar y coeficiente de variación. También proporciona el coeficiente de correlación de Pearson y p-value entre cada uno de los candidatos a gen de referencia, como también, un análisis de regresión entre cada uno de los candidatos y el valor del índice BK calculado. Otros datos aportados son, el coeficiente de correlación, coeficiente de determinación, valor de la intersección, valor de la pendiente, error estándar, p-value y el valor de cambio [x-fold].

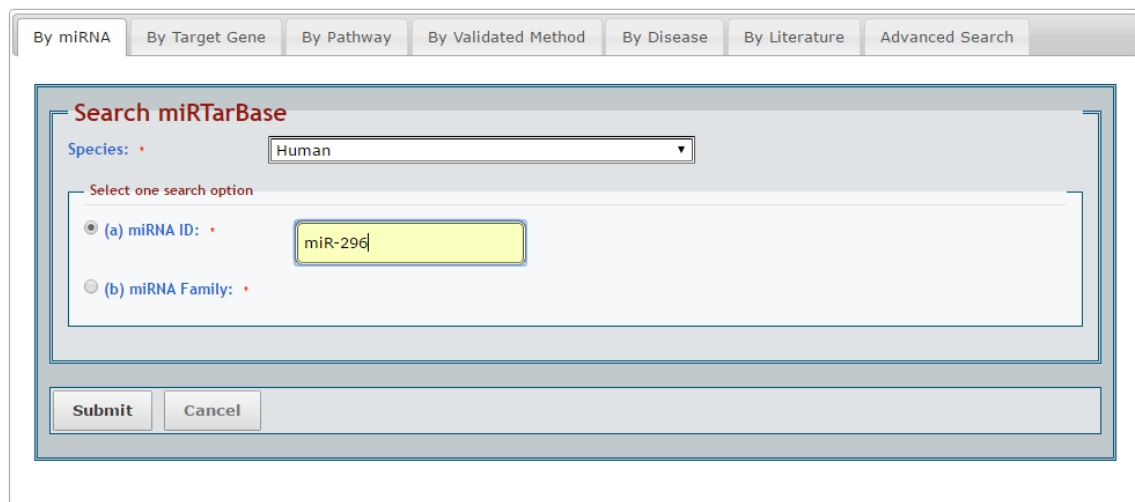
VII.4. Protocolos del análisis bioinformático

VII.4.1. Búsqueda de genes diana con miRTarBase

PROTOCOLO

Clickear en la opción búsqueda (search) de la barra de opciones y elegir la opción búsqueda por miARN (Fig. 18), luego seleccionar la especie humano. Luego seleccionar

la opción miARN ID y a continuación escribir el nombre del miARN en el recuadro que aparece. Clickear en la opción enviar (submit). Una vez obtenida la lista de genes diana para el miARN seleccionado, descargar y copiar en un archivo excel. Repetir los pasos 1 a 5 para cada uno de los miARNs del estudio. Una vez obtenida la lista de genes diana para todos los miARNs en un archivo excel, ordenar estos genes de la A a la Z y quitar los duplicados de forma manual. Una vez obtenida la nueva lista, guardar en un archivo .txt



The screenshot displays the miRTarBase search interface. At the top, there are several tabs: 'By miRNA', 'By Target Gene', 'By Pathway', 'By Validated Method', 'By Disease', 'By Literature', and 'Advanced Search'. The 'By miRNA' tab is active. Below the tabs, the search form is titled 'Search miRTarBase'. It includes a 'Species' dropdown menu set to 'Human'. Underneath, there is a section 'Select one search option' with two radio buttons: '(a) miRNA ID' (selected) and '(b) miRNA Family'. A text input field next to '(a) miRNA ID' contains 'miR-29d'. At the bottom of the form, there are 'Submit' and 'Cancel' buttons.

Fig. 18. Búsqueda de genes diana con miRTarBase. La figura muestra una captura de pantalla del primer paso ejecutado en la búsqueda de genes diana con miRTarBase.

VII.4.2. Clasificación de genes diana con PANTHER

PROTOCOLO

Seleccionar un archivo con la lista de genes a analizar en formato .txt. Luego, seleccionar un organismo: homo sapiens. A continuación, seleccionar el tipo de análisis a realizar: vista en gráfico circular. Finalmente, clickear en enviar: submit (Fig.19).

Help Tips

Steps:

- 1. Select list and list type to analyze
- 2. Select Organism
- 3. Select operation

1. Enter ids and or select file for batch upload. Else enter ids or select file or list from workspace for comparing to a reference list.

Enter IDs: supported IDs separate IDs by a space or comma

Upload IDs: Ningún archivo seleccionado

Please [login](#) to be able to select lists from your workspace.

Select List Type:

- ID List
- Previously exported text search results
- Workspace list
- PANTHER Generic Mapping File
- VCF File Flanking region

2. Select organism.

Homo sapiens

Mus musculus

Rattus norvegicus

Gallus gallus

Danio rerio

3. Select Analysis.

- Functional classification viewed in gene list
- Functional classification viewed in pie chart
- Statistical overrepresentation test Use default settings
- Statistical enrichment test Use default settings

Fig.19. Clasificación de genes diana con PANTHER. La figura muestra una captura de pantalla de los pasos ejecutados en la clasificación de genes diana con PANTHER.

VII.4.3. Clasificación de genes diana con DAVID

PROTOCOLO

En la barra de opciones superior, de la página de inicio, elegir acceso directo a las herramientas DAVID. Luego, elegir anotación funcional. En la opción cargar seleccionamos un archivo en formato .txt que contenga los genes a analizar. Seleccionar el tipo de identificador: Símbolo oficial de genes y luego seleccionar: tipo de lista. Enviar lista y aceptar en la ventana que se abre para indicar el tipo de especie, elegir: Homo sapiens y clicar en seleccionar especie. Clickear en Tabla de anotación funcional para obtener el resultado (Fig. 20).

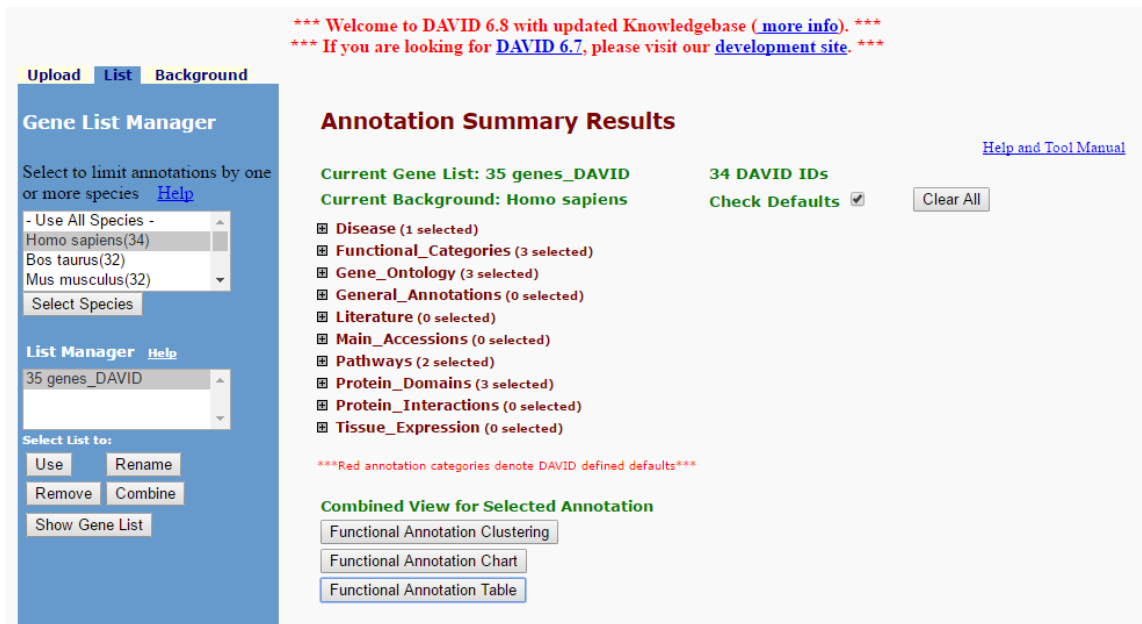


Fig. 20. Clasificación de genes diana con DAVID. La figura muestra una captura de pantalla de los pasos ejecutados en la clasificación de genes diana con DAVID.

VII.4.4. Análisis de enriquecimiento con GeneCodis

PROTOCOLO

En la barra de opciones superior elegir "Analysis"/ "Comparative Analysis".

En la pantalla de Análisis seguir los siguientes pasos, primero seleccionar el organismo (Homo sapiens), luego, seleccionar las categorías que desee incluir en el análisis (GO Biological Process, GO Molecular Function, KEGG Pathway). Pegar lista de genes a analizar o adjuntar archivo e indicar número mínimo de genes para co-ocurrencias. Seleccionar el método estadístico para calcular el p-value (Hypergeometric) y seleccionar el método de corrección para el p-value (FDR), luego clicar enviar (submit). Una vez obtenido el resultado (Fig. 21) seguir los siguientes pasos: clicar en la información de los genes que no presentan anotaciones en las categorías seleccionadas, para su identificación. Luego, clicar en "Modular Enrichment Analysis" para obtener el análisis de enriquecimiento de cada categoría. Seguidamente, clicar en "interactive table" para obtener los Resultados en forma de tabla. Exportar la tabla obtenida en el paso anterior a

un archivo Excel. Clickear en "other formats" para obtener los resultados en otro formato y gráficos.

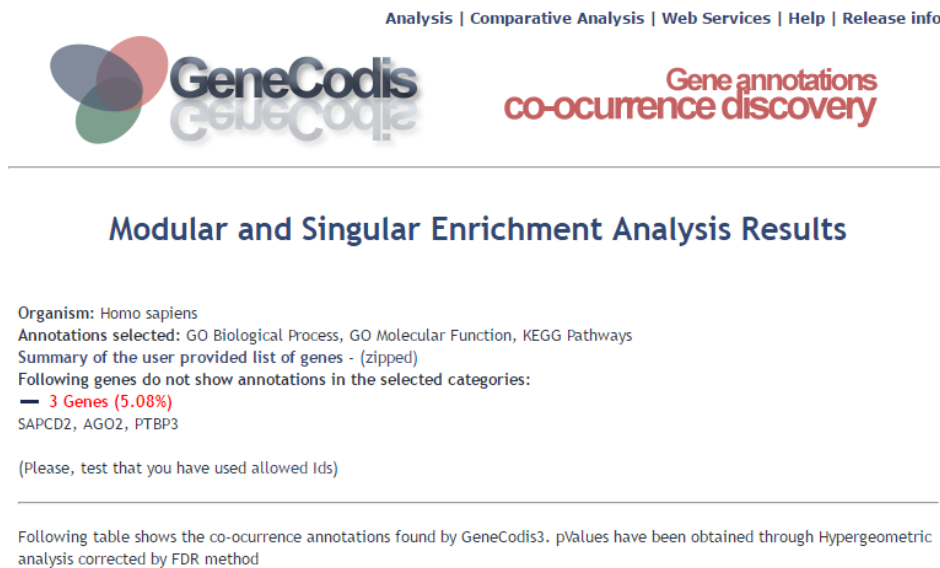


Fig. 21. Análisis de enriquecimiento con GeneCodis. La figura muestra una captura de pantalla del resultado obtenido en el análisis de enriquecimiento singular con la herramienta GeneCodis.

VII.4.5. Predecir genes diana con miRWalk

PROTOCOLO

Clickear en la opción "Predicted Target Module" de la barra de opciones, elegir la opción "miARN-gene Targets". En la etapa 1 seleccionar la especie: humano; la base de datos: miARN y el tipo de identificador: short name. En la etapa 2 seleccionar la información del miARN: marcar solo miARN. En la etapa 3 marcar "3'UTR" y el resto por defecto. En la etapa 4 elegir la ruta de la Base de datos: PANTHER, clickear en la opción buscar (search). Una vez obtenida la lista de genes diana para el miARN seleccionado descargar y copiar en un archivo excel. Repetir los pasos hasta aquí, para cada uno de los miARNs

del estudio. Una vez obtenida la lista de genes diana para todos los miARNs en un archivo excel, ordenar de la A a la Z y quitar los duplicados de forma manual. La nueva lista obtenida debe ser guardada en un archivo .txt

VII.4.6. Visualización de redes de interacción con Cytoscape

PROTOCOLO

En la barra de opciones superior clicar como sigue:

File → import → network → File (Buscar archivo en formato .txt o .xls) (Fig. 22).

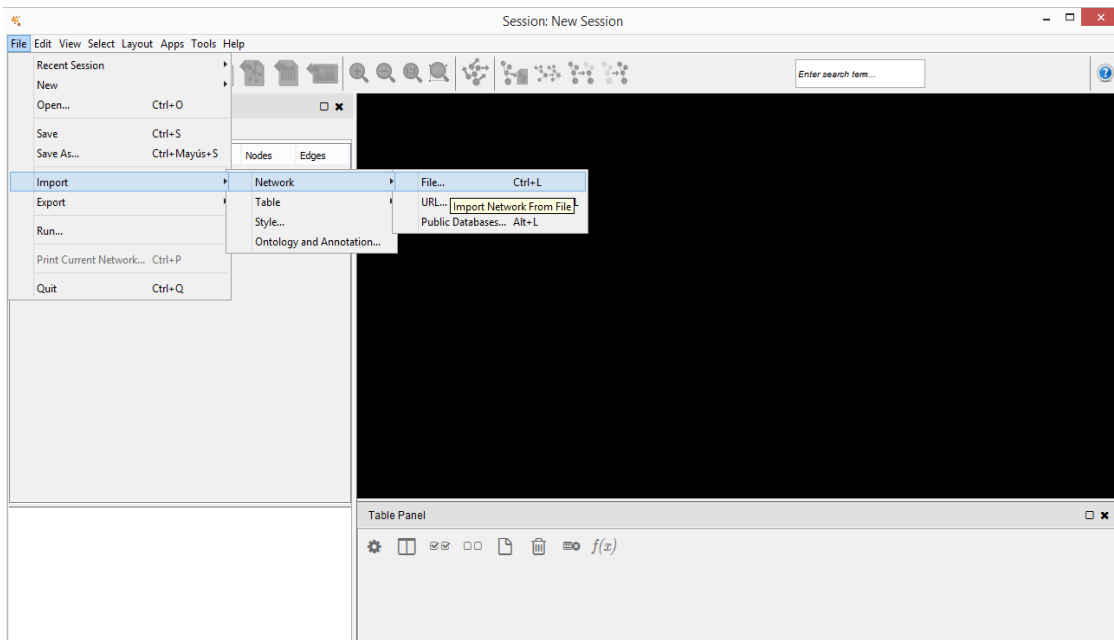


Fig. 22. Visualización de redes de interacción con Cytoscape. Etapa1. La figura muestra una captura de pantalla de la etapa inicial del proceso de ejecución de una red de interacción con Cytoscape.

Identificar cada columna como: (a) fuente de interacción, (b) tipo de interacción y (c) objetivo de interacción (Fig. 23).

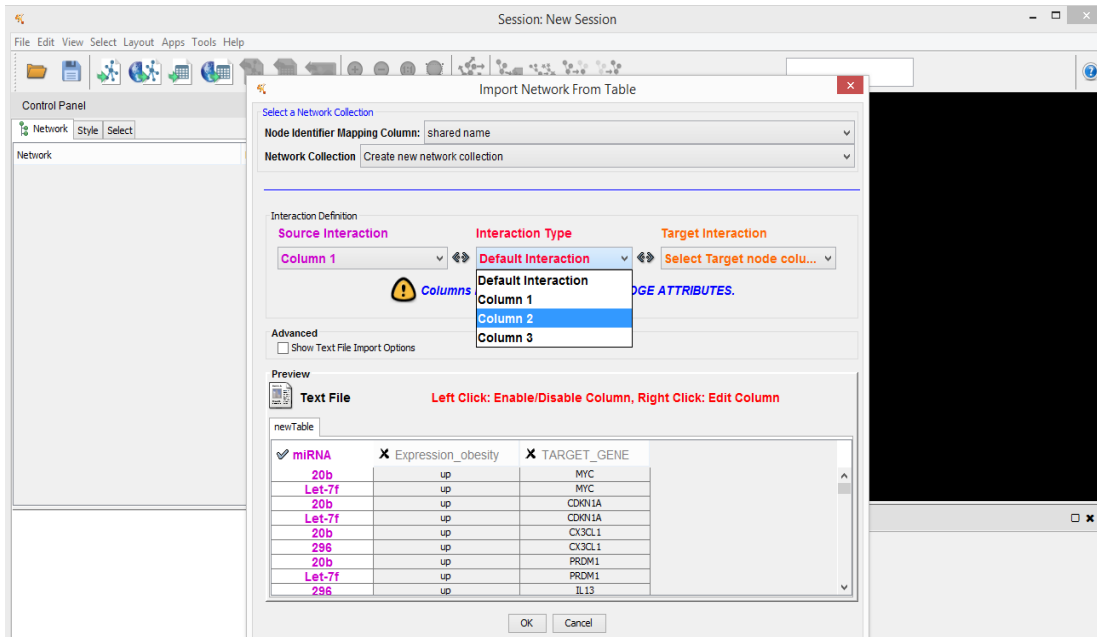


Fig. 23. Visualización de redes de interacción con Cytoscape. Etapa2. La figura muestra una captura de pantalla de la etapa de selección de los factores de interacción, en Cytoscape.

Clicar OK y aparecerá la siguiente pantalla (Fig.24).

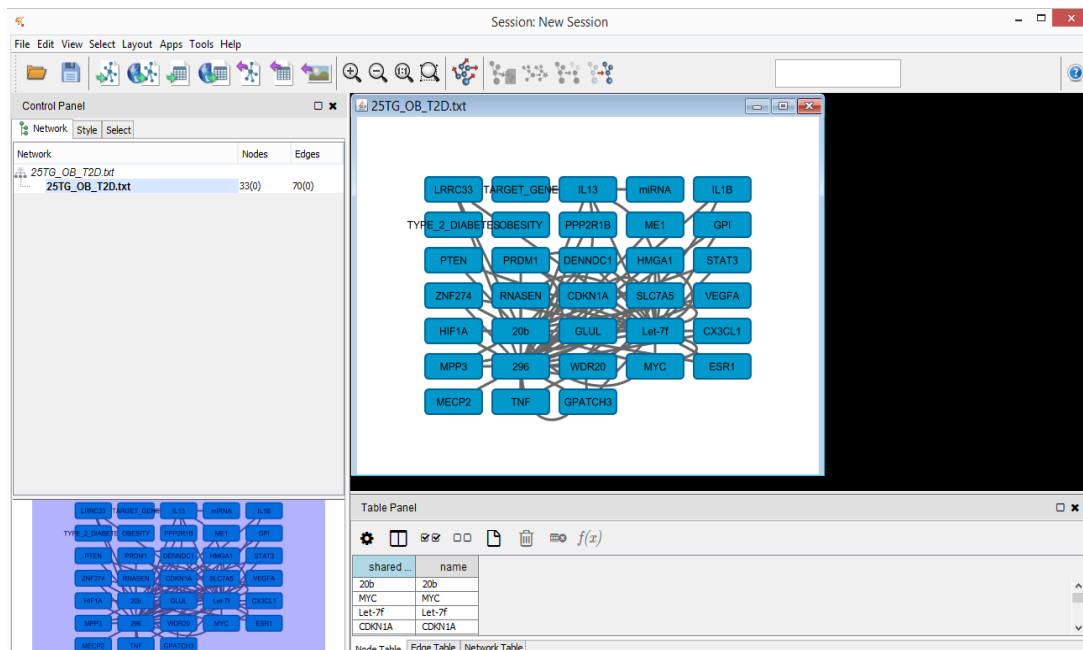


Fig. 24. Visualización de redes de interacción con Cytoscape. Etapa3. La figura muestra una captura de pantalla del resultado final del proceso de ejecución de una red de interacción con Cytoscape.

A continuación, con la opción "Layout" se puede dar a la figura diferentes estilos y colores.

VII.5. Protocolos del estudio *in vitro*

VII.5.1. Recepción de las Células 3T3-L1 (ATCC®- CL-173TM)

Comprobar que no haya fugas ni roturas en todos los recipientes. Retirar las células congeladas del envase de hielo seco e inmediatamente colocarlas a una temperatura <130°C, preferiblemente en vapor de nitrógeno líquido, hasta su uso.

VII.5.2 Descongelamiento de las células 3T3-L1

Descongelar el vial con agitación suave en un baño de agua a 37°C. La descongelación debe ser rápida (aproximadamente 2 minutos). Retirar el vial del baño de agua tan pronto como el contenido se descongela, y descontaminar pulverizando con etanol al 70%. Todas las operaciones a partir de este momento deben realizarse bajo estrictas condiciones asépticas. Transferir el contenido del vial a un tubo de centrifuga que contenga 9,0 ml de medio de cultivo completo y girarlo a aproximadamente 125xg durante 5 a 7 minutos. Desechar el sobrenadante.

Volver a suspender el sedimento celular con el medio completo recomendado y depositarlo en un recipiente de cultivo de 25 cm². Es importante evitar la alcalinidad excesiva del medio durante la recuperación de las células. Se sugiere que antes de la adición del contenido del vial, el recipiente de cultivo que contiene el medio de crecimiento completo sea colocado en la incubadora durante al menos 15 minutos para permitir que el medio alcance su pH normal (7,0 a 7,6). Incubar el cultivo a 37 °C en una incubadora adecuada, en atmósfera de aire con un 5% de CO₂.

VII.5.3. Activación de las células 3T3-L1

Resuspender varias veces la suspensión celular y sembrar una cantidad (300/500 μ l) de células en un frasco de cultivo de 75 ml que contiene 15 ml de medio de cultivo DMEM/F12/10% FCS pretemplado a 37°C durante al menos 15 minutos para permitir que el medio alcance su pH normal (7,0 a 7,6). El medio no contiene Penicilina. Incubar el cultivo a 37 ° C, en atmósfera húmeda, con 5% de CO₂ durante 24hs. Aplicar luego, un cambio de medio.

Nota: No es aconsejable eliminar el medio crioprotector por centrifugación después de la descongelación. Las células están frágiles por el trauma congelación/descongelación y la centrifugación puede disminuir substancialmente la viabilidad. Es suficiente diluir el Dimetilsulfóxido (DMSO) en el medio de cultivo. En caso de querer eliminarlo, centrifugar a baja intensidad (5' – 200xg).

VII.5.4. Cambio de medio de cultivo (Frasco o Placa 6 pocillos)

Inclinando el frasco/placa aspirar todo el medio, con pipeta o bomba extractora, manipulando en una esquina del frasco/pocillo sin tocar la superficie de sembrado. Añadir 5-7 ml de una solución bufferada (PBS) al frasco T-75 (500 μ l - 1000 μ l por pozo 6X) para quitar células muertas y resto de suero (evitando que este interfiera luego en la acción de la tripsina). Aplicar movimientos circulares (evitando que se moje el tapón del frasco T-75). Aspirar el PBS y dejar unos minutos el frasco en posición vertical para que escurra el resto de líquido que pudiera haber quedado y retirar. Añadir 15 ml DMEM/F12/10% FCS e incubar a 37°C, en atmósfera húmeda, con 5% de CO₂ y efectuar cambios de medio cada dos días hasta que las células alcancen el 70 - 80% de confluencia para subcultivarlas. Comprobar la confluencia en un microscopio (10X).

Nota: Efectuar cambios de medio cada 48 hs porque la actividad metabólica disminuye el pH y altera la osmolaridad del medio y esto promueve que las células se despeguen fácilmente. No permitir que las células superen el 70 - 80% de confluencia durante los períodos de expansión.

VII.5.5. Extracción de células con Tripsina

La tripsina debe estar a 37°C. Agregar 1 ml de tripsina (300-500µl / pocillo 6X) y llevar a 37°C-5'. Observar al microscopio (10X) que más del 90% de las células se hayan despegado. Acompañar la verificación con golpes suaves al frasco (o placa 6X). Si no están completamente despegadas, incrementar el tiempo de incubación durante algunos minutos más para facilitar el desprendimiento celular. Agregar 5 ml de medio de expansión (5 veces el volumen de tripsina utilizado) y resuspender varias veces para bloquear la acción enzimática. Recoger el medio+células en un tubo Falcon. Lavar el frasco con 6 ml de PBS (1 ml/pocillo), para recoger las células que pudieran haber quedado, siguiendo el mismo procedimiento anterior. Comprobar bajo microscopio (10X) que no han quedado células en la superficie de cultivo. Recoger el buffer+células y llevarlo al mismo tubo falcon. Centrifugar 400g - 5' - T_{Amb} (24°C). Aspirar el sobrenadante con pipeta y resuspender el pellet con 1 ml del medio de expansión y agregar 6 ml más (esta cantidad depende del tamaño del pellet) y resuspender por pipeteo.

VII.5.6. Cuantificación de células 3T3-L1

Determinar el número de células y la viabilidad usando un hemocitómetro y el azul tripano, respectivamente. En un tubo de 1,5 ml agregar partes iguales de las células obtenidas en el paso anterior y azul tripan (20 µl). Introducir en una cámara de Neubauer 10 µl de la mezcla preparada en el paso anterior y contar las células.

VII.5.7. Subcultivos

El subcultivo permite expandir las células y así poder aplicar un determinado diseño experimental. Para ello, en primer lugar, las células deben despegarse desde una determinada superficie de cultivo y sembrarlas en una nueva. El PBS (libre de calcio y magnesio) y el medio de cultivo deben mantenerse en baño de agua a 37°C hasta su uso. Sembrar 5×10^3 - 1×10^4 células/cm² de superficie de cultivo.

Nota: Es importante usar el PBS libre de calcio y magnesio para facilitar la acción quelante del EDTA contenido en la solución de tripsina.

VII.5.8. Expansión de células 3T3-L1

Preparar placas de 6 pocillos y rotular según el diseño experimental. Agregar 2 ml de medio de expansión en cada pocillo. Resuspender varias veces por pipeteo las células que tenemos en el tubo Falcon a T_{Amb} (con pipeta de 10 ml). Inclinando la placa hacia adelante sembrar las células introduciendo la punta en el medio de expansión para que las células entren en contacto con él. Resuspender las células+medio de expansión varias veces (3 a 5) por toda la superficie del pocillo.

Incubar el cultivo a 37 ° C, en atmósfera húmeda, con 5% de CO₂ durante 72 hs.

VII.5.9. Diferenciación adipogénica de células 3T3-L1

Permitir que las células proliferen hasta 100% de confluencia o incluso, uno o dos días más, después de haber alcanzado el 100% confluencia. Inclinando la placa aspirar todo el medio, con pipeta o bomba extractora, manipulando sobre la pared inferior del pocillo, sin tocar la superficie de sembrado. Lavar con 1ml de PBS y aplicar movimientos circulares. Aspirar el PBS y añadir 2ml del medio de inducción adipogénica. Incubar el cultivo a 37 ° C, en atmósfera húmeda, con 5% de CO₂ durante 48hs. Luego, realizar un

cambio de medio, substituir el medio de inducción por el medio de diferenciación adipogénica. Incubar durante al menos otros 5-12 días.

El medio de inducción adipogénica está compuesto por: DMEM/F12/10% FCS, isobutilmetilxantina (0,5 mM), dexametasona (1 μ M), insulina BOVINA (10 μ M). (1 μ M de insulina bovina también podría ser suficiente para favorecer la acumulación de lípidos). El Medio de diferenciación adipogénica está compuesto por: DMEM/F12/10% FCS, insulina BOVINA (10 μ M).

Nota: A partir del séptimo día de iniciada la inducción se deben observar las vesículas de lípidos. A medida que las células vayan acumulando lípidos tienden a despegarse durante los cambios de medio. Añadir el medio contra las paredes del pozo o frasco de cultivo.

VII.5.10. Estimulación de células 3T3-L1 con inhibidores e imitadores de miR-221 y miR-222

Solución Stock de miARN MIMIC (20 μ M): Resuspender el liofilizado (contiene 1nmol del miARN) en 50 μ l de agua libre de ARNsa. Reservar 12 alícuotas de 4 μ l y conservar a -20°C hasta su uso.

Solución Stock miARN INHIBITOR (4 μ M): Resuspender el liofilizado (contiene 1nmol del miARN) en 250 μ l de agua libre de ARNsa. Reservar 10 alícuotas de 25 μ l y conservar a -20°C hasta su uso.

Estimulación por cada dos pozos de placas 6X: Descongelar 2 μ l de solución stock de miARN MIMIC (20 μ M) y 25 μ l de miARN INHIBITOR (4 μ M) por cada pareja de pozos 6X que se quiera estimular.

MiARN MIMIC

Mezclar suavemente 2,4 μ l de solución stock de miARN MIMIC (20 μ M) con 798 μ l de DMEM/F12 libre de suero: Tubo-1. Dejar reposar 5 minutos. Mezclar suavemente 40 μ l

de medio de transfección con 760 μ l de DMEM/F12 libre de suero: Tubo-2. Dejar reposar 5 minutos. Mezclar suavemente el Tubo-1 y el Tubo-2, obteniéndose un volumen final de 1600 μ l de Transportador + miARN MIMIC: Tubo-3. Dejar reposar 20 minutos a temperatura ambiente. Añadir 400 μ l del Tubo-3 a 1600 μ l de medio de inducción adipogénica libre de antibióticos y antimicóticos a cada pozo de una placa de 6X.

MiARN INHIBITOR

Mezclar suavemente 75 μ l de solución stock de miARN INHIBITOR (4 μ M) con 525 μ l de DMEM/F12 libre de suero: Tubo-1. Dejar reposar 5 minutos. Mezclar suavemente 30 μ l de medio de transfección con 570 μ l de DMEM/F12 libre de suero: Tubo-2. Dejar reposar 5 minutos. Mezclar suavemente el Tubo-1 y el Tubo-2, obteniéndose un volumen final de 1200 μ l de Transportador + miARN INHIBITOR: Tubo-3. Dejar reposar 20 minutos a temperatura ambiente. Añadir 400 μ l del Tubo-3 a 1600 μ l de medio de inducción adipogénica libre de antibióticos y antimicóticos a cada pozo de una placa de 6X.

Nota: El Control se obtiene estimulando con el medio de transfección. Se mezclan 10 μ l de dharma FECT Transfection Reagent con 390 μ l de DMEM/F12 libre de suero. Se realizaron cinco réplicas en diferentes días

VII.5.11. Criopreservación

Llenar el contenedor crioprotector con isopropanol a temperatura ambiente según las indicaciones del fabricante. Etiquetar los crioviales con el tipo celular, número de pase, fecha. Despegar las células y efectuar recuento celular. Centrifugar a 300-400xg durante cinco minutos a temperatura ambiente y suspender el precipitado celular en medio de congelación (DMEM/F12/10% FCS suplementado con 5% DMSO) a una concentración preferentemente de 2×10^6 células/mL. Alicuotar el volumen de suspensión celular hacia

cada criovial previamente etiquetado, cuidando de no sobrepasar el volumen máximo recomendado por el fabricante para el criovial empleado. Transferir los crioviales llenos hacia el contenedor de cricongelación a temperatura ambiente. Mantener el contenedor crioprotector durante 24 horas a una temperatura de -80°C. Transferir los crioviales hacia el nitrógeno líquido (-196°C) para el almacenamiento a largo plazo.

Nota: No permitir que las células se mantengan en medio de congelación a temperatura ambiente por más de 10 minutos

VII.5.12. Preparación medios de cultivo para 3T3-L1

Medio Expansión	50 mL	100 mL	200 mL	500 mL
DMEM/F12-virgen	43,875 mL	87,750 mL	175,500 mL	438,750 mL
Penicilina/estreptomicina	500 µL	1000 µL	2000 µL	5 000 µL
L-Glutamina	625 µL	1 250 µL	2 500 µL	6 250 µL
FCS	5 mL	10 mL	20 mL	50 mL

Medio de Inducción	50 mL	100 mL	200 mL	500 mL
DMEM/F12-expansión	48,954 mL	97,908 mL	195,816 mL	489,54 mL
Insulina-Bovina (1,722 mM)- 10 µM	290,5 µL	581 µL	1 162 µL	2 905 µL
IBMXantina (44,996 mM)	555,5 µL	1 111 µL	2 222 µL	5 555 µL
Dexametasona (2,548 mM)	20 µL	40 µL	80 µL	200 µL

Mantenimiento Adipogénico	50 mL	100 mL	200 mL	500 mL
DMEM/F12-expansión	48,954 mL	97, 908 mL	195,816	489,54
Insulina-Bovina (1,722 mM)	290,5 µL	581 µL	1 162 µL	2 905 µL

Criopreservación (5 % DMSO)	1 mL	3 mL	5 mL	7 mL	10 mL
DMEM/F12-expansión	950 µL	2 850 µL	4 750 µL	6 650 µL	9 500 µL
DMSO	50 µL	150 µL	250 µL	350 µL	500 µL

Nota: Cuando se añada los inductores adipogénicos es necesario filtrar el medio a través de filtros 0,22 micras para esterilizar el medio. Conservar los medios a 4°C hasta tres-cuatro semanas.

VII.6. Protocolos del estudio in vivo

VII.6.1. Generación de ratones DIO

Los ratones deben ser identificados en el momento de su recepción. Durante una semana se mantienen con dieta del animalario y agua ad libitum para su aclimatación. Al cabo de ese tiempo son alojados en jaulas individuales y se controla su peso al principio del experimento. Deben ser excluidos los ratones con un peso corporal inferior a 15 g o superior a 25 g. Mantener los ratones bajo condiciones de salubridad normal, es decir, T° (21 ± 2 °C) humedad (50 ± 10 %), ruido ambiental controlado, ciclo 12:12 luz-oscuridad (Luz apagada a las 20:00 hs) y limpieza de jaula y cama diariamente. Alimentar los ratones con dieta que contiene 45% de grasa saturada (D12451 Research Diets Inc, New Brunswick, New Jersey, USA) y agua ad libitum, durante 8 semanas. Controlar el peso

corporal dos veces por semana en ratones despiertos. Realizar un TTG en la semana 8 de intervención dietética.

VII.6.2. Test de tolerancia a la glucosa

Preparar una solución de glucosa estéril al 40% (p/v) en solución fisiológica estéril como sigue: 4g D (+) glucosa anhydra (Sigma Aldrich, St Louis, MO) en 5 ml. de solución fisiológica. Calentar hasta la disolución completa. Completar con solución fisiológica estéril hasta 10 ml. Conservar a 4°C / 24 hs. A las 20:00 hs del día anterior a la prueba quitar los alimentos y la cama de la jaula manteniendo la botella de agua. Pesar los ratones a las 8:00 hs del día de la prueba y llevarlos a la sala de experimentación, 30' antes de la primera inyección, para ambientarlos al lugar y evitar estado de estrés. Medir la glucosa basal como sigue: insertar la tira reactiva (Nova StatStrip® Glucose Test Strips. Ref.42214. Nova biomedical, Waltham, MA 02454 USA) en el glucómetro (Stat Strip Xpress. Nova biomedical, Waltham, MA 02454 USA). Levantar el ratón y cortar la cola lo menos posible con una tijera. Poner una gota de la sangre de la cola en la tira del glucómetro y leer. Si la sangre se detiene durante la recolección, masajear la cola hacia las puntas. Precargar jeringas de 1 ml con la solución de glucosa calculada para cada ratón, 0.2 ml de glucosa al 40% / 40g de peso corporal, retirar el aire de la jeringa y administrar la glucosa por vía i.p. Medir nuevamente la glucosa en sangre, como se explicó anteriormente, a los 15, 30, 45, 60 y 120 min. Devolver los ratones a las jaulas con los alimentos y cama limpia.

VII.6.3. Test de tolerancia a la insulina

La prueba se realiza como se describe para TTG pero inyectando insulina en vez de glucosa. Para ello, preparar una solución de insulina (Actrapid®, Novo-Nordisk Pharma

SA, España). 75mU/ml como sigue: diluir 30 µl de una solución stock 100 UI/ml en 40 ml de solución fisiológica estéril. Precargar jeringas de 1 ml con la solución de insulina calculada para cada ratón, 0,01 ml de insulina 75 mU/g de peso corporal, retirar el aire de la jeringa y administrar la insulina por vía i.p.

VII.6.4. Control de la ingesta de alimentos

El procedimiento se inicia quitando toda la comida y el lecho. Observar si hay restos de comida en el lecho y en el bebedero. Pesar toda la comida de los tres puntos anteriores. Poner lecho nuevo y una cantidad de comida controlada (21 ± 1 g). El próximo día de control de ingesta se procede de la misma forma, quitar comida y lecho y pesar toda la comida no ingerida. Calcular la ingesta restando la cantidad no ingerida de la cantidad proporcionada.

Nota: Se debe advertir al personal del estabulario que no se debe cambiar la cama de los ratones, ni quitar o administrar alimentos, mientras dure el experimento.

VII.6.5. Transfección de ratones con imitadores y Control de miARNs

Los ratones fueron tratados tres veces por semana con 15 µl de una mezcla compuesta por 5 µg de imitador de mimic y el vehículo JetPei (3.75 µl mimic + 7.50 µl glucosa al 10% + 0,6 µl JetPei+3.15 µl de agua estéril). Los imitadores utilizados fueron los siguientes:

mmu-miR-221-3p MIMAT0000669 Secuencia: AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC

mmu-miR-222-3p MIMAT0000670 Secuencia: AGCUACAUCUGGCUACUGGGU

VIII. RESULTADOS



VIII.1. Características antropométricas y bioquímicas de los sujetos del estudio

La Tabla 2 muestra que los pacientes obesos sin alteraciones metabólicas tuvieron significativamente mayor el IMC, la circunferencia de cintura y cadera, el índice HOMA-IR y los triglicéridos respecto a los pacientes normo pesos sin alteraciones metabólicas. Por otro lado, los pacientes diabéticos tuvieron significativamente mayor los valores de glucosa con respecto a los no diabéticos. Por último, los pacientes obesos con RI tuvieron significativamente mayor el índice HOMA-IR con respecto a los pacientes obesos diabéticos.

Tabla 2. Características antropométricas y bioquímicas de sujetos Normo pesos y Obesos, con y sin DMT2 y Obesos con RI.

	NS (n=13)	ND (n=9)	OS (n=12)	OD (n=12)	ORI (n=4)
IMC (Kg/m ²)	22,37 ±0,63 ^b	23,84 ±0,51	45,02 ±1,85 ^b	47,71 ±3,68	54,17 ±3,24
Edad (años)	44,83 ±3,79	55 ±4,32	42,60 ±2,72	47,71 ±3,68	35,5 ±3,80
Cintura (cm)	76,75 ±2,05 ^{a, b}	89,56 ±1,30 ^a	125,00 ±3,09 ^{b, d}	136 ±6,46	144,5 ±4,79 ^d
Cadera (cm)	89,42 ±3,63 ^{a, b}	99,67 ±1,44 ^a	140,2 ±3,98 ^b	135,86 ±7,82	136,75 ±7,94
Glucosa (mg/dL)	88,75 ±1,60 ^a	142,67 ±14,18 ^a	93,1 ±3,57 ^c	144 ±10,46 ^{c, e}	97,25 ±4,48 ^e
HOMA-IR	1,17 ±0,14 ^{a, b}	2,59 ±0,55 ^a	2,85 ±0,26 ^{b, c, d}	5,47 ±0,95 ^{c, e}	10,01 ±0,47 ^{d, e}
Colesterol (mgd/L)	183 ±6,28	207 ±11,71	165,3 ±11,88	204,86 ±17,6	196,75 ±27,19
Triglicéridos (mg/dL)	71,25 ±6,57 ^{a, b}	132,56 ±18,07 ^a	96,7 ±10,89 ^{b, c, d}	157 ±27,5 ^c	223 ±70,56 ^d
HDL-c (mg/dL)	61,5 ±4,68	50,56 ±2,94	42,2 ±4,48	46,86 ±4,23	43,25 ±3,2
LDL-c (mg/dL)	105,97 ±6,87	124,33 ±9,71	103,39 ±11,44	113,75 ±15,99	SD

Tabla 2. Características antropométricas y bioquímicas de sujetos Normo pesos y Obesos, con y sin DMT2 y Obesos con RI. Los donantes (n= 50) fueron seleccionados según el IMC, el índice HOMA-IR y el estado glucémico. Los datos están expresados como la media ± ESM. La comparación entre grupos fue realizada mediante el test U Mann-Whitney. Las letras en superíndice representan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (p<0.05). a: ND vs. NS; b: OS vs. NS; c: OD vs. OS; d: ORI vs. OS; e: ORI vs. OD. IMC: índice de masa corporal; índice HOMA-IR: modelo homeostático de evaluación de RI; NS: sujetos normo pesos sin alteraciones metabólicas; ND: sujetos normo pesos Diabéticos; OS: sujetos obesos sin alteraciones metabólicas; OD: sujetos obesos Diabéticos; ORI: sujetos obesos resistentes a la insulina; SD: sin datos

La Tabla 3 muestra que los pacientes obesos tuvieron significativamente mayor el IMC y la circunferencia de cintura. Sin embargo, los valores de HDL-c y adiponectina fueron significativamente menor, con respecto a los pacientes normo pesos. Los pacientes con alto índice de RI tuvieron significativamente mayor el índice HOMA-IR con respecto a los pacientes con bajo índice de RI.

Tabla 3. Características antropométricas y bioquímicas de sujetos Normo pesos y Obesos, con alto y bajo grado de RI.

	N/B-RI (n=4)	N/A-RI (n=4)	O/B-RI (n=4)	O/A-RI (n=4)
IMC (Kg/m ²)	23.11 ±1.59 ^a	24.21 ±1.13 ^a	57.13 ±8.40 ^b	57.59 ±6.60 ^b
Edad (Años)	51.68 ±15.96	47.53 ±12.11	43.64 ±10.70	38.42 ±9.20
Cintura (cm)	83.76 ±7.90 ^a	85.12 ±5.40 ^a	142.80 ±21.77 ^b	149.00 ±25.53 ^b
HOMA-IR	1.11 ±0.84 ^a	10.33 ±4.52 ^b	3.32 ±0.82 ^a	12.54 ±4.97 ^b
Colesterol (mM)	5.20 ±1.18	4.77 ±1.01	5.39 ±1.52	4.96 ±0.67
HDL-c (mM)	1.47 ±0.52 ^a	1.52 ±0.41 ^a	0.93 ±0.68 ^b	0.98 ±0.47 ^b
SAP (mmHg)	121.47 ±11.78	129.67 ±10.71	134.40 ±22.51	142.67 ±25.87
DAP (mmHg)	68.47 ±9.91 ^a	72.23 ±8.18 ^a	82.40 ±10.90 ^b	86.33 ±17.28 ^b
Adiponectina (µg/mL)	13.55 ±5.81 ^a	14.65 ±4.76 ^a	10.83 ±4.88 ^b	9.21 ±4.90 ^b

Tabla 3. Características antropométricas y bioquímicas de sujetos Normo pesos y Obesos, con alto y bajo grado de RI. Los donantes (n = 16) fueron seleccionados de acuerdo con IMC y HOMA-IR. Los datos están expresados como la media ± ESM. La comparación entre los grupos se realizó mediante pruebas de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney. Tener en cuenta que las letras en superíndice "a" y "b" representan grupos estadísticamente diferentes (p< 0.05). SAP: Presión arterial sistólica; DAP: Presión arterial diastólica. N/B-RI: sujetos normo pesos con bajo grado de RI; N/A-RI: sujetos normo pesos con alto grado de RI; O/B-RI: sujetos obesos con bajo grado de RI; O/A-RI: sujetos obesos con alto grado de RI.

La Tabla 4 muestra que los pacientes obesos normo glucémicos tuvieron significativamente mayor el IMC, la circunferencia de cintura y la circunferencia de cadera, con respecto a los pacientes normo pesos normo glucémicos. Los pacientes normo

pesos diabéticos tuvieron significativamente mayor los valores de glucosa y triglicéridos con respecto a los normo pesos no diabéticos. Los pacientes obesos diabéticos tuvieron significativamente mayor los valores de glucosa con respecto a los pacientes obesos normo glucémicos.

Tabla 4. Características antropométricas y bioquímicas de sujetos Normo pesos y Obesos, con y sin DMT2 y sin RI.

	N-NG (n=7)	N-D (n=3)	O-NG (n=7)	O-D (n=7)
IMC (kg/m²)	22.00 ± 0.46 ^b	25.00 ± 0.32 ^c	33.97 ± 2.70 ^b	41.33 ± 3.36 ^c
Edad (años)	42.29 ± 4.52 ^a	64.00 ± 2.00 ^a	45.83 ± 5.89	52.00 ± 5.69
Cintura (cm)	80.14 ± 2.84 ^b	87.67 ± 1.20	105.83 ± 5.09 ^b	86.43 ± 23.77
Cadera (cm)	94.14 ± 3.12 ^b	100.33 ± 1.76	114.67 ± 6.71 ^b	85.86 ± 22.53
Glucosa (mg/dL)	90.57 ± 3.12 ^a	175.33 ± 19.92 ^a	92.00 ± 6.24 ^d	121.29 ± 13.00 ^d
HOMA-IR	1.44 ± 0.28	2.60 ± 0.525	2.18 ± 0.45	2.40 ± 0.61
Colesterol (mg/dL)	189.43 ± 13.71	228.67 ± 31.17	197.67 ± 14.22	210.14 ± 16.35
Triglicéridos (mg/dL)	73.71 ± 9.68 ^a	163.67 ± 21.88 ^a	106.00 ± 14.06	104.29 ± 8.29
HDL-c (mg/dL)	62.71 ± 4.00 ^b	51.00 ± 3.46	47.33 ± 3.84 ^b	58.00 ± 3.82
LDL-c (mg/dL)	116.89 ± 10.92	121.00 ± 21.22	134.5 ± 10.60	125.43 ± 12.92

Tabla 4. Características antropométricas y bioquímicas de sujetos Normo pesos y Obesos, con y sin DMT2 y sin RI. Los donantes (n = 24) fueron seleccionados de acuerdo con el IMC y el estado glucémico. Los datos se expresan como la media ± ESM. La comparación entre los grupos se realizó mediante la prueba U de Mann-Whitney. Las diferentes letras en superíndice representan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (p < 0.05). a: ND vs. N-NG; b: O-NG vs. N-NG; c: OD vs. ND; d: OD vs. O-NG. IMC: índice de masa corporal, HOMA-IR: índice de evaluación del modelo de homeostasis; N-NG: sujetos normo pesos-normo glucémicos; N-D: sujetos normo pesos diabéticos; O-NG: sujetos obesos normo glucémicos; O-D: sujetos obesos diabéticos.

VIII.2. Búsqueda y análisis de genes de referencia

Con el fin de llevar a cabo análisis de expresión génica en los sistemas celulares planteados en los objetivos (TA humano y murino, células de la FVE del TA humano y preadipocitos 3T3-L1), como se indica en el apartado VI.6 del capítulo de Materiales y

Métodos, era imprescindible determinar los genes de referencia. GAPDH y β -Actina son genes de referencia ampliamente usados por la comunidad científica (Seo K-W y col., 2013; Köllmer M y col., 2013), como así también Ciclofilina y EF1 α (Tinahones FJ y col., 2012; Curtis KM y col., 2010). Sin embargo, hasta la fecha ningún estudio determinó genes referencias para llevar a cabo el análisis de expresión génica en las células de la FVE procedente de TA humano. Por ello, ha sido imprescindible determinar en primer lugar los genes de referencia más adecuados para este tipo de estudio.

La herramienta BestKeeper fue utilizada con el fin de buscar y analizar genes de referencia adecuados para todos los sistemas analizados en este estudio. Una Desviación Estándar (DE) ≤ 1 y un Coeficiente de Variación (CV) ≤ 3 % fueron los criterios necesarios para que los genes fueran considerados adecuados para normalizar los diferentes sistemas analizados.

VIII.2.1. En humanos:

a). En Fracción Vascular Estromal para ARNm

Cinco genes, RPL13A, EEF1A1, CYC, GAPDH y 18s fueron analizados como posibles genes de referencia (Tabla 5) para la diferenciación adipogénica de las células de la FVE del TAV y TAS, aislados de sujetos con diferente IMC y HOMA-IR (Tabla 3). Los resultados muestran que RPL13A y EEF1A1 son los más adecuados (Tabla 6). Hasta donde conocemos, no hay estudios que validen genes de referencia para el análisis de células de la FVE de TAV y TAS de sujetos con diferentes IMC y HOMA-IR. Por lo tanto, el presente estudio originó un artículo publicado en la revista PlosOne (Gentile A-M y col. 2016).

Tabla 5. Genes analizados como candidatos a Gen de Referencia en células de la FVE.

<i>CYC</i>	Ciclofilina A	Ref.	4326316E	Secuencia	NM	_021130.3	Amplificación	98
<i>GAPDH</i>	Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa	Ref.	Hs99999905_m1	Secuencia	NM	_002046.3	Amplificación	122
<i>RPL13A</i>	Proteína ribosomal L13A	Ref.	Hs04194366_g1	Secuencia	NM	_001270491.1	Amplificación	113
<i>EEF1A1</i>	factor 1 alpha 1 de translación y elongación eucariota	Ref.	Hs00265885_g1	Secuencia	NM	_001402.5	Amplificación	75
<i>18s</i>	18s rRNA eucariota	Ref.	Hs99999901_s1	GenBank	X	_03205.1	Amplificación	187

Tabla 6. Estadística descriptiva de los cinco candidatos a Genes de Referencia en células de la FVE.

	RPL13A	EEF1A1	CYC	GAPDH	18s
n	32	32	32	32	32
MG (Cq)	23,64	18,26	23,54	25,30	13,42
MA (Cq)	23,65	18,27	23,56	25,34	13,48
Min (Cq)	22,24	17,05	21,12	22,86	11,41
Max (Cq)	26,02	21,13	26,76	28,19	16,42
DE ± Cq	0,49	0,48	0,85	1,07*	1,31*
CV (%)	2,06	2,61	3,62*	4,24*	7,97*

Tabla 6. Estadística descriptiva de los cinco candidatos a genes de referencia en células de la FVE.

Los datos de expresión para los cinco candidatos a genes de referencia (RG), basados en sus valores de punto de cruce (Cq), se introdujeron en el software BestKeeper. El resultado del análisis descriptivo para cada gen se muestra con los valores de Media geométrica (MG), Media aritmética (MA), Mínimo (Mín) y Máximo (Máx), Valor del punto de cruce (Cq), Desviación estándar (DE) y Coeficiente de variación (CV).

* indica cuando el valor está fuera de rango

b). En TA para miARNs

Dos genes, miR-16 y RNU6B fueron analizados como posibles genes de referencia para analizar la expresión de miARNs en TAV y TAS de pacientes normo pesos y obesos con y sin diabetes (Tabla 2). Los resultados mostraron que miR-16 es el más adecuado (Tabla 7).

Tabla 7. Estadística descriptiva del candidato a gen de referencia para miARNs de TA humano.

	miR-16	RNU6B
n	24	24
MG (Cq)	16,35	25,74
MA (Cq)	16,36	25,78
Min (Cq)	15,44	23,39
Max (Cq)	17,28	28,25
DE ± Cq	0,47	1,21*
CV (%)	2,87	4,69*

Tabla7. Estadística descriptiva de los dos candidatos a genes de referencia para miARNs de TA humano. Los datos de expresión para los dos candidatos a genes de referencia (GR), basados en sus valores de punto de cruce (Cq), se introdujeron en el software BestKeeper. El resultado del análisis descriptivo para cada gen se muestra con los valores de Media geométrica (MG), Media aritmética (MA), Mínimo (Mín) y Máximo (Máx), Valor del punto de cruce (Cq), Desviación estándar (DE) y Coeficiente de variación (CV). * indica cuando el valor está fuera de rango.

c). En TA para ARNm

El gen EF1 α (Tabla 8) fue analizado como posible gen de referencia para analizar la expresión de ARNm en VAT y SAT de pacientes normo pesos y obesos con y sin

dabetes y sin RI (Tabla 4). El resultado muestra que cumple los criterios de elección (Tabla 9).

Tabla 8. Gen analizado como candidato a Gen de Referencia para ARNm de TA humano.

EF1 α	NM_001402	CTGGCAAGGTCACCAAGTCT	Fw
		CCGTTCTTCCACCACTGATT	Rv

Tabla 9. Estadística descriptiva del candidato a gen de referencia para ARNm de TA humano.

EF1 α	
n	24
MG (Cq)	20,98
MA (Cq)	21,00
Mín (Cq)	19,61
Max (Cq)	22,84
DE \pm (Cq)	0,64
CV (%)	3,06

Tabla 9. Estadística descriptiva del candidato a gen de referencia para ARNm de TA humano. Los datos de expresión para el candidato a GR, basados en sus valores de punto de cruce (Cq), se introdujeron en el software BestKeeper. El resultado del análisis descriptivo para cada gen se muestra con los valores de Media geométrica (MG), Media aritmética (MA), Mínimo (Mín) y Máximo (Máx), Desviación estándar (DE) y Coeficiente de variación (CV). * indica cuando el valor está fuera de rango.

VIII.2.2. En ratones:

En células murinas 3T3-L1 para ARNm

Dos genes, Actb y Gapdh fueron analizados como posibles genes de referencia para analizar la expresión de ARNm en células murinas 3T3-L1 transfectadas con imitador o inhibidor de miR-221 o miR-222 (Tabla 10). Los resultados muestran que Actb es el más adecuado (Tabla 11).

Tabla 10. Genes analizados como candidatos a Gen de Referencia para ARNm en células murinas 3T3-L1.

GEN	REFERENCIA	AMPLICÓN	Ref. Secuencia
Actb	Mm_00607939_s1	115	NM_007393.1
Gapdh	Mm_99999915_g1	107	NM_008084.2

Tabla 11. Estadística descriptiva de los candidatos a Gen de Referencia para ARNm en células murinas 3T3-L1.

	Actb	Gapdh
n	30	30
MG (Cq)	27,02	26,49
MA (Cq)	27,03	26,52
Min (Cq)	25,72	23,67
Max (Cq)	28,87.	29,35
DE ± (Cq)	0,60	1,21*
CV (%)	2,20	4,55*

Tabla11. Estadística descriptiva de los dos candidatos a genes de referencia para ARNm en células murinas 3T3-L1. Los datos de expresión para los dos candidatos a genes de referencia (GR), basados en sus valores de punto de cruce (Cq), se introdujeron en el software BestKeeper. El resultado del análisis descriptivo para cada gen se muestra con los valores de Media geométrica (MG), Media aritmética (MA), Mínimo (Mín) y Máximo (Máx), Desviación estándar (DE) y Coeficiente de variación (CV). * indica cuando el valor está fuera de rango.

a) En TA murino para miARNs

Los genes, snorna142 y U6 (Tabla 12) fueron analizados como posibles genes de referencia para analizar la expresión de miARN en TAV y TAS de ratones tratados con imitador o control de miR-221 y miR-222. El resultado muestra que snorna142 es el más adecuado (Tabla 13).

Tabla 12. Genes analizados como candidatos a Gen de Referencia para miARN en TA murino

Especie	miARN	REFERENCIA
Mmu_	U6 snRNA	001973
Mmu_	snoRNA142	001231

Tabla 13. Estadística descriptiva de los dos candidatos a Gen de Referencia para miARN en TA murino

	snorna142	U6
n	24	24
MG (Cq)	22,35	22,67
MA (Cq)	22,36	22,84
Min (Cq)	20,94	19,04
Max (Cq)	23,76	29,02
DE ± Cq	0,64	2,21*
CV (%)	2,84	9,69*

Tabla 13. Estadística descriptiva de los dos candidatos a Gen de Referencia para miARNs en TA murino. Los datos de expresión para los dos candidatos a genes de referencia (GR), basados en sus valores de punto de cruce (Cq), se introdujeron en el software BestKeeper. El resultado del análisis descriptivo para cada gen se muestra con los valores de Media geométrica (MG), Media aritmética (MA), Mínimo (Mín) y Máximo (Máx), Desviación estándar (DE) y Coeficiente de variación (CV). * indica cuando el valor está fuera de rango.

c) En TA murino para ARNm

El gen Cyc (Tabla 14) fue analizado como posible gen de referencia para analizar la expresión de ARNm en VAT y SAT de ratones tratados con imitador o control de miR-221 y miR-222. El resultado muestra que cumple los criterios de elegibilidad (Tabla 15).

Tabla 14. Gen analizado como candidatos a Gen de Referencia para ARNm en TA murino

	GEN	REFERENCIA	ID	AMPLICIÓN
CYC	Ciclofilina	4326316E	NM_021130.3	98

Tabla 15. Estadística descriptiva del candidato a Gen de Referencia para ARNm en TA murino

Cyc	
n	30
MG (Cq)	29,36
MA (Cq)	29,37
Min (Cq)	27,39
Max (Cq)	31,31
DE ± Cq	0,78
CV (%)	2,65

Tabla 15. Estadística descriptiva del candidato a gen de referencia para ARNm en TA murino. Los datos de expresión para el candidato a GR, basados en sus valores de punto de cruce (Cq), se introdujeron en el software BestKeeper. El resultado del análisis descriptivo para cada gen se muestra con los valores de Media geométrica (MG), Media aritmética (MA), Mínimo (Mín) y Máximo (Máx), Valor del punto de cruce (Cq), Desviación estándar (DE) y Coeficiente de variación (CV). * indica cuando el valor está fuera de rango

VIII.3. Perfil de expresión de miARNs adipogénicos, angiogénicos y apoptóticos en TA de pacientes normo pesos y obesos con y sin diabetes T2.

El perfil de expresión de miR-15b, miR-20a, miR-20b, miR-27b, miR-126, miR-130a, miR-210, miR-221, miR-222, miR-296 y Let-7f en TAV y TAS de sujetos normo pesos y obesos con y sin DMT2 se muestra en la Fig. 25 (A-K).

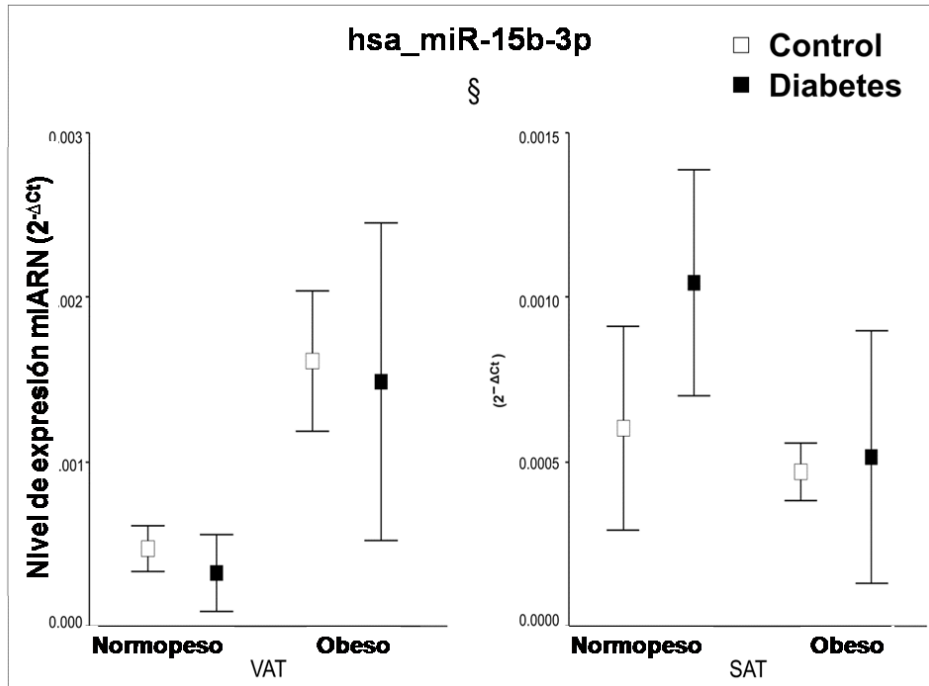
Un modelo lineal general multivariante que incluyó simultáneamente la expresión de los 11 miARNs estudiados aquí (miR-15b, miR-20a, miR-20b, miR-27b, miR-126, miR-130a, miR-27, miR-221, miR-222, miR-296 and Let-7f) sugiere la existencia de diferencia estadística significativa en la expresión de estos miARNs cuando están interactuando los tres factores simultáneamente (Obesidad, diabetes y tejido). Así, una diferencia estadísticamente significativa entre sujetos sin alteraciones metabólicas y diabéticos fué observada, como así también una interacción entre Obesidad y tipo de tejido que tiende a valores estadísticamente significativos (Tabla 16)

Tabla. 16. Análisis de la expresión génica de miARNs mediante análisis

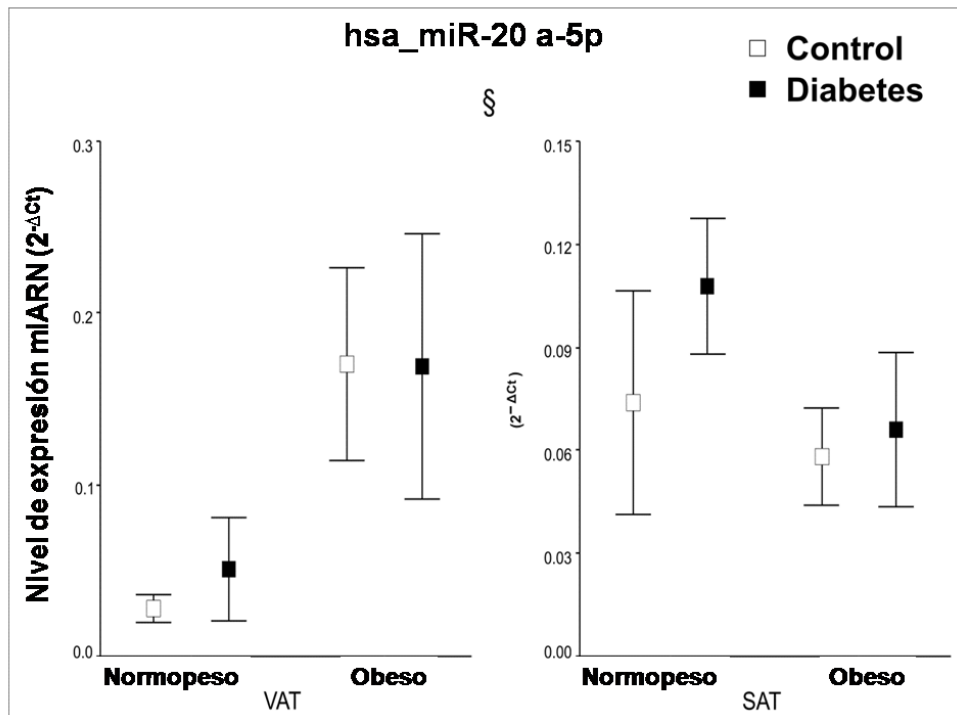
Multivariante.

Modelo Lineal Multivariante			
Efecto	Lambda de Wilks	F	p-value
Interceptación	0,022	24,209	0,000
Diabetes	0,09	5,498	0,024
Obesidad * Tejido	0,125	3,832	0,056

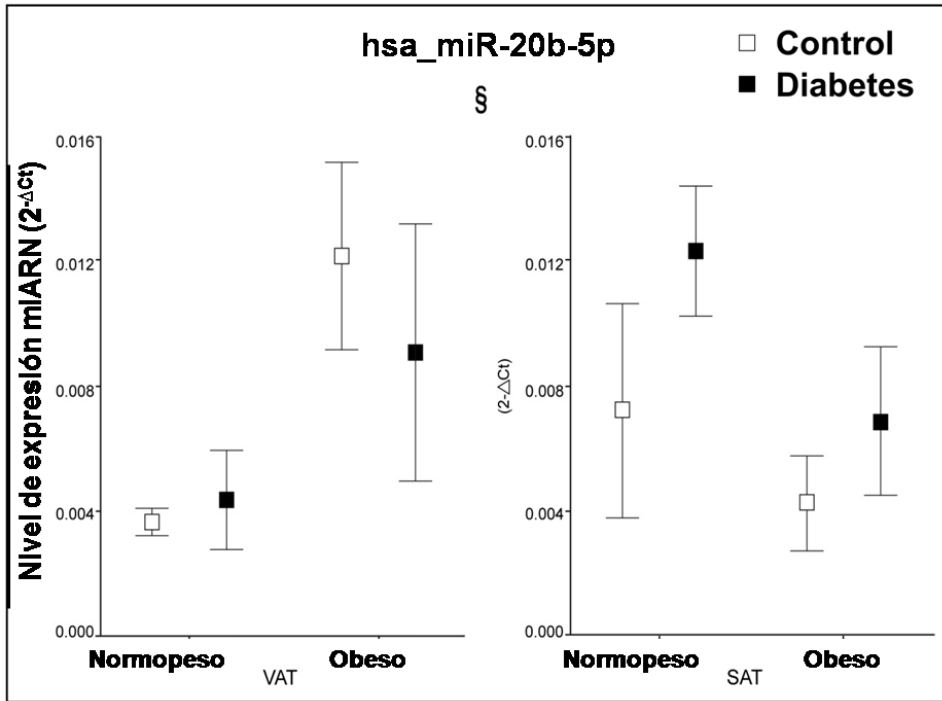
A



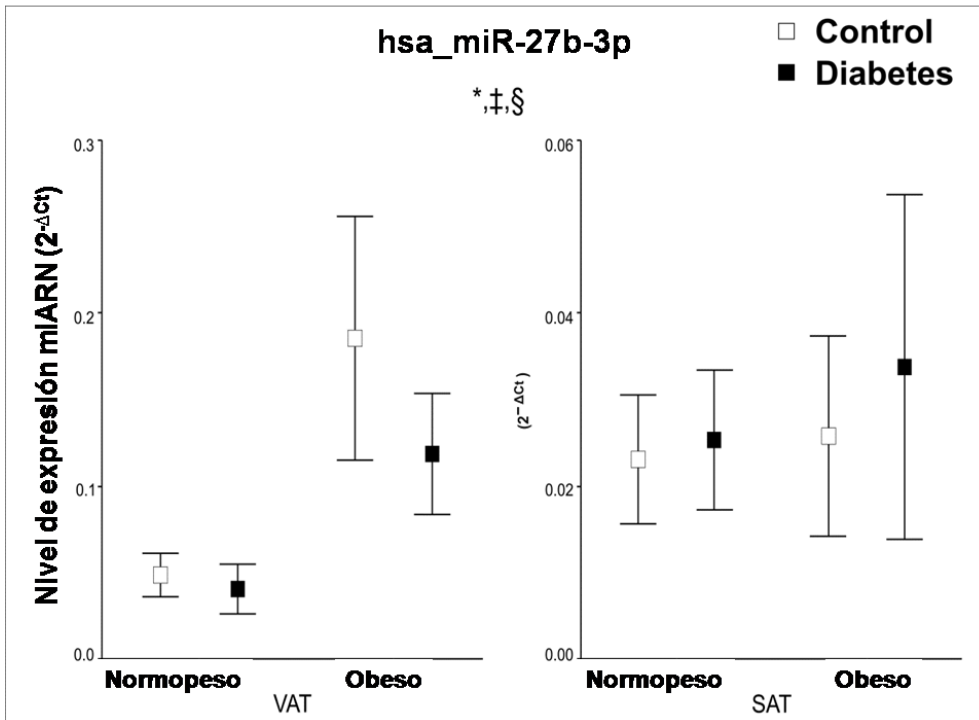
B



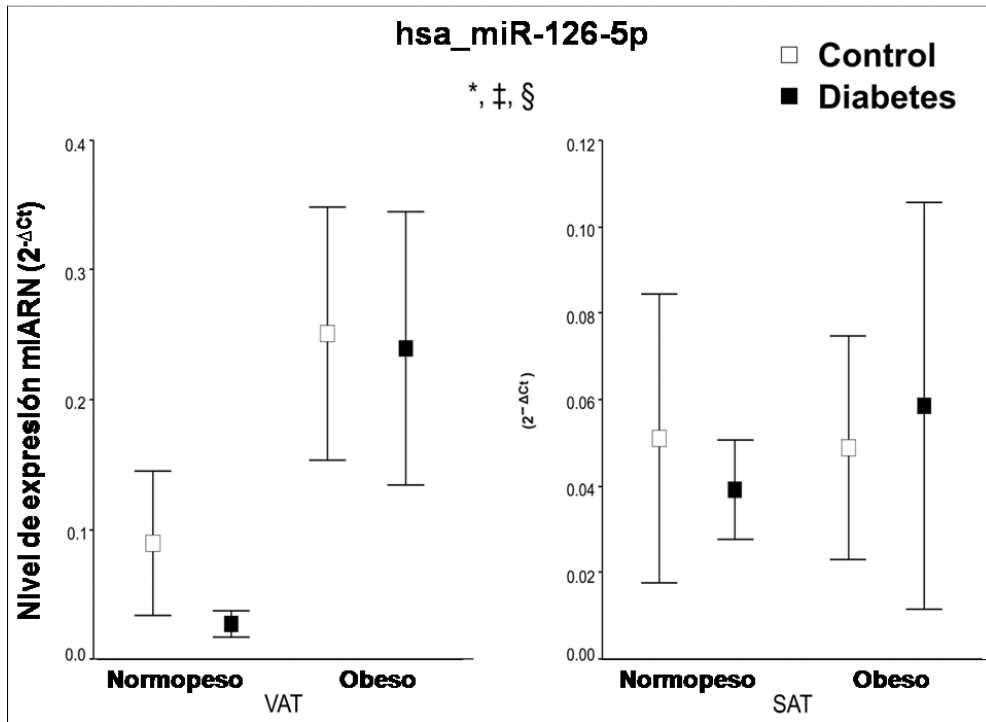
C



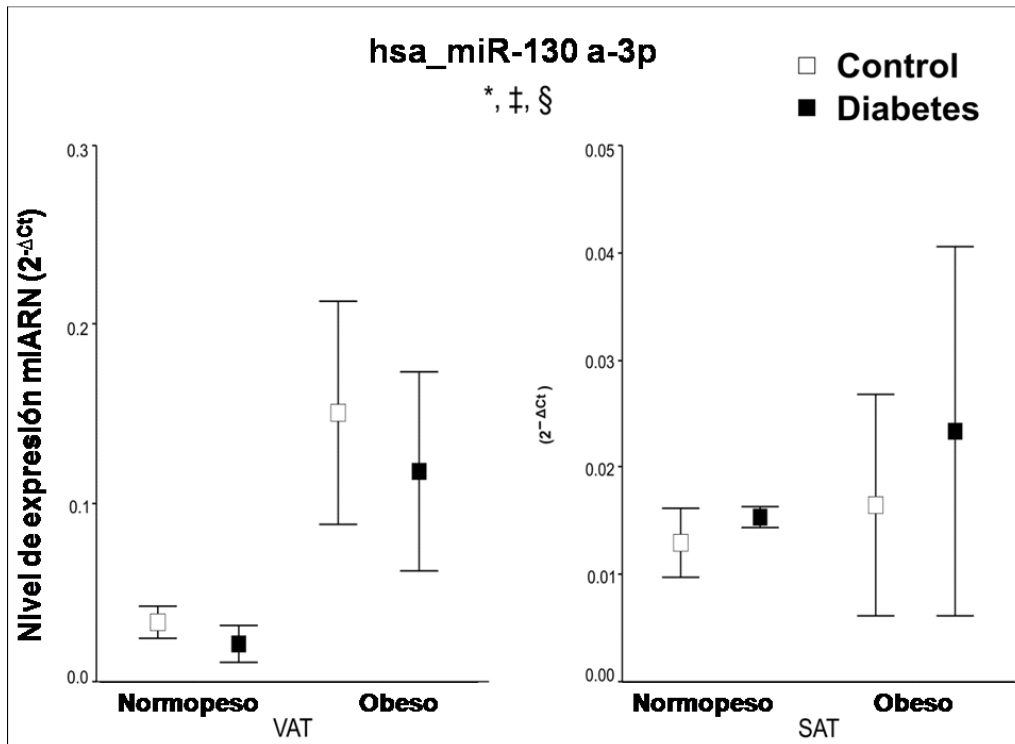
D



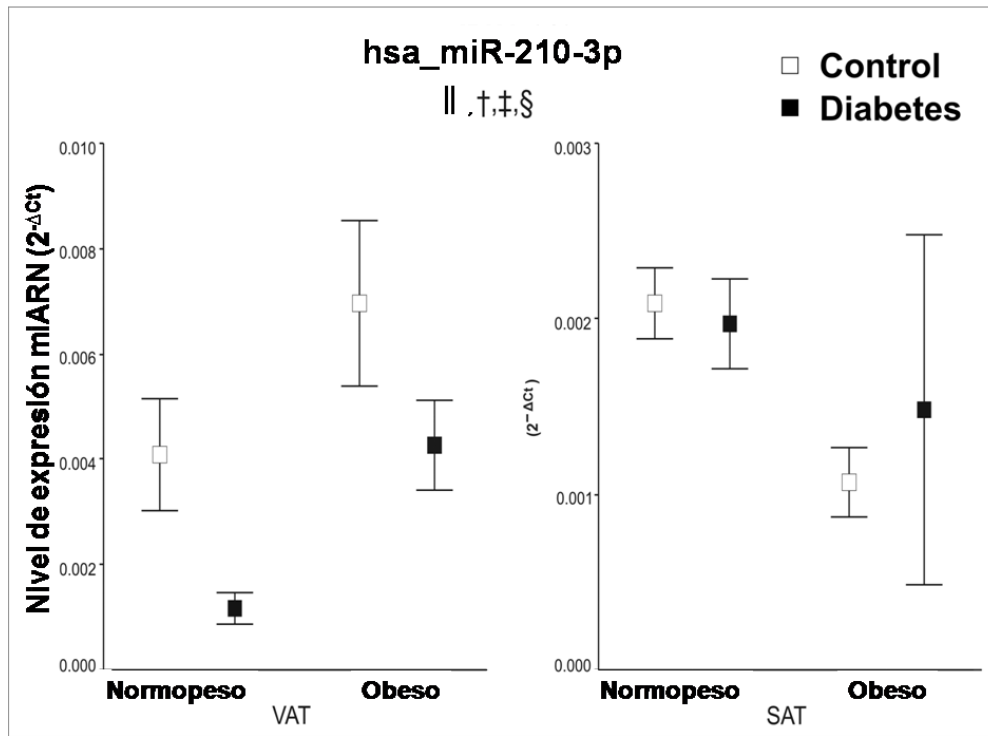
E



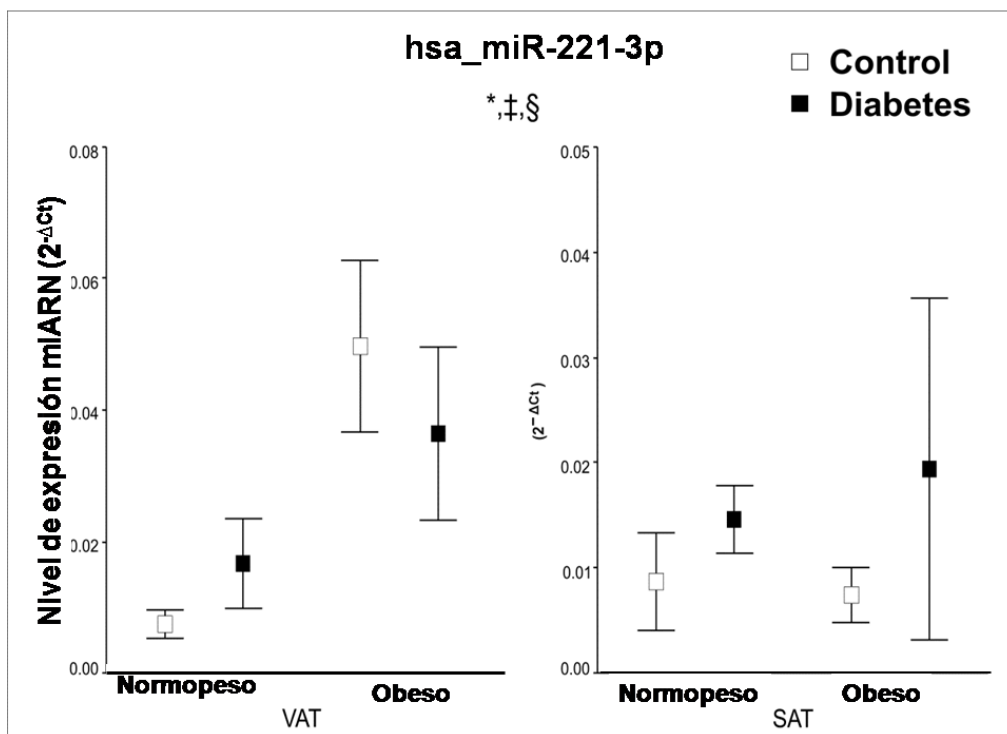
F



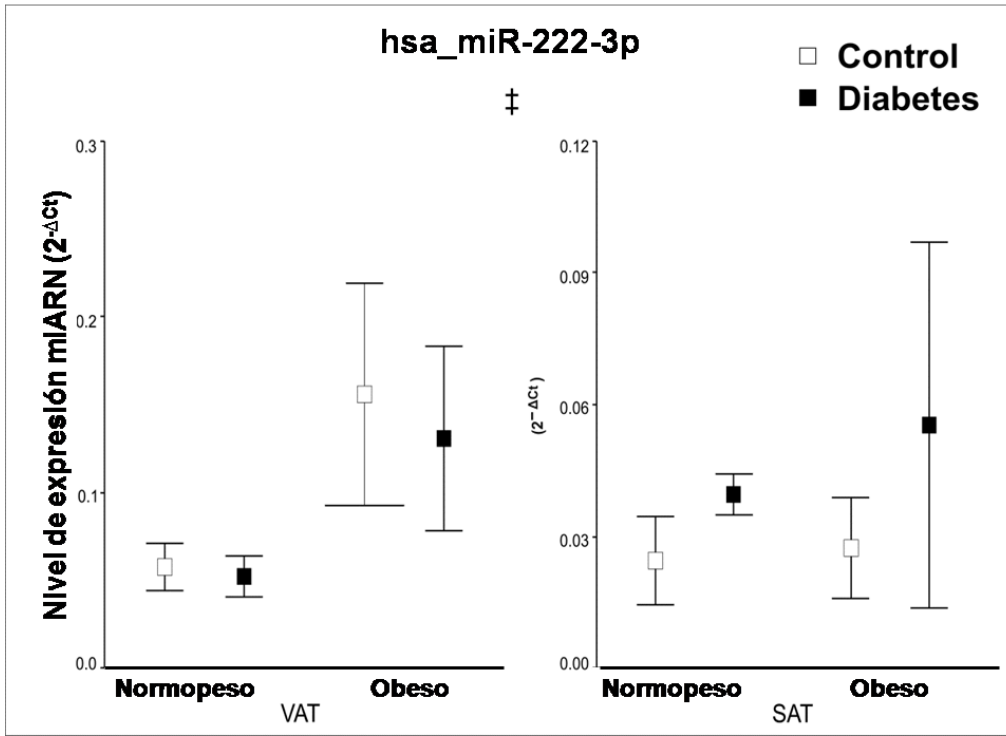
G



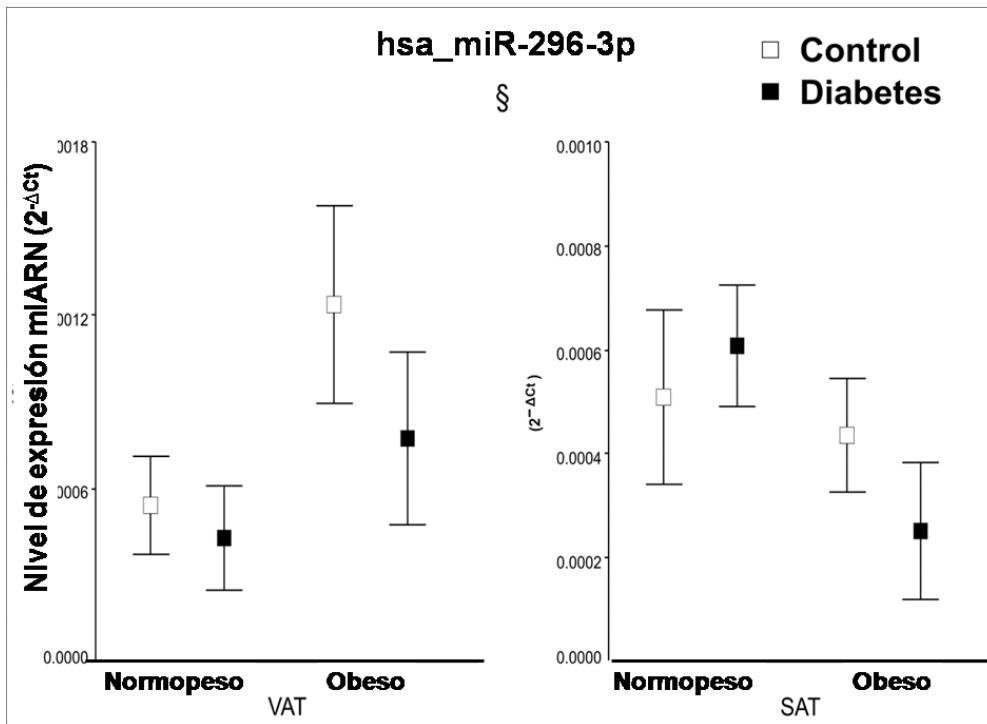
H



I



J



K

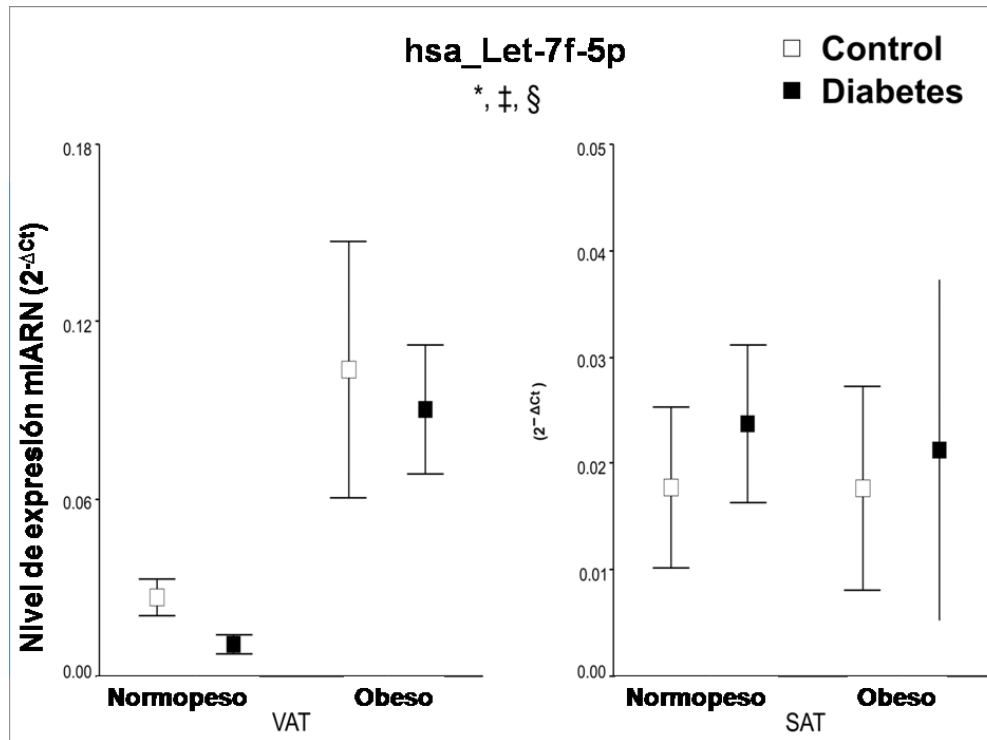


Fig. 25. Perfil de expresión de miARNs en tejido adiposo humano de pacientes normo pesos y obesos con y sin DMT2. Los miARNs (A-K) fueron extraídos de TAV y TAS de pacientes delgados y obesos con y sin DMT2 (n= 12). Para obtener ADNc fue usada la RT. La expresión génica fue medida por qPCR y una relativa cuantificación de los niveles de expresión fue llevada a cabo con el método comparativo del ciclo umbral (Cq), por duplicado. El pequeño ARN no codificante miR-16 fue usado como control endógeno. Los datos están expresados como la media \pm ESM y fueron sometidos a un análisis multivariado con un modelo lineal general. Se introdujeron los 11 miARNs como variables dependientes y los grupos de tejido, diabetes y obesidad como variables independientes. * $p < 0.05$ para la diferencia entre grupos de obesidad. ‡ $p < 0.05$ para la diferencia entre tejidos. † $p < 0.05$ para la diferencia entre grupos de diabetes. § $p < 0.05$ para la interacción entre obesidad y tejido. || $p < 0.05$ para la interacción entre diabetes y tejido.

Pruebas Univariadas basadas en las comparaciones por parejas linealmente independientes entre las medias marginales estimadas fueron realizadas (Tabla 17). Así, una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de cada uno de los 11 miARN fue observada con análisis comparativos entre duplas para obesidad (normo pesos vs. obesos), diabetes (no diabéticos vs. diabéticos) y tejido (TAV vs. TAS). Así, mostraron diferencia significativa en la expresión de miR-27b, miR-126, miR-130a, miR-221 y Let-7f para obesidad; miR-210 para diabetes y miR-27b, miR-126, miR-130a, miR-

210, miR-221, miR-222 y Let-7f para tejido. Análisis comparativos de la interacción del tejido con diabetes y obesidad fue realizado para cada uno de los miARN. Una interacción entre obesidad y tejido muestra diferencia significativa en la expresión de todos los miARNs del estudio, excepto miR-222. Una interacción entre diabetes y tejido muestra diferencia significativa en la expresión de miR-210 y se muestra en la Tabla 17.

Tabla 17. Análisis de la expresión génica de miARNs mediante Pruebas Univariadas.

Pruebas Univariadas						
miARN	Efectos					
	Interceptación	Obesidad	Diabetes	Tejido	Ob*Tejido	Diab*Tejido
15b	,000				0,03	
20a	,000				0,011	
20b	,000				0,02	
27b	,000	0,017		0,004	0,029	
126	,000	0,032		0,026	0,048	
130a	,000	0,020		0,01	0,033	
210	,000		0,038	0,0007	0,006	0,024
221	,000	0,024		0,036	0,041	
222	,000			0,019		
296	,000				0,023	
Let-7f	,000	0,011		0,012	0,009	

VIII.4. Predicción de genes diana de miR-15b, miR-20a, miR-20b, miR-27b, miR-126, miR-130a, miR210, miR-221, miR-222, miR-296 y Let-7f.

VIII.4.1. Búsqueda genes diana. miRTarBase.

Con el fin de determinar los genes diana de miR-15b, miR-20a, miR-20b, miR-27b, miR-126, miR-130a, miR210, miR-221, miR-222, miR-296 y Let-7f un análisis bioinformático con miRTarBase fue realizado como se detallada en materiales y métodos.

Un total de 5.759 genes fueron obtenidos y son mostrados en la Tabla 18.

VIII.4.2. Búsqueda de genes diana regulados por dos o más miARNs

El total de genes diana predcidos (5.759) y los miARNs que posiblemente los regulan son introducidos y analizados en un archivo de excel con el fin de determinar los genes que son regulados por dos o más miARNs. El resultado muestra que 1.415 de estos genes diana pueden estar regulados por dos o más miARNs (Tabla 19).

Tabla 18. Genes diana de miR-15b, miR-20a, miR-20b, miR-27b, miR-126, miR-130a, miR210, miR-221, miR-222, miR-296 y Let-7f.

miRTarBase	
miARN	Genes Diana (cantidad)
hsa_ miR-15b-3p	771
hsa_ miR-20 a-5p	1096
hsa_ miR-20b-5p	954
hsa _ miR-27b-3p	440
hsa _ miR-126-5p	152
hsa _ miR-130 a-3p	485
hsa _ miR-210-3p	149
hsa _ miR-221-3p	467
hsa _ miR-222-3p	444
hsa _ miR-296-5p	298
hsa _Let-7f-5p	503
TOTAL	5759

VIII.4.3. Búsqueda de procesos biológicos en los que participan los genes diana regulados por dos o más miARNs. PANTHER.

Con el propósito de conocer en qué procesos biológicos están involucrados los 1.415 genes diana regulados por dos o más miARNs, creamos una lista que fue introducida en PANTHER. Los resultados mostrados en la Fig. 26 resaltan que de un total de 1415 genes diana, 659 de ellos podrían participar en procesos celulares, de los cuales, 195

participarían en comunicación celular entre otros procesos biológicos y celulares. La

Tabla 20 muestra en detalle los resultados obtenidos.

Tabla 19. Genes diana de miR-15b, miR-20a, miR-20b, miR-27b, miR-126, miR-130a, miR210, miR-221, miR-222, miR-296 y Let-7f regulados por dos o más miARNs.

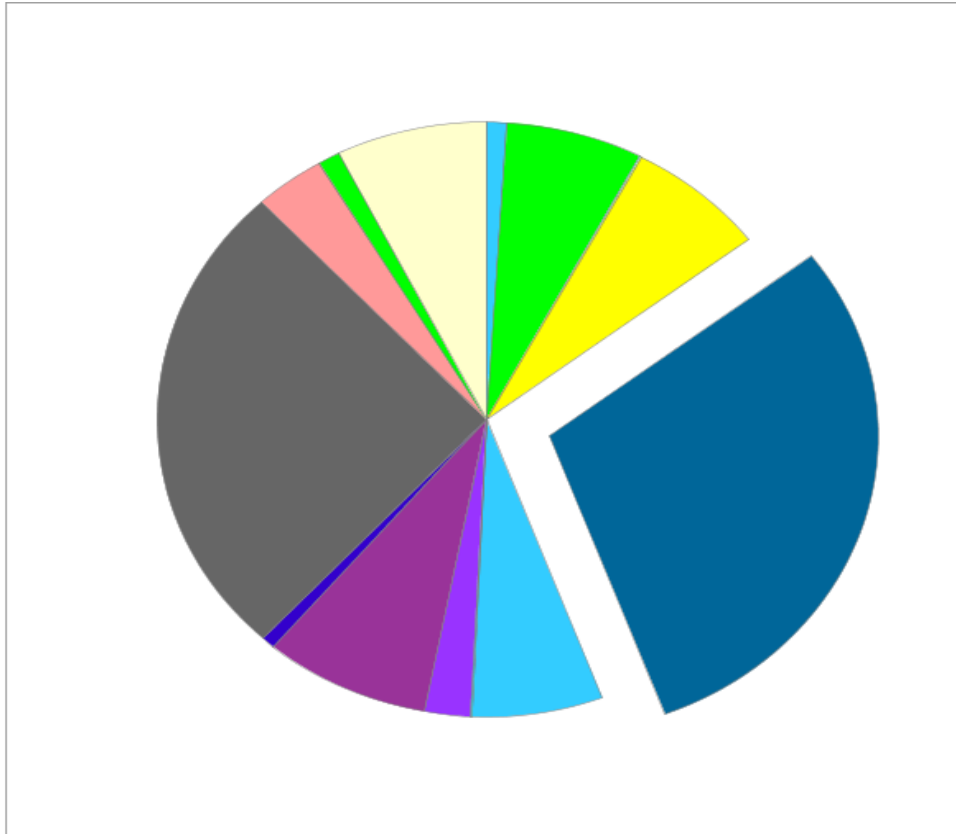
Genes comunes a 2 miARNs		Genes comunes a 3 miARNs		Genes comunes a 4 miARNs	
miARNs	Cantidad de Genes	miARNs	Cantidad de Genes	miARNs	Cantidad de Genes
20a-20b	484	20a-20b-130a	75	15b-20a-20b-130a	10
221-222	53	15b-20a-20b	56	20a-20b-130a-Let-7f	10
15b-130a	20	20a-20b-27b	34	20a-20b-221-222	8
15b- Let-7f	19	20a-20b-221	30	15b-20a-20b-126	7
15b-27b	17	20a-20b-Let-7f	30	15b-20a-20b-Let-7f	5
27b-130a	17	20a-20b-222	16	20a-20b-27b-Let-7f	5
15b-222	15	20a-20b-126	13	20a-20b-27b-130a	5
222-296	15	20a-20b-296	10	20a-20b-130a-222	4
27b-7f	14	15b-221-222	7	20a-20b-130a-221	3
15b-221	13	20a-20b-210	7	15b-130a-221-222	3
15b-296	13	20a-221-222	6	15b-20a-20b-222	2
130a-7f	13	221-222-Let-7f	5	15b-222-296-Let-7f	2
15b-210	12	15b-221-296	5	20a-20b-27b-296	2
15b-126	10	15b-27b-Let-7f	5	15b-20a-20b-221	2
296-Let-7f	10	15b-27b-130a	4	20a-20b-27b-221	2
15b-20a	9	130a-221-222	4	15b-20a-20b-27b	2
27b-20a	9	126-221-Let-7f	3	20a-20b-27b-222	2
27b-221	9	20b-221-222	3	20a-20b-130a-210	2
27b-222	9	15b-222-Let-7f	3	15b-20a-130a-222	1
222-Let-7f	8	15b-130a-222	3	20b-130a-221-222	1
20a-221	7	27b-221-222	3	27b-221-222-Let-7f	1
221-Let-7f	7	15b-20a-Let-7f	3	20a-20b-296-Let-7f	1
27b-126	7	221-222-296	3	20a-126-222-Let-7f	1
20a-222	7	126-221-222	2	20a-20b-126-Let-7f	1
20b-221	6	15b-221-Let-7f	2	15b-126-221-222	1
130a-296	6	15b-130a-221	2	20a-20b-210-Let-7f	1
20a-130a	5	20a-210-Let-7f	2	20a-27b-130a-210	1
27b-210	5	27b-130a-Let-7f	2	20a-130a-221-222	1
20a-126	5	15b-20b-222	1	20a-27b-130a-221	1
126-130a	4	20a-222-Let-7f	1	15b-27b-221-222	1
126-221	4	130a-222-Let-7f	1	20a-20b-221-296	1
210-296	4	15b-20a-221	1	15b-27b-222-296	1

221-296	4	130a-221-Let-7f	1	15b-20a-126-296	1
130a-221	4	20b-130a-221	1	27b-126-222-Let-7f	1
15b-20b	3	15b-20a-130a	1	20a-20b-126-130a	1
20a-Let-7f	3	15b-20b-130a	1	20a-20b-210-296	1
20b-27b	3	15b-27b-130a	1	20a-20b-221-Let-7f	1
20a-296	3	15b-130a-Let-7f	1	15b-221-222-296	1
27b-296	3	130a-210-221	1	20a-20b-130a-296	1
130a-210	3	15b-210-Let-7f	1	20a-20b-27b-126	1
20a-210	3	15b-27b-210	1	20a-20b-126-Let-7f	1
20b-130a	3	27b-210-222	1	20a-20b-126-130a	1
130a-222	2	15b-126-130a	1	20a-20b-210-221	1
210-7f	2	27b-126-Let-7f	1		
210-221	2	20a-130a-296	1		
126-296	2	130a-296-Let-7f	1	Genes comunes a 5 miARNs	
126-222	2	20b-130a-296	1	miARNs	Cantidad de Genes
126-Let-7f	2	15b-27b-221	1	20a-20b-221-222-Let-7f	3
126-210	1	27b-222-Let-7f	1	20a-20b-130a-221-222	3
210-222	1	27b-130a-222	1	15b-20a-20b-222-Let-7f	2
20b-222	1	20a-27b-221	1	15b-20a-20b-221-222	2
296-Let-7f	1	20b-210-221	1	20a-20b-130a-222-Let-7f	2
20b-Let-7f	1	130a-210-Let-7f	1	20a-20b-27b-130a-Let-7f	2
		15b-210-Let-7f	1	20a-20b-27b-126-130a	2
		126-130a-210	1	15b-20a-20b-130a-Let-7f	1
		15b-126-296	1	20a-20b-130a-221-Let-7f	1
		20a-126-Let-7f	1	15b-20a-20b-130a-221	1
		27b-296-Let-7f	1	27b-130a-221-222-Let-7f	1
		221-296-Let-7f	1	15b-27b-130a-221-222	1
		15b-296-Let-7f	1	15b-20a-20b-27b-221	1
		15b-27b-222	1	15b-130a-296-221-222	1
		20a-27b-Let-7f	1	15b-20a-20b-126-Let-7f	1
		27b-210-221	1	15b-27b-126-222-Let-7f	1
		126-210-Let-7f	1	15b-20a-20b-210-221	1
		20a-210-221	1	20a-20b-27b-296-Let-7f	1
		15b-130a-210	1	20a-20b-27b-221-Let-7f	1
		210-221-222	1	15b-20a-20b-27b-Let-7f	1
		15b-20a-126	1	15b-20a-20b-130a-296	1
		126-222-296	1	15b-20a-20b-296-Let-7f	1
		130a-296-Let-7f	1	126-221-222-296-Let-7f	1
		221-296-Let-7f	1	20a-20b-126-222-Let-7f	1
		15b-20a-27b	1	15b-20a-20b-27b-210	1
		27b-221-Let-7f	1		
		27b-130a-221	1	Genes comunes a 6 miARNs	
		15b-27b-126	1		
		15b-126-Let-7f	1	miARNs	Cantidad de Genes
				15b-20a-20b-221-222-Let-7f	3
				15b-20a-20b-27b-296-Let-7f	1

15b-20a-20b-27b-221-222	1
15b-20a-20b-130a-210-222	1
Genes comunes a 7miARNs	
miARNs	Cantidad de Genes
15b-20a-20b-27b-130a-221-Let-7f	2
15b-20a-20b-27b-126-130a-221	1

Tabla 20. Procesos biológicos en los que participan los genes diana regulados por dos o más miARNs.

PANTHER			
Procesos biológicos	GO	Genes	Porcentaje (%)
Procesos celulares	0009987	659	46.0
Procesos metabólicos	0008152	584	40.8
Localización	0051179	182	12.7
Respuesta a estímulos	0050896	164	11.4
Organización o biogénesis	0071840	153	10.7
Regulación biológica	0065007	149	10.4
Procesos multicelulares	0032501	78	5.4
Reproducción	0000003	24	1.7
Adhesión biológica	0022610	23	1.6
Muerte celular	0001906	2	0.1
Desarrollo	0040007	2	0.1
PANTHER			
Procesos celulares	GO	Genes	Porcentaje (%)
Comunicación celular	000715	195	29.6
Ciclo celular	0007049	92	14.0
Movimiento celular	0006928	35	5.3
Segregación cromosómica	0007059	12	1.8
Proliferación celular	0008283	10	1.5
Citocinesis	0000910	10	1.5
Crecimiento celular	0016049	2	0.3
Reconocimiento celular	0008037	2	0.3



**Chart tooltips are read as: Category name (Accession): # genes; Percent of gene hit against total # genes; Percent of gene hit against total # Process hits

Click to get gene list for a category:

- [biological adhesion \(GO:0022610\)](#)
- [biological regulation \(GO:0065007\)](#)
- [cell killing \(GO:0001906\)](#)
- [cellular component organization or biogenesis \(GO:0071840\)](#)
- [cellular process \(GO:0009987\)](#)
- [developmental process \(GO:0032502\)](#)
- [growth \(GO:0040007\)](#)
- [immune system process \(GO:0002376\)](#)
- [localization \(GO:0051179\)](#)
- [locomotion \(GO:0040011\)](#)
- [metabolic process \(GO:0008152\)](#)
- [multicellular organismal process \(GO:0032501\)](#)
- [reproduction \(GO:0000003\)](#)
- [response to stimulus \(GO:0050896\)](#)

cellular process (GO:0009987): 659; 46.0%; 29.6%

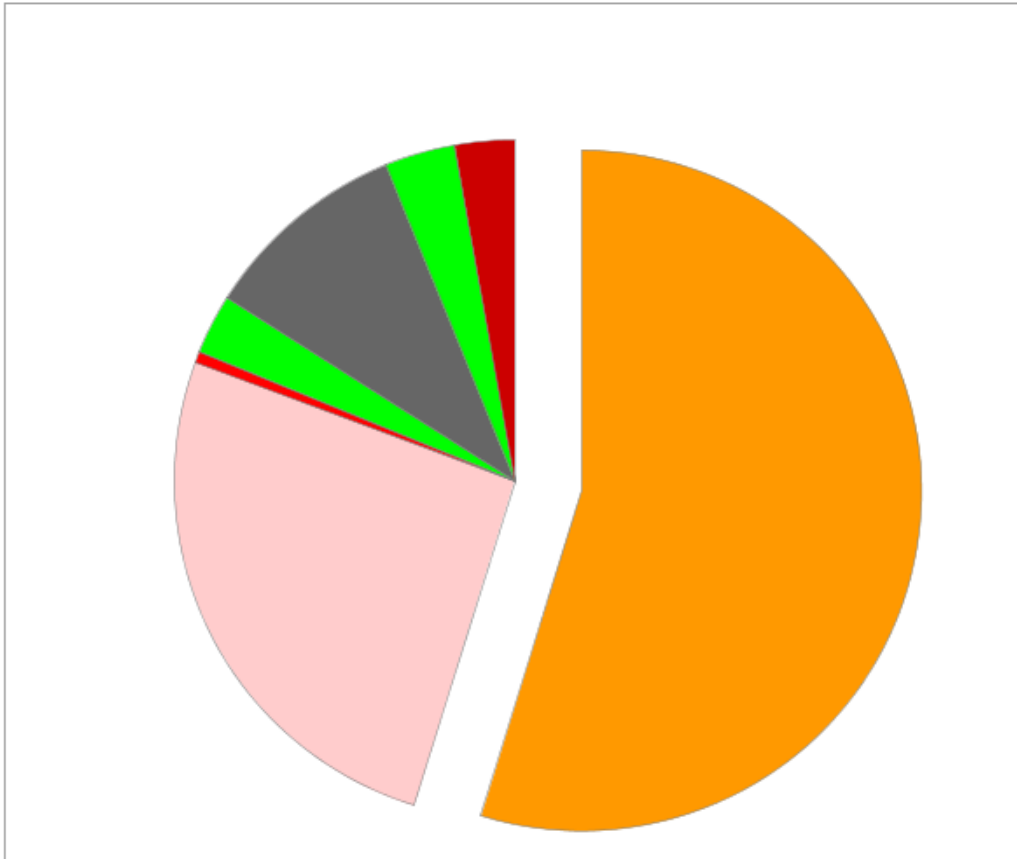
Color picker powered by



PANTHER GO-Slim Biological Process

Level 1: cellular process (GO:0009987)

Total # Genes: 659 Total # process hits: 356



Click to get gene list for a category:

[cell communication \(GO:0007154\)](#)

[cell cycle \(GO:0007049\)](#)

[cell growth \(GO:0016049\)](#)

[cell proliferation \(GO:0008283\)](#)

[cellular component movement \(GO:0006928\)](#)

[chromosome segregation \(GO:0007059\)](#)

[cytokinesis \(GO:0000910\)](#)

cell communication (GO:0007154): 195; 29.6%; 54.8%


Color picker powered by  Web Colors by VisiBone

Fig. 26. Procesos biológicos en los que participan los genes diana regulados por dos o más miARNs.

A continuación, se hace un estudio más exhaustivo en el que el grupo de miARNs estudiado ha sido reagrupado como sigue: (a) miR-221 y miR-222 y (b) miR-20b, miR-296 y Let-7f. El hecho de esta agrupación es que está descrito que miR-221 y miR-222 forman parte de un “cluster” que podría estar regulando la proliferación y migración celular (Yu B y col., 2012; Howe EN y col., 2012). Además, la búsqueda de genes diana de miR-15b, miR-20a, miR-20b, miR-27b, miR-126, miR-130a, miR210, miR-221, miR-222, miR-296 y Let-7f regulados por dos o más miARNs y que se muestra en la Tabla 19 resalta que miR-221 y miR-222 podrían estar regulando juntos 53 genes diana.

Por otra parte, miR-20b, miR-296 y Let-7f están descritos por participar en vías Wnt y Angiogénesis (Egea V y col., 2012; Ba H y col., 2016; Huang T y col., 2016).

VIII.4.4. Búsqueda de genes diana regulados por miR-221 y miR-222

Según se deduce de la Tabla 19, miR-221 y miR-222 podrían estar regulando genes junto a uno o más de los miARNs estudiados aquí. Un análisis de este hecho muestra que miR-221 y miR-222 podrían regular 67 genes diana más, junto con uno o más miARNs. (Tabla 21).

Tabla 21. Genes diana de miR-15b, miR-20a, miR-20b, miR-27b, miR-126, miR-130a, miR210, miR-221, miR-222, miR-296 y Let-7f regulados por miR-221 y miR-222, juntos o con más miARNs.

miRNAs	Cantidad de Genes	miRNAs	Cantidad de Genes	miRNAs	Cantidad de Genes
221-222	53	15b-221-222	7	20a-20b-221-222	8
		20a-221-222	6	15b-130a-221-222	3
		221-222-Let-7f	5	20b-130a-221-222	1
		130a-221-222	4	27b-221-222-Let-7f	1
		27b-221-222	3	15b-126-221-222	1
		221-222-296	3	20a-130a-221-222	1
		20b-221-222	3	15b-27b-221-222	1
		126-221-222	2	15b-221-222-296	1
		210-221-222	1		

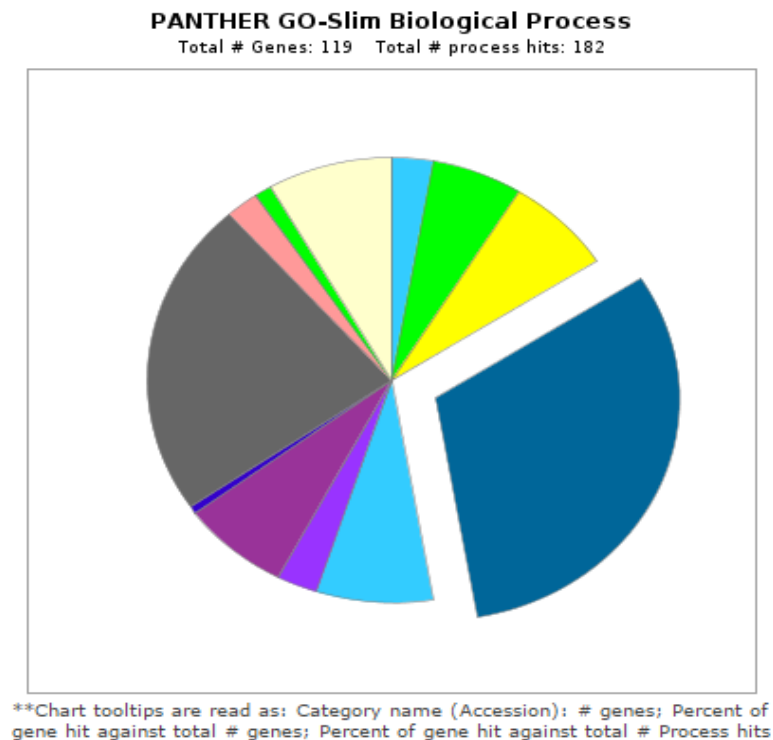
miRNAs	Cantidad de Genes	miRNAs	Cantidad de Genes
20a-20b-221-222-Let-7f	3	15b-20a-20b-221-222-Let-7f	3
20a-20b-130a-221-222	3	15b-20a-20b-27b-221-222	1
15b-20a-20b-221-222	2		
27b-130a-221-222-Let-7f	1		
15b-27b-130a-221-222	1		
15b-130a-296-221-222	1		
126-221-222-296-Let-7f	1		

VIII.4.5. Búsqueda de procesos y rutas biológicas en los que participan los genes diana regulados por miR-221 y miR-222. PANTHER. DAVID.

Con el propósito de encontrar los procesos biológicos en los que participan los genes diana regulados por miR-221 y miR-222 se creó una lista con los 120 genes diana predichos que fue luego introducida en PANTHER y analizada como se describe en materiales y métodos. Esta herramienta bio-informática mapeó 72 de los 120 genes. El resultado del análisis de procesos biológicos resalta que 57 genes diana están involucrados en procesos celulares, de los cuales 13 participarían en comunicación celular, como se muestra en la Fig 27. En cuanto a las rutas biológicas involucradas los

resultados arrojan una larga lista que se muestra en la Fig 28, mientras que la Tabla 22, los presenta con mayor detalle.

Los 48 genes diana restantes fueron identificados y se creó una nueva lista que fue introducida en DAVID y analizada como se describe en materiales y métodos. El resultado del análisis se muestra en la Tabla 23.



Click to get gene list for a category:

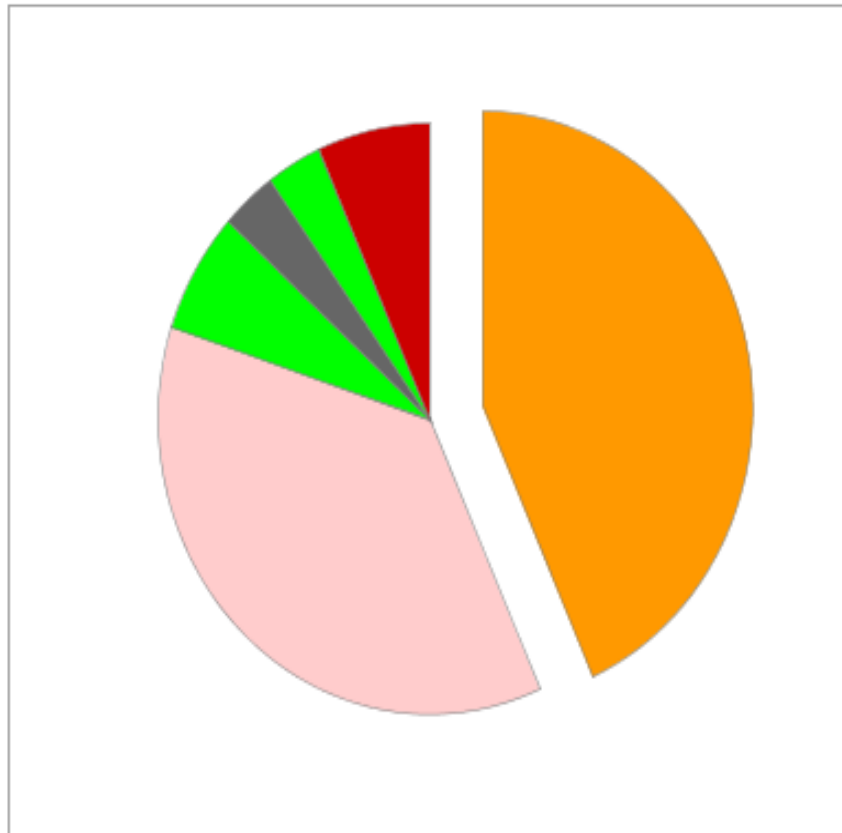
- [biological adhesion \(GO:0022610\)](#)
- [biological regulation \(GO:0065007\)](#)
- [cellular component organization or biogenesis \(GO:0071840\)](#)
- [cellular process \(GO:0009987\)](#)
- [developmental process \(GO:0032502\)](#)
- [immune system process \(GO:0002376\)](#)
- [localization \(GO:0051179\)](#)
- [locomotion \(GO:0040011\)](#)
- [metabolic process \(GO:0008152\)](#)
- [multicellular organismal process \(GO:0032501\)](#)
- [reproduction \(GO:0000003\)](#)
- [response to stimulus \(GO:0050896\)](#)

Color picker powered by Web Colors by VisiBone

PANTHER GO-Slim Biological Process

Level 1: cellular process (GO:0009987)

Total # Genes: 57 Total # process hits: 30



Click to get gene list for a category:

- [cell communication \(GO:0007154\)](#)
- [cell cycle \(GO:0007049\)](#)
- [cell proliferation \(GO:0008283\)](#)
- [cellular component movement \(GO:0006928\)](#)
- [chromosome segregation \(GO:0007059\)](#)
- [cytokinesis \(GO:0000910\)](#)


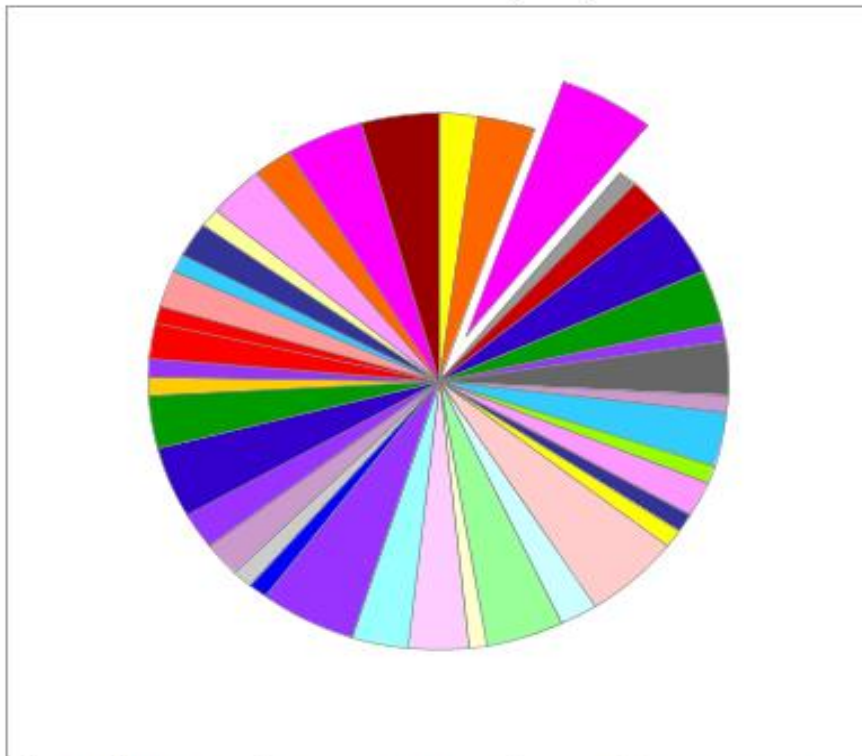
Color picker powered by  Web Colors by VisiBone

Fig. 27. Procesos biológicos en los que participan los genes diana regulados por miR-221 y miR-222

PANTHER Pathway

Total # Genes: 119 Total # pathway hits: 93



**Chart tooltips are read as: Category name (Accession): # genes; Percent of gene hit against total # genes; Percent of gene hit against total # Pathway hits

Click to get gene list for a category:

- [Alzheimer disease-presenilin pathway \(P00004\)](#) ⓘ
- [Angiogenesis \(P00005\)](#) ⓘ
- [Apoptosis signaling pathway \(P00006\)](#) ⓘ
- [Axon guidance mediated by netrin](#) ⓘ
- [B cell activation \(P00010\)](#) ⓘ
- [CCKR signaling map \(P06959\)](#) ⓘ
- [Cadherin signaling pathway \(P00012\)](#) ⓘ
- [Coenzyme A biosynthesis \(P02736\)](#) ⓘ
- [Cytoskeletal regulation by Rho GTPase \(P00016\)](#) ⓘ
- [Dopamine receptor mediated signaling pathway \(P05912\)](#) ⓘ
- [EGF receptor signaling pathway \(P00018\)](#) ⓘ
- [Endothelin signaling pathway \(P00019\)](#) ⓘ
- [FGF signaling pathway \(P00021\)](#) ⓘ
- [Glycolysis \(P00024\)](#) ⓘ
- [Gonadotropin-releasing hormone receptor pathway \(P06664\)](#) ⓘ
- [Huntington disease \(P00029\)](#) ⓘ
- [Hypoxia response via HIF activation \(P00030\)](#) ⓘ
- [Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway \(P00031\)](#) ⓘ
- [Insulin/IGF pathway-mitogen activated protein kinase kinase/MAP kinase cascade \(P00032\)](#) ⓘ
- [Insulin/IGF pathway-protein kinase B signaling cascade \(P00033\)](#) ⓘ
- [Integrin signalling pathway \(P00034\)](#) ⓘ

XZ

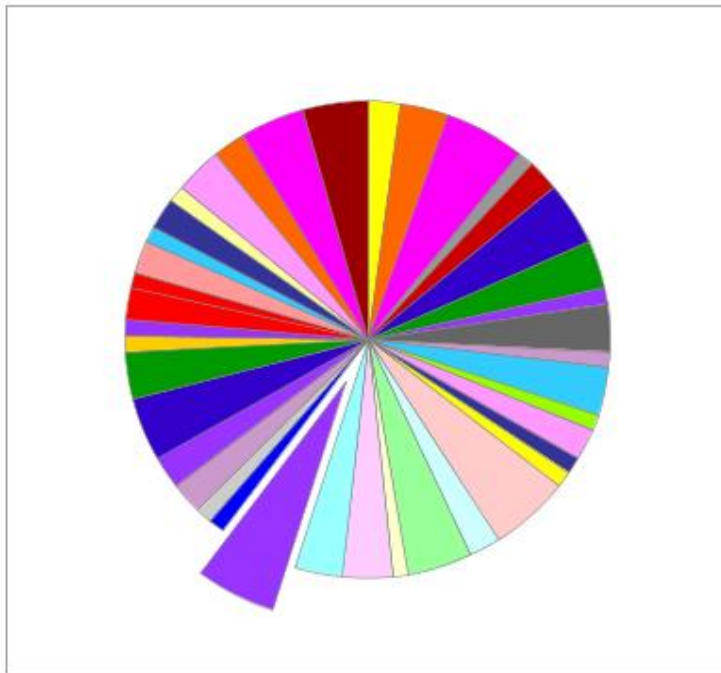


Fig. 28. Rutas biológicas en las que participan los genes diana regulados miR-221 y miR-222

Tabla 22. Rutas biológicas en las que participan los genes diana regulados miR-221 y miR-222. PANTHER.

Rutas biológicas	Ruta PANTHER	Genes	Porcentaje (%)
Apoptosis	P00006	5	4.2
Ruta señalización interleucinas	P00036	5	4.2
Enfermedad de Huntington	P00029	5	4.2
Inflamación	P00031	4	3.4
Ruta P53	P00059	4	3.4
Bucles retroalimentación ruta p53	P04398	4	3.4
Ruta señalización PDGF	P00047	4	3.4
Señalización CCKR	P06959	4	3.4
Angiogénesis	P00005	3	2,5
Ruta señalización Wnt	P04397	3	2,5
Ruta PI3 cinasa	P00048	3	2,5
Ruta insulina	P00033	3	2,5
Ruta señalización integrinas	P00034	3	2,5
Ruta señalización Receptor EGF	P00018	3	2,5
Señalización Cadherina	P00012	3	2,5
Regulación citoesquelética por GTPasa Rho	P00016	3	2,5
Ruta p53 por privación de glucosa	P04397	2	1.7
Ruta señalización FGF	P00021	2	1.7
Ruta P53	P04392	2	1.7
Ruta ubiquitina proteosoma	P00060	2	1.7
Respuesta a hipoxia	P00030	2	1.7
Activación células T	P00053	2	1.7
Ruta Ras	P04393	2	1.7
Ruta señalización receptor acetilcolina nicotínica	P00044	2	1.7
Enfermedad de Alzheimer	P00004	2	1.7
Activación células B	P00010	2	1.7
Ruta señalización VEGF	P00056	1	0.8
Ruta señalización endotelina	P00019	1	0.8
Glicólisis	P00024	1	0.8
Ruta insulina	P00032	1	0.8
Ruta señalización JAK/STAT	P00038	1	0.8
Metabolismo de Piruvato	P02772	1	0.8
Ruta señalización Toll	P00054	1	0.8
Biosíntesis S-adenosilmetionina	P02773	1	0.8
Enfermedad de Parkinson	P00049	1	0.8
Ruta farmacodinámica nicotínica	P00044	1	0.8
Ruta receptor hormona relacionada gonadotrofinas	P06664	1	0.8
Ruta señalización mediada receptor dopamina	P05912	1	0.8
Biosíntesis Coenzima A	P02736	1	0.8
Guía axón mediada por netrina	P00009	1	0.8

Tabla 23. Rutas y procesos biológicos en los que participan los genes diana regulados miR-221 y miR-222. DAVID.

Procesos celulares	GO	Genes	Porcentaje (%)
Procesos biológicos	0008150	25	52,08
Fosforilación	0006468	4	8,33
Respuesta a hipoxia	0001666	3	6,25
Componente celular	0005575	3	6,25
Proceso apoptótico	0006915	2	4,17
Vía Wnt	0016055	2	4,17
Angiogénesis	0001525	1	2,08
Respuesta inflamatoria	0006954	1	2,08
Regulación insulina	0046676	1	2,08
Transducción de señales	0007165	1	2,08
Proliferación celular	0008283	1	2,08
Regulación de la diferenciación celular	0045595	1	2,08
Adhesión celular	0007155	1	2,08

VIII.4.6. Análisis de enriquecimiento de los genes diana regulados por miR-221 y miR-222. GeneCodis3.

Con el fin de conocer los genes diana más relevantes, la lista de 120 genes diana regulados por miR-221 y miR-222 fue introducida en GeneCodis3, como se describe en materiales y métodos. Los resultados se muestran en la Fig. 29 y la Tabla 24.

VIII.4.7. Visualización de la red de interacción de los genes diana regulados por miR-221 y miR-222, los miARNs reguladores y las rutas biológicas involucradas. Cytoscape.

La herramienta Cytoscape nos permitió visualizar la red de interacción entre miARNs, los 120 genes diana regulados por miR-221 y miR-222 y las rutas biológicas involucradas como se muestra en la Fig. 30.

— Singular Enrichment Analysis of Panther Pathways

Cytoskeletal regulation by Rho GTPase Hypoxia response via HIF activation Coenzyme A biosynthesis Interleukin signaling pathway Ubiquitin proteasome pathway PI3 kinase pathway S-adenosylmethionine biosynthesis Apoptosis signaling pathway PDGF signaling pathway Insulin/IGF pathway-protein kinase B signaling cascade P53 pathway feedback loops 1 Huntington disease Ras Pathway B cell activation p53 pathway Angiogenesis EGF receptor signaling pathway p53 pathway feedback loops 2 Pyruvate metabolism p53 pathway by glucose deprivation

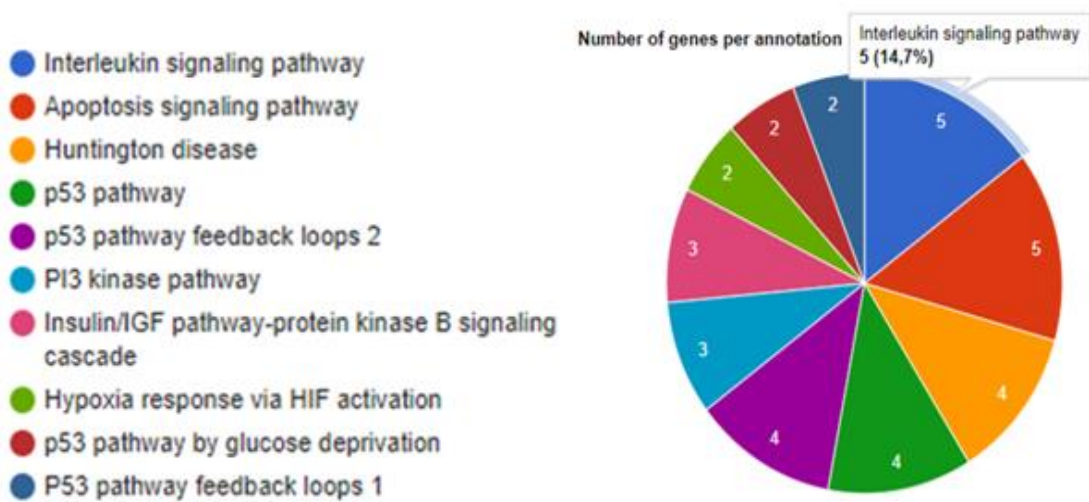


Fig. 29. Análisis de enriquecimiento de los genes diana regulados por miR-221 y miR-222. GeneCodis3.

Tabla 24. Rutas y genes del análisis de enriquecimiento de los genes diana regulados por miR-221 y miR-222. GeneCodis3.

PANTHER	NOMBRE DE LA RUTA	p-value	GENES
P00006	Ruta señalización apoptosis	0,000	FOS, AKT3, TP53, BCL2L11, TNFSF10
P00036	Ruta señalización interleucinas	0,001	Cdkn1b, FOS, FOXO3, AKT3, STAT5
P00059	Ruta p53	0,001	AKT3, TP53, PTEN, MDM2
P04398	Ruta p53 feedback loops 2	0,000	AKT3, TP53, PTEN, MDM3
P00018	Ruta señalización Receptor EGF	0,024	AKT3, STAT5A, PPP6C
P00005	Angiogénesis	0,039	FOS, AKT3, ETS1
P00048	Ruta PI3 cinasa	0,004	FOXO, AKT3, PTEN
P00033	Ruta señalización cascada Insulina/IGF proteína B cinasa	0,001	FOXO, PTEN, MDM2
P00047	Ruta señalización PDGF	0,028	FOS; STAT5A, ETS1
P04397	Ruta p53 para privación de glucosa	0,009	AKT3, TP53
P04392	Ruta p53feedback loops 1	0,001	TP53, MDM2
P00030	Respuesta a hipoxia vía activación HIF	0,013	AKT3, PTEN
P00060	Ruta ubiquitina proteosoma	0,029	UBE2N, MDM2
P00016	Regulación citoesqueletica de GTOasa Rho	0,044	ACTG1, STMN1
P04393	Ruta Ras	0,048	AKT3, ETS1
P00010	Activación células B	0,040	FOS, LYN
P02772	Metabolismo piruvato	0,045	PKM2
P02773	Biosíntesis S-adenosilmetionina	0,027	MAT2A
P02736	Biosíntesis Coenzima A	0,043	PANK3

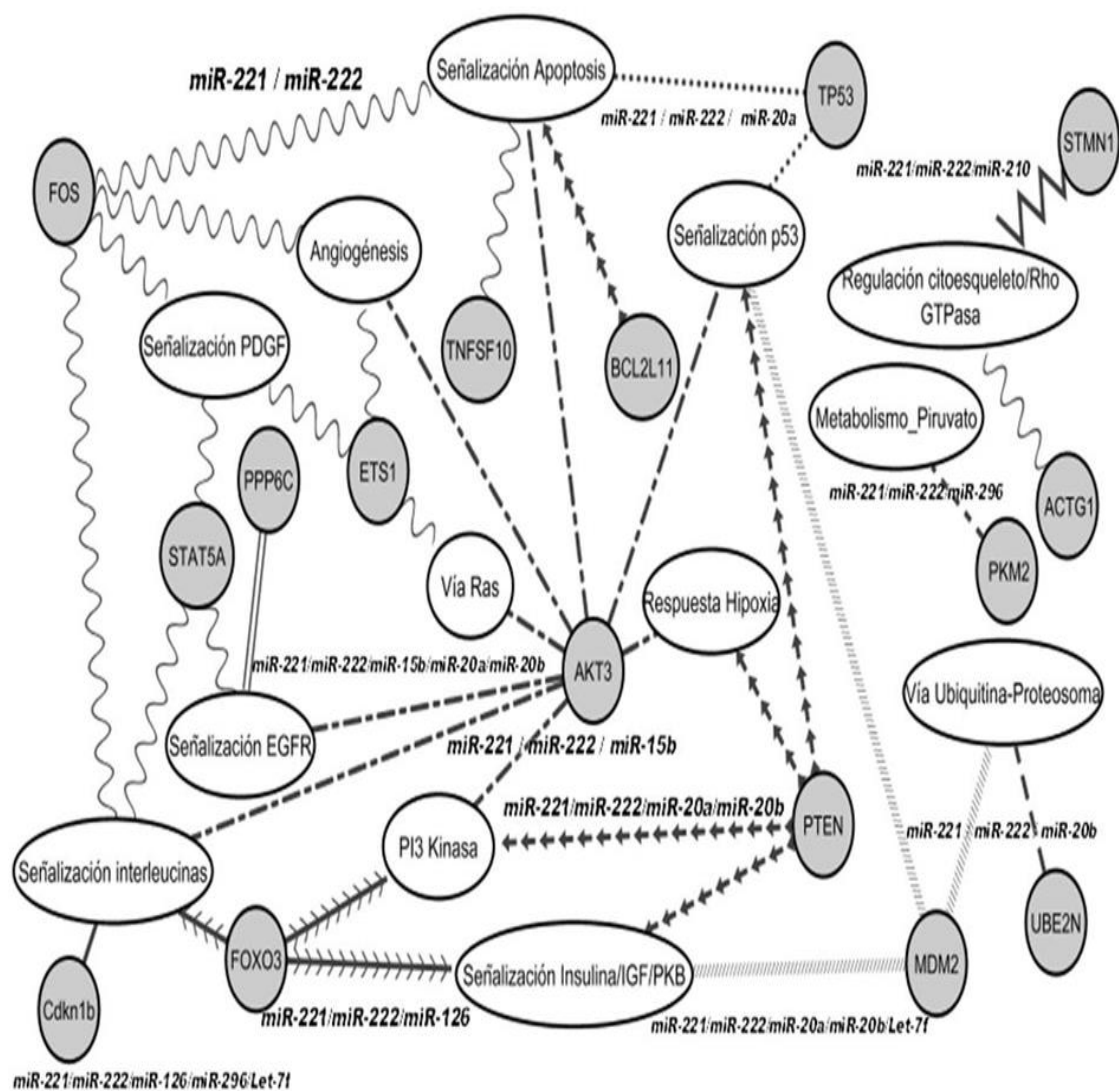


Fig. 30. Red de interacción entre miARNs, genes diana y rutas biológicas. La red de interacción entre miARNs, genes diana regulados por miR-221 y miR-222 y rutas biológicas se creó usando el software Cytoscape. Esta red está compuesta de nodos grises para cada gen objetivo regulado y nodos blancos para rutas biológicas. Los miRNAs involucrados están representados por las diferentes líneas de enlace de la siguiente manera: miR-221 / miR-222: onda sinusoidal; miR-221 / miR-222 / miR-15b: punto-guión; miR-221 / miR-222 / miR-20a: puntos; miR-221 / miR-222 / miR-20b: guiones; miR-221 / miR-222 / miR-126: flechas contiguas; miR-221 / miR-222 / miR-210: zigzag; miR-221 / miR-222 / miR-296: guiones iguales; miR-221 / miR-222 / miR-20a / miR-20b: flechas separadas; miR-221 / miR-222 / miR-15b / miR-20a / miR-20b: líneas paralelas; miR-221 / miR-222 / miR-20a / miR-20b / Let-7f: barra oblicua; miR-221 / miR-222 / miR-126 / miR-296 / Let-7f: línea continua.

VIII.4.8. Predicción de genes diana de miR-221 y miR-222 que no han sido validados.

VIII.4.8.1. Búsqueda genes diana de miR-221 y miR-222 involucrados en los procesos de adipogénesis, angiogénesis y apoptosis. miRWalk.

Con el fin de determinar los genes diana de miR-221 y miR-222, que aún no han sido validados, y que están involucrados en los procesos de adipogénesis, angiogénesis y apoptosis, un análisis bio-informático con miRWalk fue realizado como se detallada en materiales y métodos. Un total de 49 genes diana fueron obtenidos y corresponden a las secuencias maduras de miR-221-5p, miR-221-3p, miR-222-5p, miR-222-3p. Estos genes están involucrados en los procesos de interés como sigue: adipogénesis, 7 genes diana; angiogénesis, 20 genes diana y apoptosis, 22 genes diana.

VIII.4.8.2. Búsqueda de genes diana de miR-221-3p y miR-222-3p involucrados en los procesos de adipogénesis, angiogénesis y apoptosis.

Del total de 49 genes diana de miR-221 y miR-222 predichos y no validados que podrían estar involucrados en los procesos de adipogénesis, angiogénesis y apoptosis, 17 son genes diana de miR-221-3p y miR-222-3p y se muestran en la Tabla 25.

Tabla 25. Genes diana de miR-221-3p y miR-222-3p involucrados en los procesos de adipogénesis, angiogénesis y apoptosis.

PROCESO	GEN	miARN	
		miR-221-3p	miR-222-3p
ADIPOGÉNESIS	CELF1	●	●
	CREB1	●	
	LIFR	●	
	STAT2	●	●
ANGIOGÉNESIS	AKT3	●	
	DVL2	●	●
	NCK1	●	●
	PDGFD	●	●
	PIK3CD	●	●
	PRKCB	●	●
APOPTOSIS	AKT3	●	●
	APAF1	●	
	BCL2		●
	CASP10	●	●
	IKBKG	●	●
	IL1RAP	●	●
	PIK3CD	●	●
	PPP3R1	●	●
TNFSF10	●	●	

VIII.4.9. Predicción genes diana de miR-20b, miR-296 y Let-7f.

Las bases de datos miRTarBase 4.0 y miRWalk 2.0 fueron utilizadas para la predicción de genes diana validados y no validados de los tres miARNs analizados. Los sistemas de Clasificación PANTHER y DAVID fueron aplicados para anotar el proceso biológico de los objetivos predichos. Con el fin de reducir falsos positivos, con un alto grado de confianza, en la predicción de los genes diana de miR-20b, miR-296 y Let-7f, para el análisis posterior, elegimos los genes diana de miARNs de la siguiente manera: (a) Para cada miARN los genes diana que se validaron en los dos algoritmos de predicción, (b) Los genes diana que se validaron en una base de datos y que son comunes a al menos dos

miARN estudiados, y (c) Los genes diana no validados, que son comunes a los tres miARN. De acuerdo con este criterio, nosotros encontramos 98 posibles Genes diana (Tabla Suplementaria 2, Gentile A-M y col., 2018. Artículo bajo revisión en Obesity, junio 2018). Estos 98 genes fueron introducidos en las herramientas PANTHER y DAVID, con el fin de conocer los procesos biológicos en los que están involucrados (Fig.31).

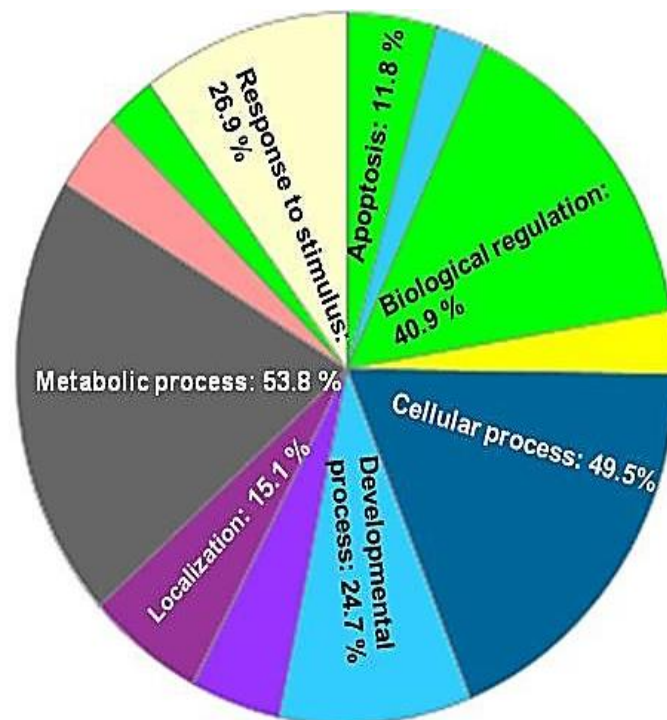


Fig. 31. Procesos biológicos en los que están involucrados los genes diana de miR-20b, miR-296 y Let-7f. Un análisis bio-informático, llevado a cabo como se detalla en Materiales y Métodos, predijo 98 Genes diana de miR-20b, miR-296 y Let-7f. Estos genes fueron introducidos en las herramientas PANTHER y DAVID para conocer los procesos biológicos en los que están involucrados.

VIII.5. Perfil de expresión de genes diana de miARNs en TA humano

Un total de 32 muestras de ARNm, obtenidas desde TA visceral y subcutáneo procedentes de 4 grupos diferentes de pacientes (NS, OS, OD, ORI) cuyas características bioquímicas y antropológicas se muestran en la Tabla 2, fueron enviadas, en hielo seco, al Laboratorio IMG (82152 Martinsried, Alemania) para realizar un Arrays de expresión génica (Agilent Whole Human Genome Microarray (G4112F) (Agilent Technologies,

California, USA). El Array analizó 41.079 genes. El informe suministrado por la Compañía informa el valor p-value obtenido, sin especificar el método utilizado.

VIII.5.1. Perfil de expresión de los 120 genes diana regulados por miR-221 y miR-222 en tejido adiposo humano.

Con el fin de analizar el nivel de expresión de los 120 genes diana en TA, un Arrays fue utilizado en 4 grupos de pacientes, descritos en el apartado anterior. Así nosotros observamos que 56 genes diana se expresaron con diferencia estadísticamente significativa en TAV y/o TAS como se muestra en las Tablas 26 y 27. La herramienta Cytoscape nos permitió confeccionar una red de interacción entre la expresión de estos genes y su relación con obesidad, RI y DMT2 (Fig. 32)

Tabla 26. Perfil de expresión genes diana en Tejido adiposo visceral.

Obesidad VAT				Resistencia Insulina VAT				Diabetes VAT			
GEN	Veces de cambio	Regulación OS vs. NS	p-value	GEN	Veces de cambio	Regulación ORI vs. OS	p-value	GEN	Veces de cambio	Regulación OD vs. ORI	p-value
BCL2L11	2,27	up	0,027	ACTB	1,20	up	0,004	ACTB	1,28	down	0,002
C18orf25	1,67	up	0,051	CDKN1C	1,53	down	0,007	BCL2L11	1,99	down	0,015
CDKN1B	1,81	down	0,092	MGMT	1,32	down	0,020	C18orf25	2,33	down	0,006
CORO1A	2,84	up	0,005	PANK3	1,31	up	0,022	CDK6	1,33	up	0,039
DERL2	1,19	down	0,017	RNF4	1,19	up	0,025	CHORDC1	2,39	down	0,039
ESR1	1,44	down	0,023	TMEM2	2,58	up	0,026	DYRK3	1,92	down	0,044
ETS1	3,15	up	0,011					EXOC8	1,55	down	0,027
FAM35A	1,32	down	0,506					FOXO3	1,82	down	0,048
FOXO3	3,43	up	0,005					ICAM1	4,26	down	0,002
ICAM1	7,34	up	0,000					KPNA2	1,28	down	0,033
LYN	2,78	up	0,030					MAT2A	3,11	down	0,001
MIDN	12,10	up	0,000					MIDN	4,57	down	0,016
PGPEP1	1,38	down	0,031					MKKS	1,68	up	0,017
ZNF275	1,88	up	0,027					PDIK1L	2,02	up	0,015
								PGPEP1	1,50	up	0,007
								PTEN	1,86	down	0,048
								SELE	19,77	down	0,008
								SF3B3	1,28	up	0,025
								SLC25A36	1,58	up	0,023
								STMN1	1,77	up	0,007
								TIPARP	4,45	down	0,033
								TMCC1	1,74	down	0,016
								TMEM2	3,19	down	0,000
								TRAT1	2,48	down	0,041
								UBE2N	1,32	down	0,044
								ZNF275	2,36	down	0,040

Tabla 27. Perfil de expresión genes diana en Tejido adiposo subcutáneo.

Obesidad SAT				Resistencia Insulina SAT				Diabetes SAT			
GEN	Veces de cambio	Regulación OS vs. NS	p-value	GEN	Veces de cambio	Regulación ORI vs. OS	p-value	GEN	Veces de cambio	Regulación OD vs. NS	p-value
DDX6	1,68	up	0,043	MYLIP	1,40	up	0,048	CABYR	1,88	up	0,008
PANK3	1,78	up	0,020	PDIK1L	1,57	down	0,039	CHORDC1	1,29	up	0,045
PGPEP1	1,41	down	0,005	PPP6C	1,50	down	0,015	CREBZF	1,77	down	0,022
SAR1A	1,24	up	0,026	PRPS1L1	3,08	down	0,022	CSTF2T	1,50	up	0,021
VANGL1	1,34	down	0,022					DDX6	1,87	up	0,026
EXOC5	1,30	up	0,041					DERL2	1,15	up	0,024
C9orf140	1,42	up	0,040					ETS1	1,45	down	0,008
								FAM84A	1,98	up	0,020
								GJA1	2,13	up	0,037
								MKKS	1,29	down	0,012
								OBFC1	1,60	down	0,002
								OIP5	2,28	up	0,022
								PANK3	1,44	up	0,006
								PGPEP1	1,55	down	0,017
								RNPS1	1,76	down	0,014
								SLC25A36	1,35	down	0,037
								SMC2	1,61	up	0,020
								EIF2C2	1,47	up	0,012
								ROD1	1,54	up	0,028

Con el propósito de conocer la relevancia de los procesos biológicos involucrados, los 56 genes expresados diferencialmente fueron introducidos en la herramienta GeneCodis, como se describe en materiales y métodos, para un análisis de enriquecimiento. Los resultados revelan un enriquecimiento en la regulación de la proliferación celular, ciclo celular, inducción de la apoptosis, transducción de señales y fosforilación, principalmente (Fig. 33 y Tabla 28).

Tabla 28. Análisis de enriquecimiento genes expresados en tejido adiposo humano.

Proceso biológico	Ontología génica (GO)	Genes (cantidad)	Porcentaje (%)	p-value	GENES
Regulación negativa de proliferación celular	0008285	7	12,5	0.000	PTEN, CDKN1C, LYN, CDKN1B, GJA1, CDK6, ETS1
Ciclo celular	0007049	6	10,7	0.003	PPP6C, CDKN1C, CDKN1B, OIP5, SMC2, CDK6
Transducción de señales	0007165	6	10,7	0.027	STMN1, LYN, ESR1, GJA1, CABYR, TRAT1
Inducción de apoptosis	0006917	5	8,9	0.000	BCL2L11, PTEN, CDKN1B, FOXO3, ETS1
Regulación positiva de proliferación celular	0008284	5	8,9	0.000	PTEN, DERL2, LYN, CDKN1B, ETS1
Regulación positiva de la transcripción del promotor de ARN polimerasa II	0045944	4	7,1	0.032	RNF4, ESR1, FOXO3, ETS1
Fosforilación	0006468	3	5,4	0.046	DYRK3, LYN, CDK6

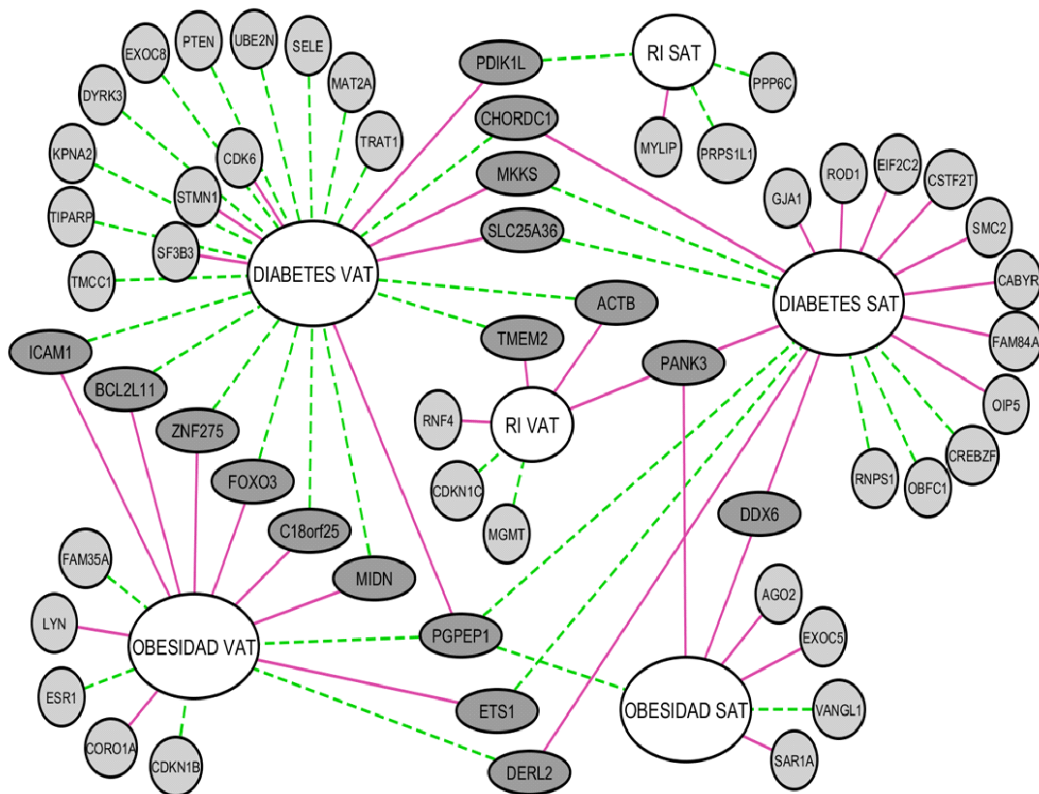


Fig. 32. Red de interacción de genes diferencialmente expresados en TAV y TAS humano. La red de interacción entre los genes diana regulados por miR-221 y miR-222 diferencialmente expresados y su relación con obesidad RI y DMT2 fue creado usando el software Cytoscape. Esta red está compuesta de nodos grises para cada gen objetivo regulado y nodos blancos para obesidad, RI y DMT2. El tipo de regulación está representado por las diferentes líneas de enlace de la siguiente manera: regulación en alza: línea roja continua; regulación a la baja: línea punteada verde.

— Singular Enrichment Analysis of GO Biological Process

fibroblast growth factor receptor signaling pathway (BP) transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway (BP) regulation of cyclin-dependent protein kinase activity (BP) T cell receptor signaling pathway (BP) phosphatidylinositol-mediated signaling (BP) **induction of apoptosis (BP)** response to drug (BP) positive regulation of cellular component movement (BP) transcription, DNA-dependent (BP) response to estradiol stimulus (BP) B cell homeostasis (BP) mRNA processing (BP) cell cycle arrest (BP) **cell cycle (BP)** response to virus (BP) positive regulation of transcription, DNA-dependent (BP) **signal transduction (BP)** interspecies interaction between organisms (BP) positive regulation of protein catabolic process (BP) nerve growth factor receptor signaling pathway (BP) activation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process (BP) androgen metabolic process (BP) cell division (BP) positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter (BP) **negative regulation of cell proliferation (BP)** erythrocyte differentiation (BP) heart development (BP) G1/S transition of mitotic cell cycle (BP) negative regulation of epithelial cell proliferation (BP) **positive regulation of cell proliferation (BP)** G1 phase of mitotic cell cycle (BP)

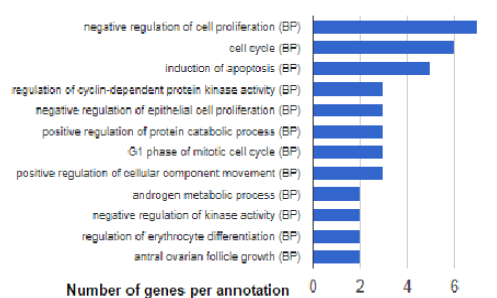


Fig. 33. Análisis de enriquecimiento genes expresados en tejido adiposo humano.

Con el propósito de comparar la relevancia de los procesos biológicos involucrados en cada TA, los genes expresados diferencialmente en TAV y TAS fueron introducidos en listas separadas en la herramienta GeneCodis, como se describe en materiales y métodos, para un análisis de enriquecimiento comparativo. Los resultados revelan en TAV un enriquecimiento en la regulación de la proliferación celular, inducción de la apoptosis, señalización mediada por fosfatidilinositol, regulación de la actividad de la proteína quinasa dependiente de ciclina, regulación negativa de la proliferación de células epiteliales, fase G1 del ciclo celular mitótico y regulación positiva del movimiento de componentes celulares, principalmente. Mientras que TAS revela un enriquecimiento en ciclo celular, regulación positiva de procesos catabólicos de proteínas, desarrollo del corazón, transcripción dependiente de DNA, respuesta a la tensión de corte del fluido

laminar, regulación negativa de la traducción implicada en el silenciamiento de genes por miARN, principalmente (Fig. 34 y Tabla 29).

Tabla 29. Análisis de enriquecimiento comparativo entre TAV y TAS

Proceso biológico (TAV)	Ontología génica (GO)	Genes (cantidad)	Porcentaje (%)	p-value	GENES
Regulación negativa de proliferación celular	0008285	6	16,2	0,0002	PTEN, CDKN1C, LYN, CDKN1B, CDK6, ETS1
Regulación positiva de proliferación celular	0008284	5	13,5	0,0017	PTEN, DERL2, LYN, CDKN1B, ETS1
Inducción de apoptosis	0006917	5	13,5	0,0003	BCL2L11, PTEN, CDKN1B, FOXO3, ETS1
Señalización mediada por fosfatidil inositol	0048015	3	8,1	0,0026	PTEN, CDKN1B, FOXO3
Regulación actividad proteína cinasa dependiente de ciclina	0000079	3	8,1	0,0013	PTEN, CDKN1B, CDKN1C
Regulación negativa de proliferación células epiteliales	0050680	3	8,1	0,0007	PTEN, CDKN1B, CDK6
Fase G1 del ciclo celular mitótico	0000080	3	8,1	0,0003	CDKN1B, CDKN1C, CDK6
Regulación positiva del movimiento de componentes celulares	0051272	3	8,1	0,0001	STMN1, LYN, ETS1
Proceso biológico (TAS)	Ontología génica (GO)	Genes (cantidad)	Porcentaje (%)	p-value	GENES
Ciclo celular	0007049	3	11,1	0,023	PPP6C, OIP5, SMC2
Regulación positiva de procesos catabólicos de proteínas	0045732	2	7,4	0,0289	GJA1, MYLIP
Desarrollo del corazón	0007507	2	7,4	0,0265	GJA1, MKKS
Transcripción dependiente de ADN	0006351	2	7,4	0,0246	CREBZF, RNPS1
Respuesta a la tensión de corte del fluido laminaar	0034616	1	3,7	0,0255	ETS1
Regulación negativa de la traducción en el silenciamiento de genes por miARN	0035278	1	3,7	0,0236	EIF2C2 (AGO2)

Para finalizar, la Fig. 35 muestra un diagrama de flujo que resume los pasos seguidos desde la predicción bioinformática de los genes diana de los 11 miARNs estudiados aquí, hasta la expresión génica en TAV y TAS de los genes dianas regulados por miR-221 y miR-222.

Singular Enrichment Analysis of GO Biological Process

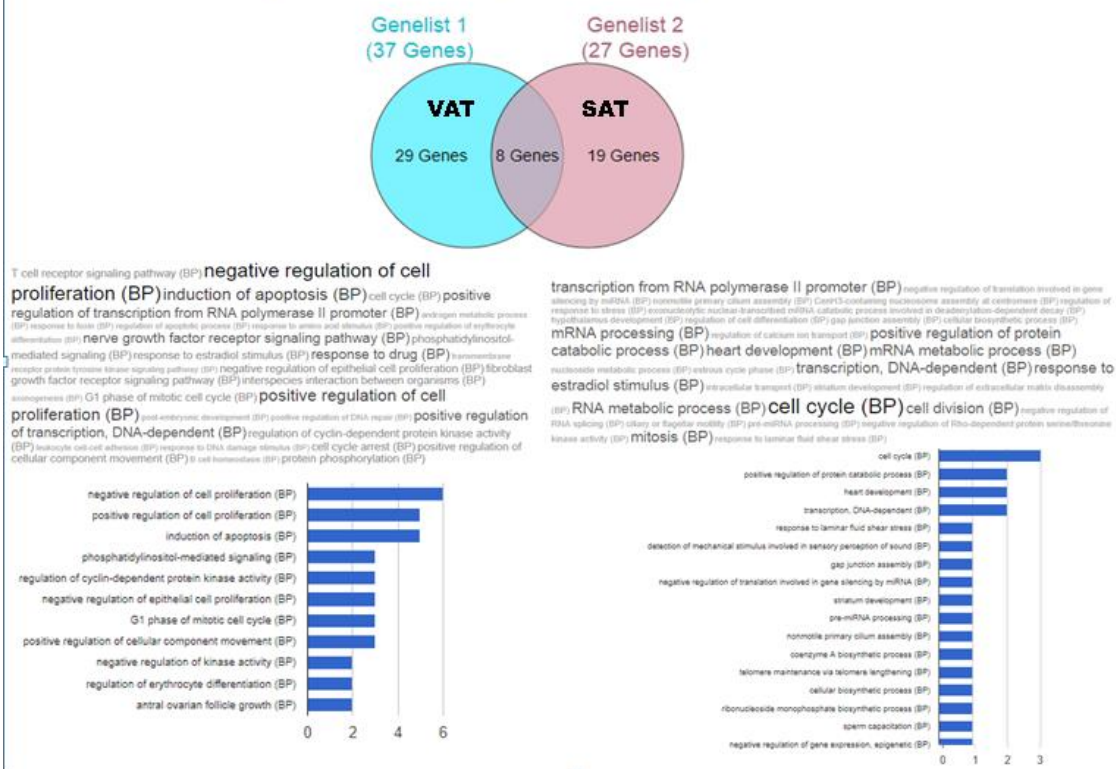


Fig. 34. Análisis de enriquecimiento comparativo entre TAV y TAS. GeneCodis3.

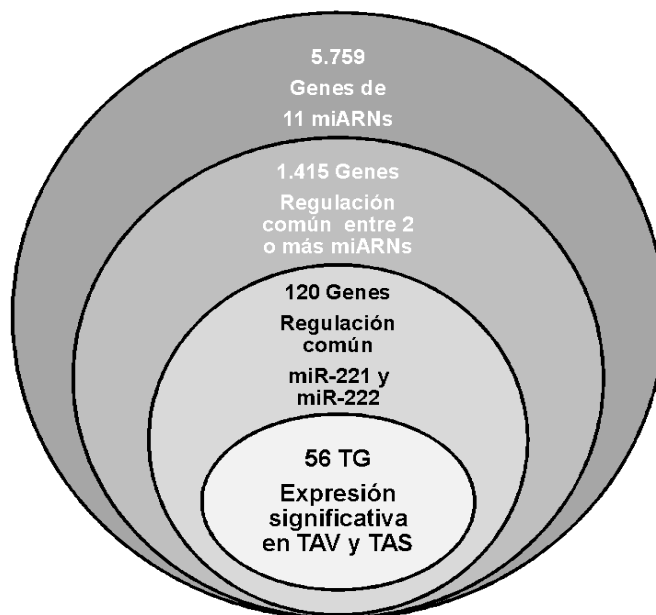


Fig. 35. Diagrama de flujo del análisis bioinformático y la expresión génica de los genes diana de los 11 miARNs.

VIII.5.2. Perfil de expresión de genes diana regulados por miR-20b, miR- 296 y Let-7f en tejido adiposo humano

a) Genes diana expresados diferencialmente en TAS humano

Los niveles de expresión en TAS de 15 Genes diana (ECE1, ERBB2, KDR, NAT10, NOS3, RET, SSSCA1, TNFRSF1B, ZNF512, CDKN1A, CX3CL1, HIF1A, PPP2R1B, STAT3 y VEGFA) se analizaron mediante un análisis con ANOVA que mostró diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de ARNm de CDKN1A ($p = 0.007$), NAT10 ($p = 0.036$) y SSSCA1 ($p = 0.039$) entre sujetos NS y OB. Por otro lado, los niveles de ARNm CDKN1A ($p = 0.009$), ECE1 ($p = 0.028$), NOS3 ($p = 0.041$), PPP2R1B ($p = 0.040$) y KDR ($p = 0.038$) fueron significativamente diferentes entre NS y OD. Específicamente, la expresión del gen CDKN1A mostró diferencias estadísticamente significativas entre NS frente a OD y la expresión del gen ECE1 mostró diferencias estadísticamente significativas entre NS frente a OS y entre OS y OD (Figura 36A). La relación entre los seis Genes diana y los tres miARNs se muestra en la Figura 36B. Se utilizó un modelo lineal general multivariante para analizar la expresión de todos los genes diana, teniendo en cuenta al mismo tiempo el efecto de la obesidad y la diabetes. De esta forma, se observó una intercepción entre tipos de sujetos, obesidad y diabetes cuando seis genes se expresan simultáneamente (PPP2R1B, NOS3, CX3CL1, NAT10, RET, VEGFA) (Wilks $\lambda = 0.025$, $F = 26.37$, $p = 0.004$) (Figura 36C), lo que indica que las diferencias en la expresión génica entre sujetos OS y NS no son las mismas cuando se tiene en cuenta el estado glucémico. Por otro lado, las pruebas univariadas sirvieron para analizar las diferencias en la expresión de cada uno de los Genes diana por separado. El análisis entre parejas (NS vs. sujetos OS) mostró una diferencia estadísticamente significativa en la obesidad; específicamente, la obesidad disminuyó significativamente

la expresión de NAT10 ($p = 0.037$, $F = 5.955$). El análisis entre las parejas (NS vs. OD) mostró una diferencia estadísticamente significativa en la diabetes; específicamente, la diabetes aumentó significativamente la expresión de PPP2R1B ($p = 0.045$, $F = 5.393$) y disminuyó la expresión de NOS3 ($p=0.046;F=5.341$).

La figura 36D resume la relación entre los seis genes diana, los tres miARNs y los procesos biológicos correspondientes, lo que indica una posible relación entre miR-296 y los genes NOS3 y PPP2R1B que podrían estar implicados en las vías de señalización de FGF, WNT e interleucinas.

b) Genes diana expresados diferencialmente en el TAV humano.

Se analizaron los niveles de expresión en TAV de 17 Genes diana (*CDKN1A*, *CX3CL1*, *HIF1A*, *PPP2R1B*, *STAT3*, *VEGFA*, *TNF*, *MYC*, *MPP3*, *DENND1C*, *GLUL*, *GPI*, *IL1B*, *LRRC33*, *RNASEN*, *WDR20*, *ZNF274*). Un análisis con ANOVA mostró diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de ARNm de GLUL ($p = 0,026$), GPI ($p = 0,033$) y VEGFA ($p = 0,037$) entre sujetos NS y OS. Por otro lado, los niveles de ARNm de GPI ($p = 0,028$), ZNF274 ($p = 0,019$) y VEGFA ($p = 0,002$) fueron significativamente diferentes entre NS y OD. Específicamente, CDKN1A, MPP3, GLUL, IL1B, STAT3, WDR20 y ZNF274 mostraron diferencias estadísticamente significativas entre NS y OS; GLUL, GPI y VEGFA entre NS y OD y CDKN1A, PPP2R1B, CX3CL1, VEGFA, WDR20 y ZNF274 mostraron diferencias estadísticamente significativas entre OS y OD (Figura 37A).

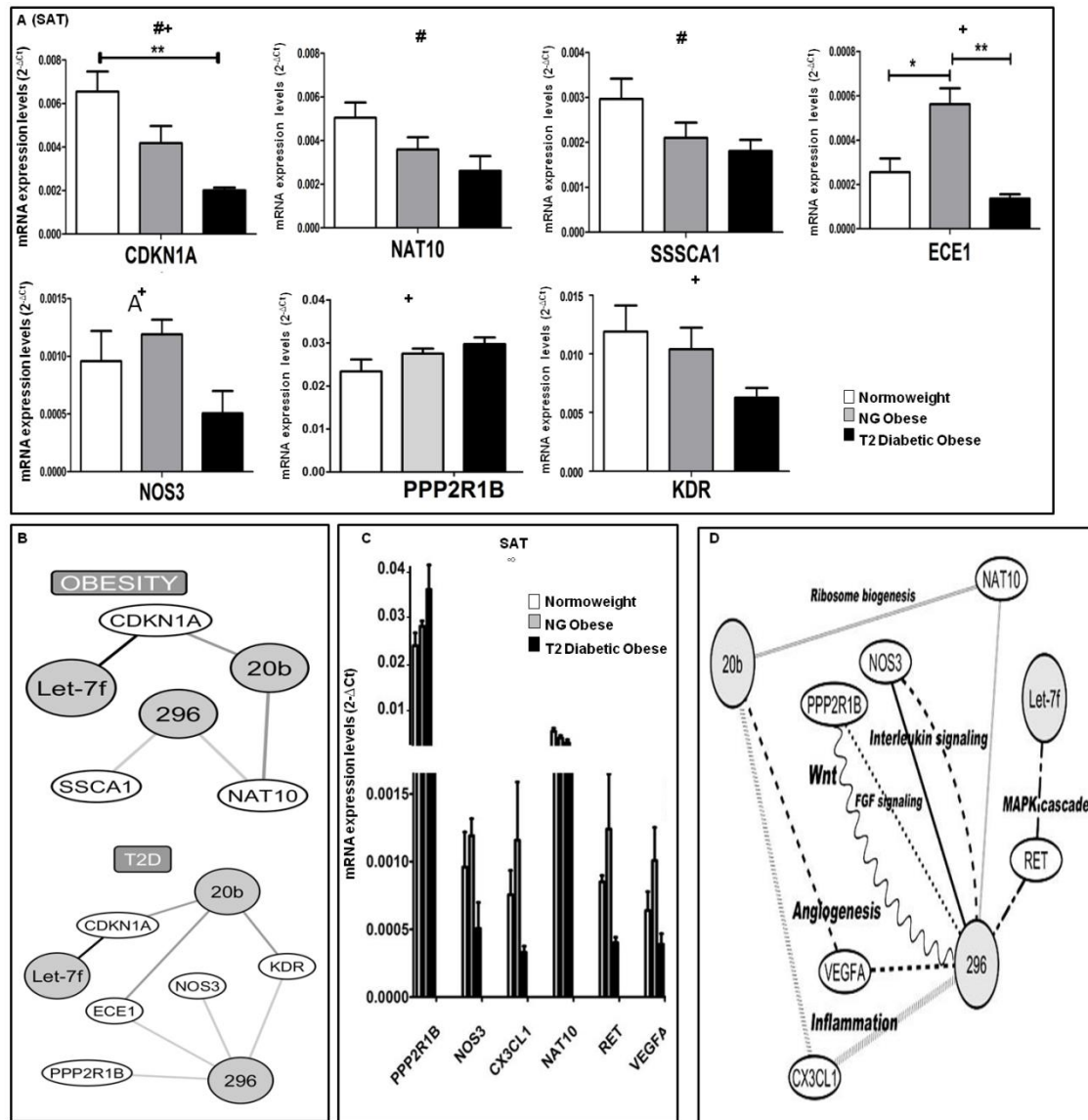


Fig.36. Genes diana expresados diferencialmente en TAS humano. **A.** El ARNm se extrajo de TAS ($n = 12$). Los niveles de expresión CDKN1A, SSSCA1, NAT10, ECE1, NOS3 y KDR se midieron por qPCR y la cuantificación relativa de los niveles de expresión se llevó a cabo con el método del ciclo umbral comparativo (Cq). EF1 α se usó como control endógeno. Las muestras se cuantificaron por duplicado y los datos se expresaron como medias \pm ESM. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ según la prueba ANOVA y la prueba pos hoc de Bonferroni; # $p < 0.05$ para la diferencia en el grupo de obesidad NW vs. OB y + $p < 0.05$ para la diferencia en el grupo de diabetes, NG vs. D-OB. NW (Normo weight): Normo pesos normo glucémicos (NS); OB (Normogluceemic Obese): Obesos normo-glucémicos (OS); D-OB (T2 Diabetic Obese): Obesos diabéticos (OD); NG: sujetos normo pesos sin DMT2 (NS). **B.** La red de interacción entre miARNs y genes diana expresados diferencialmente en TAS humano se creó usando el software Cytoscape. Esta red está compuesta de nodos grises para miR-20b, miR-296 y Let-7f, y nodos blancos para cada gen objetivo regulado. Las líneas de unión muestran la posible interacción entre miARNs y genes diana que se expresaron diferencialmente en TAS en relación con la obesidad y la DMT2. **C.** Un modelo lineal general multivariante que incluye simultáneamente la expresión de seis genes diana se realizó tal como se describe en materiales y métodos. ∞ $p < 0.05$ intercepción del modelo. **D.** La red de interacción entre miARNs y genes diana se creó usando el software Cytoscape. Esta red está compuesta de nodos grises para miR-20b, miR-296 y Let-7f y nodos blancos para cada gen objetivo regulado. Las líneas de unión muestran la posible interacción entre miARN y los genes diana que se expresaron diferencialmente en TAS humano y su función biológica (Barra oblicua: Inflamación; Guiones iguales: Angiogenesis; Línea sinusoidal: Wnt vía; Línea de puntos: señalización FGF; Línea sólida: señalización de interleucina; Líneas paralelas: Biogenesis ribosomal; Línea de punto y guión: cascada de MAPK).

La relación entre estos once genes diana y los tres microARNs se muestra en la Figura 37B.

Se utilizó un modelo lineal general multivariante para analizar la expresión de todos los Genes diana, teniendo en cuenta al mismo tiempo el efecto de la obesidad y la diabetes. De esta forma, se observó una intercepción entre tipo de sujetos, obesidad y grupos de diabetes cuando se expresaron siete genes simultáneamente (TNF, MYC, IL1B, WDR20, CX3CL1, HIF1A, GPI) (Wilks $\lambda = 0.022$, $F = 18.620$, $p = 0.018$), lo que indica que las diferencias en la expresión génica entre sujetos OS y NS no fueron las mismas cuando se tiene en cuenta el estado glucémico (Figura 37C). Por otro lado, pruebas univariadas sirvieron para analizar las diferencias en la expresión de cada Gen diana por separado. El efecto inter-sujeto dio lugar a diferencias estadísticamente significativas en IL1B ($p = 0.018$, $F = 6.532$), GPI ($p = 0.038$, $F = 4.819$), CX3CL1 ($p = 0.014$, $F = 7.031$) y WDR20 ($p = 0.006$, $F = 9.771$). El análisis entre parejas se muestra en la Tabla Suplementaria S3 (Gentile A-M y col., 2018. Artículo bajo revisión en Obesity, junio 2018). Además, el efecto de la obesidad (sujetos NS vs. OS) condujo a diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de GPI ($p = 0.026$, $F = 7.044$) y WDR20 ($p = 0.035$, $F = 6.159$). El efecto T2D (sujeto NS vs. T2-D) también condujo a diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de GPI ($p = 0.024$, $F = 7.09$) y CX3CL1 ($p=0.022, F=7.588$).

La Figura 37D resume la relación entre los siete Genes diana, los tres miARNs y sus procesos biológicos correspondientes. El análisis de predicción sugirió una posible relación entre miR-20b, Let-7f y el gen MYC que podría estar involucrado en las vías de señalización del WNT e interleucinas.

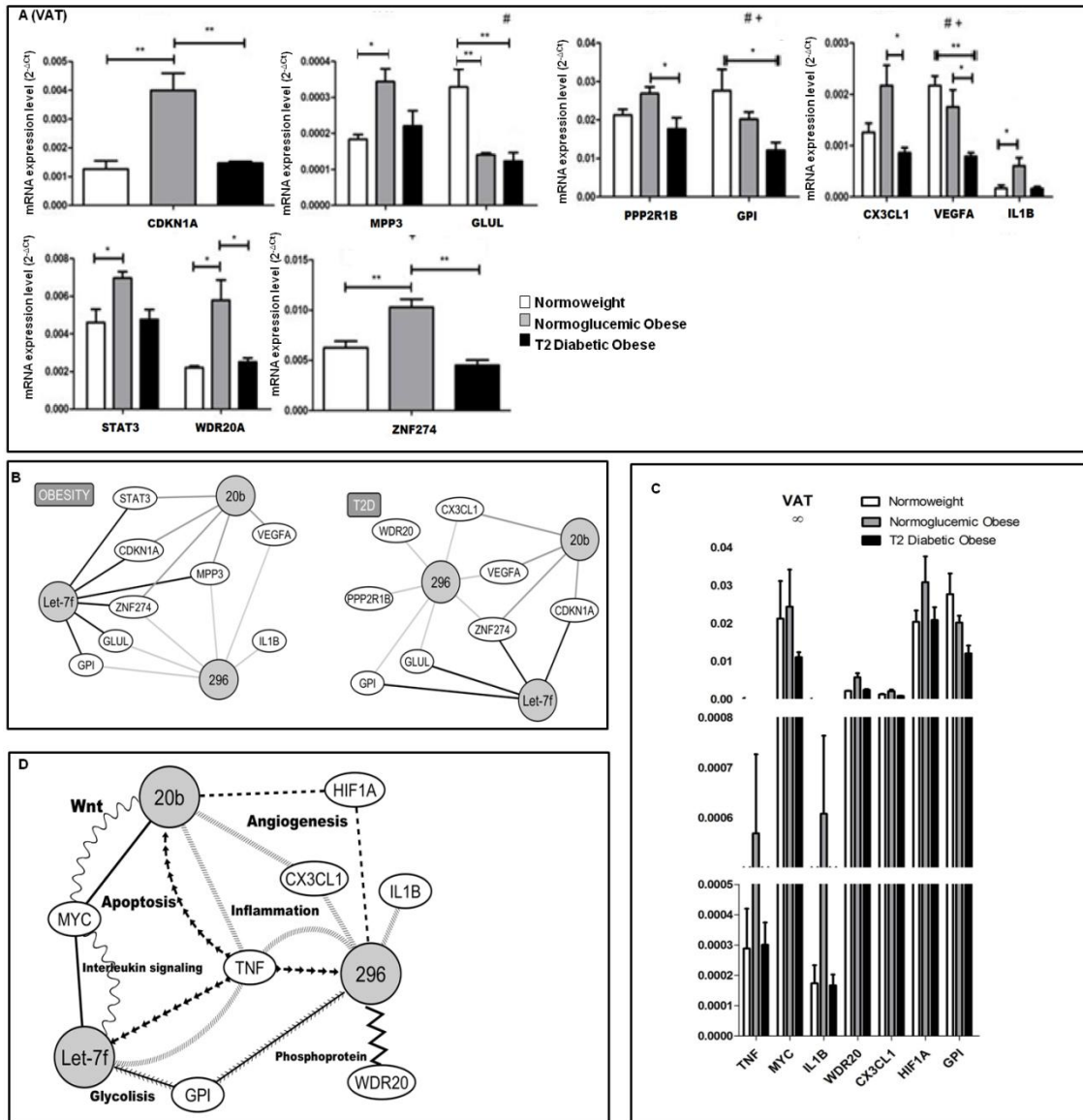


Figura. 37. Genes diana expresados diferencialmente en el TAV humano. **A.** El ARNm se extrajo del TAV (n=12). Los niveles de expresión de CDKN1A, SSSCA1, MPP3, GLUL, PPP2R1B, GPI, CX3CL1, VEGFA, IL1B, STAT3, WDR20 y ZNF274 se midieron por qPCR y la cuantificación relativa de los niveles de expresión se llevó a cabo con el método del ciclo umbral comparativo (Cq). EF1 α se usó como control endógeno. Las muestras se cuantificaron por duplicado y los datos se expresaron como medias \pm ESM. * p < 0.05 y ** p < 0.01 según la prueba ANOVA y la prueba pos hoc de Bonferroni; # p < 0.05 para la diferencia en los grupos de obesidad NS vs. OS y + p < 0.05 para la diferencia en los grupos de diabetes, NS vs. OD. NW (Normo weight): Normo pesos normo glucémicos (NS); OB (Normogluceic Obese): Obesos normogluceimicos (OS); D-OB (T2 Diabetic Obese): Obesos diabéticos (OD). **B.** La red de interacción entre miARNs y genes diana expresados diferencialmente en TAV humano se creó usando el software Cytoscape. Esta red está compuesta de nodos grises para miR-20b, miR-296 y Let-7f, y nodos blancos para cada gen objetivo regulado. Los bordes mostraron interacción entre miARNs y genes diana que se expresaron diferencialmente en TAV en relación con la obesidad y la DMT2. **C.** Un modelo lineal general multivariante que incluyó simultáneamente la expresión de siete genes diana se realizó tal como se describe en materiales y métodos. ∞ p < 0.05 intercepción del modelo. **D.** La red de interacción entre miARNs y genes diana se creó usando el software Cytoscape. Esta red está compuesta de nodos grises para miR-20b, miR-296 y Let-7f y nodos blancos para cada gen objetivo regulado. Las líneas de unión muestran la posible interacción entre miARN y los genes diana que se expresaron diferencialmente en TAV humano y su función biológica (Línea oblicua: Inflamación; Guiones iguales: Angiogénesis; Línea sinusoidal: via Wnt; Línea sólida: Señalización de interleucina; Flecha separada: Apoptosis; Flecha contigua: Glicolisis; Zigzag: Phosphoprotein).

c) Análisis de los niveles de expresión del gen diana en TAS y TAV humano.

Se utilizó un modelo lineal general multivariante para analizar la expresión de CDKN1A, CX3CL1, HIF1A, PPP2R1B, STAT3 y VEGFA simultáneamente, considerando al mismo tiempo el efecto del tipo de tejido, la obesidad y la DT2. Se observó un efecto del tipo de tejido (Wilks $\lambda = 0.194$, $F = 8.973$, $p = 0.001$), lo que indica que las diferencias en la expresión génica entre sujetos OS y NS, de TAV y TAS, no son las mismas cuando se toma el estado glucémico en consideración (Figura 38A). Específicamente, el efecto del tejido en la interacción de cada objetivo mostró los siguientes resultados: CX3CL1 ($p = 0.006$, $F = 9.595$), CDKN1A ($p = 0.000$, $F = 20.850$), HIF1A ($p = 0.028$, $F = 5.714$), PPP2R1B ($p = 0.007$, $F = 9.168$) STAT3 ($p = 0.000$, $F = 28.115$), VEGFA ($p = 0.000$, $F = 30.384$). Específicamente, se observó un efecto inter-sujeto CX3CL1 ($p = 0.003$, $F = 5.681$), CDKN1A ($p = 0.000$, $F = 13.140$), HIF1A ($p = 0.079$, $F = 2.391$), PPP2R1B ($p = 0.008$, $F = 4.79$) STAT3 ($p = 0.000$, $F = 9.550$) y VEGFA ($p = 0.000$, $F = 11.972$). El análisis entre parejas se muestra en la Tabla Suplementaria S4 (Gentile A-M y col., 2018. Artículo bajo revisión en Obesity, junio 2018).

Por otro lado, las pruebas univariadas sirvieron para analizar las diferencias en la expresión de cada Gen diana por separado. El análisis entre parejas, sujetos NS vs OS mostró una diferencia estadísticamente significativa en la obesidad (Wilks $\lambda = 0.153$, $F=12.001$, $p = 0.000$) (Figura 38A). Además, el análisis entre duplas, también mostró una diferencia estadísticamente significativa en T2D (Wilks $\lambda = 0,438$, $F = 12,001$, $p = 0,057$) (Figura 4A). La figura 38B resume la relación entre los seis Genes diana, los tres miARNs y sus correspondientes procesos biológicos. El esquema muestra que la relación entre miR-20b y miR-296 y los genes PPP2R1B, VEGFA e HIF1A podría estar implicada en las vías de señalización del WNT y la angiogénesis.

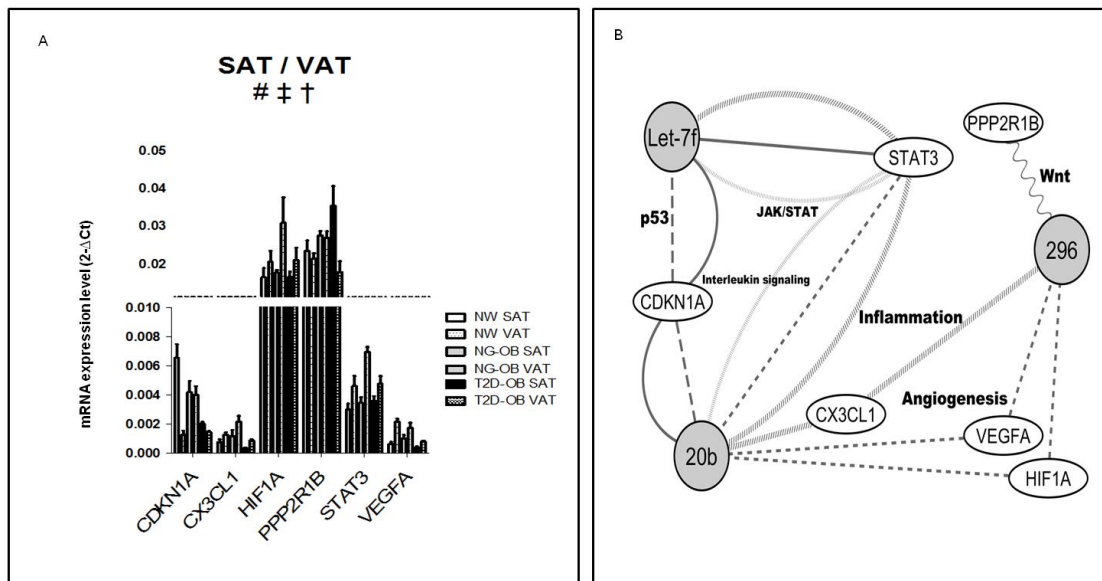


Fig. 38. Genes diana expresados diferencialmente en TAS y TAV humano. **A.** ... y ... Un modelo lineal general multivariante, que incluyó simultáneamente la expresión de estos seis genes diana en TAS y TAV, se realizó como se describe en materiales y métodos. # $p < 0.05$ para la diferencia en grupos de obesidad (NW vs. OB). ‡ $p < 0.05$ para la diferencia en grupos de tejidos (TAV vs. TAS). † $p < 0.05$ para la diferencia en diabetes (NG vs. D-OB). NW (Normo weight): Normo pesos normo glucémicos (NS); OB (Normogluceémico Obeso): Obesos normo-glucémicos (OS); D-OB (T2 Diabetic Obese): Obesos diabéticos T2 (OD) sin alteración metabólica. **B.** La red de interacción entre miARNs y genes diana se creó usando el software Cytoscape. Esta red está compuesta de nodos grises para miR-20b, miR-296 y Let-7f. Nodos blancos para cada gen diana regulado. Las líneas muestran la interacción entre miARN y genes diana que se expresaron diferencialmente en TAS y TAV y su función biológica. (Línea oblicua: Inflamación; Guiones pequeños: Angiogénesis; Línea sinusoidal: vía Wnt; Línea sólida negra: Señalización de interleucina; Guiones grandes: vía p53; Línea sólida gris: vía JAK/STAT). VAT: TA visceral; SAT: TA subcutáneo.

d) Análisis de los niveles de expresión de genes diana relacionados con miARNs, obesidad y T2D.

Colectivamente, nuestro estudio describe que los genes CDKN1A, CX3CL1, MPP3, STAT3, VEGFA y ZNF274 en TAV y el gen ECE1 en SAT mostraron altos niveles de expresión en la obesidad, sugiriendo una posible conexión entre la obesidad, miR-20b y estos Genes diana. Por otro lado, los genes CDKN1A, CX3CL1, VEGFA y ZNF274 en TAS y los genes CDKN1A y ECE1 en TAV mostraron menores niveles de expresión en sujetos con T2D, lo que sugiere una correlación potencial entre la T2D asociada a la obesidad, miR-20b y niveles de expresión de estos Genes diana. Observamos, que los

genes CX3CL1, IL1B, MPP3, VEGFA, WDR20 y ZNF274 en TAV, y el gen ECE1 en TAS mostraron niveles de expresión más altos en sujetos obesos, lo que sugiere una correlación potencial entre la obesidad, miR-296b y estos Genes diana. Por otro lado, CX3CL1, GPI, PPP2R1B, VEGFA, WDR20 y ZNF274 en TAV, y ECE1, KDR y NOS3 en TAS mostraron niveles de expresión más bajos en sujetos obesos con T2D, lo que indica la relación potencial entre T2D, miR-296, y estos Genes diana. Además, GLUL en TAV y SSSCA1 y NAT10 en TAS mostraron bajos niveles de expresión tanto en sujetos obesos metabólicamente sanos como en obesos con T2D, sugiriendo la posible conexión entre obesidad, T2D, miR-296 y estos genes diana. Por otra parte, nuestros resultados mostraron que CDKN1A, MPP3, STAT3 y ZNF274 muestran altos niveles de expresión en el TAV de sujetos obesos, lo que indica una posible relación entre obesidad, Let-7f, y estos Genes diana. GPI y ZNF274 mostraron bajos niveles de expresión en TA de sujetos obesos con T2D, lo que apunta a la conexión potencial entre T2D, Let-7f y estos dos Genes diana. Además, GLUL mostró bajos niveles de expresión en TA tanto de sujetos obesos metabólicamente sanos como obesos con T2D, lo que sugiere la posible relación entre obesidad, T2D, Let-7f y GLUL.

Después de todos los análisis que llevamos a cabo anteriormente, el siguiente paso es determinar la implicación directa de los miARNs en la regulación de los genes mediadores de los procesos en estudio, principalmente, *PPAR α* , *FABP4*, *VEGFA*, *VEGFB*, *VEGFC*, *BCL2*, e *IRS1*. Para ello estudios in vitro e in vivo se llevarán a cabo mediante el uso de inhibidores e imitadores de los miARNs analizados anteriormente.

VIII.6.- Estudio *in vitro*

VIII.6.1. Criterios de elección de los genes diana de miR-221 y miR-222 a analizar y relacionados con los procesos de adipogénesis, angiogénesis, apoptosis y señalización de insulina.

Tres criterios fueron utilizados para seleccionar los genes diana de miR-221 y miR-222 a analizar en los estudios “*in vitro*” e “*in vivo*”: (a) Genes definidos por nuestro GRUPO de investigación como reguladores de angiogénesis, adipogénesis y apoptosis en TAS y TAV y por estar relacionados con la obesidad y la RI en nuestros sujetos (Tinahones FJ y col., 2012; Tinahones FJ y col., 2013): *PPAR α* , *FABP4*, *VEGFA*, *VEGFB*, *VEGFC*, *BCL2*, e *IRS1*. (b) BIOINFORMÁTICA: genes diana adipogénicos, angiogénicos, apoptóticos de miR-221-3p y miR-222-3p, validados y no validados, mediante un análisis bioinformático con miRWalk y miRTarBase, como se detalla en la sección de Materiales y Métodos. De esta forma se seleccionaron cuatro genes, *ETS1*, *DVL2*, *BCL2* e *IL1RAP*. (c) ARRAYS: genes diana adipogénicos, angiogénicos, apoptóticos de miR-221-3p y miR-222-3p cuya expresión fue estadísticamente significativa en el estudio llevado a cabo en TA humano y descrito en el capítulo de Materiales y Métodos. Así seleccionamos cinco genes, *ETS1*, *DVL2*, *BCL2*, *IL1RAP* e *IRS1* (Tabla 30).

Tabla 30. Genes diana de miR-221 y miR-222 seleccionados para el estudio *in vitro*.

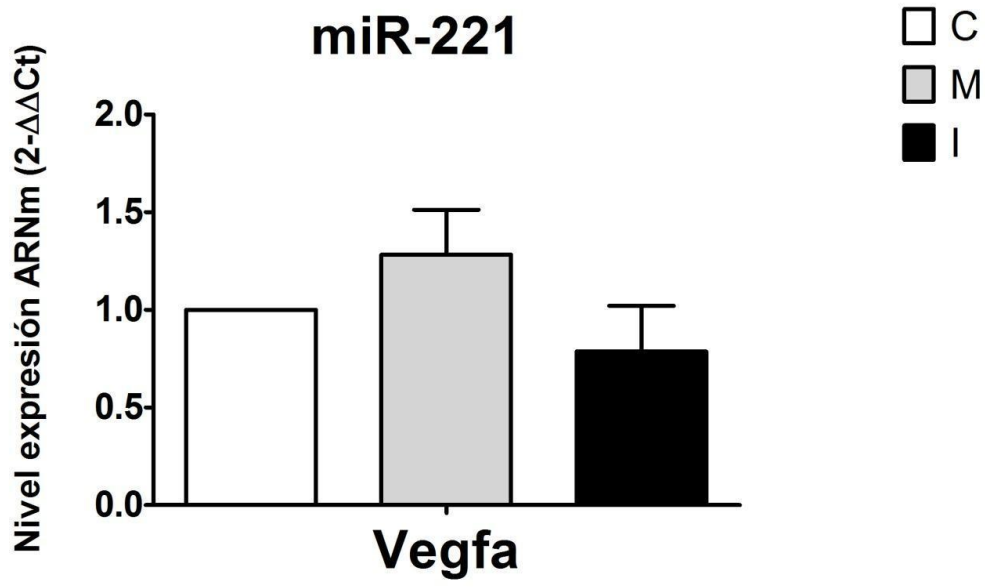
PROCESO	GEN	GRUPO	BIOINFORMÁTICA	ARRAYS
Adipogénesis	<i>PPARγ</i>	•		
	<i>FABP4</i>	•		
Angiogénesis	<i>VEGFA</i>	•		
	<i>VEGFB</i>	•		
	<i>VEGFC</i>	•		
	<i>ETS1</i>		•	•
	<i>DVL2</i>		•	•
Apoptosis	<i>BCL2</i>	•		•
	<i>IL1RAP</i>		•	•
Señalización Insulina	<i>IRS1</i>	•		•

VIII.6.2. Efecto de la imitación e inhibición de miR-221 y miR-222 sobre la expresión génica

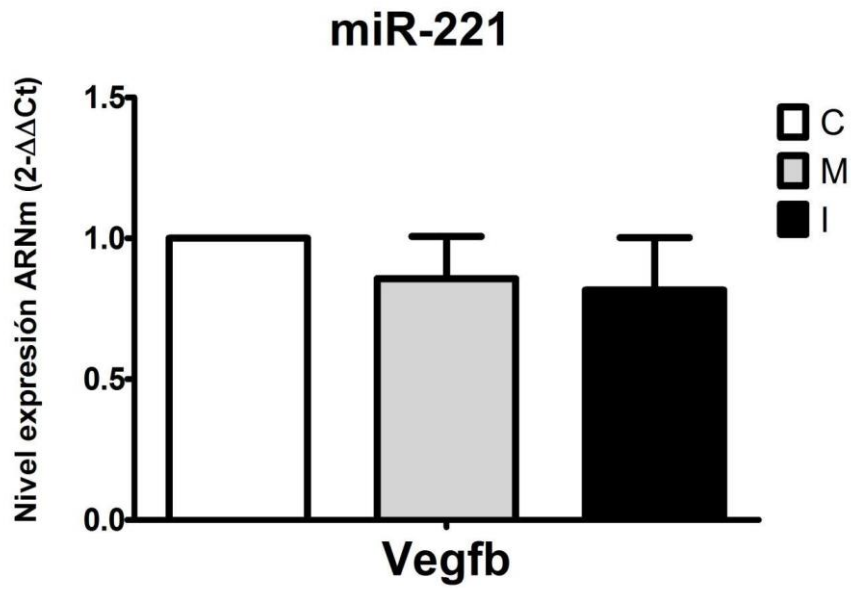
VIII.6.2.1. Efecto de la imitación e inhibición de miR-221 sobre la expresión de *Vegfa*, *Vegfb*, *Vegfc*, *Dvl2* y *Ets1*

Los pre-adipocitos 3T3-L1 diferenciados fueron cultivados en presencia de imitador e inhibidor de miR-221, como se detalla en Materiales y Métodos. En la Fig. 39-D, observamos que tanto la sobreexpresión, como la inhibición de miR-221 indujo una disminución del nivel de expresión del ARNm de *Dvl2*, con una diferencia significativa con respecto al control. Mientras, los niveles de expresión de *Vegfa*, *Vegfb*, *Vegfc* y *Ets1*, no mostraron diferencias significativas. DVL2 es una proteína que desarrolla un papel en las vías de transducción de señales mediadas por múltiples genes *Wnt*. Participa tanto en la señalización *Wnt* canónica como no canónica, uniéndose al terminal C citoplasmático de los miembros de la familia frizzled y transduciendo la señal *Wnt* a los efectores descendentes. Promueve la internalización y la degradación de proteínas frizzled sobre la señalización *Wnt* (<http://www.uniprot.org/uniprot/O14641>).

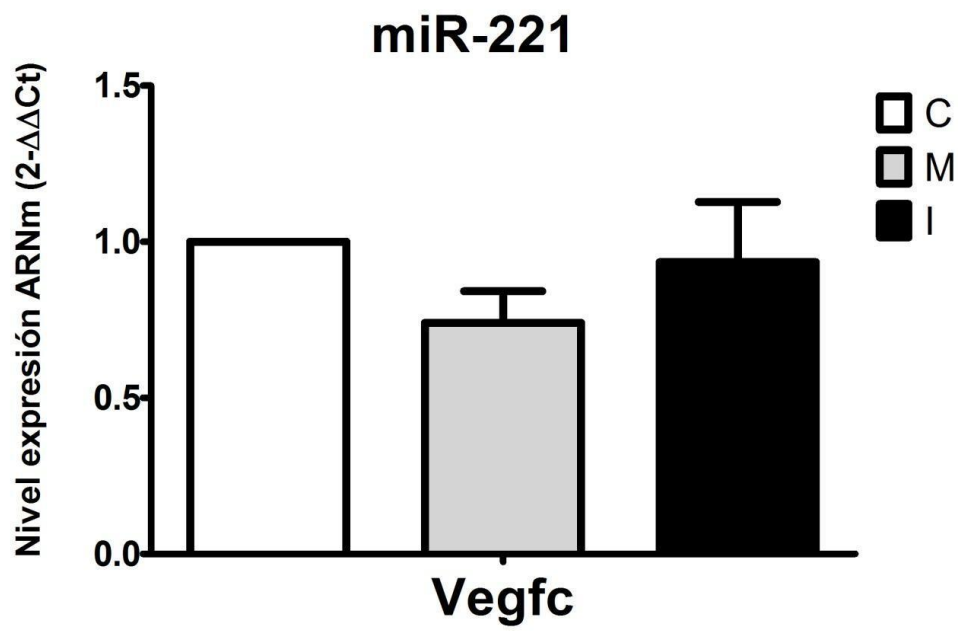
A



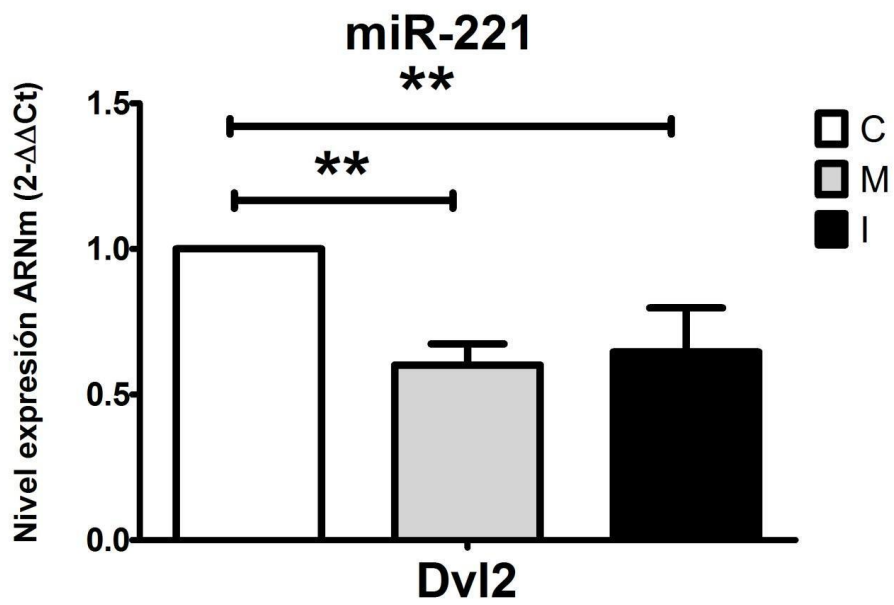
B



C



D



E

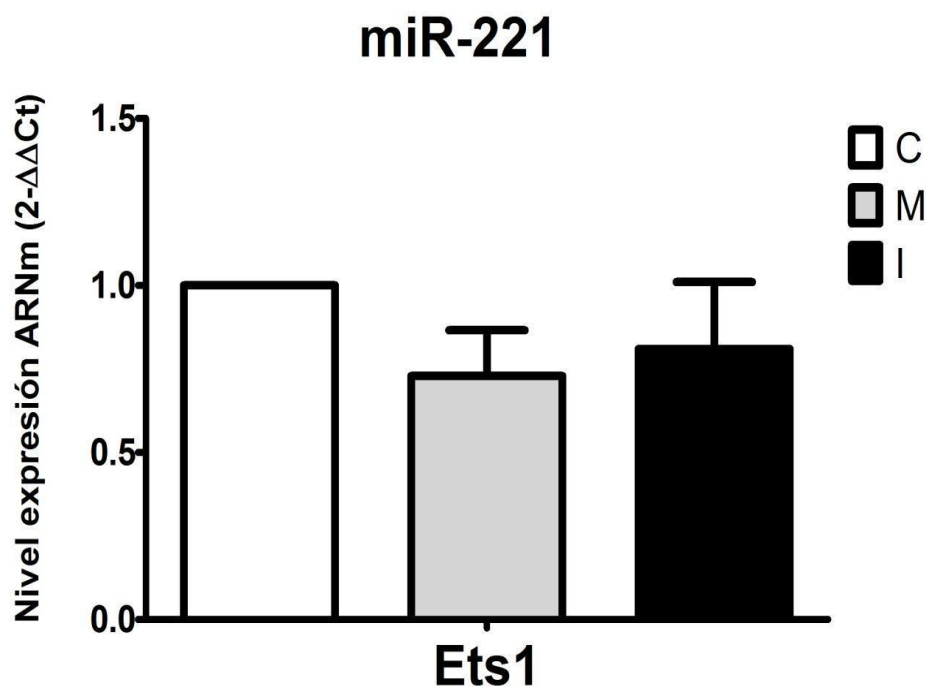


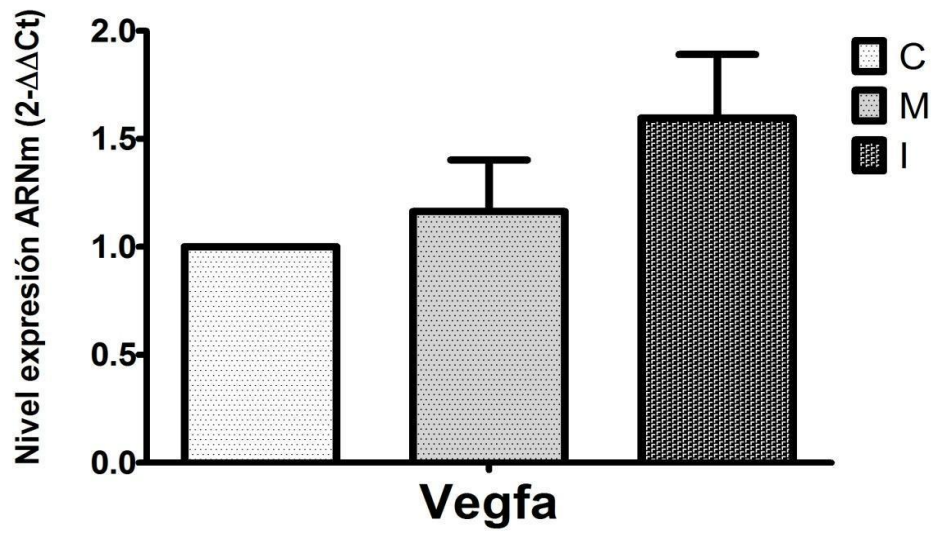
Fig. 39. Niveles de expresión de ARNm de los marcadores de angiogénesis *Vegfa*, *Vegfb*, *Vegfc*, *Dvl2* y *Ets1*, en células 3T3-L1 transfectadas con imitador e inhibidor de miR-221. El análisis de la expresión génica (n=5) (Fig. A-E) se realizó en pre-adipocitos 3T3-L1 diferenciados y transfectados con una molécula mimética (M) o una molécula inhibidora (I) de miR-221 y comparado con el control (C). Los niveles de expresión se normalizaron con Beta actina. Los datos se obtuvieron por duplicado y se expresaron como media \pm ESM. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student. Valor estadístico: * p<0.05; ** p<0.01.

VIII.6.2.2. Efecto de la imitación e inhibición de miR-222 sobre la expresión

de *Vegfa*, *Vegfb*, *Vegfc*, *Dvl2* y *Ets1*.

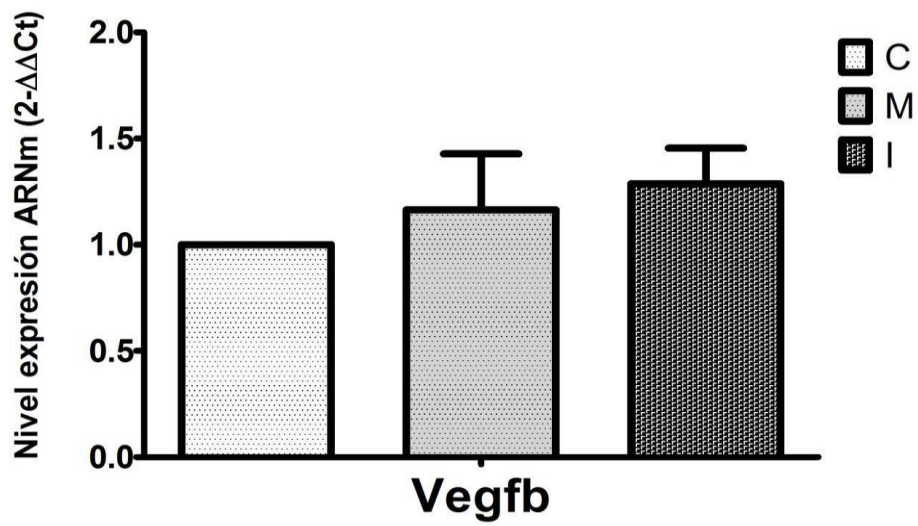
Los pre-adipocitos 3T3-L1 diferenciados fueron cultivados en presencia de imitador e inhibidor de miR-222, como se detalla en Materiales y Métodos. En la Fig. 40 A-E, observamos que tanto la sobreexpresión, como la inhibición de miR-222 no indujo diferencia significativa con respecto al control en los niveles de expresión del ARNm de *Vegfa*, *Vegfb*, *Vegfc*, *Dvl2* y *Ets1*.

miR-222

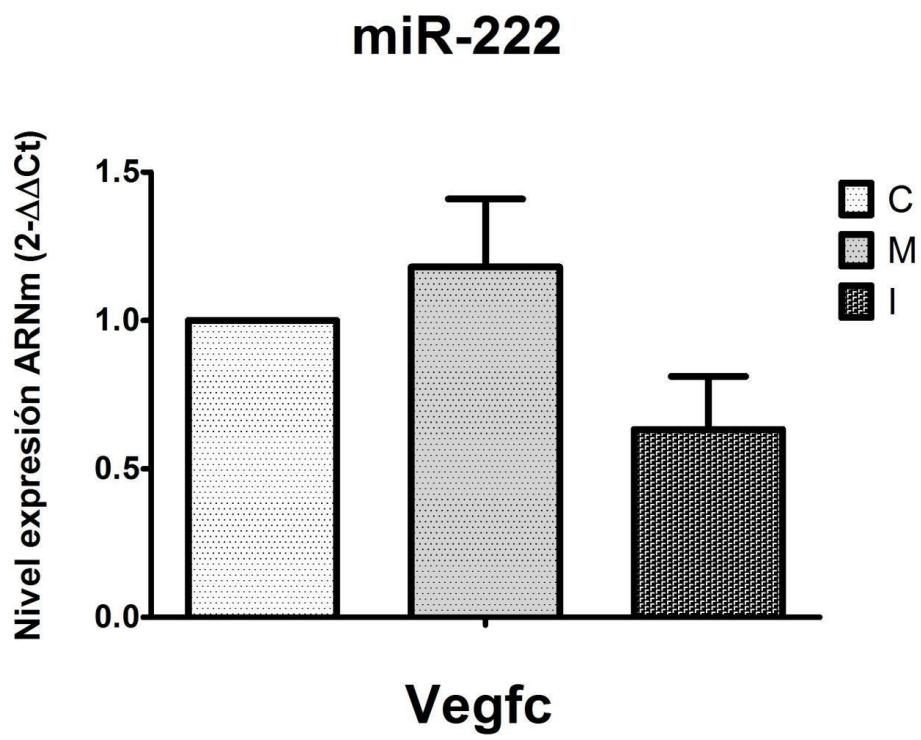


B

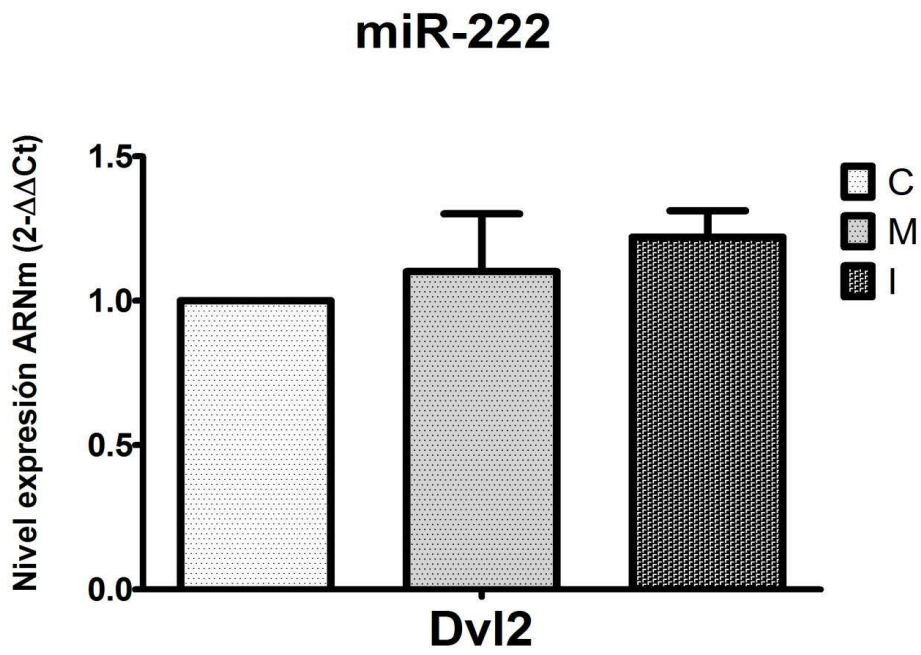
miR-222



C



D



E

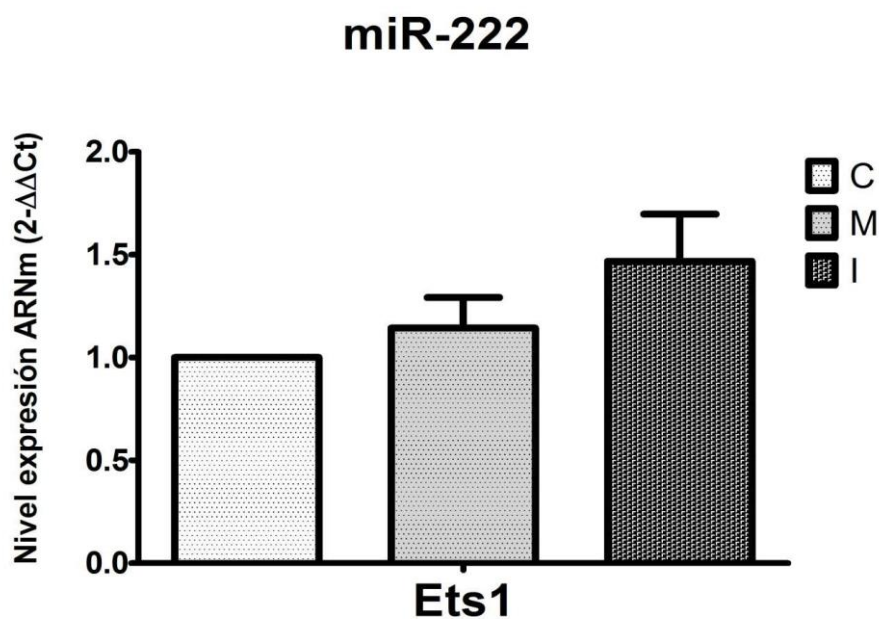


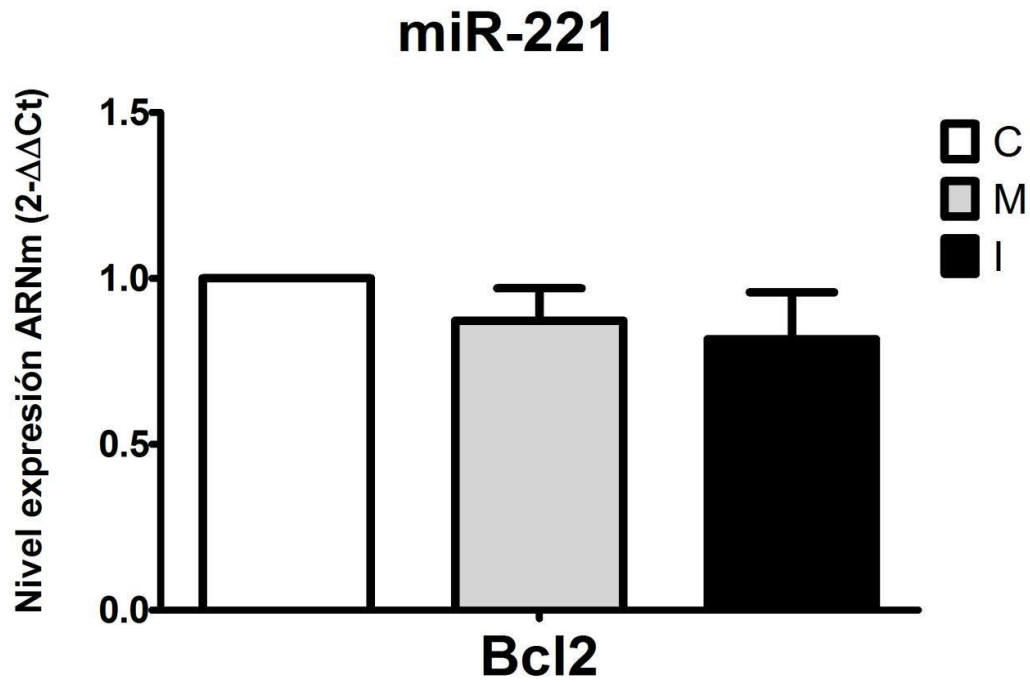
Fig. 40. Niveles de expresión de ARNm de los marcadores de angiogénesis Vegfa, Vegfb, Vegfc, Dvl2 y Ets1, en células 3T3-L1 transfectadas con imitador e inhibidor de miR-222. El análisis de la expresión génica (n=5) (Fig. A-E) se realizó en pre-adipocitos 3T3-L1 diferenciados y transfectados con una molécula mimética (M) o una molécula inhibidora (I) de miR-222 y comparado con el control (C). Los niveles de expresión se normalizaron con beta actina. Los datos se obtuvieron por duplicado y se expresaron como media \pm ESM. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student. Valor estadístico: * p<0.05; ** p<0.01.

VIII.6.2.3. Efecto de la imitación e inhibición de miR-221 y miR-222 sobre la expresión de *Il1rap* y *Bcl2*.

Los pre-adipocitos 3T3-L1 diferenciados fueron cultivados en presencia de imitador e inhibidor de miR-221 o miR-222, como se detalla en Materiales y Métodos. En la Fig. 41-C, observamos que la sobreexpresión de miR-221 indujo una disminución en los niveles de expresión del ARNm de *Il1rap*, con una diferencia significativa con respecto al control. Sin embargo, no hubo diferencia significativa con la inhibición de miR-221 en el nivel de expresión de *Il1rap*. IL1RAP es un co-receptor para IL1R1 e IL1RL2 en el sistema de señalización de interleucinas (IL-1, IL-33, IL-36) (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9NPH3>). En las Fig.41-A, B y D, observamos que tanto la sobreexpresión, como la inhibición de miR-221 o miR-222 no indujo diferencia

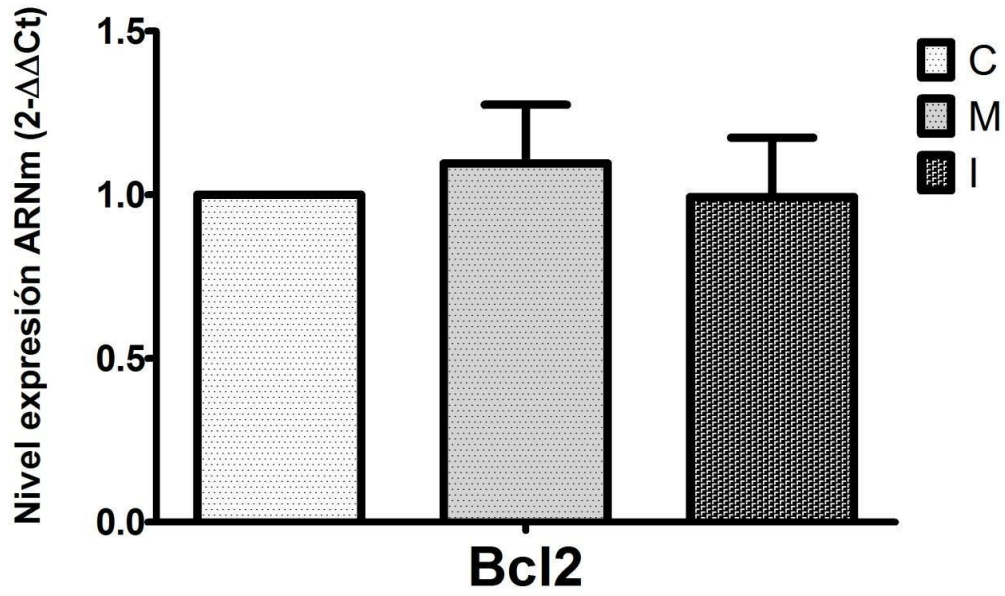
significativa con respecto al control en los niveles de expresión del ARNm de *Bcl2* o *Il1rap*.

A



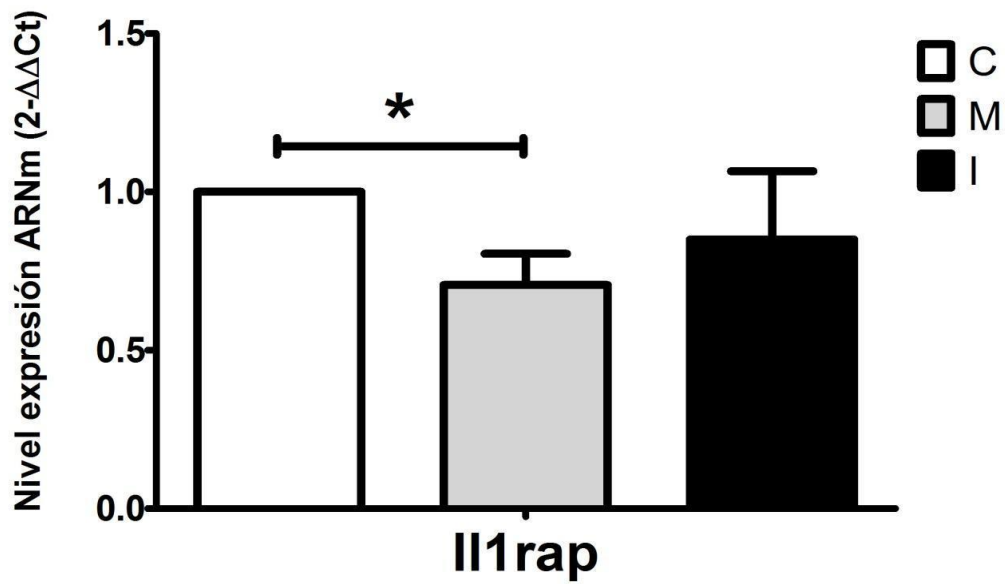
B

miR-222



C

miR-221



D

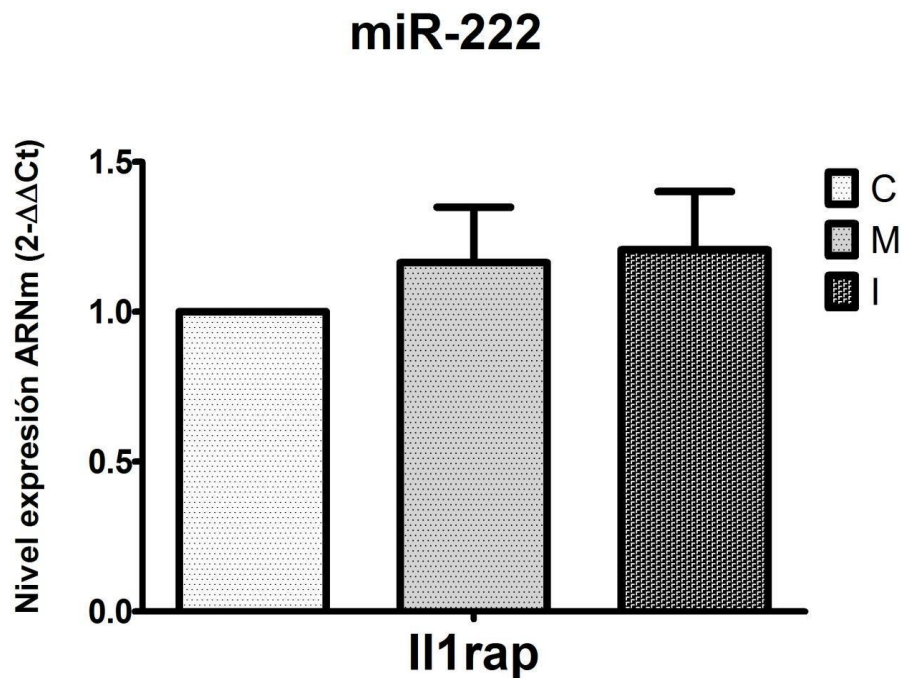


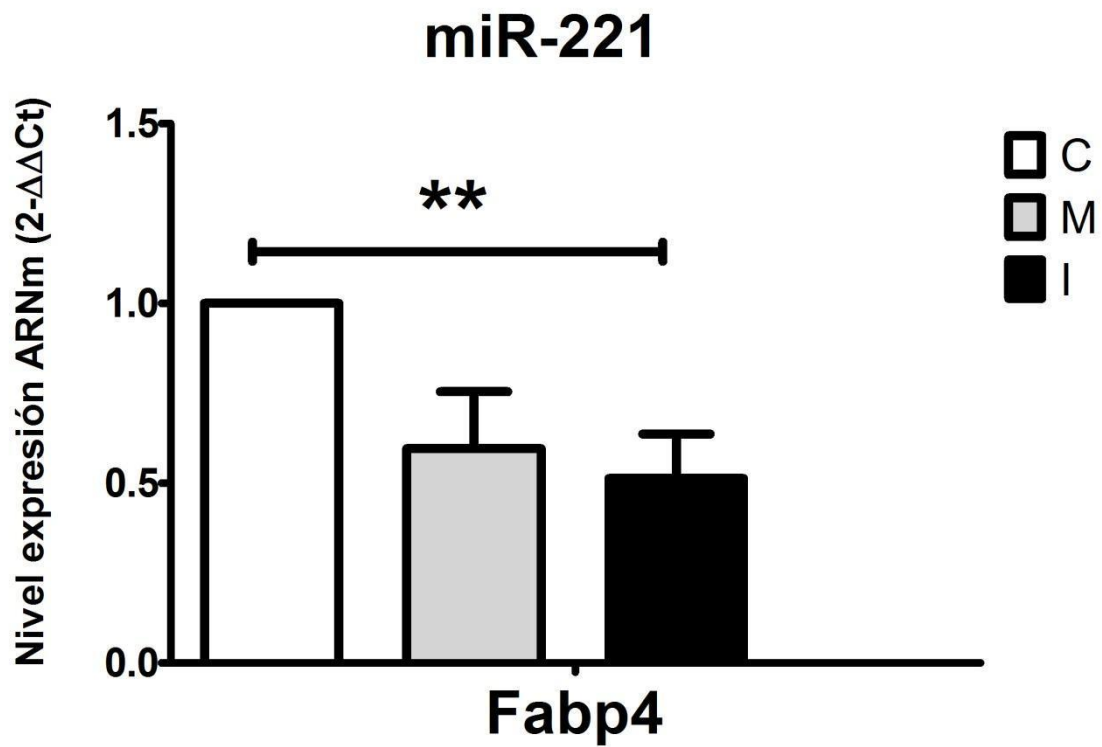
Fig. 41. Niveles de expresión de ARNm de los marcadores de apoptosis Bcl2 e Il1rap en células 3T3-L1 transfectadas con imitador e inhibidor de miR-221 y miR-222. El análisis de la expresión génica (n=5) (Fig A-D) se realizó en pre-adipocitos 3T3-L1 diferenciados y transfectados con una molécula mimética (M) o una molécula inhibidora (I) de miR-221 y miR-222 y comparado con el control (C). Los niveles de expresión se normalizaron con Beta actina. Los datos se obtuvieron por duplicado y se expresaron como media \pm ESM. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student. Valor estadístico: * p<0.05; ** p<0.01.

VIII.6.2.4. Efecto de la imitación e inhibición de miR-221 y miR-222 sobre la expresión de *Fabp4* y *Ppar α* .

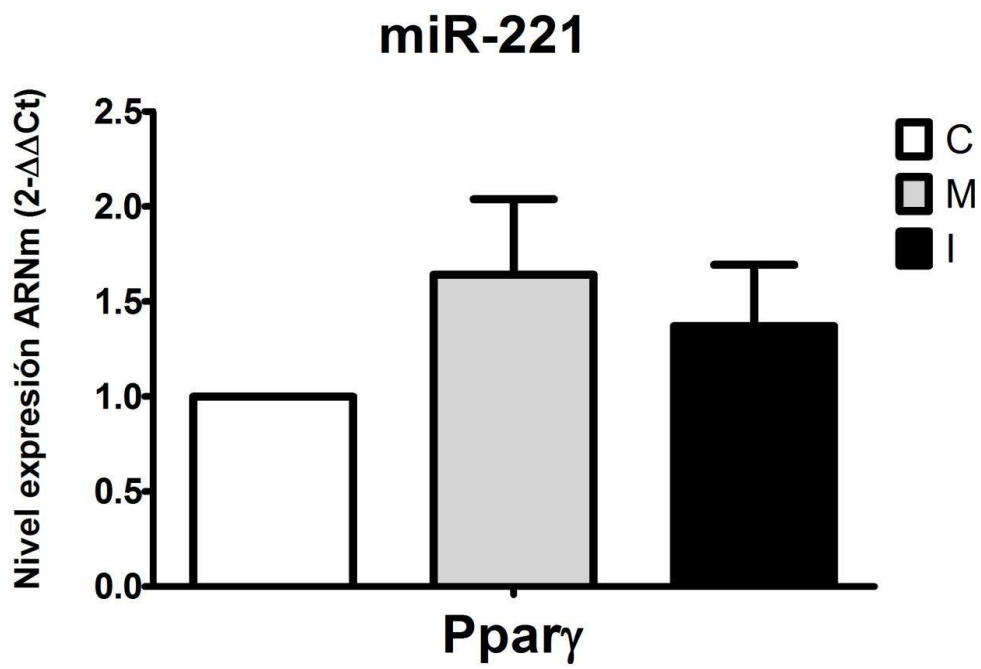
Los pre-adipocitos 3T3-L1 diferenciados fueron cultivados en presencia de imitador e inhibidor de miR-221 o miR-222, como se detalla en Materiales y Métodos. En la Fig. 42-A, observamos que la inhibición de miR-221 indujo una disminución en los niveles de expresión del ARNm de *Fabp4*, con una diferencia significativa con respecto al control. Sin embargo, no hubo diferencia significativa con la sobreexpresión de miR-221 en el nivel de expresión de *Fabp4*. Por otra parte, en la Fig. 42-C, observamos que la sobreexpresión de miR-222 indujo un aumento en los niveles de expresión de *Fabp4*, con una diferencia significativa con respecto al control. Además, el nivel de expresión del

ARNm de *Fabp4* muestra una diferencia significativa cuando se compara entre la inducción o inhibición de miR-221. También observamos (Fig. 42-D), que la sobreexpresión de miR-222 indujo un aumento en los niveles de expresión de *Ppar α* con una diferencia significativa con respecto al control.

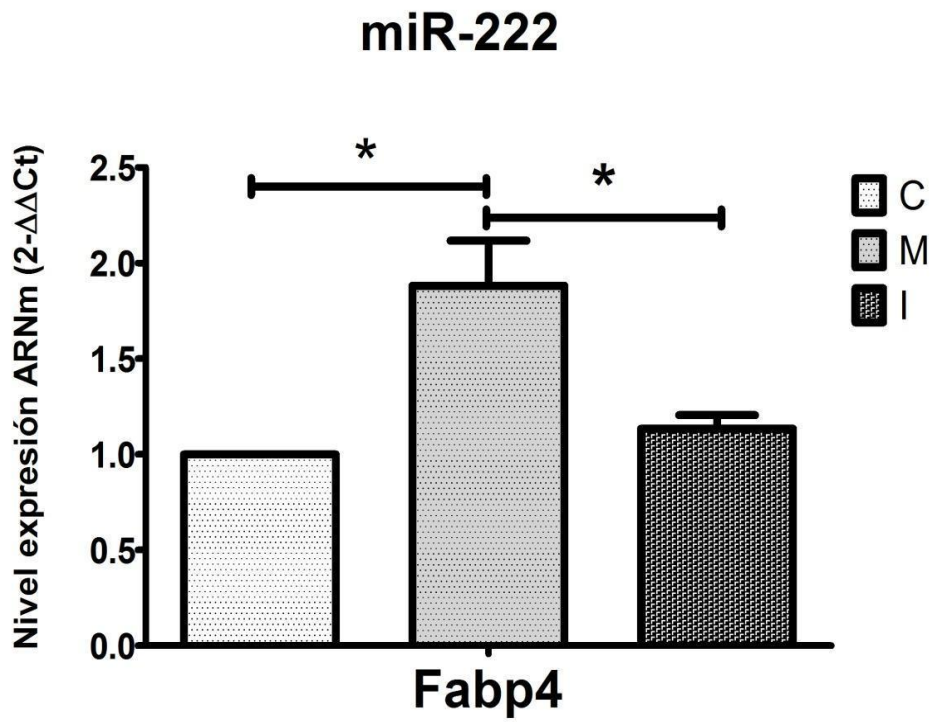
A



B



C



D

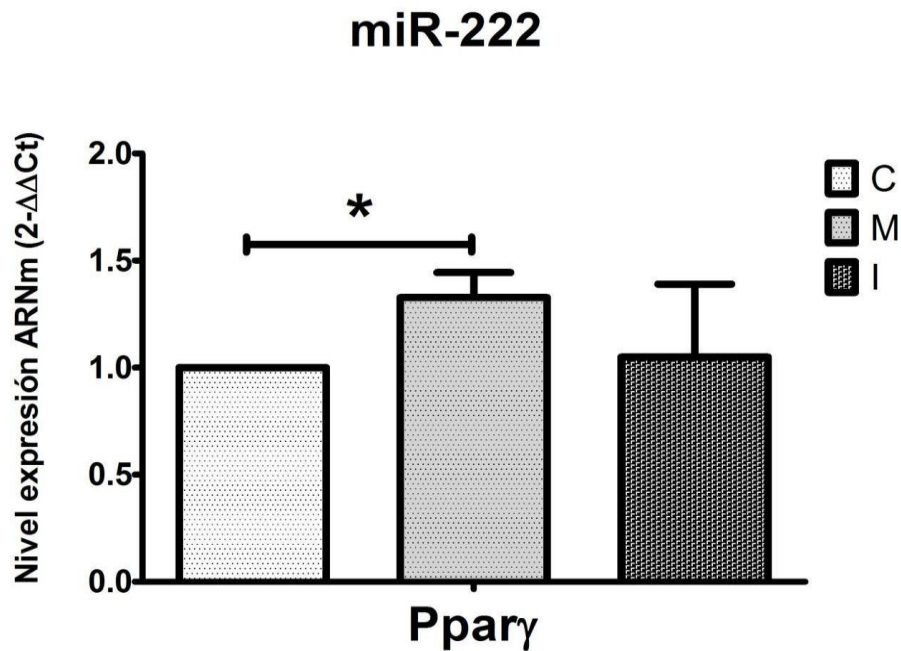
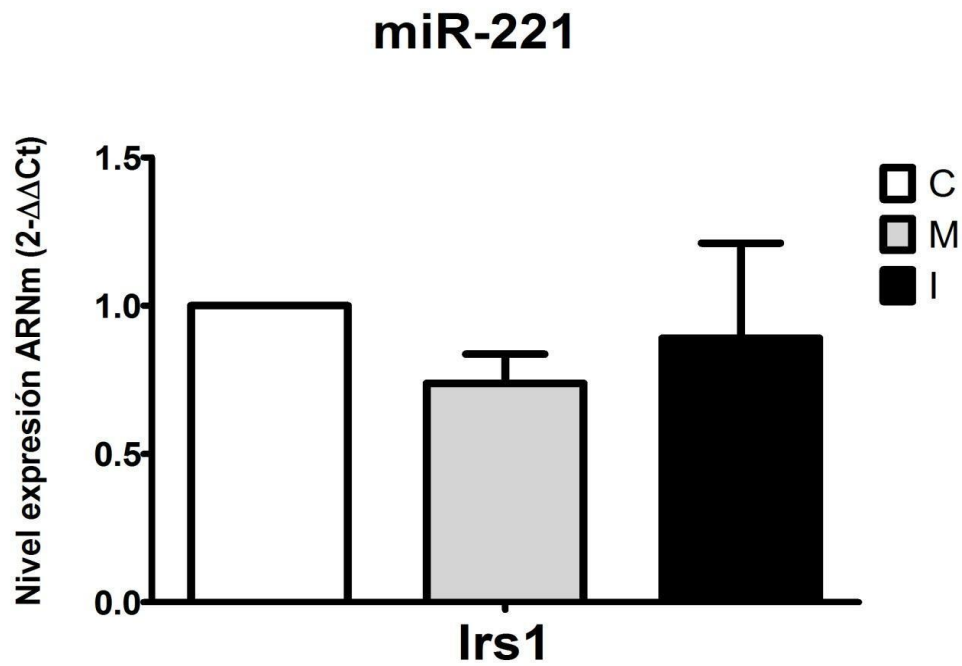


Fig. 42. Niveles de expresión de ARNm de los marcadores de adipogénesis Pparγ y Fabp4, en células 3T3-L1 transfectadas con imitador e inhibidor de miR-221 y miR-222. El análisis de la expresión génica (Fig A-D) se realizó en pre-adipocitos 3T3-L1 diferenciados y transfectados con una molécula mimética (M) o una molécula inhibidora (I) de miR-221 y miR-222 y comparado con el control (C). Los niveles de expresión se normalizaron con Beta actina. Los datos se obtuvieron por duplicado y se expresaron como media ± ESM. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student. Valor estadístico: * p<0.05; ** p<0.01.

VIII.6.2.5. Efecto de la imitación e inhibición de miR-221 y miR-222 sobre la expresión de *Irs1*.

Los pre-adipocitos 3T3-L1 diferenciados fueron cultivados en presencia de imitador e inhibidor de miR-221 o miR-222, como se detalla en Materiales y Métodos. En la Fig. 43 A-B, no hemos observado ningún cambio en el nivel de expresión del ARNm de *Irs1* con la sobreexpresión o inhibición de miR-221 y miR-222 cuando fueron comparados con el control.

A



B

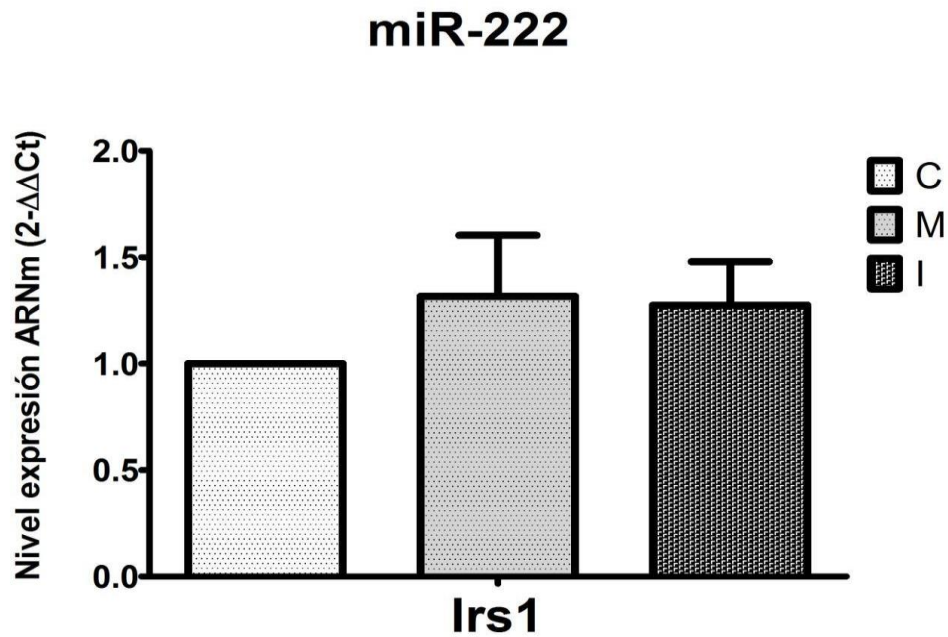


Fig. 43. Nivel de expresión de ARNm del receptor de señalización de insulina Irs1 en células 3T3-L1 transfectadas con imitador e inhibidor de miR-221 y miR-222. El análisis de la expresión génica (Fig 43A-B) se realizó en pre-adipocitos 3T3-L1 diferenciados y transfectados con una molécula mimética (M) o una molécula inhibidora (I) de miR-221 y miR-222 y comparado con el control (C). Los niveles de expresión se normalizaron con Beta actina. Los datos se obtuvieron por duplicado y se expresaron como media \pm ESM. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student. Valor estadístico: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

VIII.7.- Estudio *in vivo*.

VIII.7.1. Perfil de expresión de miR-221 y miR-222 en TAV y TAS de ratones

DIO.

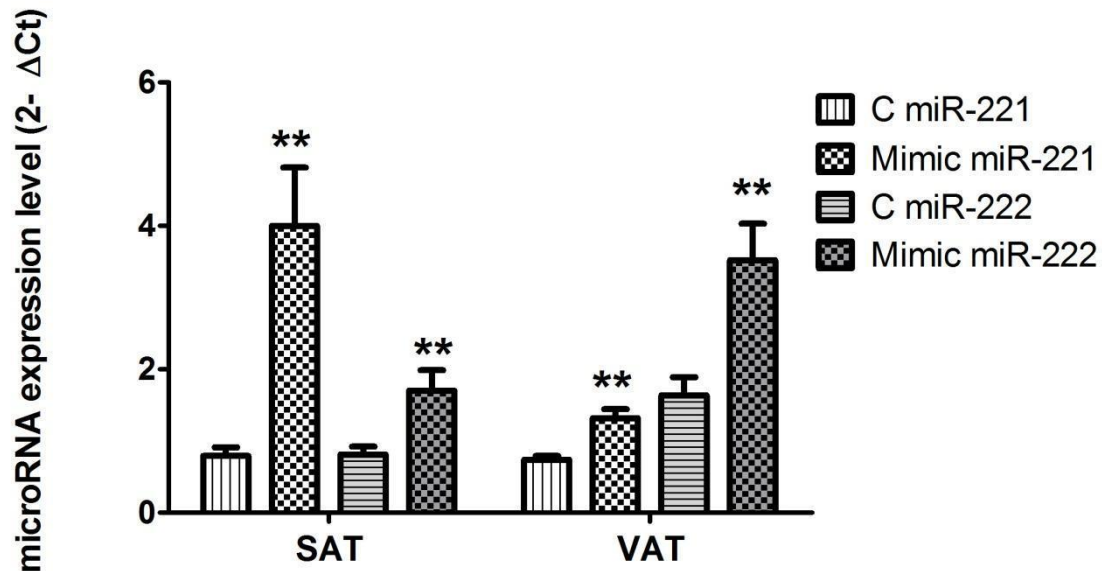


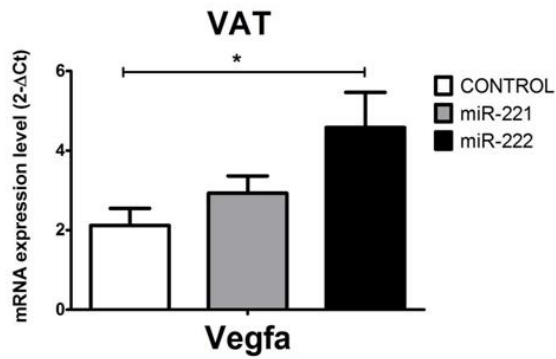
Fig. 44. Perfil de expresión de miR-221 y miR-222 en TAV y TAS de ratones DIO. El análisis de la expresión génica se realizó en TAV (n=24) y TAS (n=24) de ratones DIO transfectados con una molécula mimética de miR-221 o miR-222 o una molécula Control. Los niveles de expresión se normalizaron con snorna142. Los datos se obtuvieron por duplicado y se expresaron como la media \pm ESM. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student. Valor estadístico: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Ratones de la cepa C57BL-6J fueron transfectados con una molécula imitadora de miR-221 o miR-222, como se detalla en el capítulo de Materiales y Métodos. Después del tratamiento, los ratones fueron sacrificados y los miARNs fueron extraídos desde TAV Y TAS como se detalla en el apartado VI.3.5. del capítulo de Materiales y Métodos. Mediante un análisis de expresión génica (qPCR), hemos observado un aumento en los niveles de expresión de miR-221 y miR-222 en TAV y TAS con una diferencia estadísticamente significativa con respecto a ratones control (Fig. 44).

VIII.7.2. Perfil de expresión de ARNm de genes angiogénicos en TAV y TAS de ratones DIO tratados con imitador de miR-221 y miR-222.

Ratones DIO fueron transfectados con una molécula de imitador de miR-221, miR-222 o Control. Luego del tratamiento, los ratones fueron sacrificados y el ARNm fue extraído desde TAV Y TAS como se detalla en el capítulo de Materiales y Métodos. Mediante un análisis de expresión génica (qPCR), hemos observado en el TAV de ratones DIO transfectados con imitador de miR-222 un aumento estadísticamente significativo con respecto al control, de los niveles de expresión del ARNm de *Vegfa* (Fig. 45-A) y *Vegfb* (Fig. 46-A). Por otro lado, observamos en ratones DIO transfectados con imitador de miR-221 un aumento estadísticamente significativo con respecto al control, de los niveles de expresión del ARNm de *Vegfb* (Fig. 46-A). Sin embargo, no hemos observado diferencias estadísticamente significativas con respecto al control en el nivel de expresión de *Vegfc* (Fig. 47-A) y *Ets1* (Fig. 48-A). Además, tampoco observamos diferencias estadísticamente significativas en el nivel de expresión de genes relacionados con angiogénesis en el TAS de ratones DIO transfectados con una molécula mimética de miR-221 o miR-222 (Fig. 45-B, 46-B, 47-B y 48-B).

A



B

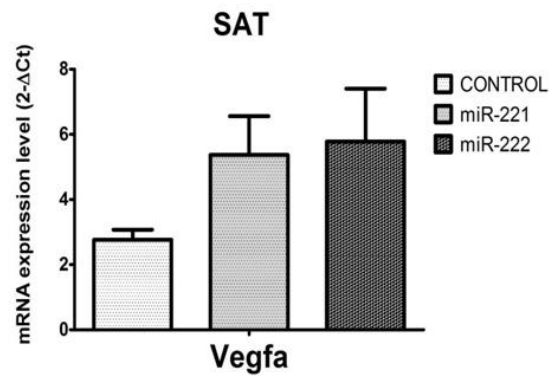
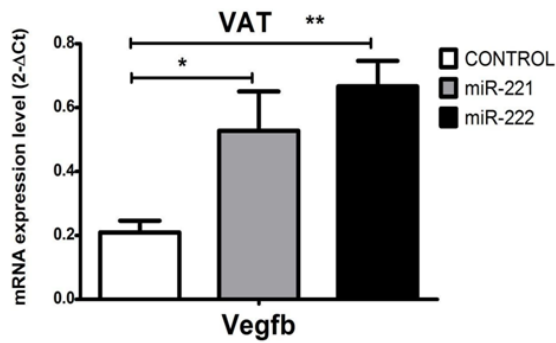


Fig. 45. Nivel de expresión de ARNm de *Vegfa* en TAV (A) y TAS (B) murino. El análisis del nivel de expresión génica se realizó en TAV y TAS de ratones DIO transfectados con una molécula mimética de miR-221 (n=8) o miR-222 (n=8) y una molécula Control (n=8). Los niveles de expresión génica se normalizaron con Ciclofilina. Los datos se obtuvieron por duplicado y se expresaron como la media \pm ESM. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student. Valor estadístico: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. VAT: TA visceral; SAT: TA subcutáneo.

A



B

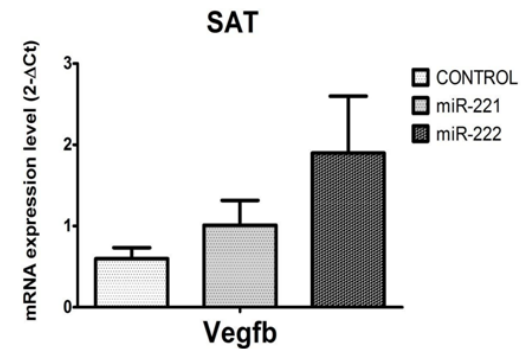


Fig. 46. Nivel de expresión de ARNm de *Vegfb* en TAV (A) y TAS (B) murino. El análisis del nivel de expresión génica se realizó en TAV y TAS de ratones DIO transfectados con una molécula mimética de miR-221 (n=8) o miR-222 (n=8) y una molécula Control (n=8). Los niveles de expresión génica se normalizaron con Ciclofilina. Los datos se obtuvieron por duplicado y se expresaron como media \pm ESM. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student. Valor estadístico: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. VAT: TA visceral; SAT: TA subcutáneo.

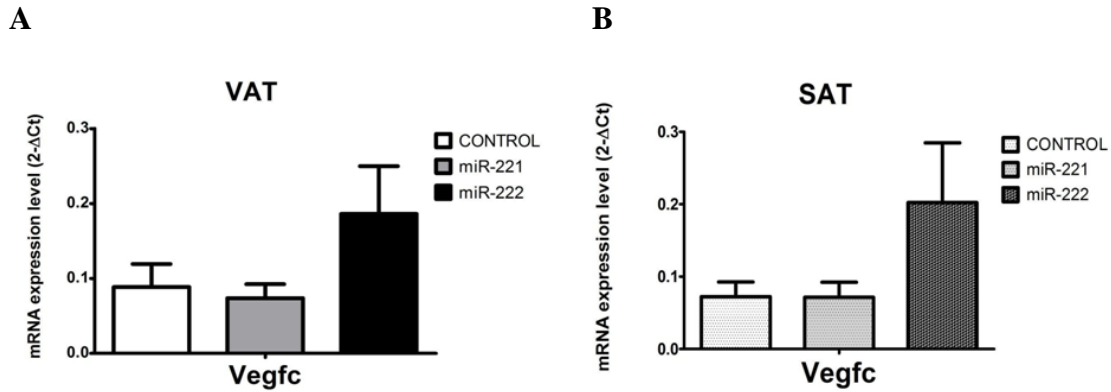


Fig. 47. Nivel de expresión de ARNm de *Vegfc* en TAV (A) y TAS (B) murino. El análisis del nivel de expresión génica se realizó en TAV y TAS de ratones DIO transfectados con una molécula mimética de miR-221 (n=8) o miR-222 (n=8) y una molécula Control (n=8). Los niveles de expresión génica se normalizaron con Ciclofilina. Los datos se obtuvieron por duplicado y se expresaron como media \pm ESM. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student. Valor estadístico: * p<0.05; ** p<0.01. VAT: TA visceral; SAT: TA subcutáneo.

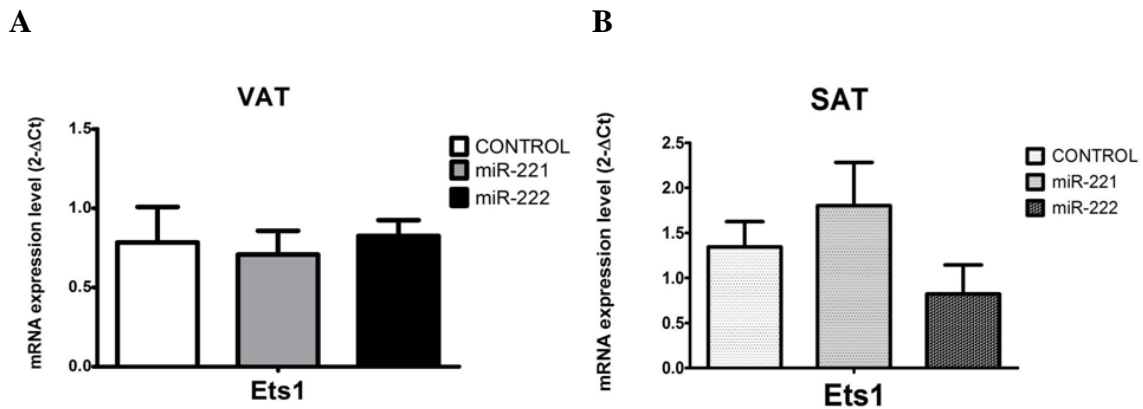


Fig. 48. Nivel de expresión de ARNm de *Ets1* en TAV (A) y TAS (B) murino. El análisis del nivel de expresión génica se realizó en TAV y TAS de ratones DIO transfectados con una molécula mimética de miR-221 (n=8) o miR-222 (n=8) y una molécula Control (n=8). Los niveles de expresión génica se normalizaron con Ciclofilina. Los datos se obtuvieron por duplicado y se expresaron como media \pm ESM. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student. Valor estadístico: * p<0.05; ** p<0.01. VAT: TA visceral; SAT: TA subcutáneo.

VIII.7.3. Perfil de expresión de ARNm de genes apoptóticos en TAV y TAS de ratones DIO tratados con imitador de miR-221 y miR-222.

Ratones DIO fueron transfectados con una molécula de imitador de miR-221, miR-222 o Control. Luego del tratamiento, los ratones fueron sacrificados y el ARNm fue extraído

desde TAV Y TAS como se detalla en el capítulo de Materiales y Métodos. Mediante un análisis de expresión génica (qPCR), no hemos observado diferencia estadísticamente significativa en los niveles de expresión del ARNm, con respecto al control, de *Bcl2* en TAV y TAS de ratones DIO transfectados con una molécula mimética de miR-221 o miR-222 (Fig. 49-A y B, respectivamente). Por otro lado, observamos un aumento en el nivel de expresión de *Il1rap* en TAV de ratones DIO transfectados con una molécula mimética de miR-222, con una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (Fig. 50-A). Sin embargo, no hemos observado diferencia estadísticamente significativa en los niveles de expresión del ARNm, con respecto al control, de *Il1rap* en TAS de ratones DIO transfectados con una molécula mimética de miR-221 o miR-222 (Fig. 50-B).

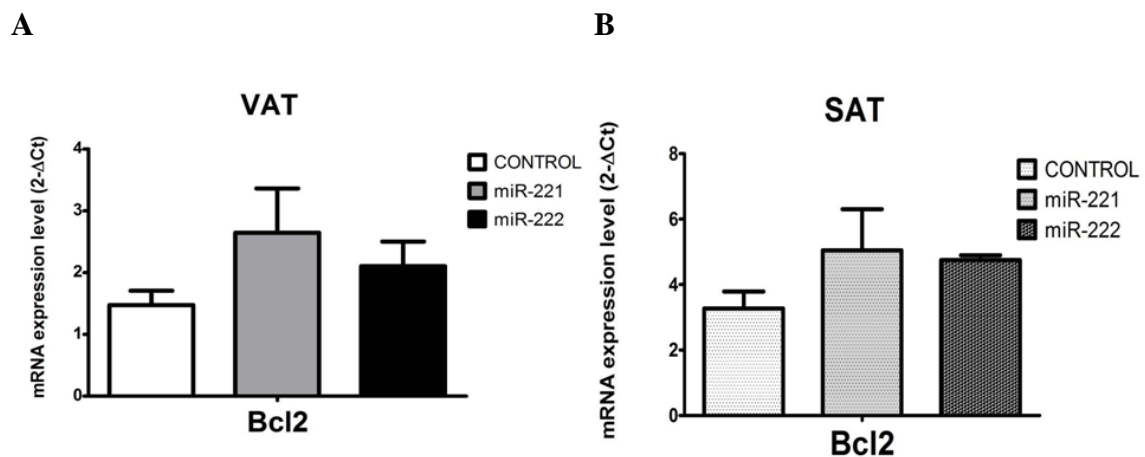


Fig. 49. Nivel de expresión de ARNm de *Bcl2* en TAV (A) y TAS (B) murino. El análisis del nivel de expresión génica se realizó en TAV y TAS de ratones DIO transfectados con una molécula mimética de miR-221 (n=8) o miR-222 (n=8) y una molécula Control (n=8). Los niveles de expresión génica se normalizaron con Ciclofilina. Los datos se obtuvieron por duplicado y se expresaron como media \pm ESM. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student. Valor estadístico: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. VAT: TA visceral; SAT: TA subcutáneo.

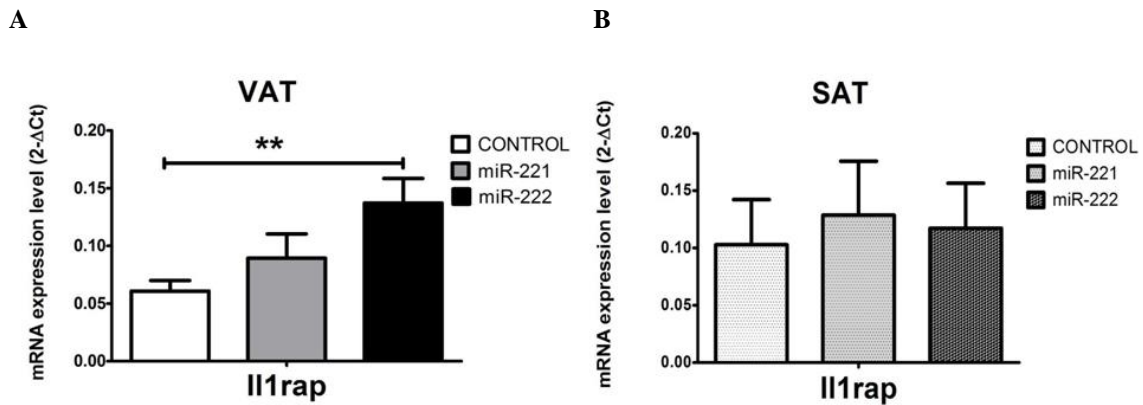


Fig. 50. Nivel de expresión de ARNm de *Il1rap* en TAV (A) y TAS (B) murino. El análisis del nivel de expresión génica se realizó en TAV y TAS de ratones DIO transfectados con una molécula mimética de miR-221 (n=8) o miR-222 (n=8) y una molécula Control (n=8). Los niveles de expresión génica se normalizaron con Ciclofilina. Los datos se obtuvieron por duplicado y se expresaron como media \pm ESM. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student. Valor estadístico: * p<0.05; ** p<0.01. VAT: TA visceral; SAT: TA subcutáneo.

VIII.7.4. Perfil de expresión de ARNm de Genes adipogénicos en TAV y TAS de ratones DIO tratados con imitador de miR-221 y miR-222.

Ratones DIO fueron transfectados con una molécula de imitador de miR-221, miR-222 o Control. Luego del tratamiento, los ratones fueron sacrificados y el ARNm fue extraído desde TAV Y TAS como se detalla en el capítulo de Materiales y Métodos. Mediante un análisis de expresión génica (qPCR), hemos observado (Fig. 51-A) diferencia estadísticamente significativa con respecto al control en los niveles de expresión del ARNm de *Ppar γ* en TAV de ratones DIO transfectados con una molécula mimética de miR-221. Sin embargo, no hemos observado (Fig. 51-B) diferencia estadísticamente significativa en los niveles de expresión del ARNm de *Ppar γ* , con respecto al control, en el TAS de ratones DIO transfectados con una molécula mimética de miR-221 o miR-222.

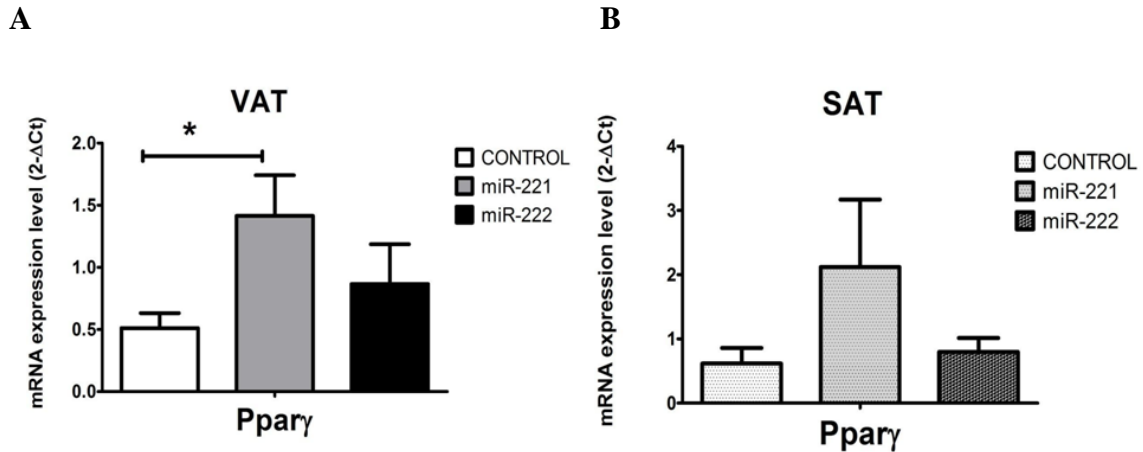


Fig. 51. Nivel de expresión de ARNm de *Ppary* en TAV y TAS murino. El análisis del nivel de expresión génica se realizó en TAV y TAS de ratones DIO transfectados con una molécula mimética de miR-221 (n=8) o miR-222 (n=8) y una molécula Control (n=8). Los niveles de expresión génica se normalizaron con Ciclofilina. Los datos se obtuvieron por duplicado y se expresaron como media \pm ESM. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student. Valor estadístico: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. VAT: TA visceral. SAT: TA subcutáneo.

VIII.7.5. Perfil de expresión de ARNm de genes de señalización de insulina en TAV y TAS de ratones DIO tratados con imitador de miR-221 y miR-222

Ratones DIO fueron transfectados con una molécula de imitador de miR-221, miR-222 o Control. Luego del tratamiento, los ratones fueron sacrificados y el ARNm fue extraído desde TAV y TAS como se detalla en el capítulo de Materiales y Métodos. Mediante un análisis de expresión génica (qPCR), no hemos observado (Fig. 52-A) diferencia estadísticamente significativa en los niveles de expresión del ARNm de *Irs1*, con respecto al control, en el TAV de ratones DIO transfectados con una molécula mimética de miR-221 o miR-222. Por otro lado, hemos observado (Fig. 52-B) un aumento en los niveles de expresión del ARNm de *Irs1*, con diferencia estadísticamente significativa con respecto al control, en el TAS de ratones DIO transfectados con una molécula mimética de miR-221.

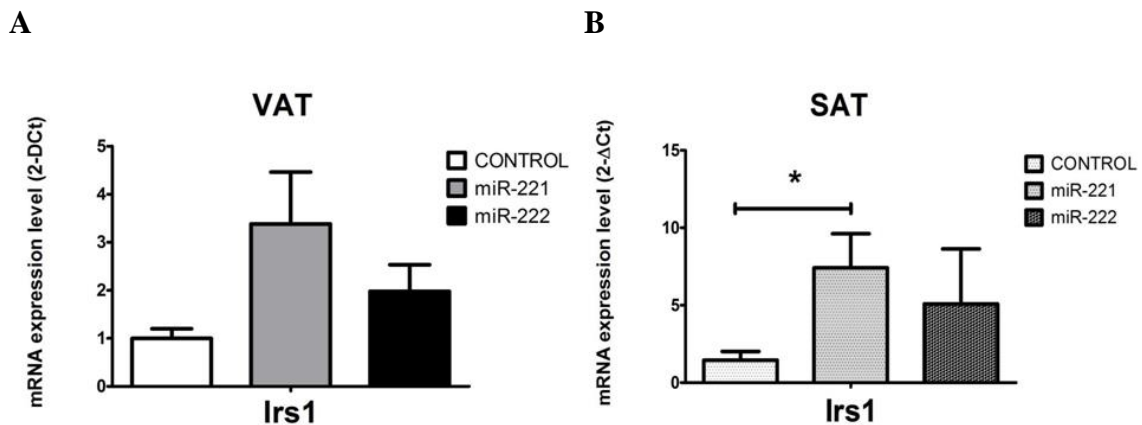


Fig. 52. Nivel de expresión de ARNm del receptor de señalización de insulina *Irs1* en TAV y TAS murino. El análisis del nivel de expresión génica se realizó en TAV y TAS de ratones DIO transfectados con una molécula mimética de miR-221 (n=8) o miR-222 (n=8) y una molécula Control (n=8). Los niveles de expresión génica se normalizaron con Ciclofilina. Los datos se obtuvieron por duplicado y se expresaron como media \pm ESM. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student. Valor estadístico: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. VAT: TA visceral; SAT: TA subcutáneo.

VIII.8. Estudio epigenético

Con el fin de identificar secuencias metiladas diferencialmente en TAV y TAS relacionadas con la obesidad, la RI y la DMT2, muestras de TA fueron seleccionadas como se detalla en el apartado materiales y métodos y se les realizó un estudio de metilación mediante el uso del Array de metilación de ADN (Illumina EPIC 850K).

Un análisis preliminar de los datos obtenidos fue llevado a cabo. Con el fin de sintetizar la información perdiendo la menor cantidad de información posible se realizó un análisis de componentes principales (CP). Un mapa de calor muestra la relación entre los componentes principales y la información fenotípica en TAV (Fig. 53) y TAS (Fig. 54). El color de la intersección indica el nivel de importancia de la relación.

La Fig. 53 muestra como la variable género tiene una relación fuertemente significativa con el segundo componente. Además, ese componente también está relacionado con el grupo de muestras. El componente más importante en términos de varianza explicada (PC-1) no está relacionado con ninguna de las variables fenotípicas

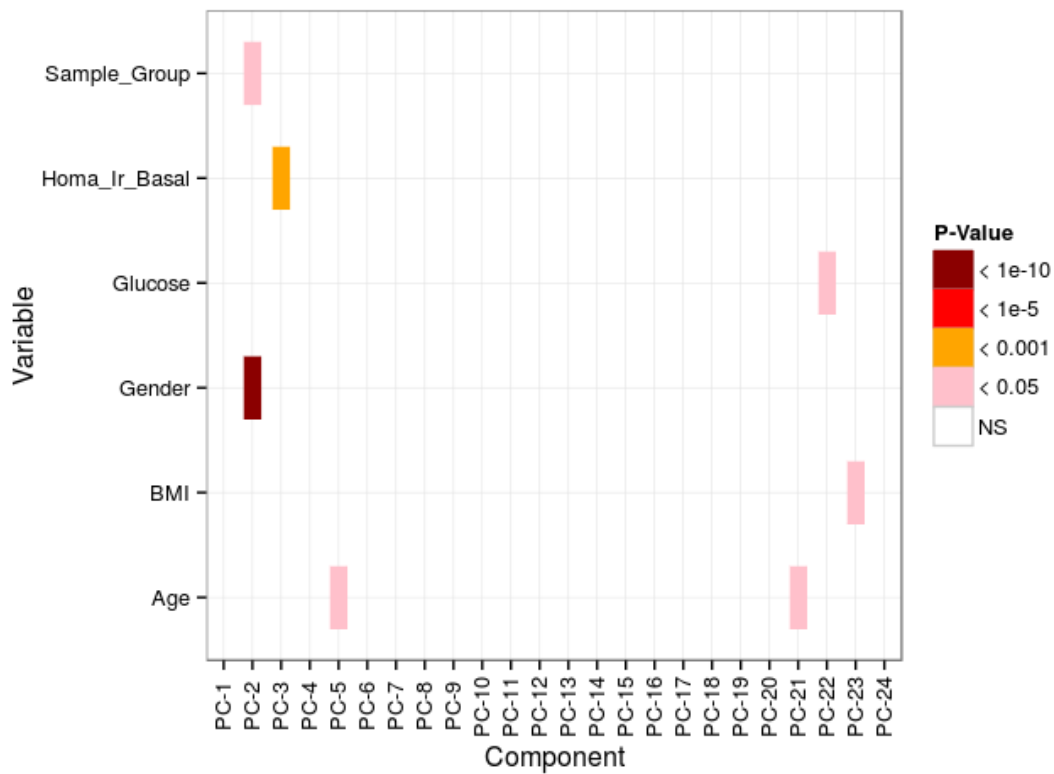


Fig 53. Mapa de calor entre componente principal y variables fenotípicas en TAV.

Esto nos está indicando que el diseño experimental estaba desequilibrado, debido a que las muestras no presentaban paridad en la variable género y en el número de muestras por grupo.

La Fig. 54 muestra como, las variables género e índice HOMA-IR tienen una relación significativa con el primer componente y la glucosa y el índice HOMA-IR tienen una relación significativa con el segundo componente. Mientras, género y edad tienen una relación significativa con el tercer componente. El fenotipo grupo de muestras, parece no estar relacionado con ninguno de los componentes, lo que podría sugerir la presencia de algún factor de confusión.

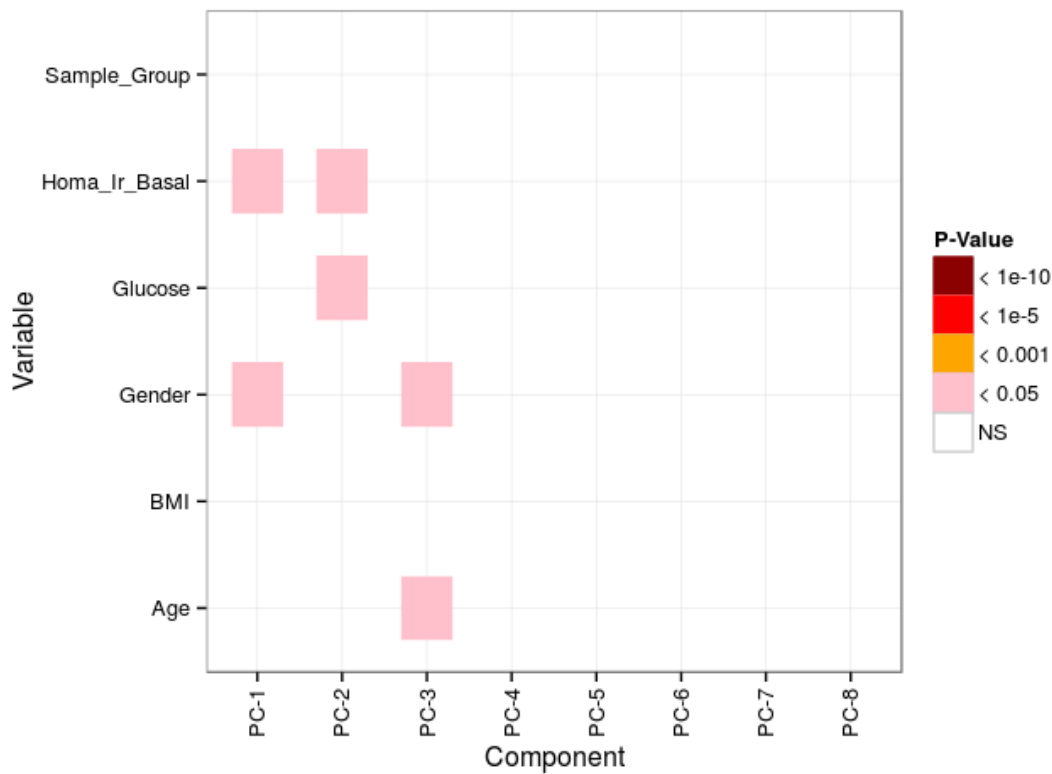


Fig 54. Mapa de calor entre componente principal y variables fenotípicas en TAS.

La confusión fue confirmada por un análisis de descomposición en valores singulares (SVD, por sus siglas en inglés), donde el género, en TAV y TAS parecía tener una relación significativa con los componentes más importantes de la variación. El principal componente de la variación, que representa más del 90% de la varianza en los datos en ambos grupos, no se relacionó con ninguna de las variables fenotípicas. Esto podría estar relacionado con el diseño desequilibrado y la incapacidad de separar el efecto sobre la metilación para estas dos variables.

Con el fin de contrarrestar la influencia de cualquier variable no tenida en cuenta en el modelo se estimó las variables sustitutas (SV, por su sigla en inglés) que es un algoritmo que permite modelar el efecto de la heterogeneidad.

Un mapa de calor muestra la relación entre las variables sustitutas y la información fenotípica para muestras de TAV (Fig.50) y TAS (Fig.51). El color de la intersección indica el nivel de importancia de la relación.

La Fig.55 muestra como la variable género parece estar impulsando parte de la varianza en el conjunto de datos después de ajustar un modelo basado en el grupo de muestra.

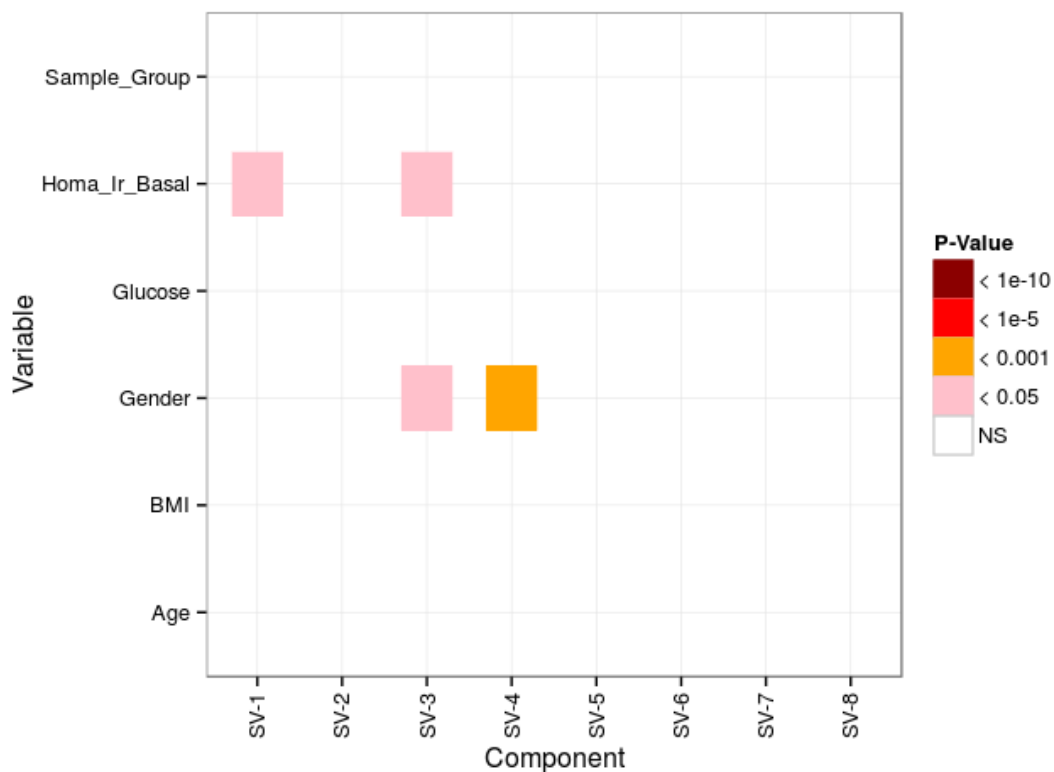


Fig. 55. Mapa de calor entre SV y las variables fenotípicas en TAV.

La Fig.56 muestra que las variables sustitutas no tienen una relación fuertemente significativa con ninguna información del fenotipo. Este hecho estaría indicando la homogeneidad de las muestras del TAS.

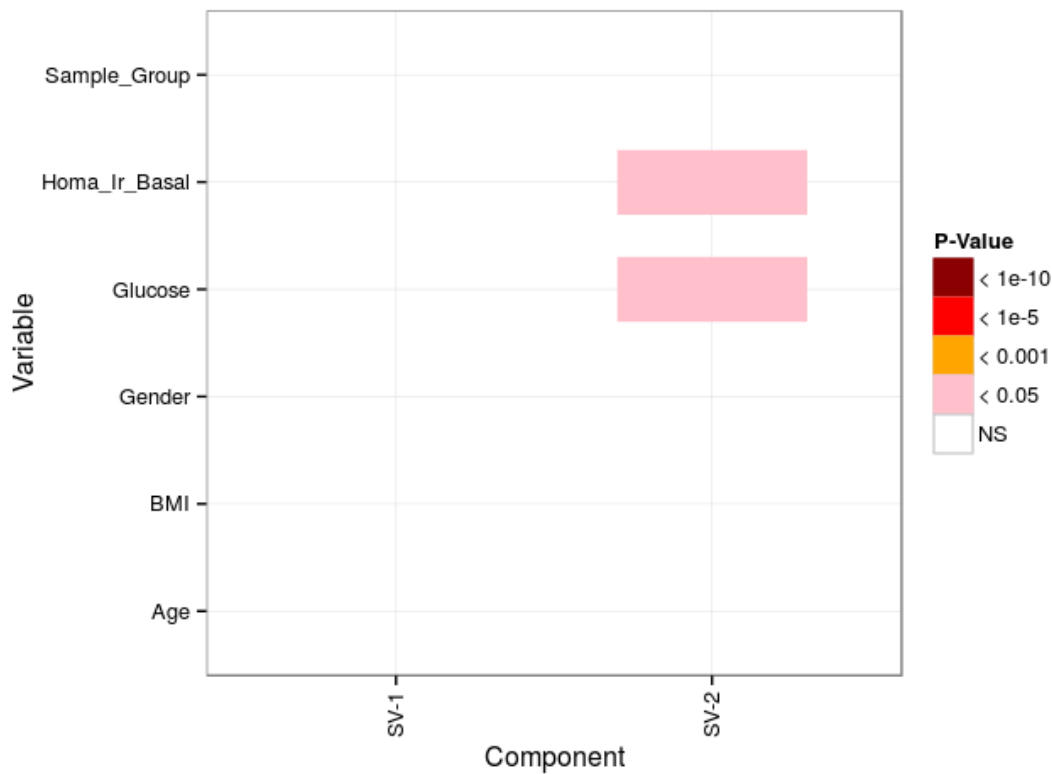


Fig 56. Mapa de calor entre SV y variables fenotípicas en TAS.

Posteriormente, se realizaron histogramas de distribución de los valores de p para los contrastes OD vs. OS de TAV y TAS (Fig. 57-Ay B). El histograma del TAS muestra una distribución donde algunas de las sondas parecen estar metiladas diferencialmente antes de la corrección de pruebas múltiples. Por el contrario, el histograma del TAV no muestra ninguna diferencia en los valores p.

Un mapa de calor que muestra los valores de metilación para las 35 pruebas metiladas diferencialmente encontrados para el contraste OD vs OS en TAS (Fig.58). Las muestras de OS (a la derecha) tienen un perfil de metilación más homogéneo, mientras que las muestras de OD (a la izquierda) parecen tener una mayor variabilidad. La distancia de Manhattan y el método de aglomeración de Ward se utilizaron para generar el agrupamiento jerárquico.

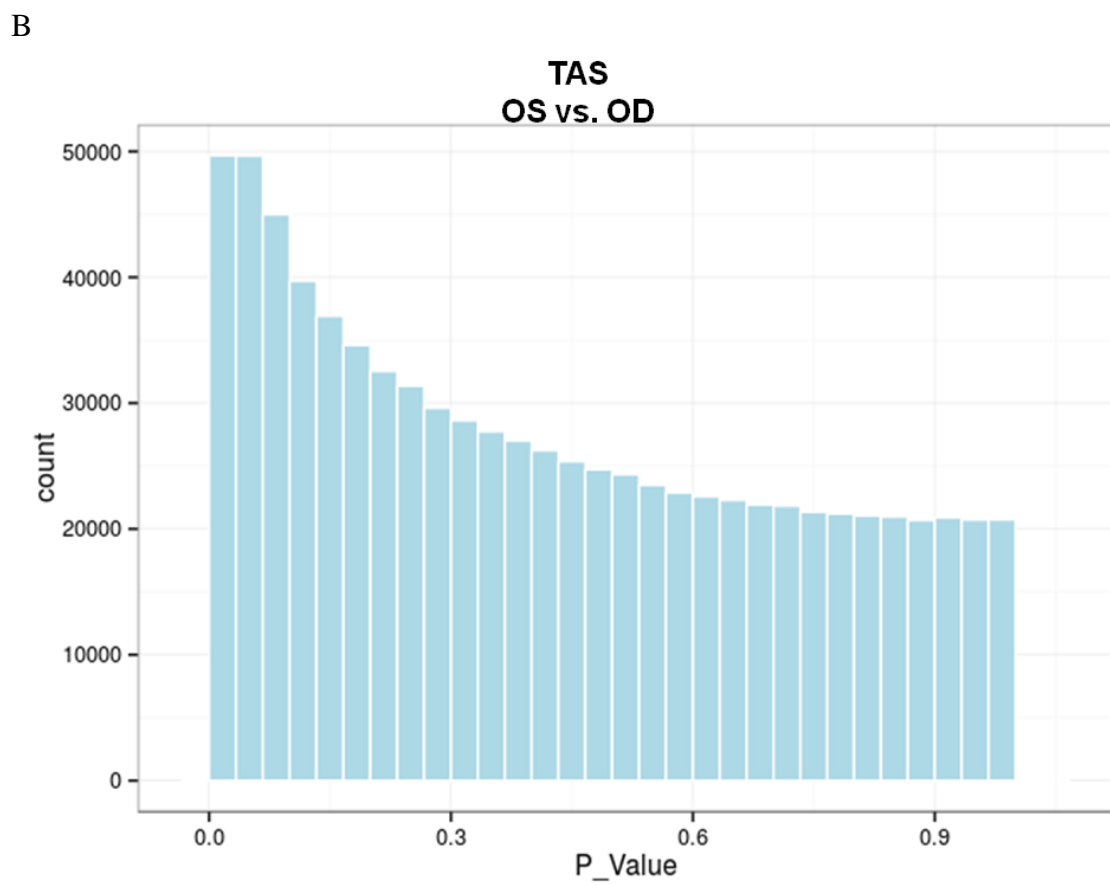
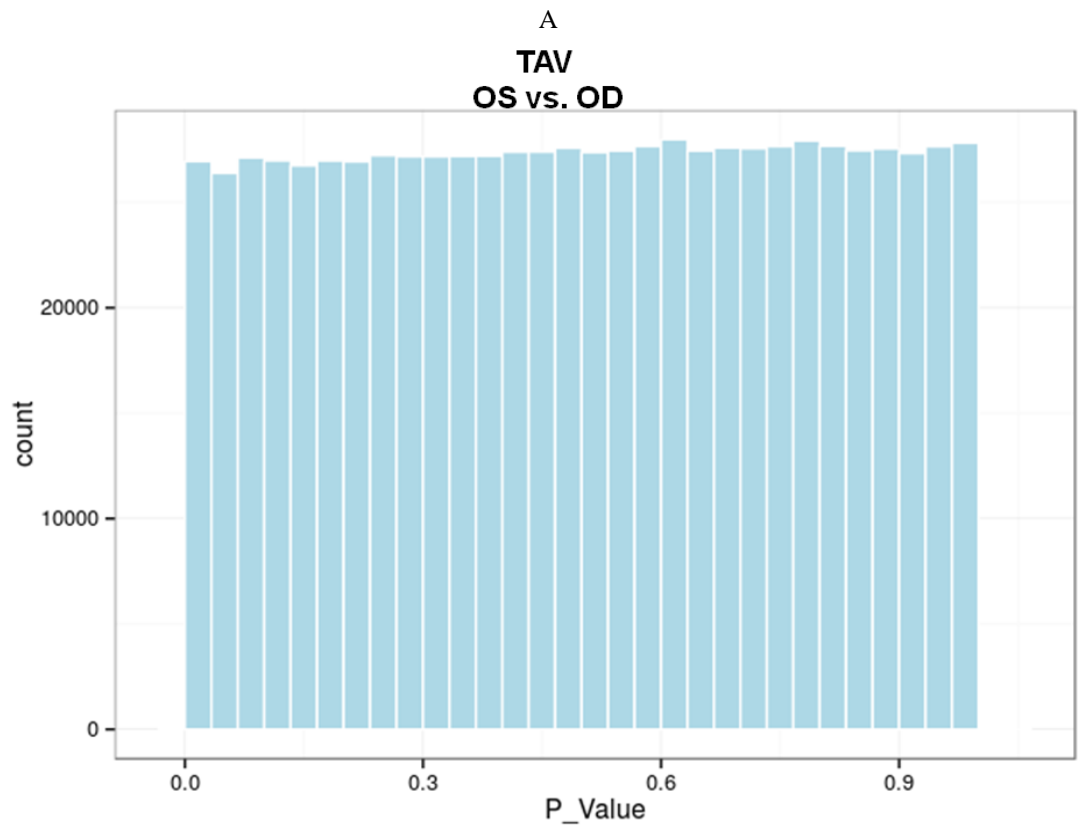


Fig. 57. Histogramas de distribución de valores p (A - B).

Un mapa de calor muestra los valores de metilación para las 35 pruebas metiladas diferencialmente encontrados para el contraste OD vs OS en TAS (Fig.53). Las muestras de OS (a la derecha) tienen un perfil de metilación más homogéneo, mientras que las muestras de OD (a la izquierda) parecen tener una mayor variabilidad. La distancia de Manhattan y el método de aglomeración de Ward se utilizaron para generar el agrupamiento jerárquico.

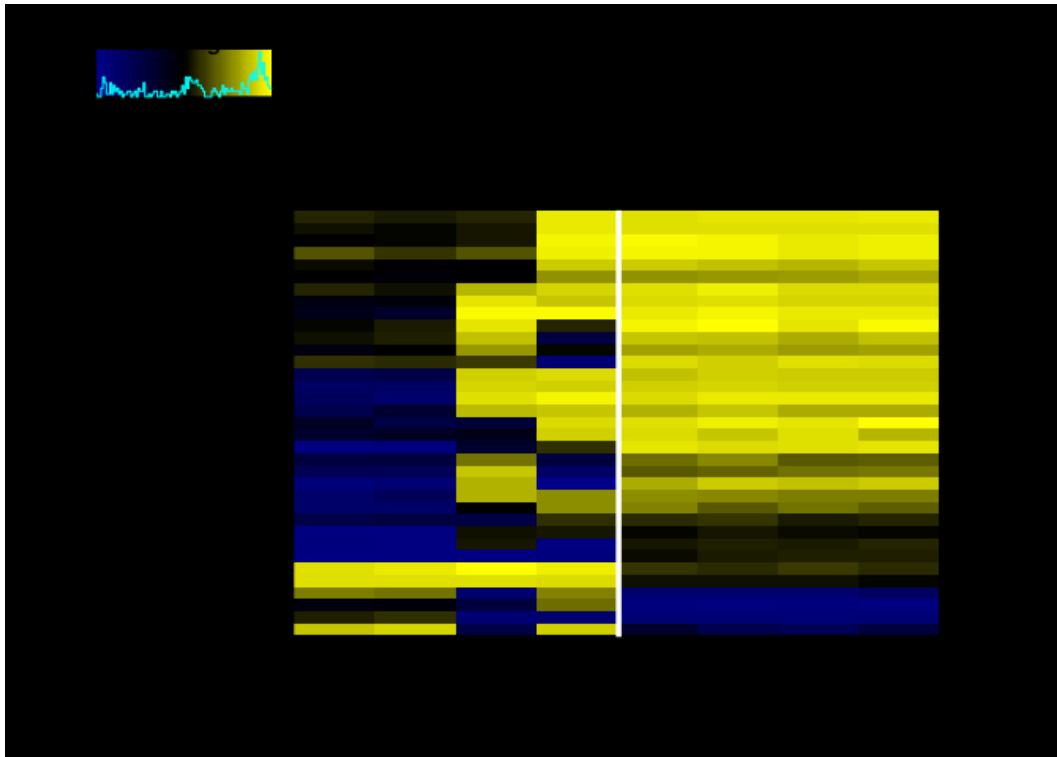


Fig. 58. Mapa de calor de las sondas diferencialmente metiladas.

A continuación, un diagrama de metilación génica muestra el conjunto de sondas metilados con el conjunto de sondas hiper e hipometiladas, con diferencia estadística significativa, obtenidas del TAS cuando se compararon OD vs OS (Fig. 59). La Tabla 31, muestra la correspondencia entre sondas y genes expresados en el TAS, mientras que la tabla 32 muestra las principales funciones atribuidas a esos genes.

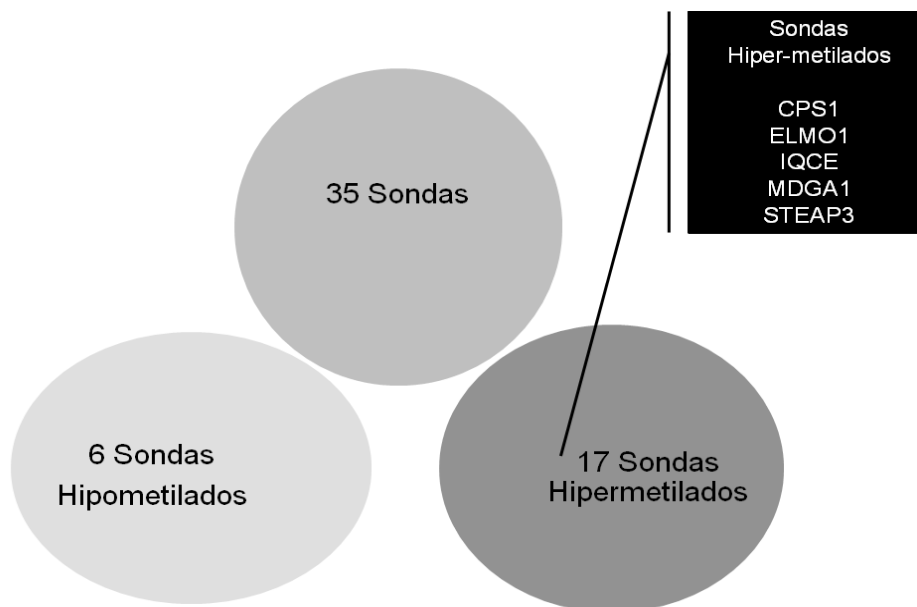


Fig 59. Diagrama de Metilación génica.

Tabla 31. Correspondencia Sonda-genes

Probe_ID	GENE
cg22316634	COMP
cg22597981	CPS1
cg01662591	ELMO1
cg21517946	FKBP5
cg01002086	FSTL4
cg18001722	GRK5
cg09650803	IL4R
cg24185656	IQCE
cg26642936	IQSEC3
cg03796003	KCTD5
cg21517946	LOC285847
cg26642936	LOC574538
cg01504940	MATN2
cg02743437	MDGA1
cg06825310	MYO1B
cg17187785	NTM
cg24189340	OPCML
cg15184869	PEBP4
cg26566189	PSORS1C1
cg27533859	SSX1
cg05234269	ST3GAL6
cg07769198	ST7
cg03237181	STEAP3

Tabla 32. Función génica de genes asociados a sondas diferencialmente metiladas de los miARNs del estudio.

miRNA	Gene	Function
20a-5p	CPS1	1.Urea cycles. 2. Metabolic Pathways. 3.Biosynthesis of amino acids.
20b-5p		
27b-5p	ELMO1	1. Interleukin receptor SHC signaling: VEGFA-VEGFR2 Pathway, Signaling by VEGF
221-3p	IQCE	1. Signaling by GPCR. 2. Signaling by Hedgehog.
210-3p	MDGA1	1. Neuron migration. 2. Brain development. 3. cerebral cortex radially oriented cell migration.
296-3p	STEAP3	1. Insulin receptor recycling. 2. Transport of glucose and other sugars. 3. Direct p53 effectors.



IX. DISCUSIÓN



El presente estudio muestra por primera vez una influencia de la obesidad y la DMT2 en la expresión de miR-15b, miR-20a, miR-20b, miR-27b, miR-126, miR-130, miR-210, miR-221, miR-222, miR-296 y Let-7f en el VAT y el SAT humano. Concordantemente, algunos genes diana de estos miARNs también se regularon de manera diferencial en la obesidad y la DMT2, dependiendo del depósito de TA. Estos genes diana están relacionados con diferentes procesos biológicos relevantes para la fisiología del tejido adiposo que refuerzan el papel putativo de estos miARNs en la regulación de la función del TA y el mantenimiento de homeostasis metabólica. Aunque se ha demostrado que la expresión de miARNs en TA está relacionada con los depósitos de grasa, con los parámetros de morfología del TA, obesidad y metabolismo de la glucosa (Viesti A Collares R y col., 2014; Klöting N y col., 2009; Chen L y col., 2014; Peng Y y col., 2014), hasta donde sabemos, hasta la fecha no hay estudios que describan los niveles de expresión de miR-15b, miR-20a, miR-20b, miR-27b, miR-126, miR-130a, miR-210, miR-221, miR-222, miR-296 y Let-7f en el TAV y TAS humano en relación con la obesidad y la DMT2.

Nuestros resultados sugieren la posible relación entre miR-27b, miR-126, miR-130a, miR-221 y Let-7f y la obesidad. Sin embargo, los mecanismos que regulan esta relación no están aclarados. Algunos de estos miARNs han sido relacionados con adipogénesis (Kong X y col., 2015; Deiliis JA y col., 2016), obesidad (Arner E y col., 2012; Meerson A y col., 2013; Peng J y col., 2017) y algunas alteraciones metabólicas relacionadas (Shi C y col., 2016). Nosotros, encontramos que un gen diana miR-221, *ETS1*, está regulado al alza en TAV. En cambio, y como han descrito otros autores (Meerson A y col., 2013) encontramos que *ETS1* está regulado a la baja en TAS, de sujetos obesos diabéticos. *ETS1* es un factor de transcripción que regula la expresión de un amplio espectro de genes, incluidas las citocinas y las quimiocinas, y se ha propuesto que la inflamación asociada a

la obesidad también puede desempeñar un papel significativo en el desarrollo de la diabetes tipo 2 (Meerson A y col., 2013). Además, según nuestro análisis de enriquecimiento funcional (Tabla), ETS1 participa en vías de regulación de la proliferación celular y apoptosis y como ya ha sido descrito, también participa en vía de señalización de VEGF (Singh S y col., 2002). Estos mecanismos podrían sugerir que un aumento en la expresión de miR-221 conduce a una disminución de la vascularización del TA y por consiguiente un aumento de hipoxia e inflamación, como sugieren otros autores (Meerson A y col., 2013). En nuestros estudios con células y TA murino, no hemos detectado cambios en la expresión de este gen.

Nuestros resultados también sugieren la posible relación entre miR-210 y DMT2 y que una interacción entre DMT2 y tejido puede influir en su nivel de expresión. De acuerdo con nuestra sugerencia, hay estudios que muestran que el nivel de expresión de miR-210 en TAS de sujetos con sobrepeso y obesidad ha sido relacionado con cambios en el peso corporal (Giardina S y col., 2018) y durante la DMT2, como biomarcador plasmático de la progresión de la enfermedad (Delic D y col., 2016).

Nuestros resultados sugieren, además, la posible relación entre miR-15b, miR-20a, miR-20b, miR-27b, miR-126, miR130a, miR-221, miR-296 y Let-7f y una interacción entre obesidad y tipo de TA. De acuerdo con esta sugerencia, se ha descrito que algunos de estos miARNs están relacionados con diferenciación de adipocitos (Aval SF y col., 2018; Chou WW y col., 2013), obesidad (Arner E y col., 2012; Shi C y col., 2016; Brennan E y col., 2017), dieta hipocalórica y ejercicio o dieta alta en grasa (Kristensen MM y col., 2017; Liu W y col., 2017), en la regulación de la funcionalidad del TA tanto en TAS como en TAV (Meale SJ y col., 2014) y como biomarcadores en relación al IMC y tipos de dieta (Munetsuna E y col., 2017; Marques-Rocha JL y col., 2016). Sin embargo, los mecanismos que regulan dicha relación no están totalmente aclarados.

Nosotros mostramos como algunos genes diana de estos miARNs se expresaron diferencialmente en TAS y TAV en relación a obesidad y DMT2 y que estos genes están involucrados en vías de angiogénesis, respuesta a hipoxia o apoptosis, las cuales participan de manera importante en la regulación de la funcionalidad del TA. De esta forma, mostramos que *BCL2L1* está regulado en alza en el TAV de sujetos obesos y a la baja en el mismo tejido, en sujetos diabéticos. Estos resultados están de acuerdo con otros realizados en ratones (Singh R y col., 2009). Nosotros mostramos en el análisis de enriquecimiento que *BCL2L1* está involucrado en la vía de apoptosis. Por otro lado, mostramos que *PTEN* está regulado a la baja en TAV de pacientes diabéticos. Este gen fue identificado como participante en vías de respuesta a hipoxia en nuestro análisis de enriquecimiento. Mientras, otros autores lo relacionan con proliferación y apoptosis (Zhou L y col., 2016). Estos resultados sugieren que un aumento en la expresión de miR-221, miR-222, miR-20a, miR-20b en el TAV podría conducir a una regulación a la baja de genes diana relacionados con apoptosis y respuesta a hipoxia. Estos mecanismos podrían conducir a una disfunción del TA y como consecuencia DMT2 inducida por obesidad.

Por otra parte, aunque hay estudios que relacionan la expresión de *Let-7f* con un efecto protector en la regulación de la inflamación asociada a DMT2 (Brennan E y col., 2017) y otros muestran a *Let-7f* y miR-20b como biomarcadores relacionados con obesidad y pérdida de peso (Hsieh CH y col., 2011), con RI (Flowers E y col., 2015) y con DMT2 (Frost RJ y col., 2011; Villard A y col., 2015; Zampetaki A y col., 2010), nosotros mostramos por primera vez una posible conexión entre la obesidad, DMT2 y la expresión de miR-20b, miR-296 y *Let-7f* en el TAV y TAS humano. Paralelamente, mostramos que genes diana de estos miARNs, que están principalmente involucrados en la regulación de las vías de VEGF y WNT, tuvieron un perfil de expresión diferencial que depende de la

obesidad, DMT2 y de los depósitos de TA. En concordancia con estos resultados, se ha descrito que miR-20b, miR-296 y let-7f están implicados en la regulación de la ruta de señalización WNT y angiogénesis a través de la regulación de múltiples genes diana que pertenecen a estas vías (Egea V y col., 2012; Wang W y col., 2012; Dhari W y col., 2017). Nuestros resultados muestran específicamente, que en SAT, *CDKN1A*, *NAT10* y *SSSCAI* parecen estar relacionados con la obesidad, mientras que *CDKN1A*, *ECE1*, *KDR*, *NAT10*, *NOS3* y *PPP2R1B* parecen estar más bien relacionados con DMT2, lo que sugiere que miR-20b, miR-296 y Let-7f podrían estar relacionados con la obesidad y la T2D a través de la regulación de las vías de VEGF, señalización WNT, señalización de FGF y cascada de MAPK, que son las vías reguladas principalmente por estos genes diana. De acuerdo con estos resultados se ha descrito que *PPP2R1B*, *MYC* y *TNF* están involucrados en la vía de señalización WNT, mientras que *VEGFA*, *HIF1A* y *STAT3* están bien descritos como los reguladores clave de angiogénesis y la vía de señalización de VEGF (Suraweera N y col., 2006; Lapeire L y col., 2014; Xu J y col., 2016; Engin A y col., 2017; Yang R y col., 2018; Feng J y col., 2014; Liao ZJ y col., 2008). Además, *MPP3* es bien conocido por tener un papel fundamental en la reestructuración de la matriz extracelular de las células epiteliales (Murakami S y col., 2014), *NAT10*, *PPP2R1B* y *WDR20* son reguladores clave de las vías de apoptosis (Liu X y col., 2016; Feng J y col., 2014; Takahashi M y col., 2016) y *RET* es un regulador de la proliferación celular (Alao JP y col. 2014, Franz H y col., 2015).

Por otra parte, nuestros resultados muestran específicamente que, en el TAV, los genes diana *CDKN1A*, *GLUL*, *GPI*, *IL1B*, *MPP3*, *STAT3*, *VEGFA* y *ZNF274* parecen estar predominantemente relacionados con la obesidad, mientras que *CDKN1A*, *CX3CLI*, *GLUL*, *GPI*, *PPP2R1B*, *VEGFA*, *WDR20* y *ZNF274* parecen estar particularmente relacionados con la DMT2. Estos resultados sugieren que miR-20b, miR-296 y Let-7f

podrían estar relacionados con la obesidad y la DMT2 a través de la regulación de las vías de VEGF, la señalización de WNT, inflamación, apoptosis y las interleucinas, que son las vías reguladas principalmente por estos genes diana. De acuerdo con nuestra sugerencia, estas vías, que están interrelacionadas, han sido bien descritas para desempeñar un papel importante en el aumento de peso y en la aparición de la obesidad asociada a DMT2. Explícitamente, se ha descrito que CDKN1A, MYC está relacionado con la obesidad (Boqué N y col., 2009; Deisenroth C y col., 2014), mientras que CX3CL1, ECE1, STAT, 3 TNF, GLUL y IL1B se relacionan con la obesidad y la inflamación asociada a DMT2 (Alexander R y col., 2011; Shah R y col., 2015; Nandispati KC y col., 2017). Otros estudios han descrito que HIF1A, KDR, VEGFA, GPI y NOS3 se asociaron principalmente con la IR y la angiogénesis asociada a la obesidad (Song MG y col., 2016; García Fuentes E y col., 2015; Georgescu A y col., 2011), y se ha descrito que ZNF274 está relacionado con la obesidad y la IR (Ahrens M y col., 2013).

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio integral en aplicar análisis multivariante para investigar la interacción entre los dos TA, visceral y subcutáneo y tres moléculas de miARN (miR-20b, miR-296 y Let-7f) y para evaluar *in silico* sus genes diana potenciales. De esta forma, pudimos priorizar seis genes diana (CDKN1A, CX3CL1, HIF1A, PPP2R1B, STAT3 y VEGFA), que fueron significativamente diferentes en su perfil de expresión tanto en TAV como en TAS en pacientes con obesidad y DMT2, lo que sugiere que estas tres moléculas de miARNs podrían tener un papel importante en la homeostasis metabólica de la obesidad y la DMT2 en el nivel de TA, que podría estar mediado por seis genes diferentes.

Por otro lado, la predicción bio-informática de genes diana seguida de análisis de enriquecimiento funcional es una nueva herramienta utilizada para obtener la mayor cantidad de información antes de diseñar la parte experimental de una investigación. En

acuerdo con nuestros resultados, otros autores han utilizado el análisis computacional de predicción seguido de análisis de enriquecimiento funcional, para determinar genes diana de miARNs (Zhang R y col., 2014; Thomé JG y col., 2015).

Por otra parte, es importante destacar que se ha descrito que miR-221 y miR-222 están implicados en la regulación de la proliferación celular, apoptosis, ciclo celular, transducción de señales y fosforilación y podrían estar regulando genes de esas vías en el TAV y TAS en relación a obesidad, RI y DMT2. En acuerdo con nuestros resultados que informa que miR-221 y miR-222 podrían estar regulando juntos y con otros miARNs, genes diana que participan en rutas importantes para la funcionalidad del TA, algunos de esos genes han sido descritos. Por ejemplo, *CDKN1C*, como necesarios para el desarrollo temprano de TA (Van De Pete M y col., 2016); *LYN*, con alta expresión en múltiples tejidos de un estudio de DMT2 (Chen J y col., 2013); *FOXO3* y *CDKN1B* relacionados con apoptosis (Spinetti G y col., 2013); *CDK6* y *Oip5*, en diferenciación de adipocitos (Price N y col., 2017; Inoue K y col., 2014); *CABYR*, proliferación celular y fosforilación (Quian Z y col., 2014); *TRAT1*, relacionado con fosforilación y ubiquitilación (Jahan AS y col., 2016); *GJA1*, en estrés celular (Fu Y y col., 2017);

Nosotros mostramos que esos genes se expresaron diferencialmente en TAS y TAV de pacientes con obesidad, diabetes o RI (Fig. 30).

En el estudio con adipocitos de células 3T3-L1, silenciando y sobre-expresando miR-221 y miR-222, pudimos determinar que estos miARNs parecen estar implicados en algunas vías reguladoras de angiogénesis, apoptosis y adipogénesis. Sin embargo, los resultados no han sido del todo claros. MiR-221 podría estar regulando *DVL2*, tanto cuando está sobre-expresado como inhibido, en adipocitos de esta línea celular. *DVL2* es un mediador clave de la vía de señalización wnt / β -catenina (Jia Z y col., 2017) y esta vía ha sido descrita por contribuir a la regulación del proceso angiogénico en el TA (Parmalee NL y

col., 2008) y por estar involucrada en la regularización de gluconeogénesis y glucólisis (Kozinski K y col., 2013). En acuerdo con nuestros resultados se ha descrito su regulación en otra línea celular (Zheng C y col., 2012). Además, nosotros hemos encontrado en el Arrays que este gen está regulado al alza ($p=0.013$) en TAV de pacientes Obesos con DMT2 cuando fueron comparados con pacientes obesos sin DMT2. Por tanto, podemos sugerir que miR-221 podría estar regulando la funcionalidad del TA a través de DVL2, en relación a obesidad y DMT2.

Por otro lado, miR-221 podría estar regulando IL1RAP cuando está sobre-expresado en adipocitos de la línea celular 3T3-L1. IL1RAP está descrito como una citocina inflamatoria. La familia de citocinas IL-1 tiene un papel importante en la endocrinología y regulación de las respuestas asociadas con el estrés inflamatorio (Banerjee M y col., 2012), relacionada con la apoptosis (Barreyro L y col., 2012) y descrita como biomarcador en la obesidad (Bozaoglu K y col., 2014). Además, nosotros mostramos en nuestro estudio *in vivo* que una sobreexpresión de miR-222 también podría estar regulando *IL1RAP* en el TAV de ratones obesos sin DMT2. Por otro lado, en el Arrays hemos encontrado que este gen está regulado a la baja ($p=0.028$) en el TAV de pacientes obesos con DMT2 cuando se los compara con obesos sin DMT2. De esta forma, podemos sugerir que miR-221 y miR-222 podrían estar regulando la funcionalidad del TA a través de IL1RAP, en relación a obesidad y DMT2.

En el estudio con ratones DIO tratados con imitador de miR-221 y miR-222, pudimos determinar que estos miARNs estaban sobre-expresados tanto en el TAV como en el TAS y que algunos genes implicados en algunas vías reguladoras de angiogénesis, apoptosis, adipogénesis y señalización de insulina podrían estar regulados por estos miARNs. En acuerdo con nuestros resultados, está descrito que miR-221 y miR-222 están relacionados con la enfermedad metabólica, la sensibilidad a la insulina y el IMC (Deiuliis JA y col.,

2016). Como así también, relacionados con la capacidad angiogénica y la regulación de genes involucrados en esta vía (Song MG y col., 2016; Hagberg CE y col., 2010).

En el mejor de nuestro conocimiento, no hay estudios que muestren regulación de FABP4 por miR-221 y miR-222. Sin embargo, nuestros resultados no son claros. Aunque la sobre-expresión de miR-221 y miR-222 en células 3T3-L1 parece mostrar una regulación de Fabp4, más estudios serán necesarios para confirmar este hecho, ya que a nivel del TA de ratones DIO el nivel de expresión de este gen era indetectable. FABP4, conocido por su papel en el transporte de los ácidos grasos, está implicada en la fase terminal de la diferenciación adipogénica (Brey C y col., 2009; Makowsky L y col., 2005) y se expresa predominantemente en macrófagos y tejido adiposo donde regula el almacenamiento de ácidos grasos y la lipólisis. Además, es un mediador importante de la inflamación (Floresta G y col., 2017). Por otro lado, el nivel de expresión de *PPAR γ* en las células 3T3-L1 parece estar regulado por miR-222, mientras que, en el TAV de nuestros ratones, parece estar regulado por miR-221. *PPAR γ* está implicado en la fase temprana de la adipogénesis mediante su activación con C/EBP α (Ali AT y col., 2013). Por tanto, creemos necesarios más estudios para confirmar la implicancia de miR-221 y miR-222 en la regulación de *FABP4* y *PPAR γ* durante la adipogénesis.

Finalmente, los resultados del estudio epigenético muestran cambios en los niveles de metilación, a nivel de TAS, en genes diana de algunos de los miARNs estudiados en este trabajo. Dichos genes están relacionados con rutas metabólicas, rutas de señalización de interleucinas y VEGF, transporte de glucosa, etc. En acuerdo con nuestros resultados otros autores presentaron evidencia que la metilación del ADN es un mecanismo clave de regulación epigenética para suprimir la expresión de algunos de los genes metilados en este estudio: *CPS1*, *ELMO1*, *STEAP3* (Liu H y col., 2011; Whitaker JW y col., 2015; Paliwal A y col., 2013). Hasta donde sabemos, no hay estudios previos que muestren la

metilación de CPS1, ELMO1, IQCE, MDGA1 y STEAP3 en el nivel de tejido adiposo relacionado con la obesidad. Este hecho indica la originalidad de nuestro estudio. Sin embargo, creemos que necesitaría ampliarse para determinar si los cambios observados se corresponden con cambios en los niveles de metilación de los promotores de dichos genes y si se traducen en cambios en los niveles de expresión de los genes diana. Una integración de miARN, metilación del ADN y los perfiles de expresión génica pueden ayudar a extraer nuevos conocimientos biológicos al establecer asociaciones entre las interacciones epigenéticas y los resultados clínicos, como resalta Shivakumar M y col., 2017. Además, para conocer la susceptibilidad o resistencia al desarrollo de obesidad y RI, podría determinarse si se inducen cambios epigenéticos a través de la dieta (fenotipo epigenético adquirido) o modificaciones genéticas hereditarias.



X. CONCLUSION



1. In human the expression levels of miR-15b, miR-20a, miR-20b, miR-27b, miR-126, miR-130a, miR-27, miR-221, miR-222, miR-296 and Let-7f in human VAT and SAT are influenced by obesity, T2DM and adipose tissue depot, when these factors are interacting simultaneously.

2. MiR-27b, miR-126, miR-130a, miR-221 and Let-7f expression levels seem to be related exclusively to obesity.

3. MiR-210 expression seems to be mainly related to T2DM and to be influenced by the interaction between T2DM and adipose tissue depot.

4. MiR-15b, miR-20a, miR-20b, miR-27b, miR-126, miR-130a, miR-221, miR-296 and Let-7f expressions seem to be related to the interaction between obesity and adipose tissue depot.

5-*ETS1* seems to be the gene mostly implicated in the interaction between miR-221 and obesity in both VAT and SAT. While, *BCL2L1* and *PTEN* seem to be the genes mostly implicated in the interaction between miR-221, miR-20a, miR-20b and obesity in VAT.

6. The interaction of adipose tissue, miR-20b, miR-296 and Let-7f with obesity and T2DM could be involving VEGF and WNT-dependent pathways regulated by *CDKN1A*, *CX3CLI*, *HIF1A*, *PPP2R1B*, *STAT3* and *VEGFA* genes

7. In adipocytes, the regulation of angiogenic and apoptotic signaling pathways by miR-221 and miR-222 seem to be most involving *DVL2* and *ILIRAP* genes, suggesting the

potential implication of these two genes in the interaction of miR-221 and miR-222 with obesity and T2DM in adipose tissue.

8. EEF1A1 and RPL13A are suitable for gene expression studies of VAT and SAT-derived stem cells from subjects with different degrees of obesity and IR.

9. The epigenetic study determined that in addition to the post-transcriptional regulation mediated by miRNAs, obesity seems to be also related to modifications at the level of DNA methylation at the subcutaneous adipose tissue level. Specifically, 5 genes have been shown to be hypermethylated in obese subjects compared to non-obese: one related to metabolic pathways and amino acid biosynthesis (CPS1); one related to the VEGF signaling path (ELMO1); one related to glucose transport and insulin receptor (STEAP3); one in the signaling of G protein coupled receptors (IQCE); and one related to adhesion and neuronal migration (MGDA1).

XI. PERSPECTIVAS



La relación causa-efecto entre obesidad, DMT2, las moléculas de miARNs y sus genes diana representan un área prometedora de futuras investigaciones para determinar el papel de sus genes candidatos en la patogénesis tanto de la DMT2 como de la obesidad. Se espera, por tanto, que el resultado de estos hallazgos sirva como una plataforma para el desarrollo de fármacos para ambas enfermedades.

Por otro lado, los resultados del estudio de metilación apuntan a la necesidad de más análisis para determinar si los cambios encontrados tienen una repercusión funcional y se traducen en modificaciones directas en los niveles de expresión de los genes hipermetilados. Además, se debería investigar el posible origen de los cambios en los niveles de metilación, para dilucidar si son fenotipos adquiridos por la dieta u otros factores externos o son modificaciones genéticas hereditarias, que podrían estar relacionadas con el hecho de que algunas personas son más susceptibles o resistentes al desarrollo de obesidad, RI o DMT2.



XII. BIBLIOGRAFÍA



- Ahrens M. *et al.* DNA Methylation Analysis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Suggests Distinct Disease-Specific and Remodeling Signatures after Bariatric Surgery. *Cell Metab.* **18**, 296-302 (2013).
- Alao, J. P. *et al.* Selective inhibition of RET mediated cell proliferation in vitro by the kinase inhibitor SPP86. *BMC Cancer.* **14**, 853 (2014).
- Alexander, R. *et al.* MicroRNAs in adipogenesis and as therapeutic targets for obesity. *Expert Opin Ther Targets.* **15**, 623-636 (2011).
- Ali, A. T. *et al.* Adipocyte and adipogenesis. *Eur J Cell Biol.* **92**, 229–236 (2013),,,
- Alligier, M. *et al.* Subcutaneous adipose tissue remodeling during the initial phase of weight gain induced by overfeeding in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **97**, E183-92 (2012).
- Aragonès, G. *et al.* FABP4, función endotelial y grosor de la íntima-media carotídeo en pacientes con riesgo cardiovascular. *Clínica e Investig en Arterioscler.* **23**, 211–218 (2011).
- Arner, E. *et al.* Adipose Tissue MicroRNAs as Regulators of CCL2 Production in Human Obesity. *Diabetes.* **61**, 1986–1993 (2012).
- Aval, S. F. *et al.* The effect of ketorolac and triamcinolone acetonide on adipogenic and hepatogenic differentiation through miRNAs 16/15/195: Possible clinical application in regenerative medicine. *Biomed Pharmacother.* **97**, 675-683 (2018).
- Ba, H. *et al.* MicroRNA profiling of antler stem cells in potentiated and dormant states and their potential roles in antler regeneration. *Mol Genet Genomics.* **291**, 943-955 (2016).
- Banerjee, M. *et al.* Interleukin-1 (IL-1) family of cytokines: role in type 2 diabetes. *Clin Chim Acta.* **413**, 1163–70 (2012).
- Bansal, A. *et al.* DNA methylation and its role in the pathogenesis of diabetes. *Pediatr Diabetes.* **18**, 167–177 (2017).
- Barreyro, L. *et al.* Overexpression of IL-1 receptor accessory protein in stem and progenitor cells and outcome correlation in AML and MDS. *Blood.* **120**, 1290–1298. (2012).
- Bartel, D. P. MicroRNA Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell.* **136**, 215–233 (2009).

- Beermann, J. *et al.* Non-coding rnas in development and disease: background, mechanisms, and therapeutic approaches. *Physiol Rev.* **96**, 1297–1325 (2016).
- Boqué, N. *et al.* Some cyclin-dependent kinase inhibitors-related genes are regulated by vitamin C in a model of diet-induced obesity. *Biol Pharm Bull.* **32**, 1462–1468 (2009).
- Bozaoglu, K. *et al.* Plasma Levels of Soluble Interleukin 1 Receptor Accessory Protein Are Reduced in Obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* **99**, 3435–3443 (2014).
- Brennan, E. *et al.* Protective Effect of let-7 miRNA Family in Regulating Inflammation in Diabetes-Associated Atherosclerosis. *Diabetes.* **66**, 2266–2277 (2017).
- Brey, C. W. *et al.* Krüppel-like family of transcription factors : an emerging new frontier in fat biology. *Int J Biol Sci.* **5**, 622–636 (2009).
- Bustin, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* **25**, 169–193 (2000).
- Cabré, A. *et al.* FABP4 plasma levels are increased in familial combined hyperlipidemia. *J Lipid Res.* **51**, 1173–1178 (2010).
- Cao, Y. Adipose tissue angiogenesis as a therapeutic target for obesity and metabolic diseases. *Nat. Rev Drug Discov.* **9**, 107–115 (2010).
- Carmona-Saez, P. *et al.* GENECODIS : a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome Biol.* **8**, R3 1-8 (2007).
- Chang, S. *et al.* Gene regulation by RNA binding proteins and microRNAs in angiogenesis. *Trends Mol Med.* **17**, 650–658 (2011).
- Chen, H. *et al.* Application of microRNAs in diabetes mellitus. *J. Endocrinol.* **222**, R1–R10 (2014).
- Chen, J. *et al.* Identifying Candidate Genes for Type 2 Diabetes Mellitus and Obesity through Gene Expression Profiling in Multiple Tissues or Cells. *J Diabetes Res.* **2013**, 1-9 (2013).
- Chen, L. *et al.* MiR-146b is a regulator of human visceral preadipocyte proliferation and differentiation and its expression is altered in human obesity. *Mol. Cell. Endocrinol.* **393**, 65–74 (2014).
- Chou, W. W. *et al.* Decreased microRNA-221 is associated with high levels of TNF- α in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells from obese woman. *Cell. Physiol. Biochem.* **32**, 127–37 (2013).

- Christadoulides, C. *et al.* WNT10B mutations in human obesity. *Diabetología*. **49**, 678-684 (2006).
- Christadoulides, C. *et al.* Adipogenesis and WNT signalling. *Trends Endocrinol Metab.* **20**,16-24 (2009).
- Christiaens, V. *et al.* Angiogenesis and development of adipose tissue. *Mol. Cell. Endocrinol.* **318**, 2–9 (2010).
- Corvera, S. *et al.* Adipose tissue angiogenesis : Impact on obesity and type-2 diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1842**, 463–472 (2014).
- Crujeiras, A. *et al.* Leptin resistance in obesity: An epigenetic landscape. *Life Sci.* **140**, 57–63 (2015).
- Curtis, K. M. *et al.* EF1 alpha and RPL13 a represent normalization genes suitable for RT-qPCR analysis of bone marrow derived mesenchymal stem cells. *BMC Mol Biol.* **11**, 2-15 (2010).
- De Rosa, S. *et al.* Type 2 Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease: Genetic and Epigenetic Links. *Front Endocrinol.* **9**, 1-13 (2018).
- Deisenroth, C. *et al.* MYC is an early response regulator of human adipogenesis in adipose stem cells. *PLoS One.* **9**, e114133 (2014).
- Deiuliis, J. A. MicroRNAs as regulators of metabolic disease : pathophysiologic significance and emerging role as biomarkers and therapeutics. *Int. J. Obes.* **40**, 88–101 (2016).
- Delic, D. *et al.* Characterization of Micro-RNA Changes during the Progression of Type 2 Diabetes in Zucker Diabetic Fatty Rats. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1–16 (2016).
- Dhahri, W. *et al.* Reduced expression of let-7f activates TGF- β /ALK5 pathway and leads to impaired ischaemia-induced neovascularization after cigarette smoke exposure. *J Cell Mol Med.* **21**, 2308-2316 (2017).
- Dweep, H. *et al.* MiRWalk - Database: Prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. *J. Biomed. Inform.* **44**, 839–847 (2011).
- Egea, V. *et al.* Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) regulates mesenchymal stem cells through let-7f microRNA and Wnt/ β -catenin signaling. *PNAS.* **109**,E309-E316 (2012).
- Elías, I. *et al.* Adipose tissue overexpression of vascular endothelial growth factor protects against diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes.* **61**, 1801-1813 (2012).

- Engin, A. *et al.* Adipose Tissue Hypoxia in Obesity and Its Impact on Preadipocytes and Macrophages: Hypoxia Hypothesis. *Adv Exp Med Biol.* **960**, 305-326 (2017).
- Esteves-Rafols, M. Adipose tissue: Cell heterogeneity and functional diversity Tejido adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional. *Endocrinol Nutr.* **61**, 100–112 (2014).
- Farrokhi, A. *et al.* Appropriate reference gene selection for real-time PCR data normalization during rat mesenchymal stem cell differentiation. *Cell Mol Biol.* **58** (2012).
- Feng, J. *et al.* miR-21 attenuates lipopolysaccharide-induced lipid accumulation and inflammatory response: potential role in cerebrovascular disease. *Lipids Health Dis.* **13**, 1-9 (2014).
- Floresta, G. *et al.* Adipocyte fatty acid binding protein 4 (FABP4) inhibitors. A comprehensive systematic review. *Eur J Med Chem.* **138**, 854–873 (2017).
- Flowers, E. *et al.* Circulating microRNA-320a and microRNA-486 predict thiazolidinedione response: Moving towards precision health for diabetes prevention. *Metabolism.* **64**, 1051–1059 (2015).
- Franz, H. *et al.* The histone code reader SPIN1 controls RET signaling in liposarcoma. *Oncotarget.* **6**, 4773-4789 (2015).
- Frost, R. J. *et al.* Control of glucose homeostasis and insulin sensitivity by the Let-7 family of microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **108**, 21075–21080 (2011).
- Fu, Y. *et al.* Cx43 Isoform GJA1-20k Promotes Microtubule Dependent Mitochondrial Transport. *Front Physiol.* **8**, 1–12 (2017).
- Fuster, J. J. *et al.* Noncanonical Wnt signaling promotes obesity-induced adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction independent of adipose tissue expansion. *Diabetes.* **64**:1235-1248 (2014).
- García-Fuentes, E. *et al.* Hypoxia is associated with a lower expression of genes involved in lipogenesis in visceral adipose tissue. *J Transl Med.* **13**, 1-9 (2015).
- Gayoso-Diz, P. *et al.* Insulin resistance (HOMA-IR) cut-off values and the metabolic syndrome in a general adult population: effect of gender and age: EPIRCE cross-sectional study. *BMC Endocrine Disorders.* **13**, 1-10 (2013).
- Georgescu, A. *et al.* Dysfunction of human subcutaneous fat arterioles in obesity alone or obesity associated with Type 2 diabetes. *Clin Sci.* **120**, 463–472 (2011).

- Giardina, S. *et al.* Modulation of Human Subcutaneous Adipose Tissue MicroRNA Profile Associated with Changes in Adiposity-Related Parameters. *Mol Nutr Food Res.* **62**, 1700594 (2018).
- Golia, E. *et al.* Adipose tissue and vascular inflammation in coronary artery disease. *World J Cardiol.* **6**, 539–554 (2014).
- Gorán, M.I. *et al.* Targeting Adipose Tissue Inflammation to Treat the Underlying Basis of the Metabolic Complications of Obesity Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser.* **73**, 49-66 (2012).
- Gullicksen, P. S. *et al.* Leptin-induced adipose apoptosis : Implications for body weight regulation. *Apoptosis.* **8**, 327–335 (2003).
- Gustafson, B. *et al.* Insulin resistance and impaired adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab.* **26**,193–200 (2015).
- Hagberg, C. E. *et al.* Vascular endothelial growth factor B controls endothelial fatty acid uptake. *Nature.* **464**, 917–21 (2010).
- Hajer, G. R. *et al.* Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J.* **29**, 2959–2971 (2008).
- Harms, M. *et al.* Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med.* **19**, 1252–1263 (2013).
- Hsieh, C. H. *et al.* Weight-reduction through a low-fat diet causes differential expression of circulating microRNAs in obese C57BL/6 mice. *BMC Genomics.* **16**, 1-11 (2011).
- Hayashi, T. *et al.* Visceral adiposity and the prevalence of hypertension in Japanese Americans. *Circulation.* **108**, 1718–1723 (2003).
- Hirabara, S. M. *et al.* Molecular Targets Related to Inflammation and Insulin Resistance and Potential Interventions. *J Biomed Biotechnol.* **2012**, 1–16 (2012).
- Horton, J. D. *et al.* Critical review SREBPs : activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest.* **109**, 1125–1131 (2002).
- Howe, E.N. *et al.* The miR-200 and miR-221/222 microRNA Families: Opposing Effects on Epithelial Identity. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia.* **17**, 65-77 (2012).

- Huang, T. *et al.* A regulatory circuit of miR-125b/miR-20b and Wnt signalling controls glioblastoma phenotypes through FZD6-modulated pathways. *Nat Commun.* **7**, 1-16 (2016).
- Ibrahim, M. M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev.* **11**, 11–18 (2010).
- Inoue, K. *et al.* Possible Involvement of Opa-Interacting Protein 5 in Adipose Proliferation and Obesity. *PLoS One.* **9**, 1–11 (2014).
- Jabbarzadeh, E. *et al.* Induction of angiogenesis in tissue-engineered scaffolds designed for bone repair: A combined gene therapy – cell transplantation approach. *PNAS.* **105**, 11099-11104 (2008).
- Jahan, A. S. *et al.* Usp12 stabilizes the T-cell receptor complex at the cell surface during signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **113**, 705–14 (2016).
- Ji, H. *et al.* Air pollution , epigenetics , and asthma. *Allerg, Asthma Clin Immunol.* **12**, 1–14 (2016).
- Jia, Z. *et al.* RAP1B, a DVL2 binding protein, activates Wnt/beta-catenin signaling in esophageal squamous cell carcinoma. *Gene.* **611**, 15–20 (2017).
- Kim, H. *et al.* Hypothalamic Angptl4 / Fiaf Is a Novel Regulator of Food Intake and Body Weight. *Diabetes.* **59**, 2772-2780 (2010).
- Kim, V. *et al.* MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6**, 376–85 (2005).
- Kim, W. *et al.* Post-transcriptional regulation in metabolic diseases. *RNA Biology.* **9**, 772–780 (2012).
- Klie, M. *et al.* Identification of superior reference genes for data normalisation of expression studies via quantitative PCR in hybrid roses (*Rosa hybrida*). *BMC Res. Notes* **4**, 518 (2011).
- Klötting, N. *et al.* MicroRNA expression in human omental and subcutaneous adipose tissue. *PLoS One* **4**, e4699 (2009).
- Köllmer, M. *et al.* Markers Are Shared Between Adipogenic and Osteogenic Differentiated Mesenchymal Stem Cells. *J Dev Biol tissue Eng.* **5**, 18–25. (2013).
- Kong, X. *et al.* Glucocorticoids Transcriptionally Regulate miR-27b Expression Promoting Body Fat Accumulation Via Suppressing the Browning of White Adipose Tissue. *Diabetes.* **64**, 393–404 (2015).

- Koziński, K. *et al.* [Wnt signaling pathway--its role in regulation of cell metabolism]. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **67**, 1098–108 (2013).
- Kristensen, M. M. *et al.* miRNAs in human subcutaneous adipose tissue: Effects of weight loss induced by hypocaloric diet and exercise. *Obesity.* **25**, 572–580 (2017).
- Kwok, K. H. *et al.* Heterogeneity of white adipose tissue : molecular basis and clinical implications. *Mol. Med.* **48** (2016).
- Kyrou, I. *et al.* Clinical Problems Caused by Obesity. Editors: Leslie J De Groot. *Endotext.org.* (2014).
- Lagos-Quintana, M *et al.* Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science.* **294**, 853–858 (2001).
- Lapeire, L. *et al.* Cancer-associated adipose tissue promotes breast cancer progression by paracrine oncostatin M and Jak/STAT3 signaling. *Cancer Res.* **74**, 6806-6819 (2014).
- Lee, R. *et al.* The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843–854 (1993).
- Lee, S. *et al.* An improved and explicit surrogate variable analysis procedure by coefficient adjustment. *Biometrika.* **2**, 303-316 (2017).
- Leek, J. T. *et al.* Capturing Heterogeneity in Gene Expression Studies by Surrogate Variable Analysis. *PloS Genet.* **3**, 1724-1735 (2007).
- Lemoine, A. Y. *et al.* Adipose tissue angiogenesis in obesity. *Thromb. Haemost.* **110**, 661–668 (2013).
- Li, L. *et al.* Computational approaches for microRNA studies: a review. *Mamm Genome* **21**, 1–12 (2010).
- Liao, Z. J. *et al.* Transcriptional regulation of genes involved in liver-selective cell communication. *Journal of Southern Medical University.* **28**, 1582–1585 (2008).
- Lijnen, H. R. Angiogenesis and obesity. *Cardiovasc Res.* **78**, 286–293 (2008).
- Liu, H. *et al.* DNA Methylation Suppresses Expression of the Urea Cycle Enzyme Carbamoyl Phosphate Synthetase 1 (CPS1) in Human Hepatocellular Carcinoma. *AJPA.* **178**, 652–661 (2011).
- Liu, W. *et al.* LncRNA Gm15290 sponges miR-27b to promote PPAR γ -induced fat deposition and contribute to body weight gain in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* **493**, 1168–1175 (2017).

- Liu, X. *et al.* NAT10 regulates p53 activation through acetylating p53 at K120 and ubiquitinating Mdm2. *EMBO Rep.* **17**, 349–366 (2016).
- Makowsky, L. *et al.* The role of fatty acid binding proteins in metabolic syndrome and atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology.* **16**, 543–548 (2005).
- Mandard, S. *et al.* Nuclear Control of the Inflammatory Response in Mammals by Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *PPAR Res.* **2013**, 1–23 (2013).
- Marques-Rocha, J. L. *et al.* Expression of inflammation-related miRNAs in white blood cells from subjects with metabolic syndrome after 8 wk of following a Mediterranean diet – based weight loss program. *Nutrition.* **32**, 48–55 (2016).
- Matthews, D. *et al.* Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* **28**, 412–419 (1985).
- McIlwain, D. R. *et al.* Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **5**, 1–28 (2013).
- Meale, S. J. *et al.* Effect of diet on microRNA expression in ovine subcutaneous and visceral adipose tissues. *J. Anim. Sci.* **92**, 3328–3337 (2014).
- Medina-Gómez, G. *et al.* [Adipose tissue as a therapeutic target in obesity]. *Endocrinol. Nutr.* **56**, 404–11 (2009).
- Medina-Gomez, G. *et al.* Adipogenesis and lipotoxicity: role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and PPARgamma coactivator-1 (PGC1). *Public Health Nutr.* **10**, 1132–1137 (2007).
- Meerson, A. *et al.* Human adipose microRNA-221 is upregulated in obesity and affects fat metabolism downstream of leptin and TNF- α . *Diabetologia.* **56**, 1971–1979 (2013).
- Mi, H. *et al.* Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nat Protoc.* **8**, 1551-1566 (2013).
- Moran, S. *et al.* Validation of a DNA methylation microarray for 850,000 CpG sites of the human genome enriched in enhancer sequences. *Epigenomics.* **8**:389-399 (2016).
- Munetsuna, E. *et al.* Association of subcutaneous and visceral fat with circulating microRNAs in a middle-aged Japanese population. *Ann. Clin. Biochem. Int. J. Lab. Med.* **55**, 437-445 (2017).

- Murakami, S. *et al.* Trans-Homophilic Interaction of CADM1 Activates PI3K by Forming a Complex with MAGuK-Family Proteins MPP3 and Dlg. *PLoS One*. **9**, e110062 (2014).
- Nandipati, K. C. *et al.* Protein kinases: mechanisms and downstream targets in inflammation-mediated obesity and insulin resistance. *Mol Cell Biochem*. **426**, 27–45 (2017).
- Nouaille, S. *et al.* The stability of an mRNA is influenced by its concentration : a potential physical mechanism to regulate gene expression. *Nucleic Acids Res*. **45**, 11711–11724 (2017).
- Oliva-Olivera, W. *et al.* Myocardial Ischemic Subject's Thymus Fat: A Novel Source of Multipotent Stromal Cells. *PLoSOne*. **10**, e0144401 (2015).
- Olivares Reyes, J. *et al.* Bases moleculares de las acciones de la insulina. *REB*. **27**, 9–18 (2008).
- Paliwal, A. *et al.* Comparative Anatomy of Chromosomal Domains with Imprinted and Non-Imprinted Allele-Specific DNA Methylation. *PLoS Genet*. **9** (2013).
- Park, J. H. *et al.* Epigenetic modification by dietaryf actors: Implications in metabolic syndrome. *Mol Asp. Med* **54**, 58–70 (2017).
- Parmalee, N. L. *et al.* Wnt Signaling in Angiogenesis. *Curr Drug Targets*. **9**, 558–564 (2008).
- Pasquinelli, A. *et al.* Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* **408**, 86–89 (2000).
- Paul, B. *et al.* Influences of diet and the gut microbiome on epigenetic modulation in cancer and other diseases. *Clin. Epigenetics*. **7**, 1-11 (2015).
- Peng, J. *et al.* MiR-221 negatively regulates inflammation and insulin sensitivity in white adipose tissue by repression of sirtuin-1 (SIRT1). *J Cel. Biochem*. **119**, 6418-6428 (2017).
- Peng, Y. *et al.* MicroRNAs: Emerging roles in adipogenesis and obesity. *Cell. Signal*. **26**, 1888–1896 (2014).
- Pfaffl, M. W. *et al.* Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett*. **26**, 509–515 (2004).
- Poy, M. N. *et al.* MiR-375 maintains normal pancreatic α - and β - cell mass. *PNAS*. **106**, 5813–5818 (2009).

- Price, N. *et al.* MiRNA regulation of white and brown adipose tissue differentiation and function. *Biochim Biophys Acta*. **1861**, 2104–2110 (2017).
- Quian, Z. *et al.* Knockdown of CABYR-a/b increases chemosensitivity of human non-small cell lung cancer cells through inactivation of Akt. *Mol Cancer Res*. **12**, 335–47 (2014).
- Ramírez, C. M. *et al.* MicroRNA 33 regulates glucose metabolism. *Mol. Cell. Biol*. **33**, 2891–2902 (2013).
- Reis, M. *et al.* Wnt signaling in the vasculature. *Exp. Cell Res*. **319**, 1317–1323 (2013).
- Rico-Rosillo, M.G. *et al.* The role and importance of the microRNAs in the diagnosis and development of diseases. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. **52**, 302-307 (2014).
- Roca-Rodríguez, M. M. *et al.* Parathyroid Hormone-Related Protein, Human Adipose-Derived Stem Cells Adipogenic Capacity and Healthy Obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. **100**, E826–E835 (2015).
- Rodríguez Quesada, A. *et al.* Angiogénesis. *Univ de Málaga servicio de publicaciones e intercamb* (2004).
- Rodríguez, A. *et al.* Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. **309** (2015).
- Rodríguez-Artalejo, F. *et al.* Rationale and methods of the study on nutrition and cardiovascular risk in Spain (ENRICA). *Rev Esp Cardiol*. **64**, 876–82 (2011).
- Rönn, T. *et al.* Impact of age, BMI and HbA1c levels on the genome-wide DNA methylation and mRNA expression patterns in human adipose tissue and identification of epigenetic biomarkers in blood. *Hum Mol Genet* **24**, 3792–3813 (2015).
- Roy, H. *et al.* Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett*. **580**, 2879-2887 (2006).
- Rupnick, M. *et al.* Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *PNAS*. **99**, 10730-10735 (2002).
- Sales, V. *et al.* Epigenetic Mechanisms of Transmission of Metabolic Disease across Generations. *Cell Metab*. **25**, 559–571 (2017).
- Seo, K-W. *et al.* ZNF281 knock down induced osteogenic differentiation of human multipotent stem cells in vivo and in vitro. *Cell Transplant*. **22**, 29–40 (2013).

- Shah, R. *et al.* Metabolic Effects of CX3CR1 Deficiency in Diet-Induced Obese Mice. *PLoS One*. **10**, e013831 (2015).
- Shi, C. *et al.* Adipogenic miRNA and meta-signature miRNAs involved in human adipocyte differentiation and obesity. *Oncotarget*. **5**, 1–16 (2016).
- Shivakumar, M. *et al.* The miR-200 and miR-221/222 microRNA Families: Opposing Effects on Epithelial Identity. *BMC Medical Genomics*. **10**, 65-75 (2017).
- Singh, R. *et al.* Differential Effects of JNK1 and JNK2 Inhibition on Murine Steatohepatitis and Insulin Resistance. *Hepatology* **49**, 87–96 (2009).
- Singh, S. *et al.* ETS proteins and MMPs: partners in invasion and metastasis. *Curr Drug Targets*. **3**, 359-367 (2002).
- Son, Y. H. *et al.* Regulation of Adipocyte Differentiation via MicroRNAs. *Endocrinol. Metab.* **29**, 122–135 (2014).
- Song, M. G. *et al.* Depot-specific differences in angiogenic capacity of adipose tissue in differential susceptibility to diet-induced obesity. *Mol Metab.* **5**, 1113–1120 (2016).
- Sontheimer, E. J. *et al.* Silence from within : Endogenous siRNAs and miRNAs. *Cell*. **122**, 9–12 (2005).
- Spinetti, G. *et al.* Global Remodeling of the Vascular Stem Cell Niche in Bone Marrow of Diabetic Patients : Implication of the microRNA-155/FOXO3a Signaling Pathway. *Circ Res*. **112**, 510–522 (2013).
- Srinivasan, S. *et al.* MicroRNAs -the next generation therapeutic targets in human diseases. *Theranostics*. **3**, 930–942 (2013).
- Suárez, Y. *et al.* MicroRNAs as novel regulators of angiogenesis. *Circ. Res.* **104**, 442–54 (2009).
- Sung, H-K. *et al.* Adipose vascular endothelial growth factor regulates metabolic homeostasis through angiogenesis. *Cell Metab.* **17**, 61–72 (2013).
- Suraweera, N. *et al.* Mutations within Wnt pathway genes in sporadic colorectal cancers and cell lines. *Int J Cancer*. **119**: 1837–1842 (2006).
- Takahashi, M. *et al.* Downregulation of WDR20 due to loss of 14q is involved in the malignant transformation of clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Sci*. **107**, 417–23 (2016).
- Tchernof, A. *et al.* Pathophysiology of human visceral obesity : an update. *Physiol Rev*. **93**, 359–404 (2013).

- Thomas, P. D. *et al.* PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Res.* **13**, 2129–2141 (2003).
- Thomé, J. G. *et al.* Circulating microRNAs in obese and lean heart failure patients: A case-control study with computational target prediction analysis. *Gene.* **574**, 1–10 (2015).
- Tinahones, F. CIBEROBN (2016). at <<http://www.ciberobn.es/noticias/investigadores-del-ciberobn-evidencian-la-existencia-de-personas-delgadas-metabolicamente-enfermas>>
- Tinahones, F. J. *et al.* Caspase induction and BCL2 inhibition in human adipose tissue: a potential relationship with insulin signaling alteration. *Diabetes Care.* **36**, 513–521 (2013).
- Tinahones, F. J. *et al.* Obesity-associated insulin resistance is correlated to adipose tissue vascular endothelial growth factors and metalloproteinase levels. *BMC Physiol.* **12**, 4 (2012).
- Uysal, K. *et al.* Improved glucose and lipid metabolism in genetically obese mice lacking aP2. *Endocrinology.* **141**, 3388–3396 (2000).
- Vague, J. La différenciation sexuelle; facteur déterminant des formes de l'obésité. *Press. Med.* **55**, 339 (1947).
- Valdés, S. *et al.* Prevalence of obesity, diabetes and other cardiovascular risk factors in Andalusia (southern Spain). Comparison with national prevalence data. The Di@bet.es study. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed.)*. **67**, 442–448 (2014).
- Van De Pette, M. *et al.* Cdkn1c Boosts the Development of Brown Adipose Tissue in a Murine Model of Silver Russell Syndrome. *PLoS Genet* **12** (2016).
- Vasudevan, S. *et al.* Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science.* **318**, 1931–1934 (2007).
- Vienberg, S. *et al.* MicroRNAs in metabolism. *Acta Physiologica.* 219, 346–361 (2017).
- Viesti A Collares, R. *et al.* The expression of LEP, LEPR, IGF1 and IL10 in obesity and the relationship with microRNAs. *PLoS One.* **9** (2014).
- Villard, A. *et al.* Diagnostic Value of Cell-free Circulating Micrnas for Obesity and Type 2 Diabetes: A Meta-analysis. *J Mol Biomark Diagn.* **6**,1-21 (2015).
- Wang, C.Y. *et al.* A Mouse Model of Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance. *Methods Mol Biol.* **821**, 421–433 (2012).

- Wang, W. *et al.* Preeclampsia up-regulates angiogenesis-associated microRNA (i.e., miR-17, -20a, and -20b) that target ephrin-B2 and EPHB4 in human placenta. *J Clin Endocrinol Metab.* **97**, E1051-E1059 (2012).
- Whitaker, J. W. *et al.* Predicting the Human Epigenome from DNA Motifs. *Nat Methods.* **12**, 265–272 (2015).
- Xu, A. *et al.* Circulating Adipocyte – Fatty Acid Binding Protein Levels Predict the Development of the Metabolic Syndrome A 5-Year Prospective Study. *Circulation.* **115**, 1537–1543 (2007).
- Xu, J. *et al.* β -catenin regulates c-Myc and CDKN1A expression in breast cancer cells. *Mol Carcinog.* **55**, 431-439 (2016).
- Xu, W. *et al.* Differential Roles of Cell Death-inducing DNA Fragmentation Factor- α -like Effector (CIDE) Proteins in Promoting Lipid Droplet Fusion and Growth in Subpopulations of Hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **291**, 4282–4293 (2016).
- Yang, R. *et al.* Activation of the Wnt/ β -catenin pathway by an inflammatory microenvironment affects the myogenic differentiation capacity of human laryngeal mucosa mesenchymal stromal cells. *Stem Cells Dev.* **27**, 771-782 (2018).
- Yu, B. *et al.* MiR-221 and miR-222 promote Schwann cell proliferation and migration by targeting LASS2 after sciatic nerve injury. *Journal of Cell Science.* **25**, 2675–2683 (2012).
- Zampetaki, A. *et al.* Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circ Res.* **107**, 810–817 (2010).
- Zampetaki, A. *et al.* MicroRNAs in vascular and metabolic disease. *Circ. Res.* **110**, 508–522 (2012).
- Zhang, R. *et al.* Screening of microRNAs associated with Alzheimer’s disease using oxidative stress cell model and different strains of senescence accelerated mice. *J Neurol Sci.* **338**, 57–64 (2014).
- Zheng C. *et al.* MiR-221 expression affects invasion potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting DVL2. *Med. Oncol.* **29**, 815–822 (2012).
- Zhou, L. *et al.* Downregulation of miR-221/222 by a microRNA sponge promotes apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells through upregulation of PTEN. *Oncol Lett.* **12**, 4419–4426 (2016).

Zuk, P. A. *et al.* Multi lineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* **7**, 211–228 (2001).

XIII. ARTÍCULOS QUE AVALAN LA TESIS

1. Gentile AM et al. *RPL13A and EEF1A1 Are Suitable Reference Genes for qPCR during Adipocyte Differentiation of Vascular Stromal Cells from Patients with Different BMI and HOMA-IR*. **PlosOne**. 2016 Jun 15; 11(6): e0157002. Doi:10.1371/journal.pone.0157002. eCollection 2016. PMID: 27304673
2. Gentile AM et al. *MiR-20b, miR-296 and Let-7f expression in human adipose tissue is related to obesity and type 2 diabetes*. **Obesity**. 2018 (En prensa).

