



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MICROARNs DESREGULADOS POR ACCIÓN DEL TNFA EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD Y LA RESISTENCIA A LA INSULINA

Javier Lozano Bartolomé

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



**UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI**

**Identificación y caracterización funcional de
microARNs desregulados por acción del TNF α en el
contexto de la Obesidad y la Resistencia a la Insulina**

JAVIER LOZANO BARTOLOMÉ



**TESIS DOCTORAL
2018**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MICROARNS DESREGULADOS POR ACCIÓN DEL TNFA
EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD Y LA RESISTENCIA A LA INSULINA
Javier Lozano Bartolomé

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MICROARNS DESREGULADOS POR ACCIÓN DEL TNFA
EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD Y LA RESISTENCIA A LA INSULINA
Javier Lozano Bartolomé

Javier Lozano Bartolomé

**Identificación y caracterización
funcional de microARNs desregulados por
acción del TNF α en el contexto de la
Obesidad y la Resistencia a la Insulina**

Tesis Doctoral

Dirigida por la Dra. Matilde Rodríguez Chacón

Departamento de Medicina y cirugía



UNIVERSITAT ROVIRA i VIRGILI

Tarragona 2018

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MICROARNS DESREGULADOS POR ACCIÓN DEL TNFA
EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD Y LA RESISTENCIA A LA INSULINA
Javier Lozano Bartolomé



Departamento de Medicina y Cirugía

C/ Sant Llorenç, 21
43203 – Reus (Tarragona)
Teléfono: 977 759 305
Fax: 977 759 322

Dra. Matilde Rodríguez Chacón, Investigadora Miguel Servet Consolidada y responsable del grupo de Investigación en Biomarcadores de Enfermedades y Mecanismos Moleculares (DIBIOMECA) del Instituto de Investigación Sanitaria Pere Virgili. Hospital Universitario Joan XXIII de Tarragona.

CERTIFICA QUE:

La tesis doctoral “**Identificación y caracterización funcional de microARNs desregulados por acción del TNF α en el contexto de la Obesidad y la Resistencia a la Insulina**”, presentada por **Javier Lozano Bartolomé** ha sido realizada bajo mi dirección en el Instituto de Investigación Sanitaria Pere Virgili y cumple los requisitos necesarios para optar al título de Doctor con Mención Internacional.

En Tarragona, a 15 de febrero de 2018

La directora de la tesis doctoral

Dra. Matilde Rodríguez Chacón

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MICROARNS DESREGULADOS POR ACCIÓN DEL TNFA
EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD Y LA RESISTENCIA A LA INSULINA
Javier Lozano Bartolomé

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MICROARNS DESREGULADOS POR ACCIÓN DEL TNFA
EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD Y LA RESISTENCIA A LA INSULINA
Javier Lozano Bartolomé

A mi familia

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MICROARNS DESREGULADOS POR ACCIÓN DEL TNFA
EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD Y LA RESISTENCIA A LA INSULINA
Javier Lozano Bartolomé

*“La verdadera ciencia enseña, por encima
de todo, a dudar y a ser ignorante.”*

Miguel de Unamuno

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MICROARNS DESREGULADOS POR ACCIÓN DEL TNFA
EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD Y LA RESISTENCIA A LA INSULINA
Javier Lozano Bartolomé

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi gratitud a todas las personas que han hecho posible la elaboración de esta tesis.

En primer lugar, le doy las gracias a mi directora de tesis la Dra. Matilde Rodríguez Chacón por todo el soporte que me ha brindado y que me ha hecho crecer cada día como investigador durante los últimos cuatro años.

A todos mis amigos de la “Unitat B de Recerca en el Hospital Joan XXIII”, que desde el primer día me han hecho sentir completamente arropado. Gracias por todo lo compartido. “Cx1P”, arreglando el mundo cada día y bien temprano.

A mi familia que tanto extraño desde la lejanía, pero que, a pesar de ello, siempre han estado cerca de mí y nunca me ha faltado ni su cariño ni su apoyo.

A mis amigos Álex, Guille, Noe, Conchi y Javirolo, a los que quiero como hermanos; con vosotros he crecido.

A Agnès, mi compañera de camino, quien *m'enlaira* con su sonrisa todos los días. Gracias por confiar en mí, aun cuando más he dudado de mi mismo. También te agradezco de todo corazón el diseño de las cubiertas de esta tesis, que han quedado magníficas.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MICROARNS DESREGULADOS POR ACCIÓN DEL TNFA
EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD Y LA RESISTENCIA A LA INSULINA
Javier Lozano Bartolomé

Índice

| | |
|--|-----------|
| I. ABREVIACIONES..... | 15 |
| II. SUMMARY..... | 23 |
| III. INTRODUCCIÓN..... | 31 |
| 1. Obesidad..... | 33 |
| 1.1. Definición de la obesidad. Prevalencia | 33 |
| 1.2. Complicaciones asociadas a la obesidad..... | 34 |
| 1.2.1. <i>El síndrome metabólico (SM)</i> | 35 |
| 1.2.2. <i>Tolerancia a la glucosa, Resistencia a la insulina (RI) y diabetes mellitus tipo 2 (DM2)</i> | 37 |
| 2. Tejido adiposo | 40 |
| 2.1. Tipos de Tejido adiposo..... | 40 |
| 2.1.1. <i>Tejido adiposo blanco</i> | 40 |
| 2.1.2. <i>Tejido adiposo Marrón</i> | 41 |
| 2.1.3. <i>Tejido adiposo Beige</i> | 43 |
| 2.2. Adipogénesis del TAB..... | 44 |
| 2.3. Distribución anatómico-funcional del TAB..... | 45 |
| 2.3.1. <i>Expansión del tejido adiposo</i> | 47 |
| 2.4. Función endocrina del TAB..... | 50 |
| 3. Señalización de la insulina y homeostasis de la glucosa en el adipocito ... | 51 |
| 3.1. Reguladores negativos de la señalización de insulina..... | 53 |
| 4. Inflamación y RI en el tejido adiposo obeso | 56 |
| 4.1. Macrófagos del tejido adiposo | 57 |
| 4.2. Mecanismos desencadenantes de la inflamación en la obesidad | 60 |
| 4.3. Citoquinas | 66 |
| 4.3.1. <i>TNFα y RI en el adipocito</i> | 69 |
| 5. MicroARNs (miRNAs) | 72 |
| 5.1. Introducción a los miRNAs | 72 |
| 5.1.1. <i>Descubrimiento de los miRNAs</i> | 72 |
| 5.1.2. <i>Nomenclatura de los miRNAs</i> | 73 |
| 5.1.3. <i>Codificación y Clasificación de miRNAs</i> | 74 |
| 5.1.4. <i>Transcripción y procesamiento de miRNAs en células animales</i> | 74 |
| 5.1.5. <i>Mecanismos de acción de los miRNAs</i> | 77 |
| 5.1.6. <i>Herramientas de predicción de dianas de miRNAs</i> | 79 |
| 5.2. miRNAs, obesidad y RI..... | 81 |
| 5.2.1. <i>miRNAs alterados en TAB en obesidad</i> | 81 |
| 5.2.2. <i>miRNAs reguladores de la adipogénesis</i> | 83 |

| | |
|---|------------|
| 5.2.3. <i>miRNAs alterados por la Inflamación y RI</i> | 84 |
| 5.2.4. <i>miRNAs en otros tejidos metabólicos</i> | 90 |
| 5.3. <i>miRNAs circulantes</i> | 92 |
| 5.4. <i>Aplicaciones terapéuticas de los miRNAs</i> | 97 |
| IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 101 |
| V. MATERIALES Y MÉTODOS | 105 |
| 1. Cultivo celular | 107 |
| 1.1. Línea celular primaria de preadipocitos humanos | 107 |
| 1.2. Línea adipocítica humana SGBS (síndrome de Simpson-Golabi-Behmel) | 108 |
| 1.3. Línea embrionaria humana de riñón (HEK) 293 | 111 |
| 2. Extracción de ARN y Análisis de expresión génica | 112 |
| 2.1. Extracción y purificación de ARN total de cultivos celulares (crecimiento en monocapa) | 112 |
| <i>Protocolo: miRCURYTM – Cell&Plant (Exiqon, Dinamarca)</i> | 112 |
| <i>Protocolo: RNeasy Mini Kit (QIAGEN, EEUU)</i> | 113 |
| 2.2 Extracción de ARN de muestras de tejido adiposo | 115 |
| <i>Protocolo: RNeasy LIPID TISSUE MIDI (Qiagen, EEUU)</i> | 115 |
| 2.3 Extracción de ARN de muestras de suero de sangre periférica | 117 |
| <i>Protocolo: miRCURYTM RNA Isolation Kit- Biofluids</i> | 117 |
| 2.4 Expresión de miRNAs | 118 |
| 2.5 Expresión génica de citoquinas y marcadores celulares | 123 |
| 3. Búsqueda de potenciales dianas para miRNAs | 126 |
| 3.1. Miranda-mirSVR | 126 |
| 3.2. MicroT-CDS. Diana Labs. | 128 |
| 4. Transfecciones transitorias de miRNAs mediante la técnica de Lipotransfección en adipocitos SGBS diferenciados | 130 |
| 4.1. Preparación de complejos de lipotransfección | 130 |
| 4.2. Sobreexpresión de miRNAs en adipocitos SGBS previa a tratamiento con Insulina en presencia o ausencia de TNF α | 133 |
| 5. Extracción de proteína y análisis por la técnica del Western Blot | 134 |
| 5.1. Extracción de proteína | 134 |
| 5.2. Cuantificación de proteína | 134 |
| <i>Protocolo: Pierce BCA Protein Assay</i> | 135 |
| 5.3. Western blot | 136 |
| 6. Ensayos de luciferasa | 141 |
| 7. Estudio poblacional | 144 |
| 7.1. Selección de pacientes | 144 |
| <i>Cohorte 1: Biopsias de tejido adiposo visceral y subcutáneo</i> | 144 |

| | |
|--|------------|
| <i>Cohorte 2: Muestras de suero de pacientes del estudio transversal</i> | |
| <i>Di@bet.es145</i> | |
| <i>Cohorte 3: Estudio prospectivo PIZARRA</i> | 145 |
| 7.2. Recolección de muestras..... | 146 |
| <i>Cohorte 1: Biopsias de tejido adiposo visceral y subcutáneo</i> | 146 |
| <i>Cohorte 2: muestras de suero del estudio Di@bet.es</i> | 147 |
| <i>Cohorte 3: muestras de suero del estudio PIZARRA</i> | 147 |
| 7.3. Medidas clínicas y antropométricas..... | 148 |
| 7.4. Métodos analíticos..... | 148 |
| 7.5. Procesamiento de las muestras..... | 149 |
| 8. Análisis estadístico | 151 |
| 8.1. Estudios <i>in vitro</i> | 151 |
| 8.2. Estudio poblacional..... | 151 |
| <i>Modelo Univariante</i> | 152 |
| <i>Modelos multivariantes</i> | 152 |
| VI. RESULTADOS | 155 |
| 1. Selección de miRNAs | 157 |
| 2. Determinación de perfiles de expresión de los miRNAs seleccionados en adipocitos humanos primarios previamente estimulados con TNFα | 160 |
| 3. Expresión de miR-181a-5p, miR-23a-3p y miR-155-5p en línea humana de adipocitos (SGBS) bajo estímulo de TNFα | 164 |
| 4. Expresión de miRNAs de miR-181a-5p, miR-23a-3p y miR-155-5p en tejido adiposo visceral y subcutáneo humano de pacientes con y sin obesidad | 166 |
| 4.1. Expresión de miR-181a-5p, miR-23a-3p y miR-155-5p en el tejido adiposo humano en función del grado de tolerancia a la glucosa..... | 170 |
| 4.2. Estudio de correlaciones bivariadas entre el perfil clínico y los datos antropométricos de los pacientes del estudio y la expresión de miR-181a-5p, miR-23a-3p y miR-155-5p en las biopsias de TAS y TAV..... | 172 |
| 5. Implicación de miR-181a-5p y miR-23a-3p en la ruta de la insulina en adipocitos humanos | 175 |
| 5.1. Evaluación del efecto preventivo de miR-181a-5p y miR-23a-3p sobre RI inducida por TNF α en adipocitos humanos <i>in vitro</i> | 178 |
| 5.2. PTEN y S6K se identifican como genes diana para miR-181a-5p y miR-23a-3p..... | 180 |
| 6. Análisis de los niveles circulantes en suero de miR-181a-5p y miR-23a-3p | 186 |
| 6.1. En pacientes del estudio PIZARRA, que desarrollan prediabetes después de 4 años de seguimiento. Estudio prospectivo..... | 186 |

| | |
|--|------------|
| 6.1.1. Estudio de correlaciones bivariadas entre variables clínicas y antropométricas a tiempo basal y niveles circulantes de miR-181a-5p y miR-23a-3p | 191 |
| 6.1.2. Estudio del valor potencial de miR-181a-5p en el pronóstico de prediabetes | 193 |
| 6.1.3. Modelos multivariantes de predicción de prediabetes | 194 |
| 6.2. En pacientes con DM2 del estudio di@bet.es. Estudio transversal | 199 |
| VII. DISCUSIÓN..... | 203 |
| VIII. CONCLUSIONS | 223 |
| IX. BIBLIOGRAFÍA..... | 229 |
| X. PUBLICACIONES OBTENIDAS DURANTE LA TESIS DOCTORAL..... | 257 |

I. ABREVIACIONES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MICROARNS DESREGULADOS POR ACCIÓN DEL TNFA
EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD Y LA RESISTENCIA A LA INSULINA
Javier Lozano Bartolomé

#

3'UTR: región 3' del ARNm no traducida

A

ADNc: ADN complementario

AGL: ácidos grasos libres

Ago: proteína argonauta

AKT (PKB): proteína quinasa B

ALAT: alanina aminotransferasa

ARNm: ARN mensajero

ASAT: aspartato aminotransferasa

ATM: macrófago de tejido adiposo

AUC: área bajo la curva

C

C / EBP: *CCAAT/enhancer-binding protein*

CDS: secuencias codificantes

CCR4-NOT: *carbon catabolite repressor 4 – negative on TATA*

CLS: estructuras similares a coronas

CLT: complejos de Lipotransfección

CN: control negativo de *mimics*

CRISPR-Cas9: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats- associated protein-9 nuclease*

CSF1: factor estimulante de colonias 1

CXCL5: quimioquina 5 con motivo C-X-C

D

DAG: diacilglicerol

DAMP: patrones moleculares asociados a daño celular

DGGR8: *DiGeorge syndrome chromosomal region 8*

DM2: *diabetes mellitus* de tipo 2

E

E.E.: error estándar de la media

ECACC: Colección Europea de Cultivos Celulares Autenticados

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EGIR: Grupo Europeo para el Estudio de Resistencia a la Insulina

eIF4: factor de iniciación eucariota 4

ERE: Estrés de retículo Endoplasmático

F

FABP4: proteína de unión a ácidos Grasos 4

FBS: suero fetal bovino

FEV: fracción estromal vascular

FOXA2: proteína *forkhead-box A2*

FOXC2: proteína *forkhead-box C2*

FOXO1: proteína *forkhead-box O1*

G

GATA2: proteína de unión a motivos GATA 2

GATA3: proteína de unión a motivos GATA 3

GGT: *gamma* glutamil transferasa

GLUT4: transportador de glucosa de tipo 4

GM3: monosialogangliósido 3

GM-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos

Grb: proteína de unión a receptores de crecimiento

GSK3 β : glucógeno sintasa quinasa 3 *beta*

GTP: guanosina trifosfato

H

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

HDL: lipoproteína de Alta densidad

HEPES: ácido 4(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico

HIF-1 α : factor 1 alfa de inducción de la hipoxia

HOMA-IR: índice de resistencia a la insulina

I

IBMX: 3-isobutil-1-metilxantina

ICC: índice cintura/cadera

iCN: control negativo de inhibidores de miRNAs

IDF: Federación Internacional de Diabetes

IDH1: isocitrato deshidrogenasa 1

IKK β : subunidad *beta* del inhibidor de la quinasa de NF κ B

IL-1 β : interleuquina 1 *beta*

IL-4: interleuquina 4

IL-6: interleuquina 6

IL-8: interleuquina 8

IL-12: interleuquina 12

IL-13: interleuquina 13

IL-23: interleuquina 23

IMC: índice de masa corporal

iNKT: célula T *natural killer* invariante

INSR: receptor de insulina

IRAK1: quinasa 1 asociada al receptor de IL-1

IRS: substrato del INSR

J

JNK: quinasa c-Jun N-terminal

K

kDa: kiloDalton

L

LDL: lipoproteína de baja densidad

LPS: lipopolisacárido

luc-PTEN 3'UTR: vector indicador de luciferasa fusionada a 3' UTR de *PTEN*

luc-S6K 3'UTR: vector indicador de luciferasa fusionada a 3' UTR de *S6K*

M

M1: macrófago activado por vía clásica

M2: macrófago activado por vía alternativa

MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno

MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos 1

M-CSF: factor estimulante de colonias de monocitos

Mimic: miRNA maduro sintético

miRISC: complejo de silenciamiento inducido por miRNA

miRNA: microARN

MRE: Elementos de reconocimiento de los miRNAs

mTOR: diana de rapamicina en mamíferos

N

NCEP ATP III: Guía para el Tratamiento en Adultos III del Programa Nacional de Educación en Colesterol

NFκB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras *kappa* de las células B activadas

NLR: receptores *NOD-like*

NLRP3: *NLR Family Pyrin Domain Containing 3*

nt: nucleótido/s

O

OMS: Organización Mundial de la Salud

P

P38: proteína de 38 kDa

PABP: proteína de unión a poliadeninas

PAD: presión arterial diastólica

PAN2-PAN3: complejo de nucleasas de poliadenina 2 y 3

PAS: presión arterial sistólica

PAZ: PIWI-AGO-ZWILLE

PBS: tampón fosfato salino

PCOS: Síndrome del ovario poliquístico

P-C-R: Proteína C Reactiva

PDK1: Quinasa 1 dependiente de fosfatidilinositol

PHLPP: fosfatasa con dominios de homología a Pleckstrina y repeticiones de leucinas

PI3K: fosfatidil inositol 3 quinasa

PLS-DA: Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales

Pol II: ARN polimerasa II

PP2A: proteína fosfatasa 2A

PPAR γ : receptor activado por proliferadores de peroxisomas *gamma*

PPIA (CYP): peptidilpropil isomerasa A (Ciclofilina A)

Prox1: *prospero homeobox protein 1*

PRR: receptores de reconocimiento de patrones

PTEN: fosfatasa y homólogo de tensina

Q

qRT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo Real

R

RBP4: proteína de unión a retinol 4

REDOX: niveles de óxido-reducción en suero

RI: resistencia a la insulina

RL: regresión logística

RLU: unidades relativas de luz

RNasa: ribonucleasa

ROC: característica operativa del receptor

ROS: especie reactiva de oxígeno

S

S/T: sin tratamiento

S6K: proteína quinasa S6 ribosomal

SAA: amiloide sérico tipo A

SDS: dodecilsulfato sódico

SFR5: *Frizzled related protein 5*

SGBS: síndrome de Simpson Golabi Behmel

SHBG: globulina de unión a hormonas sexuales

SHIP2: *SH2-containing 5'-inositol phosphatase 2*

SIRT-1: sirtuína 1

SM: síndrome metabólico

Smad: *mothers against decantaplegic homolog*

snRNU6: ARN pequeño nuclear U6

SOCS: Supresor de la Señalización de Citoquinas

SREBP1c: proteína de unión a elementos reguladores de esterol 1c

T

TAB: Tejido Adiposo Blanco

TACE (ADAM17): enzima
convertidora de TNF α

TAM: tejido adiposo marrón

TAS: tejido adiposo subcutáneo

TAV: tejido adiposo visceral

Tcf7l2: *transcription factor 7-like 2*

TGF β : factor de crecimiento
transformante *beta*

Th: linfocito T colaborador

TNFR1: receptor de TNF α de tipo I

TNFR2: receptor de TNF α tipo II

TNF α : factor de necrosis tumoral
alfa

TRAF6: factor 6 asociado al
Receptor de TNF

Treg: linfocito T regulador

TRBP: *HIV-1 TAR RNA binding
protein*

TTOG: test de tolerancia oral a la
glucosa

U

UCP-1: proteína desacopladora 1

UPR: respuesta a proteínas mal
plegadas

V

VIP: importancia de la variable en
proyección

W

W-C: unión Watson-Crick

Wisp2: *WNT1-inducible signaling
pathway protein 2*

Wnt: *Wingless-type MMTV
integration site*

X

XPO5: exportina 5

Z

ZAG: glicoproteína Zinc- α 2

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MICROARNS DESREGULADOS POR ACCIÓN DEL TNFA
EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD Y LA RESISTENCIA A LA INSULINA
Javier Lozano Bartolomé

II. SUMMARY

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MICROARNS DESREGULADOS POR ACCIÓN DEL TNFA
EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD Y LA RESISTENCIA A LA INSULINA
Javier Lozano Bartolomé

Background and aims

Chronic inflammation has an important role in the pathogenesis of obesity and type 2 *diabetes mellitus* (T2DM). Obese adipose tissue is characterized by an increase in macrophage infiltration and by elevated levels of adipokines and inflammatory cytokines, such as monocyte chemoattractant protein-1, tumor necrosis factor alpha (TNF α) and interleukin-6, which are produced not only by adipocytes, but also by adipose tissue infiltrating macrophages. As a consequence of this inflammatory environment, insulin signaling in adipose tissue is impaired and local and systemic insulin resistance (IR) occurs.

TNF α has been identified as a major mediator in the development of IR during obesity. Indeed, chronic exposure of adipocytes to low concentrations of TNF α dramatically reduces glucose uptake upon insulin stimulation. It has been previously described that TNF α directly interferes with insulin signaling by inhibiting the auto-phosphorylation of its receptor and the phosphorylation of its substrate, IRS-1, which consequently blocks the biological actions of insulin. However, the mechanisms involved in mediating these effects are not yet fully understood.

MicroRNAs (miRNAs) are highly conserved non-coding RNA molecules (19–21 base pairs) that function to negatively regulate gene expression, either by degrading mRNA transcripts or by repressing protein translation. Previous studies have documented alterations in the expression of miRNAs in insulin-sensitive tissues (liver, muscle, endothelium and adipose tissue, among others) in obese and/or diabetic patients, suggesting that miRNAs are implicated in these pathologies. Consistent with this is the finding that miRNAs are emerging as key regulators of metabolism. Accordingly, the deregulation of miRNA

expression may contribute to metabolic abnormalities. All these data indicate that miRNAs may be potential therapeutic targets to alleviate or improve complications from metabolic disorders such as obesity and T2DM. In addition, the presence of circulating miRNAs in biological fluids, such as serum, raises the possibility that they serve as signaling molecules and possible biomarkers of endocrine diseases. Changes in miRNA expression in response to abnormal levels of cytokines can cause alterations in cellular homeostasis. In this respect, TNF α is directly involved in the modulation of several miRNAs in diverse cell types, including immune and endothelial cells. While the modulation of miRNAs by TNF α in adipose tissue has been extensively described, very little is known about their role in regulation of the insulin pathway in mature adipocytes and, accordingly, the underlying mechanisms that connect miRNAs and TNF α -induced IR in mature adipocytes of obese adipose tissue remains enigmatic.

Methodology

The expression of 25 selected miRNAs was determined in human adipocytes following an inflammatory stimulus induced by TNF α to model IR. The selected miRNA candidates showing a change in expression of 30% after TNF α stimulation (miR-181a-5p, miR-23a-3p and miR-155-5p) were analyzed by qRT-PCR from paired biopsies of subcutaneous (SAT) and visceral (VAT) adipose tissue. Adipose tissue biopsies corresponded to an age- and sex-matched cohort of patients stratified according to their body mass index (BMI) <30 (N = 30) and BMI \geq 30 (N = 28), and glucose tolerance status.

The function of both miR-181a-5p and miR-23a-3p in the insulin pathway was evaluated in transient overexpression experiments using mimic-miRNAs in mature SGBS (Simpson-Golabi-Behmel Syndrome)

adipocytes, which were stimulated with insulin or insulin plus TNF α . The levels of phosphorylated (p)AKT and AKT substrate of 160 kDa (pAS160) were measured as surrogate markers of insulin signaling.

Using target prediction algorithms for miRNAs (miRanda-mirSVR and microT-CDS), potential regulators of the insulin pathway were identified that could be modulated by miR-181a-5p and miR-23a-3p, and PTEN and S6K were selected as the best candidates. miRNA binding to PTEN and S6K were experimentally validated by luciferase reporter assays in HEK293 cells, and by measuring their endogenous protein levels in SGBS adipocytes transfected with mimics or miRNA inhibitors.

The potential value of miR-181a-5p and miR-23a-3p as prognostic markers was assessed by measuring serum circulating levels in a cohort of 101 normoglycemic subjects selected from the PIZARRA study (48 diagnosed pre-diabetic and 53 remaining normoglycemic), followed for 4 years. The selected miRNAs were also tested in a cohort of age-, sex- and BMI-matched patients, selected from the Di@bet.es study (50 controls and 50 subjects with T2DM).

Results

We found that TNF α significantly affected the expression of 3 out of the 25 miRNAs selected in our study (miR-181a-5p, miR-23a-3p and miR-155-5p) in human adipocytes. miR-155 is a well known TNF α -inducible miRNA and served as a positive control. Our results showing the reduced expression of miR-181a-5p and miR-23a-3p following TNF α treatment in mature human adipocytes is a novel finding.

In human adipose tissue, miR-181a-5p and miR-23a-3p were downregulated in VAT with respect to SAT, indicating that they could be actively involved in VAT function, which is closely linked to obesity-

related comorbidities. The expression of both miR-181a-5p and miR-23a-3p was significantly lower in the VAT from BMI \geq 30 individuals than in those with BMI $<$ 30. Interestingly, we observed lower expression of both miRNAs in the VAT of T2DM patients with BMI \geq 30, pointing a combined comorbidity effect (obesity + T2DM). Additionally, we found that the expression of miR-181a-5p and miR-23a-3p in VAT was inversely related to homoeostasis model assessment-IR, blood glucose levels and adiposity. Furthermore, we observed that the expression level of TNF α , which was increased in VAT, correlated inversely with the expression levels of both miRNAs. Overall, these data suggest a role for miR-181a-5p and miR-23a-3p in obese IR-adipose tissue. Regarding the expression of miR-155-5p, we did not detect differences in SAT or in VAT according to BMI or glucose tolerance status.

Overexpression of miR-181a-5p and miR-23a-3p in adipocytes improved insulin sensitivity by up-regulating pAKT and pAS160 protein levels, implying a functional role in the insulin pathway. In addition, a significant protective effect against TNF α -induced IR in adipocytes was observed when both miR-181a-5p and miR-23a-3p were co-transfected simultaneously.

PTEN and S6K, which are known negative regulators of insulin signaling, were identified as the best shared predicted targets for miR-181a-5p and miR-23a-3p. Target validation by luciferase reporter assays in HEK293 cells and by transfection with mimics and inhibitors in SGBS adipocytes, confirmed the presence of functional sites in the 3' untranslated regions of PTEN and S6K, for both miR-181a-5p and miR-23a-3p.

Circulating miR-181a-5p and miR-23a-3p could be detected in human serum. Additionally, levels of both miRNAs were significantly

reduced in the serum of prediabetic subjects from the PIZARRA cohort as compared with controls. However, no changes in the circulating levels of miR-181a-5p and miR-23a-3p were observed with the presence of T2DM in the Di@bet.es cohort of patients.

miR-181a-5p levels were found significantly reduced at baseline in the serum of prediabetic subjects from the PIZARRA cohort, pointing to its prognostic value for this disease. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis of miR-181a-5p at baseline yielded an area under the curve (AUC) of 0.633 with 82.7% sensitivity and 33.3% specificity. Multivariate logistic regression analysis including miR-181a-5p along with other serological signatures [HDL cholesterol, C reactive protein (CRP) and adiponectin], resulted in an ROC curve (AUC = 0.793) that could classify 72.3% of the patients with significantly higher specificity (72.9%). To evaluate the potential of miR-181a-5p in patient stratification, we applied a Partial Least Squares Discriminant Analysis. The model was constructed using anthropometric, clinical and biochemical variables. Cross-validation analysis of the first component showed that it had an accuracy of 54.9%. Regarding the Variable Importance in Projection of the first component of this model, scores showed that miR-181a-5p ranked fourth in importance, behind HDL cholesterol, CRP and adiponectin. Thus, although the diagnostic accuracy is moderate for all the indices we examined, the four serum signatures (HDL cholesterol, CRP, adiponectin and miR-181a-5p) could represent a potential biomarker panel that allows the early diagnosis of prediabetic patients.

Conclusions

The expression of miR-181a-5p and miR-23a-3p is decreased in the VAT of obese patients ($BMI \geq 30$); this reduction is more pronounced in the presence of T2DM.

The expression of miR-181a-5p and miR-23a-3p is inversely related to adiposity and the presence of IR.

miR-181a-5p and miR-23a-3p may prevent $TNF\alpha$ -induced IR in adipocytes through modulation of PTEN and S6K.

miR-181a-5p serum levels are deregulated before the onset of prediabetes, indicating a possible prognostic role for this miRNA in this disease.

III. INTRODUCCIÓN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MICROARNS DESREGULADOS POR ACCIÓN DEL TNFA
EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD Y LA RESISTENCIA A LA INSULINA
Javier Lozano Bartolomé

1. Obesidad

1.1. Definición de la obesidad. Prevalencia

Considerada una de las enfermedades con mayor prevalencia en el mundo occidental en el siglo XXI (alrededor del 13% de la población adulta en 2016), la obesidad casi ha triplicado el número de casos durante los últimos 40 años ¹.

La obesidad puede definirse como la ganancia desproporcionada de peso corporal con respecto a la altura, con un exceso en el acúmulo de grasa en el tejido adiposo, y normalmente acompañada de un estado de inflamación crónica, moderada y sistémica, que repercute negativamente en la salud. El aumento en los depósitos de grasa corporal es resultado del desequilibrio entre la ingesta calórica y el gasto energético ².

La obesidad se mide de forma estandarizada a través del Índice de Masa Corporal ($IMC = \text{Peso (Kg)} / [\text{Altura (m)}]^2$). El IMC constituye la medida poblacional más útil del sobrepeso y la obesidad, pues la forma de calcularlo no varía en función del sexo ni de la edad en la población adulta. Sin embargo, debe considerarse como una medida aproximativa, pues puede no corresponder al mismo grado de obesidad en diferentes individuos y entre diferentes etnias; además, no permite distinguir entre el peso asociado a la masa muscular y el peso asociado a la masa grasa, de modo que existen otros métodos que se relacionan mejor con la adiposidad, por ejemplo el cociente cintura/cadera que se explica más adelante. De acuerdo al informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) del año 2.000 ³, el IMC define los siguientes grados de obesidad: Bajo Peso, $<18,5 \text{ Kg/m}^2$; Peso Normal $18,5-24,9 \text{ Kg/m}^2$; Sobrepeso, $25-29,9 \text{ Kg/m}^2$; Obesidad de clase I, $30-34,9 \text{ Kg/m}^2$; Obesidad de clase II, $35-39,9 \text{ Kg/m}^2$; Obesidad de clase III, $\geq 40 \text{ Kg/m}^2$.

Sin embargo, para una mayor precisión en la evaluación de la adiposidad total, se emplean otras herramientas antropométricas como la plicometría (medición de grosor de los pliegues subcutáneos, impedancia bioeléctrica (para medir la composición corporal) o técnicas de imagen (ecografía, tomografía computerizada o resonancia magnética) para determinar la grasa abdominal.

En relación a la acumulación de grasa abdominal, se toman otras medidas como la circunferencia de la cintura (cm) (CC) y el índice cintura (cm) /cadera (cm) (ICC), como factores de riesgo de padecer condiciones severas asociadas a la obesidad central. Se consideran valores de riesgo de CC mayores de 94 cm para los hombres y mayores de 80cm para las mujeres; así como un ICC mayor de 0.90 para hombres y mayor de 0.85 para mujeres ⁴.

1.2. Complicaciones asociadas a la obesidad

Los estudios poblacionales han demostrado claramente que las personas con obesidad están expuestas a un mayor riesgo de padecer alteraciones metabólicas [hiperglicemia, resistencia a la insulina (RI), dislipemias e hipertensión] que conducen a diversas comorbilidades asociadas: trastornos endocrinos [*Diabetes Mellitus* tipo 2 (DM2)], problemas respiratorios (ej., apnea del sueño); enfermedades hepáticas (ej., esteatosis y esteatohepatitis); enfermedades inflamatorias (ej., colecistitis, pancreatitis, osteoartritis); enfermedades cardiovasculares (ej., aterosclerosis, enfermedad coronaria, infartos); y distintos tipos de cáncer (ej., cáncer de mama posmenopáusico, de colon, de endometrio, de hígado, de riñón, de próstata, de tiroides) ⁵.

1.2.1. El síndrome metabólico (SM)

El SM, definido originalmente como “Síndrome X” por Gerald Reaven en 1988 ⁶, es un trastorno que reúne una serie de anomalías metabólicas [obesidad abdominal, hiperglicemia, RI, dislipemias e hipertensión] que aumentan sinérgicamente el riesgo de desarrollar la enfermedad cardiovascular y DM2, así como la propensión a una muerte prematura ⁷.

Actualmente existen diferentes criterios para el diagnóstico del SM que se agrupan en la **Tabla 1**.

| | NCEP ATP III (revisión 2005) | OMS (1998) | EGIR (1999) | IDF (2005) |
|----------------------------------|---|---|--|---|
| Requisito obligado | ninguno | RI (intolerancia a la glucosa o glucosa en ayunas >110 mg/dl) o DM2 | Hiperinsulinemia (Insulina plasmática >percentil 75) | Obesidad central, CC: ≥84cm (hombres), ≥80cm (mujeres) |
| Criterio | Presencia de tres de los siguientes cinco criterios | RI o DM2 más dos de los siguientes cinco criterios | Hiperinsulinemia (Insulina >percentil 75), más 2 de los 4 siguientes criterios | Obesidad central más dos de los siguientes criterios |
| Obesidad | CC: >101,6cm (hombres), >88,9cm (mujeres) | Ratio C/C: >0,9 (hombres), >0,85 (mujeres); o IMC>30Kg/m ² | CC: >94cm (hombres), >80cm (mujeres) | Requisito obligatorio |
| Hiperglicemia | Glucosa (Ayunas) ≥100mg/dl o Tto | La RI es requisito obligatorio | La RI es requisito obligatorio | Glucosa (ayunas) ≥100mg/dl |
| Dislipemia | TG ≥150mg/dl o Tto | TG≥150mg/dl o Colesterol HDL:<35mg/dl (hombres), <39mg/dl (mujeres) | TG≥177mg/dl o Colesterol HDL:<39mg/dl | TG≥150mg/dl o Tto |
| 2º Criterio de dislipemia | Colesterol HDL: <40mg/dl (hombres), <50mg/dl (mujeres); o Tto | ninguno | ninguno | Colesterol HDL: <40mg/dl (hombres), <50mg/dl (mujeres); o Tto |
| Hipertensión | PAS >130 mmHg o PAD >85 mmHg; o Tto | PAS >140mmHg y PAD >90 mmHg | PAS >140mmHg y PAD >90 mmHg; o Tto | PAS >130 mmHg o PAD >85 mmHg; o Tto |
| Otras condiciones | ninguna | Microalbuminuria | ninguna | ninguna |

Tabla 1. Criterios de definición del SM, Guía para el Tratamiento en Adultos III del Programa Nacional de Educación en Colesterol (del inglés, NCEP ATP III), Organización Mundial de la Salud (OMS), Grupo Europeo para el Estudio de Resistencia a la Insulina (del inglés, EGIR), Federación Internacional de Diabetes (del inglés, IDF). *Fuente adaptada de Huang 2009* ⁸.

1.2.2. Tolerancia a la glucosa, Resistencia a la insulina (RI) y diabetes mellitus tipo 2 (DM2)

La **insulina** es una hormona producida por las células *beta* del páncreas en respuesta al aumento de glucosa y otros nutrientes en sangre procedentes de la dieta. Su función consiste en estimular la conversión de glucosa en glucógeno, almacenado en el músculo esquelético y el hígado, inhibir la gluconeogénesis en el hígado y promover la acumulación de triglicéridos, acelerando la degradación de la glucosa mediante glucólisis y la síntesis de ácidos grasos libres, así como la inhibición de la lipólisis en el adipocito. En definitiva la insulina es un regulador de la homeostasis y el almacenamiento de energía ⁹.

La RI se define como la incapacidad de los tejidos (principalmente músculo esquelético, hígado y tejido adiposo) de responder a la acción de la insulina, y es el nexo definitivo entre la obesidad y la DM2. Los mecanismos subyacentes en la etiopatogénesis de la RI en relación a la obesidad se caracterizan por la inhibición de las cascadas de señalización del receptor de la insulina como consecuencia de la acción de diversos factores como niveles elevados de ácidos grasos libres (AGL), mediadores inflamatorios [Factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), interleuquina (IL)-6 e IL-1b], estrés oxidativo y disfunción mitocondrial, estrés de retículo endoplasmático y por la disminución de los receptores de insulina en la membrana plasmática celular consecuencia de la hiperinsulinemia (**ver apartados 3.1 y 4.2**).

Cuando los tejidos no pueden responder adecuadamente a la insulina los niveles de glucosa en sangre se disparan, lo que da lugar a un estado de hiperglucemia. Las células *beta* del páncreas tratan de contrarrestar la hiperglucemia, pero cuando la función y masa de células *beta* del páncreas

se ven comprometidas, la producción de insulina no es suficiente para resolver el estado sistémico de RI, entonces se habla de DM2¹⁰.

En 2014 se estimó que en el mundo existían 422 millones de casos de DM2 entre la población adulta, y que su prevalencia casi se ha duplicado desde 1980¹¹. Dada la asociación clínica entre la obesidad y la DM2 y los mecanismos moleculares que vinculan estas dos patologías, se acuñó el término de “Diabesidad”¹². Además, las personas con DM2 están expuestas a un mayor riesgo de sufrir retinopatías, enfermedades cardiovasculares, nefropatías y neuropatías¹³.

En cuanto a los métodos de estimación de la resistencia a la insulina, el clamp hiperinsulinémico-euglicémico¹⁴ se considera el estándar de oro de referencia entre esta clase de ensayos. El método consiste en una infusión intravenosa constante de insulina, para crear un estado constante de hiperinsulinemia artificial, y una infusión de glucosa variable para mantener un estado euglicémico; pero es un método muy laborioso para la práctica clínica y supone un alto coste económico. No obstante, existen otros métodos de medición validados y utilizados en clínica o en estudios epidemiológicos, como por ejemplo la insulina en ayunas, el índice QUICKY o el Índice de RI (HOMA-IR, del inglés, *Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance*), entre otros¹⁵. Éste último es el que empleamos en los estudios poblacionales de esta tesis. La elección del método para evaluar la resistencia a la insulina depende de la naturaleza de la información requerida (clasificación de sujetos individuales, comparaciones de grupos, medición precisa de la sensibilidad / resistencia a la insulina a nivel sistémico, muscular o hepático) y de los recursos disponibles¹⁶.

El HOMA-IR es un método simple y mínimamente invasivo para la medición de la resistencia a la insulina e integra los niveles sanguíneos de glucosa e insulina en ayunas en la siguiente fórmula ¹⁷:

$$\text{HOMA-IR} = [\text{Insulina } \mu\text{UI/mL} \times \text{Glucemia mg/dL}] / 405$$

No hay puntos de corte estandarizados del HOMA-IR, ya que depende del género, la edad y etnias específicas ¹⁸.

La medición de los niveles de glucemia en ayunas y el test de tolerancia oral a la glucosa (TTOG) también son comúnmente empleados en el diagnóstico de prediabetes y DM2. El TTOG consiste en la administración oral de 75g de glucosa y la cuantificación de los niveles de glucosa a las 2h. Los niveles de glucosa en sangre entre 7,8 y 11,1 mmol/L en un TTOG definen un estado alterado de intolerancia a la glucosa y aumenta significativamente el riesgo de progresión hacia la DM2 ¹⁹.

De acuerdo a los criterios de la OMS de 1999 ²⁰, en la **Tabla 2** se recogen los puntos de corte para unos niveles de glucemia normales, en estado prediabético o en estado diabético:

| | Normal | Prediabetes ¹ | DM2 |
|----------------------------|--------|--------------------------|-------|
| Glucosa en ayunas (mmol/L) | <6.11 | 6,11-6,9 | ≥7 |
| TTOG (mmol/L) | <7,8 | 7,8-11 | ≥11,1 |

Tabla 2. Glucosa en ayunas y Test de tolerancia oral a la glucosa. (1) El estado prediabético puede incluir niveles de glucosa basales por encima de los normales, intolerancia a la glucosa o ambos.

2. Tejido adiposo

El tejido adiposo en mamíferos es un tipo de tejido conectivo laxo derivado del mesénquima embrionario, caracterizado por su heterogenicidad celular, donde además de adipocitos, que suponen un tercio de todo el tejido adiposo, se encuentran otros tipos celulares que conforman la **fracción estromal vascular** (FEV). La FEV incluye células madre mesenquimales, fibroblastos, pericitos, células endoteliales y precursores endoteliales, células T reguladoras, monocitos, macrófagos y preadipocitos ^{21,22}. Aunque es comúnmente conocido como un reservorio de energía, el tejido adiposo también desempeña importantes funciones a nivel endocrino, en la regulación de la termogénesis y en la protección mecánica de órganos vitales ²³.

2.1. Tipos de Tejido adiposo

Los mamíferos tienen tres tipos de tejido adiposo funcionalmente diferentes: el tejido adiposo blanco, el tejido adiposo marrón y el tejido adiposo beige.

2.1.1. Tejido adiposo blanco

El tejido adiposo blanco (TAB) evolucionó para almacenar el exceso de energía en **grandes cantidades**, en forma de triglicéridos, para su uso durante períodos de escasez de alimentos. El tejido almacena la grasa procedente de los lípidos que absorbe a través de la dieta y de los que sintetiza a través de la **lipogénesis**. Ante la demanda de energía por otras células del organismo, moviliza esta grasa en forma de ácidos grasos libres (AGL) través del proceso de la **lipólisis**. Además, el TAB

desempeña una función endocrina que contribuye a la regulación de la homeostasis de la energía de todo el cuerpo, y lo hace mediante la secreción de varias hormonas derivadas del adipocito, las **adipoquinas**. El principal componente del TAB es el **adipocito blanco** que lleva a cabo las funciones primarias como transporte de lípidos y glucosa, síntesis y movilización de ácidos grasos, regulación de la sensibilidad a la insulina y función endocrina. Los adipocitos que forman el TAB son células con forma redondeada y un tamaño de 10-200 μm de diámetro, conteniendo en su citoplasma una gran gota lipídica que ocupa el 95% de todo su volumen donde almacenan los triglicéridos. En los siguientes apartados se profundizará en la distribución, la biología y las funciones del TAB (**ver apartados 2.2 – 2.4**).

2.1.2. Tejido adiposo Marrón

El tejido adiposo marrón (TAM) se descubrió por primera vez en animales en hibernación y en recién nacidos, y su función principal es la termogénesis no temblorosa, como un mecanismo adaptativo para combatir la hipotermia ²⁴. El TAM también difiere morfológicamente de TAB, y sus adipocitos se caracterizan por contener múltiples gotas pequeñas de lípidos en su citoplasma, un núcleo central y un abundante número de mitocondrias que confieren al tejido ese color pardo ²⁴. Los adipocitos marrones derivan del mesodermo, compartiendo este origen con miocitos y condrocitos ²⁵. Además el TAM está mucho más innervado y vascularizado que el TAB.

El TAM en humanos es más abundante en neonatos que en adultos. En los recién nacidos supone el 5% de su masa corporal, y se distribuye principalmente en depósitos interescapulares, supraclaviculares, suprarenales, pericardiales, para-aórticos y alrededor del páncreas,

riñones, hígado, bazo y tráquea. En adultos el TAM se desarrolla en respuesta al frío prolongado y es común encontrarlo en depósitos peritraqueales, paravertebrales, mediastinales, supraclavicular para-aórticos y supra- y perirrenales ²⁶.

El mecanismo a través del cual los adipocitos marrones producen calor reside en sus mitocondrias. En ellas presentan una proteína conocida como proteína desacopladora 1 (UCP-1) o termogenina, cuya función es la de aprovechar el gradiente de protones que genera la cadena respiratoria para bombearlos desde el espacio intermembrana de la mitocondria hacia la matriz mitocondrial y generar calor. En este sentido, UCP-1 desacopla parte del consumo de oxígeno que emplea el factor V en la producción de ATP, para producir energía térmica ²⁷ (**Figura 1**).

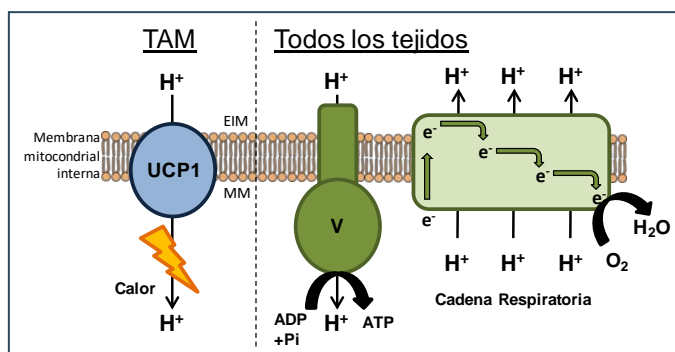


Figura 1. Desacoplamiento de la cadena respiratoria. La cadena respiratoria genera un gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna mediante la translocación de protones de la matriz al espacio intermembrana (EIM). Los protones pueden reingresar a la matriz mitocondrial (MM) por el complejo V o por la fuga de protones catalizada por UCP-1. La fuerza protón-motriz permite la producción de ATP a partir de ADP y un grupo fosfato (Pi) en el complejo V, o bien se disipa como energía térmica (Calor) a través de UCP-1 en el Tejido adiposo Marrón (TAM). Fuente adaptada de Klingenspor et al., 2012 ²⁷.

La activación de este sistema es inducida por exposición prolongada al frío y estimulación *beta*-adrenérgica que induce la lipólisis y la expresión de los factores de transcripción CREB (en inglés, *cAMP Response Element-Binding*), ATF-2 (en inglés, *Activating Transcription*

Factor 2) y PGC1 (en inglés, *PPAR γ Coactivator 1*) que inducen la expresión de UCP-1 y la biogénesis mitocondrial ²⁷.

2.1.3. Tejido adiposo Beige

Los adipocitos blancos pueden adquirir las propiedades morfológicas y funcionales de los adipocitos marrones mediante un proceso de transdiferenciación llamado "*beiging*". El proceso de "*beiging*" puede inducirse por una exposición prolongada al frío o por estimulación β -adrenérgica, expresando altos niveles de UCP-1 y aumentando el número de mitocondrias a través del coactivador-1 α de PPAR γ (PGC-1 α) ²⁸. Sin embargo, existen trabajos que demuestran que muchos de los adipocitos beige provienen de la diferenciación *de novo* de una población de precursores diferente, aunque ambos modelos no son excluyentes ²⁹.

Los adipocitos beige muestran un mayor gasto de energía y reducción del contenido lipídico que los adipocitos blancos. En el contexto de la obesidad, la inflamación se asocia con una reducción en la generación de adipocitos beige, que reduce la sensibilidad a la insulina del tejido adiposo. En este sentido, se han propuesto estrategias para inducir la transformación de adipocitos blancos en beige para combatir el estado patológico de la obesidad ³⁰.

2.2. Adipogénesis del TAB

El tejido adiposo presenta una alta tasa de renovación celular (10% anual en humanos), en la cual los adipocitos más envejecidos inician un programa de apoptosis y son eliminados por los macrófagos residentes del tejido adiposo ³¹, mientras que los nuevos adipocitos, diferenciados a partir de precursores ya presentes en el tejido adiposo, reemplazan a los adipocitos viejos ³², por un proceso conocido como **adipogénesis**.

La adipogénesis consta básicamente de dos fases diferenciadas: La primera fase, conocida como **determinación**, da como resultado la conversión un célula madre mesenquimal multipotente a un preadipocito, que no puede distinguirse morfológicamente de su célula precursora, pero ha perdido la capacidad de diferenciarse en otros tipos celulares. En la segunda fase, que se conoce como **diferenciación terminal**, el preadipocito adquiere las características y funciones primarias del adipocito maduro, ya descritas en el párrafo anterior ³³.

La diferenciación terminal es un proceso complejo orquestado por una cascada transcripcional que implica principalmente al receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma (PPAR γ) y a miembros de la familia C / EBP (del inglés, *CCAAT/enhancer-binding protein*), ambos necesarios para coordinar la expresión de genes adipogénicos ³⁴. Otros factores que participan en este proceso son los de la familia de factores tipo Kruppel (KLF), cuya función es la de reclutar cofactores o coinhibidores hacia el promotor de *PPARG*, o la proteína de unión a elementos reguladores de esterol 1c (SREBP1c), como factor de transcripción proadipogénico. PPAR γ no solo es crucial para la adipogénesis, sino también para el mantenimiento del estado diferenciado del adipocito ^{35,36}. La adipogénesis también está regulada por reguladores negativos como la vía de señalización de Wnt (en inglés, *Wingless-type*

MMTV integration site)/ β -catenina que inhibe los estadios tempranos de la diferenciación adipocitaria al reprimir la expresión de PPAR γ y C/EBP α ^{37,38}. Además, existe una interrelación entre las señales del factor de necrosis tumoral α (TNF α) y Wnt, que pueden bloquear la adipogénesis, lo que sugiere que las citoquinas aumentadas en la obesidad podrían utilizar los mecanismos canónicos de señalización de Wnt para inhibir la diferenciación de los adipocitos³⁹. Otros factores represores de la adipogénesis incluye a algunos miembros de la familia de proteínas que unen motivos GATA (GATA) como GATA2 y GATA3,^{40,41} y de la familia *Forkhead-box* (FOX) como FOXO1, FOXA2 y FOXC2⁴²⁻⁴⁴.

En fases avanzadas de la obesidad, la adipogénesis se ve reducida, de modo que de las cantidades excesivas de lípidos que entran en el tejido adiposo para ser almacenadas promueven la hipertrofia de los adipocitos, que a su vez está relacionado con la disfunción metabólica del tejido adiposo, como la inflamación y aparición de RI en los adipocitos.

2.3. Distribución anatómico-funcional del TAB

De acuerdo a su localización, el TAB se distribuye como **tejido adiposo subcutáneo (TAS)** y **tejido adiposo visceral (TAV)** (**Figura 2**).

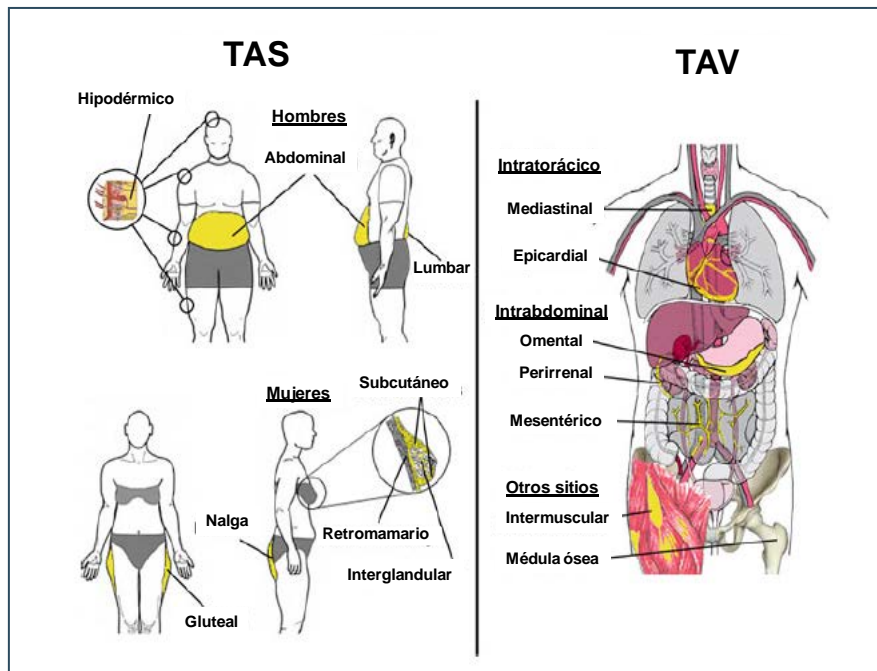


Figura 2. Distribución del tejido adiposo subcutáneo (TAS) y visceral (TAV).
Fuente adaptada de Stephane y Ronald 2012 ⁴⁵.

El **TAS** se encuentra entre la piel y la cavidad peritoneal, y en humanos se distribuye principalmente por las regiones lumbar posterior, epidural, femoroglútea y abdominal. Además el tejido adiposo subcutáneo ocupa una fina capa en la hipodermis que recubre todo el cuerpo. Sin embargo su distribución varía en función de la etnicidad, la edad, el sexo, los niveles de hormonas sexuales y por factores genéticos ⁴⁵.

Por otro lado, la grasa acumulada dentro de la cavidad abdominal se denomina **TAV**. El TAV se encuentra unido al tejido conectivo de los intestinos o mesenterio a lo largo de vasos sanguíneos y linfáticos, y también se desarrolla sobre la membrana serosa que une el hígado, el estómago y el duodeno, conocida como omento. El TAV también se encuentra cubriendo el epicardio, los riñones o las gónadas ⁴⁵.

El TAS contiene adipocitos de menor tamaño a los del TAV, y son más sensibles a la insulina y más ávidos por la captación de AGLs y

triglicéridos, previniendo así la deposición de la grasa en tejidos no adipogénicos ⁴⁶. Por otra parte, los adipocitos viscerales son de mayor tamaño y metabólicamente más activos que los subcutáneos, con mayor actividad lipolítica, y son más resistentes a la insulina ⁴⁶.

Otra característica que diferencia a los dos tipos de tejidos es su perfil de expresión de adipoquinas y citoquinas. El TAS es una fuente principal de producción de **leptina** ^{47,48}, una hormona reguladora del apetito y el balance energético y directamente correlacionada con los depósitos de triglicéridos. El TAV es más susceptible de infiltración de células inflamatorias, y es mayor productor de citoquinas proinflamatorias como TNF α , IL-6 o la proteína C reactiva (P-C-R) ^{49,50}.

Existe una teoría que sugiere que los AGLs, las citoquinas y las adipoquinas que secreta el TAV son drenadas a través de la vena Porta hacia el hígado. Se conoce como “**Teoría de la circulación Portal**” ⁵¹ y trata de explicar, al menos en buena parte, la relación que existe entre la obesidad central y las anomalías metabólicas asociadas. En este sentido, el aumento de los niveles de AGLs, liberados por adipocitos hipertrofiados y disfuncionales del TAV, estimularía la gluconeogénesis en el hígado elevando la glicemia y reduciendo la sensibilidad a la insulina en diferentes tejidos, derivando en una hiperinsulinemia compensatoria y un estado metabólico alterado generalizado. En apoyo a esta teoría, las citoquinas proinflamatorias producidas por el TAV (TNF α , IL-6, Resistina, etc) pueden ejercer su efecto desensibilizador a la insulina a través del mecanismo portal ⁵².

2.3.1. Expansión del tejido adiposo

Una de las características más atribuibles al tejido adiposo es su **capacidad de expansión**, la cual refleja la capacidad del tejido adiposo

para almacenar lípidos, ya sea por el aumento del tamaño de los adipocitos (**hipertrofia**) y / o por aumentar en número de adipocitos (**hiperplasia**) a través de la adipogénesis.

El TAV se caracteriza por una menor tasa de proliferación y capacidad de diferenciación de sus adipocitos, lo que hace que sean más susceptibles de hipertrofiarse y, en consecuencia, de verse alteradas sus funciones.

Por otro lado, el TAS (preferiblemente el TAS abdominal) crece por hiperplasia e hipertrofia actuando como reservorio natural del exceso acumulado de energía, pero su capacidad de almacenar lípidos es limitada, cuyo límite puede variar de un individuo a otro. En este sentido, Vidal Puig y Gray, propusieron **la teoría de la expandibilidad del tejido adiposo**⁵³. Cuando el TAS excede su capacidad como reservorio de energía, los AGL aumentan en circulación y comienzan a depositarse en el TAV y de forma ectópica en células no adipocitarias como miocitos (músculo esquelético y corazón), hepatocitos (hígado) y células *beta* del páncreas (**Figura 3**)^{53,54}, causando en ellos un efecto de **lipotoxicidad** que conduce a las células a un estado proinflamatorio y de RI, al estrés celular y a la apoptosis^{53,54}. En situaciones de **lipotoxicidad**, la capacidad limitada de las células no adiposas para oxidar la grasa induce en ellas un exceso de β -oxidación de los lípidos y acumulación de gotas lipídicas, disfunción mitocondrial y la activación de vías no oxidativas que generan derivados lipídicos citotóxicos como el diacilglicerol (DAG), las ceramidas y el monosialogangliósido 3 (GM3)^{55,56}. En consecuencia, el acúmulo ectópico de lípidos afecta negativamente la homeostasis metabólica del organismo, contribuyendo así al desarrollo de comorbilidades asociadas a la obesidad, ya mencionadas, como la esteatosis hepática, RI, DM2 o la enfermedad cardiovascular⁵³ (**Figura 3**).

En apoyo a esta hipótesis, los pacientes con lipodistrofia generalizada no pueden desarrollar adecuadamente su tejido adiposo por lo que presentan pérdida parcial o total de TAS, mayores depósitos de TAV y acumulación de grasa ectópica. También desarrollan RI y son más propensos a las comorbilidades metabólicas (ej. Esteatosis hepática, dislipemias, DM2, etc) y no metabólicas ^{57,58}, probablemente como consecuencia de la imposibilidad en la expansibilidad de su tejido adiposo.

Además, algunos individuos no obesos son resistentes a la insulina, y otros son obesos pero metabólicamente sanos ⁵⁹. No obstante, esta hipótesis no desvincula la relación entre obesidad y RI, ya que en un estado de obesidad el riesgo de alcanzar el límite de expansibilidad del tejido adiposo es mayor y, por tanto, aumenta el riesgo de sufrir las comorbilidades asociadas a la obesidad.

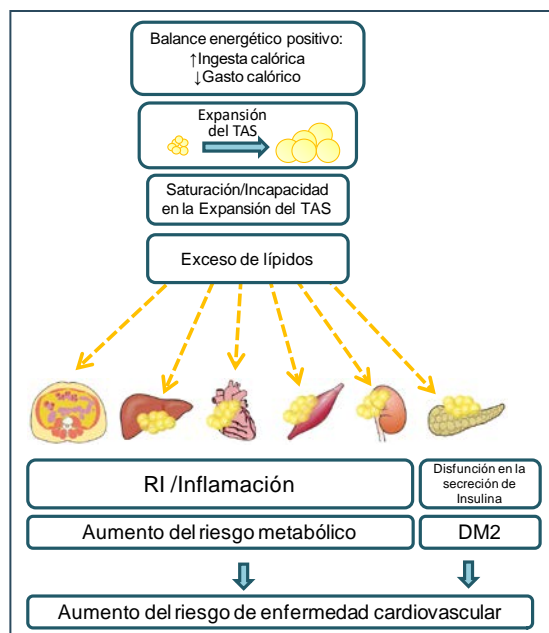


Figura 3. Consecuencias de la saturación o incapacidad de expansión del tejido adiposo subcutáneo (TAS). RI: Resistencia a la insulina, DM2:diabetes mellitus tipo 2. Fuente modificada de Tchernof y Després, 2013⁶⁰.

2.4. Función endocrina del TAB

El TAB se corroboró por primera vez como órgano endocrino al caracterizar la primera hormona propia de este tejido, la leptina ⁶¹. La leptina actúa en el hipotálamo inhibiendo el apetito, regulando así el balance energético del organismo. A la leptina le siguieron una lista de factores producidos por el TAB con funciones en la regulación de la homeostasis metabólica ⁶² que incluye la secreción de péptidos bioactivos (hormonas, factores de crecimiento, citoquinas) y AGLs y sus productos derivados (diacil glicerol, ceramidas y GM3). Gran parte de la producción de las proteínas secretadas por el TAB proviene de su FEV ⁶³. Estos factores pueden actuar de forma autocrina y paracrina en el propio TAB, o actuar de forma sistémica en otros tejidos como el cerebro, el hígado, el páncreas, el corazón y el músculo esquelético. Además de ser productor de estas señales, también presenta receptores que responden a otros estímulos (receptores de glucocorticoides, receptores de catecolaminas, receptor de insulina y factores de crecimiento, receptor de TNF α , etc), incluidos los que responden a señales del sistema nervioso central ⁶⁴.

Entre los péptidos bioactivos más estudiados que produce el TAB, conocidas como **adipoquinas**, se encuentran la leptina y la adiponectina (exclusivas del adipocito) y citoquinas como TNF α , la interleuquina 6 (IL-6), la resistina, la proteína de unión a retinol 4 (RBP4) y la visfatina, entre otras (**ver apartado 4.3**). Hay que recordar que el TAV es mayor secretor de adipoquinas y citoquinas que el TAS, por lo que las alteraciones que se produzcan en el primero durante la obesidad pueden desencadenar consecuencias metabólicas y no metabólicas de carácter pernicioso para la salud.

3. Señalización de la insulina y homeostasis de la glucosa en el adipocito

La **insulina** es conocida como la hormona hipoglucemiante. Como tal, su función primaria consiste en reducir rápidamente los niveles de glucosa en sangre (glucemia) promoviendo su transporte al interior de las células, pero sólo actúa en este sentido sobre el tejido adiposo (adipocitos) y el músculo estriado (miocitos y cardiomiocitos). La insulina realiza esta función induciendo el transporte a la membrana plasmática del transportador de glucosa 4 (**GLUT4**), que únicamente se expresa en células de los tejidos arriba mencionados. Todas las células tienen transportadores específicos de glucosa para facilitar su difusión a través de sus membranas, pero el único transportador dependiente de insulina está sólo en las células de los tejidos arriba citados, las cuales tienen además transportadores no dependientes de insulina.

La insulina actúa activando una cascada de señalización que comienza por la autofosforilación de su receptor (**INSR**) y de sus sustratos. Los sustratos del receptor de la insulina (**IRS**) 1 y 2 son regulados positivamente a través de la fosforilación de sus residuos de tirosina, o negativamente a través de sus residuos de serina (**Figura 4**). Los IRS activados fosforilan la fosfatidil inositol 3-quinasa (**PI3K**) que convierte fosfatidilinositol-3,4-bisfosfato (PI(3,4)P₂) en fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PI(3,4,5)P₃). PI3P fosforila a **PDK1** y éste fosforila y activa a la proteína quinasa B (PKB o **AKT**)⁶⁵ (**Figura 4**). La activación de AKT potencia, a través de la fosforilación e inhibición del sustrato de Akt de 160 kDa (**AS160**), el tráfico de vesículas contenedoras de **GLUT4**⁶⁶. Este mecanismo de señalización induce la captación de glucosa en sangre por los tejidos, y cualquier anomalía que disminuya o inhiba por completo esta respuesta celular, da lugar a un estado metabólico alterado conocido

como **RI**. La activación de AKT también induce la activación del complejo 1 de mTOR (en inglés, *mammalian target of rapamycin*) hacia la regulación de una serie de genes implicados en el control del metabolismo, la síntesis de proteínas, la lipogénesis y el crecimiento celular ⁶⁷ (**Figura 4**). AKT por otro lado también inhibe la activación de los factores de transcripción FOXO, lo que resulta en la inhibición de la gluconeogénesis ⁶⁸ (**Figura 4**).

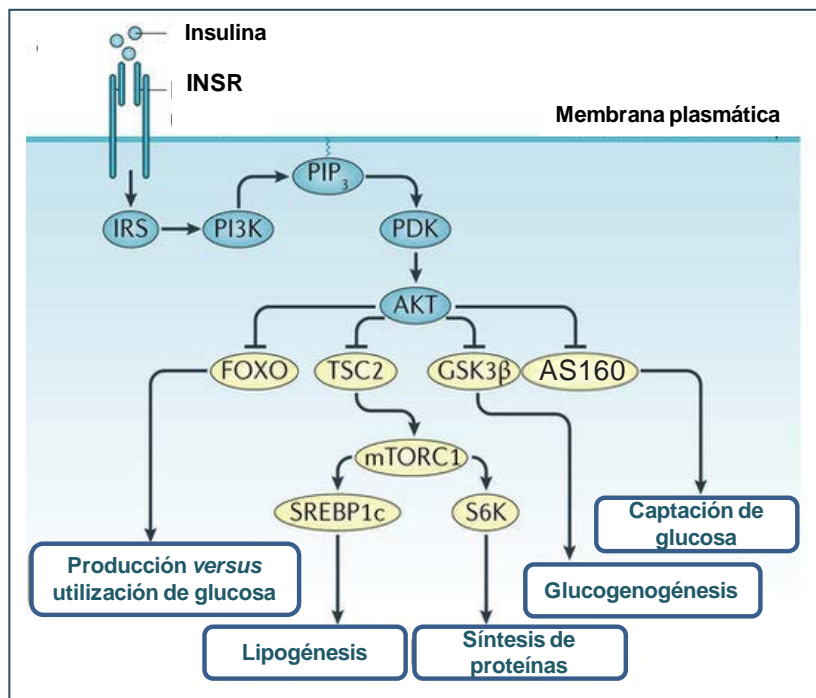


Figura 4. Vía de señalización de la insulina. Después de la unión a la insulina, se activa la tirosina quinasa del receptor de insulina (INSR), lo que provoca la fosforilación de tirosina de las proteínas del sustrato de INSR (IRS). Los sitios de fosfotirosina en IRS permiten la unión de la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K), que sintetiza PI (3,4,5) P3 (PIP3) en la membrana plasmática. Esto recluta la quinasa dependiente de fosfoinosítido (PDK), que fosforila directamente el residuo Thr308 de AKT. Una segunda fosforilación de AKT, en el residuo de Ser473, se lleva a cabo por el complejo mTOR 2 (mTORC2) (no mostrado). El AKT activado continúa fosforilando una cantidad de sustratos en los residuos Ser / Thr. Estos incluyen: los factores de transcripción de la familia *forkhead-box O* (FOXO); la proteína de esclerosis tuberosa 2 (TSC2), que permite la activación de mTORC1 y sus dianas: la proteína ribosómica S6 quinasa (S6K) y la proteína

de unión del elemento regulador de esterol 1c (SREBP1c); glucógeno sintasa quinasa 3 *beta* (GSK3 β) y el sustrato de AKT de 160kDa (AS160). Estas proteínas efectoras median los efectos de la insulina en la producción, utilización y captación de glucosa, así como la síntesis de glucógeno, proteína y lípidos. (1) Síntesis de glucógeno solo en hígado y músculo. *Fuente adaptada de Haeusler et al. 2017* ⁶⁹.

3.1. Reguladores negativos de la señalización de insulina

La **insulina** en sí es posiblemente el regulador negativo más importante de su propia señalización. De forma similar a otros receptores tirosín-quinasas, el **INSR** sufre internalización inducida por ligando y degradación lisosómica o reciclaje de nuevo a la superficie celular. No obstante, la cascada de señalización desencadenada por la insulina es también atenuada o 'ajustada' por varios reguladores negativos a nivel del INSR y los IRS, la reacción del fosfatidil inositol trifosfato y la activación de AKT ⁷⁰ (**Figura 5**).

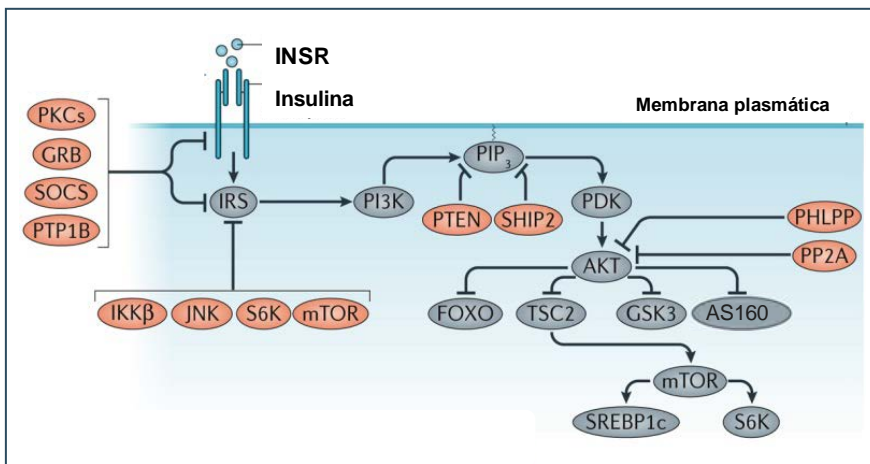


Figura 5. Reguladores negativos de la ruta de la insulina. La señalización de la insulina se antagoniza a través de numerosos mecanismos; estos incluyen la internalización y degradación del receptor de insulina (INSR) inducido por ligando (no mostrado en este panel), fosforilación inhibitoria del sustrato INSR (IRS) [por quinasas tales como I κ B quinasa β (IKK β), c-Jun N-terminal quinasa (JNK), proteína ribosómica S6 quinasa (S6K) y mTOR], agotamiento de PI (3,4,5) P₃ (PIP₃) por lípidos fosfatasa (PTEN y SHIP2), eliminación de residuos

fosforilados por proteínas fosfatasa (PTP1B, PHLPP y PP2A)], y la inhibición por sustratos alternativos del INSR (tales como las proteínas GRB10, GRB14 y SOCS). La proteína quinasa C (PKC) fosforila el INSR, bloqueando así la autofosforilación del INSR. *Fuente adaptada de Haeusler et al. 2017*⁶⁹.

La Tirosin-fosfatasa-1B (**PTP1B**) defosforila los sustratos de tirosina en el INSR y los IRS⁷¹. Miembros de la familia de Supresores de la Señalización de Citoquinas (**SOCS**) inhiben la actividad Tirosín-quinasa del INSR y facilitan la degradación de los IRS⁷². Los miembros de la familia de proteínas de unión a receptores de crecimiento (**Grb**) 10 y Grb14, actúan como pseudosustratos del INSR, lo que impide la unión y activación de los IRS⁷³ (**Figura 5**).

La fosforilación en los residuos de serina/treonina (Ser/Thr) en el INSR y los IRS ejerce en ellos un efecto de inactivación o terminación de la señalización de la insulina. La proteína quinasa S6 ribosomal (**S6K**), activada por la vía mTOR, y **mTOR** fosforilan residuos de Ser/Thr en los IRS, lo que resulta en una señalización de los IRS y su degradación por proteasoma⁷⁴. Las citoquinas proinflamatorias (**TNF α** , **IL-1b**, and **IL-6**) que se encuentran aumentadas en el tejido adiposo obeso, actúan de forma paracrina activando en los adipocitos serin-quinasa como la subunidad β de la quinasa de I κ B (**IKK β**), la quinasa N-terminal de c-Jun (**JNK**), **S6K** y **mTOR**. Estas quinasa actúan inhibiendo los IRS, lo que provoca RI en el adipocito⁶⁵. La proteínas quinasa C (PKC), que se activan por los productos de la *beta* oxidación de ácidos grasos (Diacil glicerol y ceramidas) en hígado y músculo en la obesidad, también fosforilan residuos de serina del IRS inhibiendo su acción y promoviendo su degradación (**Figura 5**).

La fosfatasa y homólogo de tensina (**PTEN**) invierte la reacción iniciada por la PI3K, es decir convierte PI(3,4,5)P₃ en PI(3,4)P₂ inhibiendo la señalización de la insulina⁷⁵, además se ha demostrado su función como tirosín fosfatasa de IRS-1⁷⁶. **SHIP2** (del inglés: *SH2-*

containing 5'-inositol phosphatase 2) es otra fosfatasa que actúa de forma similar a PTEN, sin embargo en este caso SHIP2 convierte PI(3,4,5)P₃ en PI(4,5)P₂⁷⁷ (**Figura 5**).

En cuanto a la regulación de AKT, su desfosforilación corre a cargo de la fosfatasa con dominios PH (homología a Pleckstrina) y repeticiones de leucinas (**PHLPP**)⁷⁸ y por la proteína fosfatasa 2A (**PP2A**)⁷⁹ (**Figura 5**).

4. Inflamación y RI en el tejido adiposo obeso

La **inflamación** es una respuesta fisiológica de defensa del organismo ante estímulos nocivos (ej. Una infección o una lesión tisular) con el fin de restaurar la homeostasis en el tejido afectado. La respuesta inflamatoria aguda es iniciada por mastocitos y macrófagos residentes en el tejido que liberan mediadores químicos (citoquinas, quimioquinas, eicosanoides, etc). Estos mediadores inducen la expresión de moléculas de adhesión vascular en el endotelio facilitando el reclutamiento, extravasación e infiltración en tejido de leucocitos sanguíneos, especialmente neutrófilos y monocitos; estos últimos son activados en el tejido como macrófagos. La respuesta inflamatoria finaliza con un proceso altamente regulado conocido como resolución de la inflamación dando paso a la reparación y recuperación del estado homeostático del tejido. Sin embargo, si el estímulo nocivo no es neutralizado y eliminado, y por tanto si la resolución de la inflamación no llega a término, se genera un estado de inflamación crónica con efectos perniciosos en la integridad y el funcionamiento del tejido en cuestión ⁸⁰.

La obesidad es definida como una **enfermedad inflamatoria crónica de bajo grado** ⁸¹. La primera evidencia que relacionó la obesidad con la inflamación fue en 1993 cuando Hotamisligil y colaboradores detectaron que el TAB de ratones obesos expresaba niveles elevados de la citoquina proinflamatoria TNF α en comparación con el TAB de los ratones delgados, asociándose estos niveles con el estado de RI ⁸². Poco tiempo después, este hecho fue corroborado en tejido adiposo humano de individuos obesos ⁸³. Diversos estudios posteriores han reforzado la relación entre obesidad e inflamación al encontrar aumentados los niveles circulantes de citoquinas proinflamatorias y proteínas de fase aguda en obesidad ⁸⁴. Además, se ha observado una mayor expresión de marcadores

inflamatorios en el tejido adiposo de sujetos obesos en comparación con sujetos delgados, cuya expresión se reduce después de la pérdida de peso ^{85,86}.

El tejido adiposo obeso, en comparación al de individuos delgados, se caracteriza por una mayor infiltración y activación de macrófagos y otros leucocitos (mastocitos, neutrófilos, linfocitos T y B y células dendríticas) (**Figura 6**), así como de una mayor liberación de quimioquinas y citoquinas inflamatorias como la proteína quimioatrayente de macrófagos 1 (MCP-1), IL-1 β , TNF α e IL-6 ⁸⁰. El microambiente inflamatorio en obesidad altera la homeostasis del TAB, lo que a su vez repercute negativamente en el funcionamiento de otros órganos y tejidos (especialmente el hígado, el músculo, el páncreas y el sistema cardiovascular) ⁸⁷. De hecho, la obesidad y la inflamación son procesos altamente integrados en la patogénesis de diversas comorbilidades asociadas como la RI, la DM2, la aterosclerosis o la esteatosis hepática no alcohólica ⁸⁸.

4.1. Macrófagos del tejido adiposo

Los macrófagos del tejido adiposo (**ATM**, por sus siglas en inglés) tienen funciones importantes en la homeostasis de este tejido. Los ATM son responsables de la retirada de las células apoptóticas y de sus restos celulares, un proceso conocido como eferocitosis y que es crucial en tejidos donde existe renovación celular ⁸⁹. También se les ha atribuido la función de amortiguar el exceso de lípidos acumulados, evitando la lipotoxicidad en otros tejidos ^{90,91}

En obesidad, el aumento de la adiposidad y el tamaño de los adipocitos están directamente relacionados con el número de **macrófagos**

infiltrados en el tejido adiposo, tanto en humanos como en modelos de ratón ⁴⁹ (**Figura 6**). Los ATM en obesidad suelen encontrarse rodeando adipocitos apoptóticos formando estructuras similares a coronas (CLS)⁹² o en áreas fibróticas del tejido adiposo⁹³.

La **quimioquina MCP-1** es la principal señal de reclutamiento de macrófagos al tejido adiposo en la obesidad y se encuentra aumentada en suero y tejido adiposo (sobre todo en el TAV) de ratones e individuos obesos ⁹⁴. Otras proteínas implicadas en el aumento de macrófagos en el TAB en obesidad son la quemerina, la progranilina o el factor estimulante de colonias 1 (CSF1) ⁹⁵.

Los ATM pueden ser reclutados a partir de reservorios de monocitos presentes en sangre, bazo y médula ósea⁹⁶. Además, estudios recientes sugieren que una fracción significativa de ATM prolifera localmente en el tejido adiposo^{97,98}. Cuando los macrófagos son reclutados por los tejidos, éstos son activados diferencialmente en respuesta a diversos estímulos en función del microambiente tisular. Se ha demostrado que ciertas citoquinas están implicadas en la activación y polarización de las respuestas inmunitarias. Así, encontramos diferentes tipos de macrófagos según su estado de activación. Con el fin de imitar la nomenclatura de los linfocitos T colaboradores (Th)-1 y Th-2, se creó una clasificación de activación de **macrófagos de tipo M1 y M2**, que representan los extremos fenotípicos de una gama continua de estados funcionales, resaltando la gran heterogeneidad y plasticidad que representa la población de los ATM⁹⁹. La estimulación de macrófagos con citoquinas de tipo Th1 tales como interferón gamma (IFN γ), junto a otras citoquinas [ej., TNF α y el Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Monocitos (GM-CSF)] y estímulos bacterianos [ej., el lipopolisacárido (LPS)] promueve la polarización de macrófagos a M1 activados "clásicamente". Estos macrófagos se caracterizan por una alta secreción

de citoquinas proinflamatorias como $TNF\alpha$, IL-12, IL-23, IL-6, IL-1 β y MCP-1, e intermediarios tóxicos como el óxido nítrico (por la producción de la óxido nítrico sintasa) o especies reactivas de oxígeno (ROS), así como una alta capacidad presentadora de antígenos. Por el contrario, diversas señales de tipo antiinflamatorio [ej., IL-4, IL-13, glucocorticoides, adiponectina o el factor estimulante de colonias de monocitos (M-CSF)] inducen distintas funciones en los macrófagos, activando la “via alternativa” e induciendo la polarización de los macrófagos a tipo M2; estos macrófagos son capaces de reajustar la respuesta inflamatoria, promover la angiogénesis, la sensibilidad a la insulina y la remodelación y reparación tisular y de secretar citoquinas de carácter antiinflamatorio (ej., IL-4, IL-10, IL-13) y arginasa 1^{99,100}.

En modelos de roedores, la obesidad inducida por la dieta generalmente conduce a un cambio en el fenotipo de los ATM desde un estado polarizado de tipo M2 en animales delgados a un estado polarizado de tipo M1 en animales obesos¹⁰¹. En humanos, los resultados observados en cuanto a los cambios en la polarización de ATM en sujetos obesos presentan cierta controversia. Algunos estudios han demostrado que los niveles de marcadores proinflamatorios en ATM subcutáneos y viscerales están elevados en sujetos obesos en comparación con sujetos delgados^{102,103}. Además, se ha demostrado que la pérdida de peso inducida por una dieta muy baja en energía o un *bypass* gástrico induce un aumento en los niveles de marcadores específicos de macrófagos antiinflamatorios y una reducción en los niveles de marcadores de macrófagos proinflamatorios en el TAS^{85,103,104}. Sin embargo, otro estudio ha demostrado que los ATM subcutáneos cambian a un fenotipo más antiinflamatorio por la obesidad⁹³.

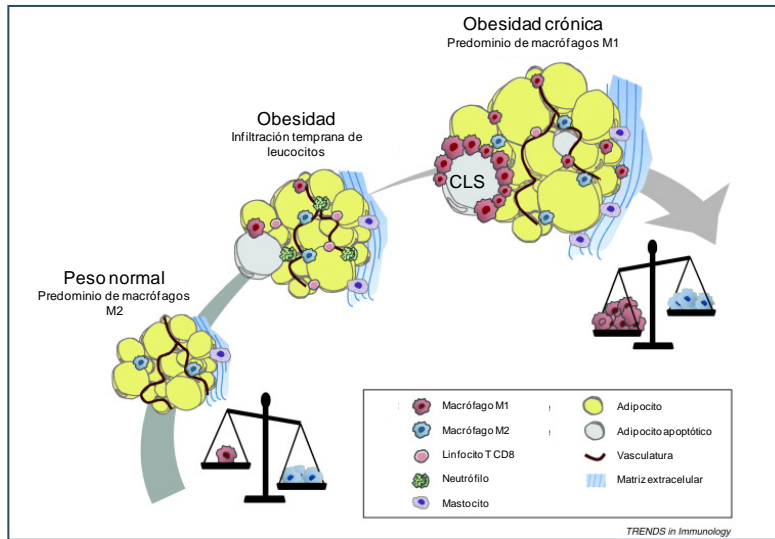


Figura 6. Inflamación en el tejido adiposo. El tejido adiposo no obeso contiene macrófagos M2 residentes que ayudan a mantener la homeostasis tisular. Durante la obesidad, varios tipos de células inmunitarias, incluyendo neutrófilos, linfocitos T CD8 y mastocitos, infiltran el tejido adiposo antes de reclutar macrófagos de fenotipo proinflamatorio tipo M1. Los adipocitos hipertróficos adquieren un perfil inflamatorio y / o necrótico, atrayendo así macrófagos de tipo M1 organizados en estructuras similares a coronas (CLS). La obesidad se asocia con un desequilibrio de la relación de macrófagos M1 / M2, a favor de los macrófagos M1. Fuente adaptada de Dalmas et al., 2011¹⁰⁵.

4.2. Mecanismos desencadenantes de la inflamación en la obesidad

Aunque no se conoce con exactitud los desencadenantes de este proceso inflamatorio durante la obesidad, en la actualidad se han propuesto diferentes mecanismos que incluye la participación de agentes externos procedentes de la dieta o bien endotoxinas de la propia flora intestinal; sin descontar aquellos factores intrínsecos que surgen durante la rápida expansión del tejido adiposo como son las señales procedentes de la hipoxia, el estrés celular o el estado necrótico de los adipocitos durante la hipertrofia del tejido adiposo^{106,107}.

Endotoxemia metabólica

Se ha observado que el aumento de peso inducido mediante una dieta rica en grasa, tanto en humanos como en modelos animales, se asocia con una mayor permeabilidad intestinal y un ligero aumento de los niveles plasmáticos de LPS procedente de la flora intestinal¹⁰⁸⁻¹¹⁰, una endotoxina que forma parte de la pared externa de las bacterias gram negativas. También se ha observado en ratones, que el aumento inducido de los niveles plasmáticos de LPS desencadena un estado inflamatorio sistémico que promueve adiposidad y reduce la sensibilidad a la insulina en hígado, músculo y tejido adiposo, originando así un estado conocido como “**endotoxemia metabólica**”¹⁰⁹. El LPS procedente de la flora intestinal podría iniciar una cascada inflamatoria a través de la activación de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR, por sus siglas en inglés), tales como el receptor *Toll-like (TLR) 4*, conduciendo a un estado de RI en diferentes tejidos metabólicos que expresan TLR4, como el tejido adiposo, el músculo o el hígado¹¹¹. En apoyo a esta hipótesis se ha comprobado que los niveles plasmáticos de LPS están aumentados en individuos obesos y/o con DM2¹¹²⁻¹¹⁴.

Lípidos endógenos o de la dieta

Los AGL de la dieta (concretamente, los ácidos grasos saturados) o los liberados por el tejido adiposo durante la lipólisis se encuentran elevados en circulación en obesidad e inducen inflamación al unirse y activar los receptores TLR4 y TLR2^{115,116}. Además, se ha observado que ratones deficientes en TLR4 o en TLR2 están protegidos de la activación inflamatoria y de la RI asociadas a la obesidad^{117,118}. De hecho, los niveles de expresión tanto de TLR2 como de TLR4 se encuentran elevados en tejido adiposo de individuos obesos¹¹⁹ y en monocitos de sujetos con DM2¹²⁰. En el adipocito, la activación de TLR4 o TLR2 transduce una cascada de señalización hacia la activación del factor

nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B), dando lugar a la expresión de quimioquinas atrayentes (ej- MCP-1) de macrófagos proinflamatorios que se infiltrarán en el tejido adiposo.

Hipertrofia y muerte celular del adipocito

En el tejido adiposo obeso, los adipocitos hipertrofiados muestran alteraciones de carácter necrótico ^{92,121,122}. Los adipocitos necróticos liberan numerosas señales que reclutan monocitos de la sangre hacia el tejido adiposo obeso donde se activan como macrófagos proinflamatorios ¹⁰¹, mientras que macrófagos residentes del tejido adiposo obeso se activan y proliferan en torno a un adipocito muerto, pudiéndose observar **CLS** a nivel histológico ^{92,98}. Los adipocitos estresados y en estado necrótico liberan componentes de su núcleo y citosol que son reconocidos como patrones moleculares asociados a daño celular (**DAMP**, por sus siglas en inglés) por los ATMs a través de otro tipo de PRR conocidos como receptores *NOD-like* (NLR) ¹²³. Los NLRs activan la vía NLRP3 (del inglés: *NLR Family Pyrin Domain Containing 3*) del inflamosoma en los macrófagos que induce la producción de las citoquinas inflamatorias IL-1 β e IL-18 a través de la acción de la Caspasa-1, lo que sugiere un importante nexo entre la muerte del adipocito y la inflamación. A favor de esta hipótesis, se ha comprobado que ratones deficientes en NLRP3 están protegidos de la inflamación y la RI inducidos en obesidad ¹²⁴. Además, la actividad de NLRP3 se ha visto aumentada en células mieloides de pacientes con DM2 ¹²⁵. Este proceso supone un incremento importante del número de macrófagos activados en el tejido adiposo en obesidad y un estado inflamatorio que afecta negativamente la sensibilidad a la insulina.

Hipoxia

La hipoxia ocurre cuando el suministro de oxígeno no satisface la demanda de los tejidos. Durante la obesidad, la rápida expansión del

tejido adiposo y el descompensado soporte de vascularización provoca la aparición de áreas donde la tensión de oxígeno se ve reducida y los adipocitos sufren **hipoxia**^{126,127}. La hipoxia puede inducir inflamación en el tejido adiposo mediante la inducción de la expresión de genes relacionados con la hipoxia en adipocitos y macrófagos. Un importante regulador de la respuesta adaptativa a alteraciones en la tensión de oxígeno es el factor 1 alfa de inducción de la hipoxia (**HIF-1 α**), el cual es un factor de transcripción que se acumula durante la hipoxia y activa las vías del NF- κ B, lo que activa la inflamación en áreas localizadas de hipoxia¹²⁸. HIF-1 α se expresa en el tejido adiposo humano, tanto en adipocitos aislados como en los macrófagos infiltrantes y su expresión está aumentada en tejido adiposo de individuos obesos¹⁰⁴.

Estrés celular

La expansión alterada y la hipertrofia del tejido adiposo en la obesidad conducen a un estado disfuncional del adipocito y estrés celular que promueven la activación de vías sensibles a diferentes estímulos de estrés que contribuyen a la inflamación.

Existe una correlación positiva entre el IMC y biomarcadores de estrés oxidativo¹²⁹, y además está reportado en la literatura que la obesidad induce producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) causantes de **estrés oxidativo** en los adipocitos¹³⁰. El aumento de glucosa y ácidos grasos en el adipocito activa diferentes vías que resultan en la disfunción mitocondrial y un incremento en la producción de ROS, que sobrepasa los mecanismos de defensa antioxidantes de la célula generando así un estado desequilibrado de estrés oxidativo^{130,131}. ROS activa sensores de estrés, como las MAPK JNK y P38 y el factor de

transcripción NF- κ B, que inducen un estado inflamatorio en el adipocito, la liberación alterada de adipoquinas diabéticas y RI¹³¹ (**Figura 7**).

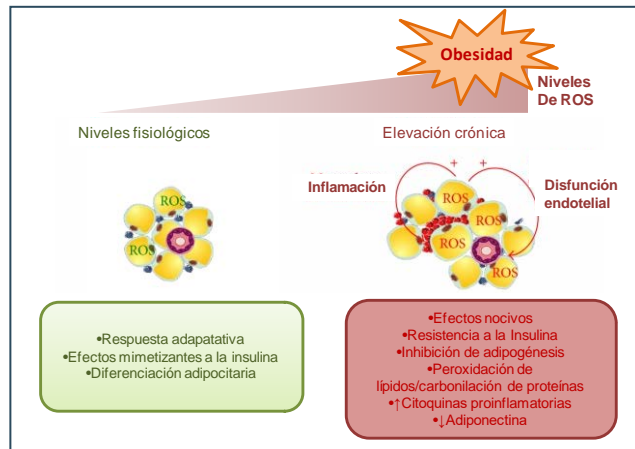


Figura 7. Estrés oxidativo en tejido adiposo. Las respuestas metabólicas adaptativas o nocivas dependen de los niveles de ROS en el metabolismo del tejido adiposo. Dependiendo de los niveles intracelulares de ROS, los adipocitos desencadenarán diferentes respuestas metabólicas. Los niveles fisiológicos de ROS, mantenidos por un sistema de desintoxicación eficiente, pueden inducir efectos similares a la insulina del H_2O_2 y favorecer la adipogénesis, que puede verse como una respuesta adaptativa para hacer frente a la sobrecarga de nutrientes. Por el contrario, el equilibrio redox excesivo o inapropiado conducirá a un aumento considerable de ROS intracelulares que tendrá efectos perjudiciales, particularmente al alterar la señalización de insulina, la secreción de adipoquinas y la diferenciación adipocitaria. La peroxidación lipídica, la carbonilación de proteínas y la secreción de citoquinas proinflamatorias se incrementan en los adipocitos obesos después de la exposición a altos niveles de ROS. Por otra parte, la mejora de la producción de ROS por adipocitos hipertrofiados también afecta al entorno vecino, es decir, las células inmunes infiltradas en TAB o las células endoteliales en las proximidades del tejido adiposo perivascular. Los macrófagos se representan esquemáticamente en azul (tipo M2) o rojo (M1) entre los adipocitos. Fuente adaptada de Lay et al.2014¹³²

En 2004 se describió en modelos de ratones que la obesidad también causa **estrés de retículo endoplasmático (ERE)** y que, además, conlleva la inactivación de la cascada de señalización de la insulina¹³³.

El retículo endoplasmático es un orgánulo subcelular implicado en la síntesis de lípidos y el procesamiento de proteínas. Diversas

perturbaciones asociadas con la obesidad, como endotoxemia, RI con hiperglucemia, AGL elevados, hipernutrición, hipoxia local o el estrés oxidativo pueden conducir a la aparición de ERE en el tejido adiposo, lo que activa la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, por sus siglas en inglés) ¹³⁴. La activación de UPR induce la transcripción de genes implicados en el ensamblaje, plegamiento, modificación y degradación de proteínas para aliviar el ERE, y también aumenta la actividad de las quinasas sensoras de estrés y la expresión de citoquinas proinflamatorias ^{106,135} (**Figura 8**). De hecho estudios recientes han mostrado que el estrés de retículo endoplasmático es uno de los factores etiológicos de la inflamación crónica en el tejido adiposo en obesidad ¹³⁶⁻¹³⁸.

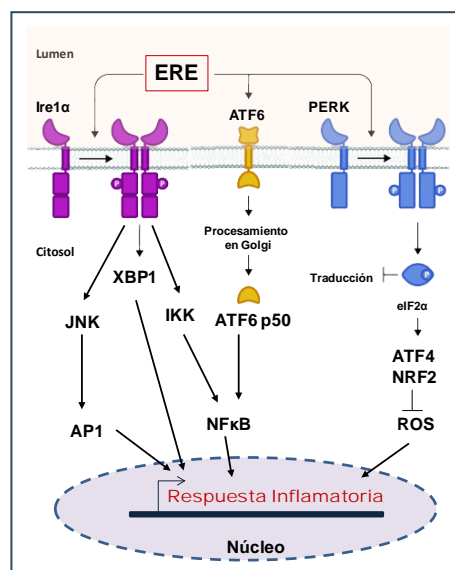


Figura 8. Señalización inflamatoria mediada por el sistema UPR. La UPR regula la inflamación a través de una variedad de mecanismos que implican ROS, JNK y NFκB. PERK promueve ATF4 y NRF2, que luego suprimen la producción de ROS mediante la activación de la vía antioxidante. Tras la activación, el complejo IRE1α / TRAF2 recluta IKK (quinasa IκB), lo que conduce a la fosforilación de IκBα y la posterior activación de NFκB. IRE1α / TRAF2 también puede activar JNK, seguido de la activación de AP1. XBP-1 inducido por IRE1α también puede inducir la expresión de diversos genes implicados en la inflamación. Además, ATF6 en su forma soluble puede promover la inflamación mediante la activación de NFκB. Fuente adaptada de Zhong 2013 ¹³⁹

4.3. Citoquinas

Las citoquinas son hormonas de naturaleza peptídica que regulan la respuesta inflamatoria, y actúan interaccionando con receptores específicos que activan funciones de proliferación y diferenciación celular, quimiotaxis, etc., en la célula diana. Son secretadas fundamentalmente por los linfocitos y macrófagos activados, aunque también pueden ser producidas por leucocitos polimorfonucleares, células endoteliales, epiteliales, adipocitos y células del tejido conjuntivo. Según la célula que las produzca se denominan linfoquinas (linfocito), monoquinas (monocitos), **adipoquinas** (adipocitos) o interleuquinas (células hematopoyéticas), o si desempeñan una función quimiotáctica son denominadas quimioquinas.

El tejido adiposo está involucrado en la regulación de la función celular e influye en la respuesta de diversos tejidos a través de la secreción de adipoquinas, que actúan a nivel **endocrino, paracrino y/o autocrino**. En obesidad se han identificado perfiles de expresión alterados de numerosas adipoquinas, algunas con funciones protectoras, y otras con efectos inflamatorios y metabólicos perjudiciales. El equilibrio entre estos mensajeros químicos es de vital importancia para mantener la homeostasis del organismo. El balance desregulado entre adipoquinas pro- y antiinflamatorias puede dar lugar al desencadenamiento de diversas patologías asociadas a la obesidad y la resistencia a la insulina como enfermedades hepáticas, cardiovasculares o DM2 ⁸⁴.

Hasta la fecha se han identificado más de 600 adipoquinas secretadas por el tejido adiposo ¹⁴⁰. A continuación, en las **Tablas 3 y 4** se listan brevemente aquellas adipoquinas alteradas en obesidad y/o DM2.

| Adipoquina | Distribución y secreción | Función | Aumento de los niveles circulantes en obesidad |
|-------------------------------|--|--|---|
| Leptina | Secretada por TAB, hipotálamo, epitelio gástrico, placenta y gónadas | Regula ingesta y gasto energético. Regula metabolismo lipídico y señalización insulina | Ratones y humanos obesos (correlación con IMC) |
| Resistina | En roedores, secretada por los adipocitos. Humanos, secretada por macrófagos y monocitos y TAB | Metabolismo glucosa, neogluconeogénesis y RI en roedores. Pro-inflamatorio en humanos | Ratones y humanos obesos. Correlación con IR y DM2 |
| TNFα | Macrófagos y adipocitos | Metabolismo de la glucosa e insulina. Provoca RI, estimula lipólisis e inhibe adipogénesis | Ratones y humanos obesos (correlación con IMC) |
| IL-6 | Adipocitos, macrófagos, músculo esquelético, células endoteliales y fibroblastos | Metabolismo de la glucosa. Papel controvertido en RI | Humanos obesos. Correlación positiva con adiposidad. Aumentado en plasma de DM2 |
| IL-7 | Células del estroma y del endotelio vascular | Homeostasis sistema inmune. Regula peso corporal, masa grasa y señalización insulina | Aumentada en obesos mórbidos |
| IL-8 | Adipocitos y macrófagos | Quimiotaxis de neutrófilos | Relacionado con masa grasa y niveles TNF α |
| IL-1 | Adipocitos y macrófagos | Quimiotaxis macrófagos y termogénesis | Ratones obesos, correlación con IMC e IR |
| RBP4 | Adipocitos, macrófagos y hepatocitos | Afecta la sensibilidad a la insulina, producción glucosa hepática y señalización insulina en músculo | Niveles aumentados en obesos. Correlación con IMC e IR |
| MCP-1 | Tejido adiposo | Reclutamiento de macrófagos en TAB. Inflamación. Afecta la sensibilidad a la insulina. | Aumentado en modelos de ratones obesos y pacientes con DM2 |

| PAI-1 | Tejido adiposo blanco | Inhibidor de la vía fibrinolítica | Aumentado en humanos obesos y DM2 |
|-------------------------|---|--|--|
| CXCL5 | Macrófagos de la fracción estroma vascular | Interfiere con la señalización de la insulina en músculo | Niveles elevados en individuos obesos y disminuyen tras dieta baja en calorías |
| Visfatina | Hígado, músculo, TAB, médula ósea, linfocitos | Afecta secreción y sensibilidad a la insulina. Propiedades inflamatorias | Relacionado con adiposidad visceral en humanos |
| Chemerina | TAB y placenta | Diferenciación adipocitaria, función metabólica e inflamación vascular | Obesos y DM2 Aumentado en individuos con infarto agudo de miocardio |
| Angiotensinógeno | Hígado y TAB | Regulación de la presión arterial. Asociado a hipertensión y adiposidad | Asociado a hipertensión en obesidad |
| Vasplina | TAB, hipotálamo, islotes pancreáticos, piel | Mejora sensibilidad a la insulina | Aumentado en obesidad y DM2 |
| WISP2 | TAB, osteoblastos, músculo y cartílago | Antiadipogénico, Mejora RI y aumenta producción de adiponectina | Aumentado en obesidad y RI |
| Ceruloplasmina | TAB, hígado, cerebro, pulmones, bazo y testículos | Angiogénesis | Potencial marcador de cáncer asociado a obesidad |
| SAA | Hígado y TAB | Proinflamatorio, Aterogénico y promueve la lipólisis | Marcador de riesgo cardiovascular en obesidad. Reduce sus niveles con la pérdida de peso |

Tabla 3. Adipoquinas y/o citoquinas aumentadas en la obesidad y/o DM2.
 Fuente adaptada de Makki, Froguel, y Wolowczuk 2013⁸⁴; Leal y Mafra 2013¹⁴¹; Arner et al. 2014¹⁴² y Grünberg et al. 2017¹⁴³. RBP4: retinol binding protein 4; CXCL5: quimioquina 5 con motivo C-X-C; WISP2: *WNT1-inducible signaling pathway protein 2*; SAA: amiloide sérico tipo A

| Adipoquina | Distribución y secreción | Función | Disminución de los niveles circulantes en obesidad |
|---------------------|---|---|--|
| Adiponectina | Sólo tejido adiposo | Insulino-sensibilizador. Mejora RI y metabolismo de la glucosa | Disminuido en obesidad. Correlación negativa con IMC. Aumenta tras pérdida de peso. |
| IL-10 | Monocitos, macrófagos, células dendríticas, células B y T | Mejora la sensibilidad a la insulina y transporte de glucosa | Atenuado en DM2. Aumenta con pérdida peso |
| Omentina | TAB, corazón, pulmones, ovario y placenta. | Mejora captación de glucosa en adipocitos humanos. Efecto anti-inflamatorio | Niveles bajos en individuos obesos, DM2 e intolerantes a glucosa Reducidos en individuos con infarto agudo de miocardio |
| SFRP5 | TAB, retina y páncreas | Antiinflamatorio y mejora la sensibilidad a la insulina | Reducido en DM2, intolerancia a la glucosa y obesidad en roedores y humanos. Aumenta con la pérdida de peso |
| ZAG | TAB | Promotor de gasto energético y lipólisis | Inversamente relacionado con IMC y CC |

Tabla 4. Adipoquinas y/o citocinas disminuidas en la obesidad y/o la DM2.
Fuente adaptada de Makki, Froguel, y Wolowczuk 2013⁸⁴; Leal y Mafra 2013¹⁴¹; y Tan et al. 2014¹⁴⁴. SFR5: *Frizzled related protein 5*; ZAG: glicoproteína Zinc- α 2

4.3.1. TNF α y RI en el adipocito

TNF α es una citoquina multifuncional que puede regular diversos procesos celulares y biológicos, como la función inmunitaria, la diferenciación celular, la proliferación, la apoptosis y el metabolismo energético³⁹.

La primera vez que se identificó el TNF α en el tejido adiposo, fue en modelos de animales obesos en los cuales los niveles de TNF α en TAB estaban marcadamente elevados. Este hallazgo tuvo especial repercusión puesto que se observó que TNF α reprimía la captación de glucosa inducida por insulina, asociando por primera vez la inflamación con la RI en la obesidad ⁸². En tejido adiposo de individuos obesos los niveles de TNF α están sobreexpresados. En suero de pacientes obesos los niveles circulantes de TNF α son más elevados y se reducen con la pérdida de peso ¹⁴⁵. Además, se ha demostrado que la mayor fuente de TNF α en el tejido adiposo obeso reside en los ATMs ¹⁴⁶.

La citoquina TNF α es inducida por el factor de transcripción NF- κ B y la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) y se sintetiza como una proteína transmembrana de 26 kDa, que tras el procesamiento enzimático por la enzima convertidora de TNF α (TACE, o también conocida como ADAM17), da lugar a una forma soluble de 17 kDa ¹⁴⁷. TNF α ejerce sus efectos a través de los receptores de TNF α tipo I y II [TNFR1 (60kDa) y TNFR2 (80kDa), respectivamente], ambos sobreexpresados en obesidad tanto en TAS como en TAV ¹⁴⁸. Sin embargo, la acción de TNF α en la función del tejido adiposo depende principalmente de la señalización a través TNFR1 ¹⁴⁹⁻¹⁵¹.

TNF α induce RI en el adipocito y lo hace a través de diferentes mecanismos (**Figura 9**):

- ▶ A nivel transcripcional y a través de la activación de NF- κ B y las vías de las MAPK, TNF α inhibe la expresión de diversas proteínas necesarias para la captación de glucosa estimulada por la insulina en los adipocitos, como PPAR γ , INSR, IRS-1 y GLUT4 ¹⁵²⁻¹⁵⁴.

- ▶ También induce RI a través de la activación de inhibidores de IRS-1 como JNK, IKK β y SOCS3¹⁵⁵⁻¹⁵⁸.
- ▶ TNF α es un inhibidor de la adipogénesis y altera el metabolismo lipídico en el adipocito promoviendo la lipólisis e inhibiendo la captación de AGL y la lipogénesis^{159,160}. La alteración en el desarrollo y expansión del tejido adiposo, así como el aumento de AGL en el tejido adiposo y en circulación también contribuyen a la RI¹⁶¹.
- ▶ Los efectos transcripcionales del TNF α además promueven el ERE, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial, lo cual también compromete a la señalización de la insulina y el metabolismo lipídico de los adipocitos^{153,162-164}.

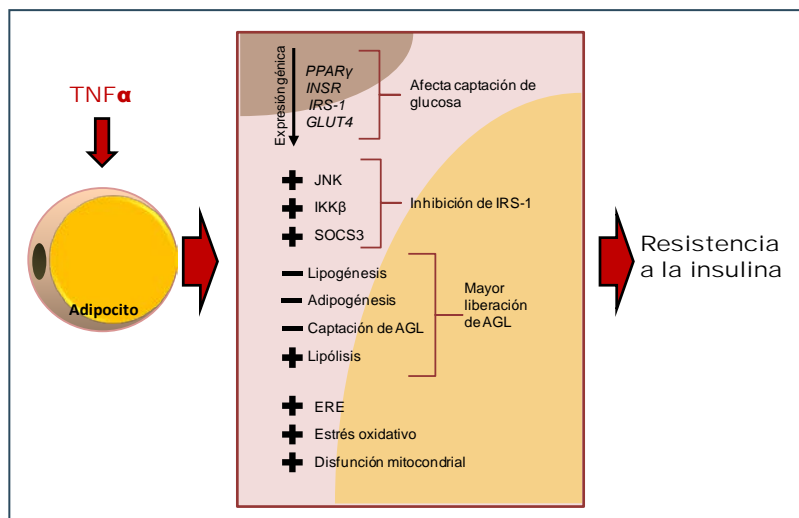


Figura 9. Mecanismos de inducción de RI por TNF α en el adipocito. Los símbolos + y - indican activación e inhibición, respectivamente. TNF α : factor de necrosis tumoral *alfa*; PPAR γ : receptor activado por proliferadores de peroxisomas *gamma*; INSR: receptor de insulina; IRS-1: sustrato 1 del INSR; GLUT4: Transportador de Glucosa de tipo 4; IKK β : Subunidad *beta* del inhibidor de la quinasa de NF κ B; JNK: quinasa c-Jun N-terminal; SOCS3: Supresor de la Señalización de Citoquinas 3; AGL: Ácidos grasos libres ;ERE: Estrés de retículo endoplasmático.

5. MicroARNs (miRNAs)

5.1. Introducción a los miRNAs

Los **miRNAs** se definen como **ARNs reguladores** de ~17 a 24 nucleótidos (nt), no codificantes y altamente **conservados** que actúan como moléculas guía para un complejo de proteínas efectoras del silenciamiento de ARNs mensajeros, reprimiendo su traducción e induciendo su degradación. Un único miRNA normalmente regula simultáneamente una gran cantidad de genes diana, al tiempo que un mismo gen puede estar regulado por múltiples miRNAs ^{165,166}. Esto supone una gran complejidad en la regulación de redes de genes y vías de señalización.

5.1.1. Descubrimiento de los miRNAs

En 1993 se descubrió la presencia de **un ARN de pequeño tamaño, origen endógeno y con función reguladora** en *Caenorhabditis elegans*, por Victor Ambros, Rosalind Lee y Rhonda Feinbaum: **Lin-4**, en relación con el gen *lin-14* ¹⁶⁷. Lin-4 codifica dos ARN de pequeño tamaño de 61 nt y 22 nt, respectivamente. El ARN de 61 nt, con estructura secundaria de bucle en horquilla, se propuso como precursor del otro más corto. Este gen se expresa durante la fase temprana del desarrollo larval del nematodo *C. elegans* y regula la expresión del gen *lin-14* por represión translacional, reconociendo en su ARNm secuencias complementarias en la región 3' no traducida (en inglés, 3'UTR) ¹⁶⁷, pero no hallaron homólogos para Lin-4 en otras especies. No fue hasta siete años después cuando se descubrió otro ARN regulador de características similares: el microARN **let-7**, que

regulaba la transición de larva L4 de *C. elegans* a adulto reprimiendo la expresión de *lin-41* y además presentaba genes homólogos en humanos¹⁶⁸. Sin embargo, no fue hasta 2001 cuando se acuñó por primera vez la palabra microARN (miRNA en inglés)¹⁶⁹.

5.1.2. Nomenclatura de los miRNAs

El método estándar de nomenclatura se recoge en la base de datos de miRNAs denominada **miRBase**¹⁷⁰.

Los miRNAs maduros se nombran con el prefijo miR- seguido de un número, de acuerdo al orden de registro de miRNAs. Los genes que codifican miRNAs parálogos se indican añadiendo una letra como sufijo (por ejemplo, miR-125a y miR-125b). Los miRNAs parálogos tan sólo se diferencian en una o dos bases de su **semilla** [secuencia heptamérica de los nucleótidos 2 al 8 del miRNA (sentido 5'→3') perfectamente complementaria al ARNm diana]. Si el mismo miRNA maduro se genera a partir de múltiples *loci* separados, se agregan sufijos numéricos al final de los nombres de los loci de miRNA (por ejemplo, miR-125b-1 y miR-125b-2). Cada *locus* produce dos miRNAs maduros: uno de la cadena 5' y otro de la cadena 3' del precursor (por ejemplo, miR-125a-5p y miR-125a-3p). Sin embargo, un brazo (la hebra "guía") suele ser mucho más frecuente y biológicamente más activo que el otro brazo (hebra "pasajera", también anotada como miRNA*). Por último, para referirse a la especie puede añadirse un prefijo seguido de un guión delante de miR, por ejemplo hsa-miR-125a-5p, se refiere al miRNA hsa-miR-125a-5p en la especie *Homo sapiens*.

5.1.3. Codificación y clasificación de miRNAs

Los miRNAs pertenecen a una gran familia de genes ampliamente distribuidos en virus, protozoos, hongos, plantas y animales ¹⁷¹. En humanos, la mayoría de los miRNAs están codificados por intrones integrados en secuencias codificantes o no codificantes, o bien algunos miRNAs son codificados por regiones exónicas. Además, es común encontrar varios *loci* de miRNA cerca los unos de los otros, constituyendo así una unidad de transcripción policistrónica (*cluster*, en inglés) ¹⁷². En humanos, cerca del 40% aparecen agrupados formando *clusters* entre los más de 2.600 miRNAs ya catalogados en la base de datos de miRNAs miRBase.org ¹⁷³. Uno de los *clusters* más caracterizados es el miR-17~92, que codifica para miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 y miR-92a. Además los *clusters* pueden clasificarse como familias de *clusters*. Siguiendo con el mismo ejemplo, el *cluster* mir-17~92 forma junto al *cluster* miR-106b~25 y el *cluster* miR-106a~363 la familia de *clusters* miR-17~92 ¹⁷⁴. Los miRNAs agrupados en *clusters* o familias de *clusters* están altamente conservados a lo largo de la evolución, y la teoría más aceptada es que estos miRNAs regulan de forma coordinada genes funcionalmente relacionados ¹⁷⁵.

5.1.4. Transcripción y procesamiento de miRNAs en células animales

Los genes de miRNA pueden residir en los intrones de genes que codifican proteínas y, por lo tanto, o bien comparten el promotor del gen que los contiene o bien, los promotores de miRNA intrónicos son distintos de los promotores de sus genes hospedadores ^{176,177}.

Los genes de miRNAs son transcritos por la **ARN polimerasa II** (Pol II), dando lugar a un transcrito primario o **pri-miRNA**, de una longitud de aproximadamente de 1 Kb ¹⁷⁸. Este proceso inicial está controlado por

factores de transcripción y reguladores epigenéticos ¹⁷⁹. El pri-miRNA consta de una secuencia de ARN lineal con un *cap* 7-metilguanosa en su extremo 5' y una cola de poliadenina en su extremo 3'. Además contiene una estructura secundaria en forma de uno o más bucles en horquilla, dependiendo de si el pri-mirna codifica para uno o varios miRNAs. Cada estructura de bucle en horquilla está formada a su vez por un tallo de ARN de doble cadena (~33 pares de bases), donde se localizan las secuencias del miRNA y la hebra pasajera complementaria, así como un bucle terminal de cadena simple.

En el núcleo, el pri-miRNA es reconocido y procesado por la endorribonucleasa **Drosha** ¹⁸⁰ (**Figura 10**), una proteína nuclear de 160 kiloDaltons (kDa) perteneciente a la familia de las endonucleasas RNAsas de tipo III, específicas de ARN de doble cadena ¹⁸¹. Drosha forma un complejo con su cofactor **DGCR8** (en inglés, *DiGeorge syndrome chromosomal region 8*), y se le denomina **microprocesador**. Este complejo reconoce el pri-mirna e introduce un corte en cada hebra del tallo de la horquilla liberando una nueva horquilla de ARN de ~65 nt de longitud, el miRNA precursor o **pre-miRNA** ^{182,183} (**Figuras 10 y 11**).

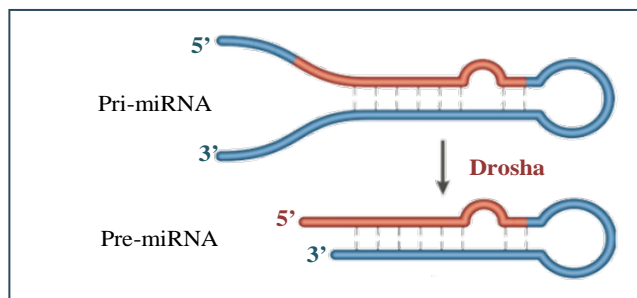


Figura 10. Esquema de Pri-miRNA y pre-miRNA. Los miRNAs son transcritos por la RNAsa polimerasa II dando lugar al pri-miRNA, y este es procesado en el núcleo por la endorribonucleasa DROSHA para dar lugar al pre-miRNA. El color rojo indica la secuencia del futuro miRNA maduro.

Tras el primer procesamiento en el núcleo, la **Exportina 5** dependiente de Ran-Guanosina Trifosfato (GTP) se une al pre-miRNA y lo transporta activamente al citoplasma a través de los poros nucleares^{184,185}. A continuación, la GTPasa Ran asociada hidroliza el GTP y la exportina libera el pre-miRNA en el citosol, donde es reconocido y procesado por DICER, una endorribonucleasa de tipo III citosólica de ~200kDa^{186,187} (**Figura 11**).

En cuanto a su estructura, **DICER** contiene un dominio helicasa N-terminal, un dominio C-terminal PIWI-AGO-ZWILLE (PAZ) y un centro catalítico formado por dos dominios con actividad endorribonucleasa de tipo III: RIIIa y RIIIb. El dominio helicasa interacciona con el bucle terminal del pre-miRNA¹⁸⁸, mientras que el dominio PAZ reconoce los extremos 3' hidroxilo y 5' fosfato del pre-miRNA^{189,190}. A 19-24nt del extremo 5' fosfato del pre-miRNA, los dominios RIIIa y RIIIb introducen un corte en cada hebra dando lugar a un dúplex de ARN de pequeño tamaño¹⁹¹. A continuación el dúplex pasa a formar parte una proteína Argonauta (AGO 1-4 en humanos)¹⁹² con la ayuda de su cofactor TRBP (en inglés, *HIV-1 TAR RNA binding protein*), una proteína con sitios de unión a ARN de doble hélice^{193,194} (**Figura 11**).

La proteína **AGO** presenta una conformación bilobular y se compone de los siguientes dominios: en el lóbulo N-terminal se localizan los dominios N-terminal y PAZ; y en el lóbulo C-terminal los dominios MID y PIWI ¹⁹⁵. El nucleótido del extremo 5' del miRNA guía se inserta en el bolsillo MID, mientras que extremo 3' interactúa con el dominio PAZ ¹⁹⁶. La proteína AGO separa y libera la hebra pasajera conservando el ARN guía ^{197,198}, que corresponde al miRNA maduro de cadena sencilla, formando así el **Complejo de silenciamiento inducido por ARN** (miRISC, por sus siglas en inglés) ¹⁹⁹ (**Figura 11**).

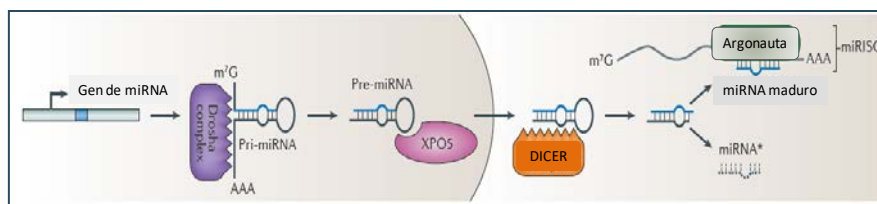


Figura 11. Procesamiento de miRNAs. Los pre-miRNAs, resultantes del procesamiento por DROSHA en el núcleo, son transportados al citoplasma por la exportina 5 (XPO5). El complejo DICER elimina la región del bucle de pre-miRNAs, y una de las cadenas del dúplex resultante se une al Argonauta para formar un complejo de silenciamiento inducido por miRNA (miRISC), que se dirige a los mRNA para la regulación. La otra cadena, que a menudo se llama cadena pasajera (miRNA *), se degrada. Fuente adaptada de Pasquinelli 2012 ²⁰⁰.

5.1.5. Mecanismos de acción de los miRNAs

Tras la maduración del miRNA y la formación del miRISC, éste reconoce y se asocia con un ARNm diana, normalmente en su 3'UTR), reprimiendo su traducción e induciendo su degradación ^{200,201} (**Figura 12**).

La especificidad del miRISC con su diana depende de la complementariedad entre la semilla del miRNA y el ARNm ²⁰². También es requisito la existencia de cierto grado de complementariedad entre el

extremo 3' del miRNA y el mensajero, ya que aporta estabilidad termodinámica a la interacción²⁰¹.

El mecanismo, a través del cual el miRISC reduce la expresión del ARNm diana, es todavía objeto de discusión. Lo que es un hecho es que el miRISC reprime la traducción del ARNm diana precediendo a su desestabilización por deadenilación, y en consecuencia su degradación^{203,204}.

El miRISC unido a su ARNm diana, actúa como plataforma para la actuación de otras proteínas, conocidas como *P-bodies*, que participarán en el bloqueo de la iniciación interfiriendo la actividad del complejo de iniciación eIF4F^{205,206}, y la deadenilación de la cola de poliadenina del ARNm^{203,204}. La proteína **GW182** (TNRC6A-C en humanos) interacciona con la proteína AGO y con la proteína de unión a poliadeninas (**PABP**), a la vez que recluta los complejos con actividad deadenilasa **PAN2-PAN3** y **CCR4-NOT**²⁰⁷⁻²⁰⁹ (**Figura 12**). Este último, además, recluta a la helicasa con caja DEAD eIF4A2²¹⁰. La helicasa eIF4A2 inhibe la lectura de la subunidad 40S del ribosoma en la región 5'UTR del ARNm en busca del codon de iniciación AUG^{210,211}. Tras la represión de la traducción, los complejos PAN2-PAN3 y CCR4-NOT efectúan la deadenilación del mensajero²¹²⁻²¹⁴ (**Figura 12**). Además, un estudio de 2013 apunta a que el miRISC también recluta factores de *decapping* que eliminan el *cap* 5' del ARNm²¹⁵. Finalmente, el ARNm diana es enviado a su degradación.

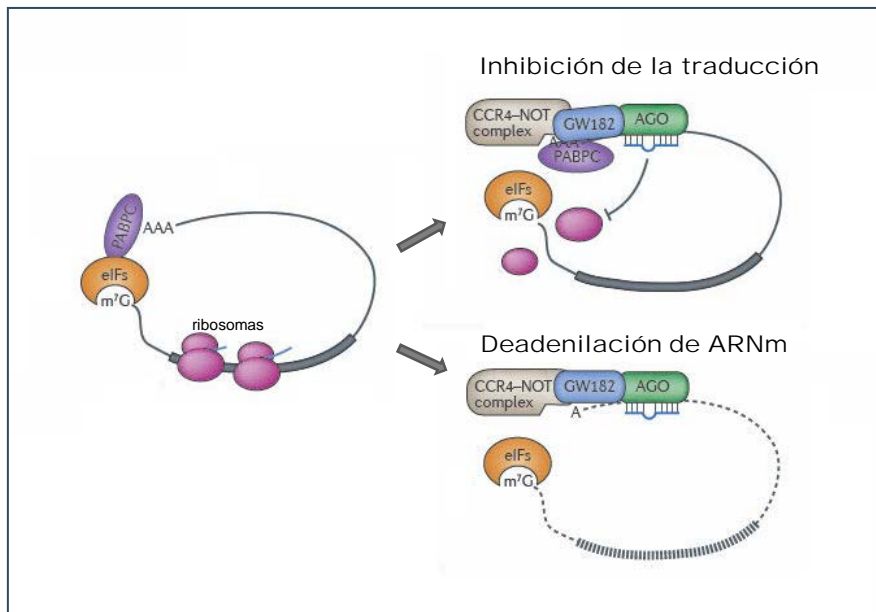


Figura 12. Mecanismos de acción de miRNAs. Los miRNAs unidos a su argonata (AGO) regulan la expresión génica a nivel postranscripcional inhibiendo la traducción a proteínas de su gen diana e induciendo la deadenilación del ARNm; ambos procesos a través del reclutamiento del complejo CCR4–NOT por la proteína GW182 asociada al miRISC. *Fuente modificada de Pasquinelli 2012*²⁰⁰.

5.1.6. Herramientas de predicción de dianas de miRNAs

Los **algoritmos de predicción** de dianas para miRNAs son herramientas informáticas para identificar y computar de forma aproximada la eficiencia de la interacción de los sitios de hibridación entre el miRNA y el ARNm, así como la estimación de la eficiencia de inhibición del ARNm diana, obteniendo un valor que se correlaciona directamente con la probabilidad de inhibir la expresión del mensajero

216,217

La estimación de dicho valor predictivo debe atender a las características contextuales de linealidad del dúplex miRNA:ARNm (grado de complementariedad, energía libre de unión, contenido de

repeticiones AU, accesibilidad de la estructura secundaria del miRNA y a abundancia de sitios de unión en el ARNm diana) y el grado de conservación evolutiva (valor biológico funcional) de las secuencias que participan en dicha interacción. Un mismo miRNA puede presentar diferentes sitios de unión o elementos de reconocimiento del miRNA (ERM) en la misma secuencia de la 3'UTR de un ARNm, lo que potencia su valor predictivo. También es fácil encontrar un mismo ARNm con potenciales ERMs para diferentes miRNAs, lo que da lugar a un potencial efecto sumatorio de regulación^{216,217}. A continuación se listan algunos de los algoritmos más utilizados en la predicción de dianas para miRNAs (Tabla 5):

| Herramienta de predicción | Complementariedad de la semilla | Conservación | Energía libre de la interacción miRNA:ARNm | Accesibilidad al sitio | Abundancia de sitios de unión | Máquina de aprendizaje |
|---------------------------|---------------------------------|--------------|--|------------------------|-------------------------------|------------------------|
| miRanda-mirSVR | X | X | X | X | | X |
| TargetScan | X | X | | | | |
| DIANA-microT- | X | X | X | X | X | X |
| MirTarget2 | X | X | X | X | | X |
| RNA22-GUI | X | | X | | | |
| TargetMiner | X | X | X | X | X | X |
| SVMicrO | X | X | X | X | X | X |
| PITA | X | X | X | X | X | |
| RNAhybrid | X | | X | | X | |

Tabla 5. Herramientas de predicción de dianas de miRNAs. En la primera columna se listan los diferentes algoritmos de predicción de dianas para miRNAs. Los algoritmos operan atendiendo a diferentes características que definen el potencial de la interacción miRNA-ARNm (indicado con una X). Acceso a páginas web: miRanda-mirSVR <http://www.microrna.org/>; TargetScan <http://www.targetscan.org/>; DIANA-microT-CDS <http://www.microrna.gr/microT-CDS>; MirTarget2 <http://mirdb.org>; RNA22-GUI <https://cm.jefferson.edu/rna22v1.0/>; TargetMiner https://www.isical.ac.in/~bioinfo_miu/targetminer20.htm; SVMicrO <http://compgenomics.utsa.edu/svmicro.html>; PITA <http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/>; RNAhybrid <http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>. Fuente adaptada de Peterson et al., 2014²¹⁸.

La validación experimental de dianas de miRNAs puede realizarse por diferentes métodos²¹⁶, de los cuales destacan los siguientes:

- Sobreexpresión transitoria de miRNAs artificiales. Se evalúa la acción represora del miRNA sobre los niveles de expresión endógenos del gen diana. Si la diana es real, su expresión se verá reducida.

- Inhibición de miRNAs endógenos. Se evalúa la expresión del gen diana. Si la diana es real, su expresión se verá aumentada.
- Sobreexpresión transitoria de miRNAs artificiales en cotransfección con un sistema de expresión de luciferasa conjugada a la región 3'UTR del gen diana. Validación específica de los sitios de unión.
- Análisis de interacción miRNA-ARNm por microarray. Aunque permite analizar numerosas interacciones, solo detecta cambios de expresión a nivel de ARNm lo que conduce a probables falsos negativos.
- Inmunoprecipitación de complejos proteína AGO-miRNA-ARNm y secuenciación, técnica conocida como HITS-CLIP. Solo permite detectar interacciones entre el miRNA y su ARNm diana.

5.2. miRNAs, obesidad y RI

En la obesidad se han descrito miRNAs desregulados y muchos de ellos se han visto implicados en diferentes procesos metabólicos, inflamación, adipogénesis y RI²¹⁹⁻²²¹.

5.2.1. miRNAs alterados en TAB en obesidad

Como ya se ha comentado en apartados anteriores, el tejido adiposo es más que un reservorio de energía. Los procesos que implican la expansión del tejido adiposo, su función endocrina o su papel en la homeostasis energética del organismo y la inflamación, son procesos altamente regulados, no solo por complejas cascadas de señalización, factores de transcripción o epigenéticos, sino también por los miRNAs, que ejecutan importantes funciones reguladoras.

En algunos estudios, en los que se ha analizado la expresión génica de miRNAs por la tecnología del chip de ADN o *microarray* de biopsias de TAB, se han identificado diversos miRNAs diferencialmente expresados en el tejido adiposo de individuos obesos con o sin DM (**Tabla 6**).

| Expresión aumentada | Expresión reducida | Tipo de TA | Ref. |
|---|--|----------------------|----------------|
| <i>ninguno</i> | miR-17-5p y miR-132 | TAV | ²²² |
| miR-519d | miR-150 y miR-659 | TAS | ²²³ |
| miR-99a, miR-199a- 5p, miR-125b, miR-221 y miR-1229 | miR-130b, miR-139-5p, miR-185 y miR-484 | TAS | ²²⁴ |
| miR-21 | miR-143 | TAS | ²²⁵ |
| miR-222 y miR-342- 3p | let-7a, let-7d, let-7i, miR-16, miR-26a, miR-30c, miR-92a, miR-126, miR-139- 5p, miR-143, miR-145, miR-151- 5p, miR-193a-5p, miR-193b, miR-197, miR-484-5p, miR-378 y miR-652 | TAS | ²²⁶ |
| miR-221 | miR-193a-3p y miR-193b-5p | TAS | ²²⁷ |
| <i>ninguno</i> | miR-141 y miR-520 | TAV | ²²⁸ |
| <i>ninguno</i> | miR-221 | TAV | ²²⁹ |
| <i>ninguno</i> | miR-125a | TAS y TAV | ²³⁰ |
| <i>ninguno</i> | miR-200a y miR-200b | TAV | ²³¹ |
| miR-146b | <i>Ninguno</i> | TAS | ²³² |
| miR-192-3p | <i>Ninguno</i> | TAV | ²³³ |
| miR-29a-3p/5p | miR-20b-5p | TAS | ²³⁴ |
| <i>ninguno</i> | miR-1275 | adipocitos de TAV | ²³⁵ |
| <i>ninguno</i> | miR-100 | TAV | ²³⁶ |
| miR-146a | <i>Ninguno</i> | TAS | ²³⁷ |

Tabla 6: miRNAs desregulados en tejido adiposo en obesidad. Fuente adaptada de Arner, 2015 ²¹⁹.TA: tejido adiposo; TAV: tejido adiposo visceral; TAS: tejido adiposo subcutáneo

A pesar del número de miRNAs con expresión alterada en el tejido adiposo obeso, muy pocos de estos miRNAs han sido validados funcionalmente en el adipocito (**ver apartado 5.2.3**) por lo que se conoce poco sobre sus dianas y su implicación en el desarrollo de la obesidad o complicaciones asociadas como la RI.

5.2.2. miRNAs reguladores de la adipogénesis

La alteración de la diferenciación adipocitaria en la obesidad ha sido extensamente estudiada por su repercusión negativa en el desarrollo y funcionamiento del tejido adiposo^{238,239}, y en este sentido se ha prestado especial atención a los miRNAs implicados en la adipogénesis²²⁰. Estudios han detectado cambios significativos en la expresión de diversos miRNAs durante la diferenciación de preadipocitos humanos o de ratón a adipocitos maduros. Algunos miRNAs se han caracterizado como miRNAs proadipogénicos y otros como miRNAs antiadipogénicos (**Tabla 7**), regulando directa o indirectamente factores de transcripción y vías de señalización implicados en el proceso de la adipogénesis^{220,240,241}.

| miRNAs proadipogénicos | | miRNAs antiadipogénicos | |
|------------------------|------------|-------------------------|------------|
| miR-17-92 | miR-148a | miR-26a | miR-155 |
| miR-21 | miR-199 | miR-27a/b | miR-185 |
| miR-26b | miR-200a/c | miR-92a | miR-193a/b |
| miR-30 | miR-204 | miR-100 | miR-194 |
| miR-29b | miR-342-3p | miR-135a-5p | miR-206-3p |
| miR-99a-5p | miR-371 | miR-138 | miR-221 |
| miR-103 | miR-378 | miR-139-5p | miR-215-5p |
| miR-122 | miR-429 | miR-143 | miR-224 |
| miR-125b-5p | | miR-145 | miR-302a |
| miR-519 | | miR-146b | miR-335 |
| miR-143 | | miR-150 | miR-369-5p |

Tabla 7. miRNAs proadipogénicos y miRNAs antiadipogénicos. Fuente adaptada de Zaiou 2017²²⁰.

Entre los primeros miRNAs que se hallaron asociados a la adipogénesis se encuentra miR-21, el cual se encuentra sobreexpresado en

el TAS de individuos obesos²²⁵. miR-21 es promotor de la diferenciación de células madre mesenquimales humanas a adipocito modulando negativamente la vía de señalización de TGF- β ²⁴² y positivamente la vía ERK-MAPK²⁴³. Los miembros del *cluster* miR-30 (miR-30a, -30b, -30d y -30e) se han detectado aumentados durante la diferenciación adipocitaria, y también tienen funciones proadipogénicas²⁴⁴⁻²⁴⁶. De hecho la inhibición completa de miR-30 inhibe también la adipogénesis²⁴⁴.

En contrapartida, otros miRNAs son reguladores negativos de la adipogénesis de los que destaca el *cluster* miR-27 (miR-27a y -27b) y miR-130 por su directa inhibición de la expresión de PPAR γ ²⁴⁷⁻²⁴⁹, ya mencionado como un importante regulador del desarrollo del tejido adiposo. miR-155 también juega una importante función antiadipogénica en preadipocitos. miR-155 es inducible por TNF α en adipocitos y participa en el efecto antiadipogénico de esta citoquina en adipocitos 3T3-L1. Se han identificado y validado dianas de miR-155 en C/EBP β , CREB y PPAR γ a través de las cuales reprime la diferenciación adipocitaria²⁵⁰.

5.2.3. miRNAs alterados por la Inflamación y RI

Los niveles de expresión de los miRNAs podrían verse afectados por la inflamación local en el TAB, y estas alteraciones podrían ser causa, al menos en parte, de la disfuncionalidad del tejido adiposo en la obesidad. Se ha detectado expresión alterada por estímulos inflamatorios (TNF α , IL-6, resistina, leptina, etc) con posibles efectos reguladores sobre la señalización de la insulina y la homeostasis de la glucosa en modelos celulares de ratón o en adipocitos humanos *in vitro*.

Los miRNAs que se encuentran asociados con la inflamación y/o la resistencia a la insulina en el adipocito aparecen listados a continuación, junto con las dianas celulares dónde actúan (**Tabla 8**):

| miRNAs | Modelo de estudio | Comportamiento | Dianas validadas | Ref. |
|--|--------------------------------------|--|---|------|
| miR-26a, miR-92a, miR-126, miR-143, miR-193a/b, miR-652, let-7a/d | Preadipocitos humanos diferenciados | Reducen la secreción de MCP-1 | MCP-1 por miR-126 | 226 |
| miR-145 | | miR-193b afecta secreción de IL-6 y MCP-1 | ETS y MAX (inductores indirectos de MCP-1) por miR-193a | |
| miR-26a, let-7d, miR-143, miR-92a, let-7a, miR-193a-5p y miR-193b | Preadipocitos humanos | Reducen secreción de TNF α | — | 251 |
| miR-145 | | Aumenta secreción de TNF α | ADAM-17 | |
| mir-21 | Adipocitos 3T3-L1 de ratón | Reducido en adipocitos RI Su sobreexpresión mejora la sensibilidad a la insulina | PTEN | 252 |
| | Adipocitos humanos | Inducible por adipocinas proinflamatorias y AGL | | 253 |
| miR-93 y miR-223 | Adipocitos humanos primarios | Aumentados en TAS de mujeres RI con o sin PCOS | GLUT4 | 254 |
| | | miR-223 es inducible por TNF α | | 255 |
| miR-26b | TAS humano | Su expresión se asocia inversamente con el número de macrófagos infiltrados en el TAS | PTEN | 256 |
| | Preadipocitos humanos diferenciados | Reducido por TNF α , leptina y resistina | | 257 |
| | Preadipocitos humanos | Reducido en TAV de ratones e individuos obesos Inversamente relacionado con IMC y el índice HOMA-IR Mejora la sensibilidad a la insulina | | 258 |
| miR-103/107 | Modelo <i>in vivo</i> : TAB de ratón | Desestabilizan INSR Su inhibición mejora la señalización de la insulina, la captación de glucosa y reduce el tamaño del adipocito | caveolina 1 | 259 |
| miR-320 | adipocitos 3T3-L1 | Aumentado en adipocitos RI Su inhibición mejora la sensibilidad a la insulina en modelo de adipocito RI | subunidad p85 de PI3K | 260 |

| | | | | |
|---------------------|---|--|---------------|------|
| miR-335 | Adipocitos humanos | Aumentado por TNF α , leptina, resistina e IL-6 | — | 261 |
| miR-155-5p | Adipocitos y macrófagos | Aumentado en adipocitos y macrófagos inflamados Reduce su expresión ante la pérdida de peso | PPAR γ | 224 |
| | Adipocitos y TAS humanos | Inducible por TNF α vía NF κ B Aumentado en TAB en obesidad Su sobreexpresión aumenta el estado inflamatorio del adipocito | | 262 |
| miR-130a y miR-130b | Adipocitos 3T3-L1 y TAB de ratón | Aumentado en TAB en obesidad Aumentados por TNF α en adipocitos Sobreexpresión afecta funcionalidad del adipocito | PPAR γ | 263 |
| miR-130b | Adipocitos 3T3-L1 y TAB de ratón | Aumentado en macrófagos en obesidad Favorece polarización M1 Promueve inflamación y RI en TAB | | 264 |
| miR-146b-5p | Adipocitos humanos | Inducible por TNF α e IL-6 | IRAK1 y TRAF6 | 265 |
| | monocitos de individuos obesos | Aumentado en monocitos en obesidad, y media acción antiinflamatoria de la adiponectina | | 266 |
| | Adipocitos SGBS humanos tratados con sobrenadante de macrófagos | Mecanismo de retroalimentación negativa de la respuesta inflamatoria en el adipocito | | 237 |
| | adipocitos de cerdo | Inducible por TNF α Inhibe la adipogénesis | | INSR |
| miR-377 | Adipocitos 3T3-L1 de ratón | Inducible por TNF α . Promueve inflamación y RI | SIRT1 | 268 |
| miR-181b | Células endoteliales (CE) de TAB de ratón | Reducido en CE de TAB de ratones obesos/diabéticos. La infusión intravenosa de miR-181b mejora la función endotelial; reduce la RI y la inflamación en TAB. | PHLPP2 | 269 |

Tabla 8. miRNAs asociados a inflamación y/o RI en el adipocito.

Estudios de sobreexpresión de miRNAs en adipocitos humanos han identificado miRNAs potencialmente implicados en la inflamación del tejido adiposo. Arner y colaboradores identificaron miRNAs reducidos en obesidad con capacidad de aumentar (**miR-145**) o reducir (**miR-26a**, **miR-92a**, **miR-126**, **miR-143**, **miR-193a/b**, **miR-652**, **let-7a/d**) la secreción de MCP-1 en adipocitos maduros, lo que indica que podrían estar afectando la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo obeso. Además identificaron que **miR-193a** y **miR-126** reprimían directa e indirectamente la expresión de MCP-1, respectivamente ²²⁶. Este mismo grupo dos años después identificó que la mayoría de estos miRNAs (**miR-26a**, **let-7d**, **miR-143**, **miR-92a**, **let-7a**, **miR-193a-5p**, **miR-193b** y **miR-145**) además podían afectar la secreción de TNF α por el adipocito de forma similar, uno de los mediadores más importantes de la inflamación ²⁵¹.

miR 132, cuyan expresión está reducida en TAV de individuos con obesidad ²²², induce la activación del complejo NF- κ B, provocando un aumento en la transcripción de IL-8 y MCP-1 en adipocitos humanos ²⁷⁰.

A miR-146b se le atribuyen funciones antiinflamatorias y puede disminuir la producción de TNF α , IL-1 β e IL-6 en monocitos THP-1 reprimiendo directamente la expresión de la quinasa 1 asociada al receptor de IL-1 (IRAK-1) y el Factor 6 asociado al Receptor de TNF (TRAF6), importantes moléculas adaptadores de la vía IRAK/NF κ B ²⁷¹. miR-146b está aumentado en monocitos de individuos obesos²⁷², y en adipocitos humanos tratados con TNF α e IL-6 ²⁶⁵. Además, la depleción de miR-146b en esta línea celular bloquea la acción antiinflamatoria de la adiponectina²⁶⁶. La expresión de miR146b también está aumentada en adipocitos de la línea SGBS tratados con medio condicionado de macrófago, por lo que se le ha atribuido a miR146b un papel regulador de

retroalimentación negativa para contrarrestar la respuesta inflamatoria en el adipocito mediante la represión de IRAK-1 y TRAF6²³⁷.

miR-155 es conocido por su función reguladora en la inmunidad innata y su papel protumoral²⁷³, así como por su función represora de la adipogénesis. La expresión de miR-155 está aumentada en adipocitos y macrófagos bajo tratamiento proinflamatorio²²⁴ y su sobreexpresión aumenta el estado inflamatorio de adipocitos 3T3-L1 *in vitro*²⁶². Los niveles de expresión de miR-155 también están aumentados en TAS de individuos obesos²⁶², y que revierten ante la pérdida de peso²²⁴.

miR-377 aparece sobreexpresado en adipocitos 3T3-L1 de ratón ante el estímulo de TNF α , y promueve inflamación y RI reprimiendo directamente SIRT-1²⁶⁸, ya que una de las acciones de SIRT-1 es inhibir NFkB, un activador de la inflamación²⁷⁴.

miR-335 aumenta su expresión en adipocitos humanos estimulados con TNF α , IL-6, resistina y leptina²⁶¹, aunque se desconoce si ejerce alguna función reguladora de la inflamación o la sensibilidad a la insulina en el tejido adiposo.

miR-21 aparece reducido en un modelo de adipocitos 3T3-L1 resistentes a la insulina y su sobreexpresión mejora ese estado inhibiendo la expresión de PTEN²⁵². Sin embargo la expresión de miR-21 está reducida en TAS de individuos obesos²²⁵, y recientemente se ha comprobado que miR-21 muestra incrementada su expresión en adipocitos humanos al tratarlos con AGL o adipoquinas proinflamatorias²⁵³. Probablemente miR-21 actúe a través de un mecanismo compensatorio frente a la RI agravada por la inflamación en el tejido adiposo obeso.

miR-320 también se ha estudiado en un modelo de adipocitos 3T3-L1 resistentes a la insulina en los cuales aparece aumentado, y se ha comprobado que su inhibición en este modelo de adipocitos mejora el estado de sensibilidad a la insulina, ya que presenta una diana validada en

la subunidad p85 de la PI3K ²⁶⁰, crucial en la cascada de señalización del receptor de la insulina.

miR-93 y miR-223 aparecen aumentados en el TAS de mujeres RI con o sin Síndrome del ovario poliquístico (PCOS), un cuadro clínico con características muy similares a las del SM ²⁵⁴. Ambos miRNAs ejercen efectos negativos en la captación de glucosa en el adipocito ya que reprimen la expresión de GLUT4 ^{254,255}. Además la expresión de miR-223 aumenta en adipocitos humanos primarios estimulados con TNF α ²⁵⁵.

miR-26b está muy estudiado, Su expresión se encuentra inversamente asociada con el número de macrófagos infiltrados en TAS ²⁵⁶, aunque no se ha comprobado si afecta los niveles de expresión de MCP-1. Xu y colaboradores vieron en un primer estudio que la expresión de miR-26b se reducía en adipocitos humanos por acción de TNF α , Leptina o Resistina ²⁵⁷. Este mismo grupo, en un estudio posterior detectaron que miR-26b en el TAV de ratones e individuos con obesidad presentaba una expresión reducida y que se relacionaba inversamente con el IMC y el HOMA-IR. Además, en este mismo estudio validaron PTEN como una de sus dianas, y comprobaron que la sobreexpresión de este miRNA mejoraba la sensibilidad a la insulina de preadipocitos humanos que sobreexpresaban PTEN ²⁵⁸.

miR-130a y miR130b, son dos miembros del *cluster* miR-130, y su expresión está aumentada en los depósitos grasos de ratones con obesidad inducida por dieta hipercalórica, así como en adipocitos 3T3-L1 diferenciados *in vitro* estimulados con TNF α vía NF- κ B ²⁶³. La sobreexpresión de miR-130a/b genera un efecto disfuncional en estos adipocitos a través de PPAR γ ²⁶³. Estudio recientes muestran que la expresión de **miR-130b** está aumentada en macrófagos peritoneales de ratones obesos y además este miRNA promueve la polarización a macrófagos de tipo M1 contribuyendo, a través de su diana en PPAR γ , a la inflamación y la RI en el TAB de ratón ²⁶⁴.

En un estudio reciente, Sun y colaboradores han observado que la infusión intravenosa de **miR-181b** mejora la función endotelial y reduce la RI y la inflamación en el TAB de ratones obesos diabéticos. La sobreexpresión de miR-181b en células endoteliales inhibe directamente la PHLPP2, aumentando la fosforilación de AKT; en consecuencia se reducen las actividades de FOXO y de la óxido nítrico sintasa, reduciendo el estado inflamatorio de las células endoteliales y del TAB ²⁶⁹.

5.2.4. miRNAs en otros tejidos metabólicos

Este apartado se centrará en la regulación que ejercen algunos miRNAs en la producción de insulina y su acción en diferentes tejidos metabólicos, así como su importancia en la obesidad y la aparición de DM2.

miRNAs y producción de insulina por células *beta*

Los miRNAs son necesarios para el correcto desarrollo de las células alfa y *beta* del páncreas. Cuando DICER, necesario en la maduración de los miRNAs, es delecionado específicamente en el páncreas de embriones de ratón, más del 75% de las células del páncreas con función endocrina entran en apoptosis y los ratones mueren de forma prematura²⁷⁵.

Es más, si DICER es inactivado en células *beta* de ratones adultos, éstos producen menores niveles de insulina inducida por glucosa, desarrollando hiperglicemia e intolerancia a la glucosa en tres semanas ²⁷⁶. En este último estudio, uno de los miRNAs más afectados y específicamente expresado en los islotes de Langerhans es el miR-375. Precisamente, miR-375 ya había sido identificado como un regulador de la producción de insulina ²⁷⁷, así como de la proliferación de células alfa y *beta* del páncreas ²⁷⁸. Otro miRNA implicado en la regulación de secreción de insulina es miR-9, que regula indirectamente y de forma

negativa el proceso de exocitosis de la insulina en células *beta* ²⁷⁹. Además, tanto miR-375 como miR-9 se han visto elevados en suero de pacientes diabéticos ²⁸⁰.

Como ya se mencionó, los miRNAs de un mismo *cluster* suelen regular las mismas vías de señalización celular. El cluster miR-200 (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, y miR-429) está altamente sobreexpresado en los islotes de ratones diabéticos, cuya sobreexpresión es suficiente para inducir apoptosis en las células *beta* con resultados letales, activando indirectamente la señalización de los genes proapoptóticos *Trp53* y *Bax* ²⁸¹.

La señalización de la insulina en los tejidos y la homeostasis de la glucosa son procesos altamente regulados, donde los miRNAs también toman partida.

miRNAs y resistencia a la insulina en el músculo esquelético

El músculo esquelético es el primer tejido en verse afectado por la disfunción de las células *beta* del páncreas. miR-106b es uno de los miRNAs alterados en músculo de pacientes diabéticos ²⁸². Se ha observado que la sobreexpresión de miR106b induce RI en miotubos C2C12 de ratón a través de reprimir la expresión de la Mitofusina 2 ²⁸³, una proteína mitocondrial necesaria para el buen funcionamiento de las células musculares ²⁸⁴. En otro estudio se observa que miR135a está sobreexpresado en el músculo esquelético de ratones diabéticos *db/db*, reduciendo los niveles de IRS2 y, en consecuencia, afectando la vía de señalización de la insulina y la captación de glucosa. De hecho, el silenciamiento de miR-135a atenúa los niveles de hiperglicemia y mejora el estado de tolerancia a la glucosa en estos ratones. Además, comprobaron que miR135a también aparece sobreexpresado en el músculo esquelético de pacientes con DM ²⁸⁵.

miRNAs y metabolismo energético en hígado

El hígado es un órgano metabólico muy sensible a las alteraciones en la homeostasis de la glucosa, donde los miRNAs también desempeñan un papel relevante. La expresión hepática de IRS1 está regulada por miR-126, provocando RI y disfunción mitocondrial en la línea de hepatocitos humanos SK-Hep1²⁸⁶. miR-143 se ha descrito como un miRNA sobreexpresado en el hígado en ratones *db/db* obesos, donde a través de inhibir la proteína Orp8, los hepatocitos no pueden activar la fosforilación de AKT en respuesta a la insulina. Además la delección del *cluster* miR-145-143 protege a los ratones de la RI asociada a obesidad²⁸⁷. La sobreexpresión de miR-378a induce resistencia hepática a la insulina en ratones *ob/ob* al inhibir la subunidad p110 α de la PI3K, una enzima clave en el eje de la vía de señalización de la insulina²⁸⁸.

5.3. miRNAs circulantes

Son muchos los estudios que han revelado la presencia de miRNAs en el sobrenadante de cultivos celulares y en diferentes fluidos biológicos, y son comúnmente conocidos como **miRNAs extracelulares o circulantes**. Se han detectado en plasma, suero, saliva, líquido sinovial, líquido cerebrospinal, leche materna, fluido seminal, etc²⁸⁹.

Los miRNAs circulantes proceden de toda clase de tejidos, sin embargo se ha observado en ratones que la mayor fuente de miRNAs circulantes corresponde al tejido adiposo²⁹⁰. Los miRNAs circulantes a menudo circulan en forma de **exosomas** (endosomas excretados como vesículas de 50-100nm), **microvesículas** (partículas de 0,1-1 μ m, originadas a partir de la membrana plasmática), unidos a su **argonauta** o a

lipoproteínas de alta densidad (**HDL**); y protegidos de la acción degradativa de las ribonucleasas ²⁸⁹ (**Figura 13**).

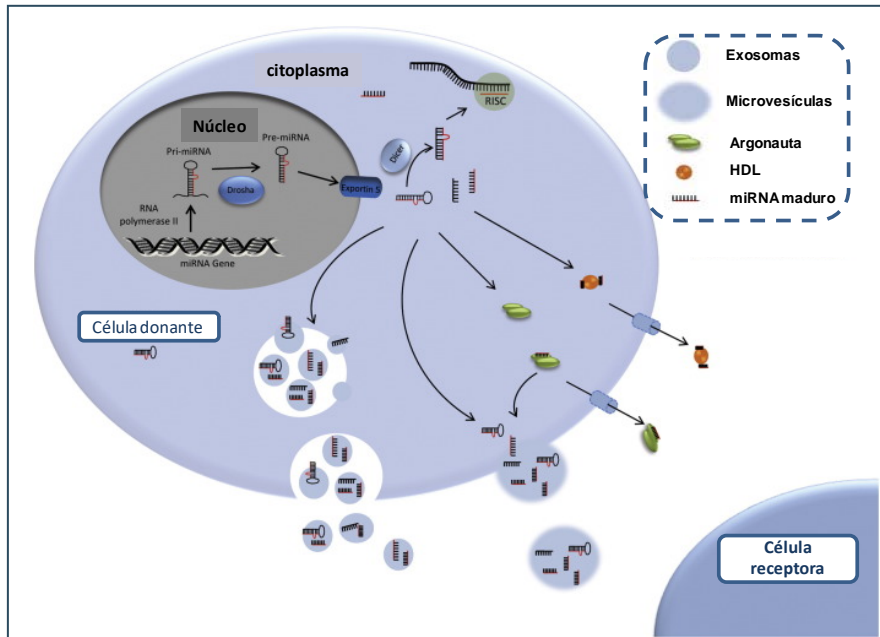


Figura 13. Mecanismos de secreción de miRNAs circulantes. Los miRNAs maduros pueden incorporarse selectivamente en los exosomas o asociarse con la proteína Argonauta y liberarse en el medio extracelular. De forma alternativa, pueden envolverse en microvesículas o unirse a lipoproteínas de alta densidad (HDL) y luego liberarse al entorno extracelular. Fuente adaptada de Shoel, 2016 ²⁸⁹.

Algunos autores apuntan a que los miRNAs secretados como exosomas o microvesículas actúan de forma paracrina o endocrina, como sistema de comunicación intercelular ²⁹¹⁻²⁹³.

El transporte de miRNAs *in vitro* en asociación con exosomas o HDL se puede administrar a las células receptoras en su forma activa y puede modular los niveles de su ARNm diana, alterando la función celular y los procesos clave de señalización celular ^{294,295}. Aunque el papel funcional de los miRNAs circulantes *in vivo* no se conoce, representan una nueva red de comunicación intercelular, y también entre diferentes órganos.

La presencia de miRNAs en biopsias líquidas (biofluidos) ha atraído la atención de los investigadores debido a su potencial como biomarcadores no invasivos de enfermedades. Los paneles de expresión de miRNAs pueden ayudar en diferentes aspectos clínicos como en la identificación del riesgo de desarrollar una enfermedad, en el diagnóstico no invasivo de enfermedades de acuerdo a su etiología, en el pronóstico de la evolución de una patología y en la monitorización de respuesta a un tratamiento ²⁹⁶.

Se han propuesto paneles de miRNAs para el diagnóstico precoz de algunos tipos de cáncer, como marcadores metastásicos o incluso para predecir la respuesta de pacientes con cáncer a la quimioterapia ²⁹⁷. En cuanto a patologías metabólicas, se han identificado perfiles de expresión de miRNAs circulantes alterados en obesidad, DM2, esteatohepatitis, esteatosis, aterosclerosis, hipertensión, entre otras enfermedades ^{224,298-301}.

miRNAs circulantes alterados en obesidad

Ortega y colaboradores observaron que los pacientes con obesidad mórbida mostraban un aumento marcado de los niveles plasmáticos de miR-140-5p, miR-142-3p y miR-222 y una disminución de miR-532-5p, miR-125b, miR-130b, miR-221, miR-15a, miR-423-5p y miR-520c-3p. Además, la pérdida de peso tras someterse a una cirugía bariátrica provocó una disminución en circulación de miR-140-5p, miR-122, miR-193a-5p y miR-16-1 y un aumento de miR-221 y miR-199a-3p ²²⁴. En otro trabajo analizaron la expresión de miRNAs en suero de pacientes obesos, DM2 y obesos con DM2. Encontraron que miR-138 estaba reducido en obesidad y miR-17, miR-152 y miR-593 aumentados en obesidad. Curiosamente, los niveles circulantes de miR-593 se observaron reducidos en presencia de DM2 y en obesos con DM2 ³⁰². En un estudio realizado en obesidad infantil prepuberal se encontraron desregulados los niveles de 15 miRNAs

en plasma (disminución de los niveles de miR-221 y miR-28-3p y aumento de los niveles de miR-486-5p, miR-486-3p, miR-142-3p, miR-130b) y estos cambios se asociaron con el HOMA-IR y parámetros de adiposidad como IMC, perímetro de la cintura y el porcentaje de masa grasa. En 10 de los 15 miRNAs mencionados los niveles variaban en plasma a lo largo de 3 años de seguimiento en función de la ganancia o pérdida peso ³⁰³. En un trabajo reciente se han identificado a miR-122 y miR-199a como biomarcadores de esteatosis hepática no alcohólica en obesidad infantil, correlacionándose positivamente con el IMC y los niveles de transaminasas ²⁹⁸. Además, los niveles elevados miR-122 circulante se han asociado de forma significativa con presencia de obesidad y RI en adultos jóvenes ^{304,305}. En otro estudio reciente en obesidad infantil y en pacientes adultos con DM2, 3 miRNAs circulantes (miR-486, miR-146b y miR-15b) se han detectado considerablemente aumentados, lo que sugiere que estos miRNAs podrían advertir de los riesgos futuros de desarrollar DM2 en niños con obesidad, aunque es una hipótesis que debería validarse en estudios poblacionales de carácter prospectivo ³⁰⁶. Profundizando en el estudio funcional *in vitro* de miR-486, miR-146b y miR-15b, los autores de este mismo trabajo encontraron a miR-486 implicado en el aumento de la tasa de proliferación de preadipocitos y la intolerancia a la glucosa de miotubos, y también observaron que miR-146b y miR-15b afectaban negativamente la secreción de insulina pancreática inducida por altas concentraciones de glucosa; sin embargo, en este trabajo no llegaron a estudiar los mecanismos subyacentes a través de los cuales actúan estos miRNAs ³⁰⁶.

miRNAs circulantes alterados en DM2

En un estudio prospectivo, en el que participaron 800 individuos, identificaron niveles plasmáticos reducidos de miR-126, miR-15a, miR-29b, miR-223, excepto miR-28 que encontró aumentado en pacientes con prediabetes y al manifestar DM2 ²⁹⁹. En suero con 56 pacientes con DM2 se identificaron aumentados los niveles de miR-9, miR-29a, miR-30d, miR-34a, miR-124a, miR-145a y miR-375, respecto a los controles ²⁸⁰. En otro estudio, realizado en suero de 256 participantes con SM y en pacientes con DM2, analizaron miRNAs exosomales de sangre periférica y encontraron aumentados los niveles de miR-150, miR-192, miR-27a, miR-320a, miR-375 en pacientes ³⁰⁷.

Los estudios mencionados anteriormente han identificado una serie de miRNAs circulantes, que se encuentran alterados en el plasma o suero de pacientes con obesidad y/o DM2, pero los paneles de miRNAs son poco o nada consistentes entre los diferentes estudios, tal como comentábamos acerca de los miRNAs alterados en el tejido adiposo obeso. Una de las razones de esta disparidad es la falta de procedimientos estandarizados para detectar miRNAs específicos de estas patologías ²⁹⁶. Sin embargo, se espera que en un futuro los miRNAs circulantes no solo ofrezcan un panel de miRNAs estandarizado para el diagnóstico o predicción de enfermedades, sino que además puedan ser utilizados como un tratamiento para la mejora de las mismas, como refleja el siguiente apartado.

5.4. Aplicaciones terapéuticas de los miRNAs

En las últimas dos décadas se ha ido recopilando mucha información acerca de las funciones reguladoras de los miRNAs en numerosos procesos biológicos, así como su importancia en la aparición y desarrollo de diversas enfermedades como el cáncer, enfermedades metabólicas, enfermedades neurológicas y enfermedades inmunológicas. No es de extrañar, que debido a su capacidad de regular la expresión de diversos genes alterados en enfermedades, haya conducido a los investigadores a proponer el uso de los miRNAs como una nueva estrategia terapéutica, ya sea con miRNAs sintéticos (mimics) o con inhibidores de miRNAs (antimiRs)³⁰⁸.

Los agentes terapéuticos basados en miRNAs sintéticos (mimics) o antimiRs pueden administrarse de forma sistémica o local. En este sentido, las investigaciones dirigidas a estas terapias deben enfrentarse a dos desafíos muy importantes: primero, en mejorar la estabilidad *in vivo* de moléculas de ARN escapando a la acción degradativa de las nucleasas y también a la acción lisosomal dentro de las células; y segundo, en optimizar el diseño de sistemas de administración que permitan actuar específica y eficientemente en los focos de la enfermedad, considerando la menor toxicidad posible para el organismo, sin que genere una respuesta inmunitaria perjudicial^{309,310}.

Entre las estrategias para aumentar la estabilidad del ARN se encuentran el uso de diferentes vehículos para emquetar los mimics y antimiRs (liposomas, vectores virales, copolímeros, emulsiones lipídicas neutras, liposomas neutros, bacterias modificadas o targomirs, dendrímeros, etc); otra manera de otorgar estabilidad al ARN es modificando la naturaleza química de los nucleótidos que componen los mimics y anti-miRs por modificación de los nucleótidos (ej. ácido

nucleico bloqueado o LNA), por metilación de las moléculas de ARN o por adición de grupos de tipo fosforotioato. Estas modificaciones químicas además tienen la ventaja añadida de mejorar la afinidad de los mimics o anti-miRs por sus dianas ³¹⁰.

Actualmente algunas terapias basadas en miRNAs o en anti-miRs se encuentran en fase preclínica en modelos de ratón o primates ³¹¹. Por ejemplo, el uso de anti-miR-122 *in vivo* en ratones obesos mejora los niveles de colesterol en hígado y suero y el estado de esteatosis hepática al disminuir la síntesis de ácidos grasos en hígado a través de la regulación de enzimas lipogénicas como la sintasa de ácidos grasos (FASN), 3-hidroxi-3-metil-glutaril-Coenzima A reductasa, SREBP-1c y SREBP-2 ³¹². Los niveles circulantes de miR-122 están aumentados en pacientes con hiperlipidemia ³¹³; y se ha observado que la pérdida de peso inducida por la cirugía bariátrica en pacientes obesos produce una marcada disminución de miR-122 en plasma ³¹⁴. Estos hallazgos añaden un potencial valor terapéutico a la inhibición de miR-122 para recuperar la función normal del hígado en obesidad y DM2.

Otros estudios han llegado incluso a alcanzar ensayos clínicos de fase II, como se muestra en la **Tabla 9**. Con respecto a terapias basadas en miRNAs enfocadas en el tratamiento de enfermedades metabólicas en seres humanos, únicamente se encuentra en fase clínica el RG-125/AZD4076 (*Regulus Therapeutics Inc.*), un anti-miR específico de miR-103 y miR-107 dirigido al tratamiento de esteatosis hepática no alcohólica en pacientes con prediabetes o DM2.

| Nombre (compañía) | Agente Terapéutico | Sistema de administración | Enfermedades a las que van dirigidos | Ensayos clínicos |
|--|------------------------|--|--|------------------|
| Mirvirasen (Santaris Pharma A/S and Hoffmann-La Roche) | AntimiR-122 | AntimiR con modificación de tipo LNA | Hepatitis C (infecciones crónicas incluídas) | Fase II |
| RG-101 (Regulus Therapeutics) | AntimiR-122 | AntimiR conjugado con N-acetil galactosamina | Hepatitis C crónica | Fase II |
| RG-125/AZD4076 (Regulus Therapeutics) | AntimiR-103/107 | AntimiR conjugado con N-acetil galactosamina | Esteatosis hepática no alcohólica y DM2 | Fase II |
| MRG-106 (miRagen Therapeutics) | AntimiR-155 | AntimiR con modificación de tipo LNA | Linfoma cutáneo de células T y micosis fungoides | Fase I |
| MRG-201 (miRagen Therapeutics) | <i>Mimic</i> de miR-29 | Dúplex de miRNA conjugado con colesterol | Escleroderma o esclerosis sistémica | Fase I |
| MesomiR-1 (EnGeneIC) | <i>Mimic</i> de miR-16 | Vehículo desarrollado por EnGeneIC | Mesotelioma y cáncer de pulmón no microcítico | Fase I |
| MRX34 (Mirna Therapeutics) | <i>Mimic</i> de miR-34 | Nanopartículas lipídicas (<i>Smarticles</i>) | Tumores sólidos múltiples | Fase I |

Tabla 9. miRNAs terapéuticos en fase clínica. Fuente modificada de Rupaimoole y Slack (2017)³¹⁰. LNA: ácido nucleico bloqueado.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MICROARNS DESREGULADOS POR ACCIÓN DEL TNFA
EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD Y LA RESISTENCIA A LA INSULINA
Javier Lozano Bartolomé

IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MICROARNS DESREGULADOS POR ACCIÓN DEL TNFA
EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD Y LA RESISTENCIA A LA INSULINA
Javier Lozano Bartolomé

Hipótesis

Sabemos que:

- ▶ Se han descrito diversos miRNAs desregulados por la inflamación inducida por citoquinas inflamatorias en el contexto de la obesidad y la RI.
- ▶ Se desconoce el papel funcional de la mayoría de los miRNAs descritos en el tejido adiposo relacionados con la RI y, por lo tanto, su aplicabilidad potencial como dianas terapéuticas.
- ▶ TNF α es una citoquina proinflamatoria implicada en la RI en obesidad.

Ante estos antecedentes, postulamos que:

La citoquina proinflamatoria TNF α podría estar alterando la expresión de miRNAs implicados en la señalización de la insulina en el adipocito, como un mecanismo subyacente al desarrollo de RI en el tejido adiposo en la obesidad, por lo que la identificación de dichos miRNAs y sus genes diana podría abrir nuevas dianas terapéuticas a la RI.

Objetivos

Objetivo general

El objetivo general del presente estudio es identificar miRNAs desregulados en el contexto inflamatorio de la obesidad y la RI y analizar su papel funcional en la RI inducida por TNF α en el adipocito humano.

Objetivos secundarios:

- ▶ Buscar bibliográficamente miRNAs desregulados en un contexto inflamatorio y analizar el perfil de expresión de un panel de miRNAs seleccionado en un modelo de RI inducida por TNF α sobre adipocitos humanos.
- ▶ Analizar la expresión de los miRNAs seleccionados en biopsias pareadas de tejido adiposo subcutáneo y visceral de una cohorte de pacientes obesos (IMC \geq 30) y no obesos (IMC<30), con diferentes grados de tolerancia a la glucosa.
 - Analizar la relación entre la expresión de dichos miRNAs y los parámetros antropométricos, clínicos y bioquímicos de los pacientes de estudio.
- ▶ Descifrar los posibles mecanismos que conectan a los miRNAs seleccionados con la RI inducida por TNF α en el adipocito.
- ▶ Valorar el poder pronóstico de los miRNAs seleccionados en sueros de una cohorte prospectiva de pacientes que desarrollan prediabetes a los 4 años de seguimiento.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MICROARNS DESREGULADOS POR ACCIÓN DEL TNFA
EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD Y LA RESISTENCIA A LA INSULINA
Javier Lozano Bartolomé

1. Cultivo celular

1.1. Línea celular primaria de preadipocitos humanos

Adquirimos un vial criogenizado con 500.000 preadipocitos humanos de tejido adiposo subcutáneo de mujer caucásica de 45 años e índice de masa corporal de 27, a través de *European Collection of Authenticated Cell Cultures* (ECACC), Reino Unido, con referencia 802s-05a. El crecimiento y mantenimiento de preadipocitos y su diferenciación a adipocitos maduros se realizaron utilizando el kit *Preadipocyte Medium Kit* (*Cell Applications*, INC., EEUU) que incluye los siguientes medios:

- ❖ Medio Basal de Preadipocito (*Preadipocyte basal médium*, 500ml)
- ❖ Suplemento de Crecimiento (*Preadipocyte Growth supplement*, 50ml)
- ❖ Medio de Diferenciación de Adipocitos (*Adipocyte Differentiation Medium*, 250ml)

En primer lugar preparamos el Medio de Crecimiento de Preadipocitos Suplementado (MCPS) añadiendo 50ml de Suplemento de Crecimiento a 500ml de Medio Basal de Preadipocito. Descongelamos el vial a 37°C y crecimos las células en 15ml de MCPS en dos frascos de cultivo de 75cm² a 37°C, 5% CO₂ y atmósfera húmedificada para su expansión y preparación de los experimentos. Una vez alcanzado el 80% de confluencia, levantamos las células con 4ml de Tripsina-EDTA al 0.25% (Gibco, EEUU) durante 2-4 min a 37°C y detuvimos la tripsinización con 4ml de DMEM/F12 con 10% de suero fetal bovino (FBS), ya que el suero inhibe cualquier actividad enzimática posterior. A continuación centrifugamos los preadipocitos a 400 x g durante 5min y resuspendimos el pellet en MCPS. Sembramos los preadipocitos por

duplicado en placa de 12 pocillos (4cm²pocillo) a una densidad de 30.000 células/cm² (confluencia del 80%), dejando a los predipocitos adherirse a la placa durante la noche en medio de crecimiento de preadipocitos. Diferenciamos los preadipocitos a adipocitos maduros durante 14 días en presencia de Medio de Diferenciación de Adipocitos a 37°C, 5%CO₂ y atmósfera humificada, cambiando el 50% del medio cada 2 días. A día 14, tratamos los adipocitos con 50ng/ml de TNF α (Peprotech, Reino Unido) o las dejamos sin tratar en DMEM/F12 (Gibco, EEUU) sin FBS durante 8h. A continuación lisamos las células en 350 μ l de tampón de lisis (de Exiqon para análisis de microARNs o Qiagen para análisis de expresión de ARNm, ambos con β -mercaptoetanol al 1% v/v) para su posterior extracción de ARN total.

1.2. Línea adipocítica humana SGBS (síndrome de Simpson-Golabi- Behmel)

Las línea celular SGBS ³¹⁵ fue originada a partir de una cepa de preadipocito humano derivada del tejido adiposo subcutáneo blanco de un paciente con síndrome de Simpson-Golabi-Behmel (SGBS), una enfermedad recesiva ligada al cromosoma X, cuyo fenotipo se caracteriza principalmente por trastornos de crecimiento pre- y postnatal acelerado. Esta línea celular exhibe una alta capacidad de diferenciación a células adiposas maduras bioquímica y funcionalmente similares a los adipocitos humanos. La línea adipocítica SGBS se utilizó como modelo celular de adipocitos humanos para los estudios funcionales y de expresión.

Los preadipocitos SGBS fueron proporcionados por el Dr. Martin Wabitsch (Universidad de Ulm, Ulm, Alemania). El método de crecimiento, mantenimiento y proceso de diferenciación de los

preadipocitos SGBS es el modificado de Fischer-Posovszky *et al.*, 2008³¹⁶. Crecimos los preadipocitos SGBS a 37 °C, 5% CO₂ y atmósfera humidificada en medio SGBS de Mantenimiento en frastos de cultivo de 75 cm², cuya composición se muestra en la **Tabla 1**. Para la siembra de los experimentos, tripsinizamos las células con 4 ml tripsina-EDTA al 0.25% (Gibco, EEUU) durante 2-4 min a 37 °C, y detuvimos la tripsinización añadiendo 4ml de DMEM/F12 más FBS al 10%. Las células así recogidas se centrifugaron a 400 x g durante 5min y resuspendimos el pellet en medio SGBS de Mantenimiento fresco. Sembramos los preadipocitos por duplicado en placa de 12 pocillos (4cm²/pocillo) a una densidad de 30.000 células/cm² (confluencia del 80%), dejando a los preadipocitos adherirse a la placa durante la noche en medio SGBS de Mantenimiento. Los preadipocitos se incubaron durante 4 días en medio SGBS de diferenciación A y durante 5 días en medio SGBS de diferenciación B (**Tabla 10**); a partir del día 5 ya se empieza a observar la acumulación de lípidos. A día 9, cuando el 80% de los adipocitos ya habían acumulado gotas lipídicas, se trataron con 50ng/ml de TNF α (Peprotech. Reino Unido) o se dejaron sin tratar durante 8h. A continuación lisamos las células y las recogimos en 350 μ l de tampón de lisis (*Lysis solution* de Exiqon o RLT de Qiagen, ambos con β -mercaptoetanol al 1% v/v) para su posterior extracción de ARN total.

| Reactivos | Concentración | Casa Comercial |
|-----------|---------------|----------------|
|-----------|---------------|----------------|

Medio SGBS de Mantenimiento

| | | |
|--------------------------|--------------|-----------|
| DMEM /F12 | 1x | Gibco |
| Biotina | 33 μ M | Sigma |
| Pantotenato | 17 μ M | Sigma |
| FBS | 10% | Lonza |
| Plasmocin | 5 μ g/mL | InvivoGen |
| Antibiótico-Antimicótico | 1X | Gibco |
| HEPES | 25mM | Gibco |

Medio SGBS de Diferenciación A

| | | |
|--------------------------|-------------|----------|
| DMEM /F12 | 1x | Gibco |
| Biotina | 33 μ M | Sigma |
| Pantotenato | 17 μ M | Sigma |
| Antibiótico-Antimicótico | 1X | Gibco |
| HEPES | 25mM | Gibco |
| Transferrina | 0.01mg/ml | Sigma |
| Insulina | 20nM | Actrapid |
| Cortisol | 0.1 μ M | Sigma |
| Triyodotironina | 0.2nM | Sigma |

Medio SGBS de Diferenciación B

| | | |
|-----------------------------|-----------|-------------|
| M. SGBS de Diferenciación A | 1x | Gibco |
| IBMX | 0.5mM | Calbiochem |
| Rosiglitazona | 2 μ M | Glaxo Smith |
| Dexametasona | 25nM | Sigma |

Tabla 10. Medios de mantenimiento y de diferenciación para preadipocitos SGBS. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium: mezcla de nutrientes F-12), HEPES (Ácido 4(2-hidroxietyl)-1-piperazinetanosulfónico), IBMX (3-isobutil-1-metilxantina).

1.3. Línea embrionaria humana de riñón (HEK) 293

La línea HEK 293 se generó de la transformación de células de riñón embrionario humano con el ADN del adenovirus A5 en el laboratorio del doctor en biología molecular Alex J. van der Eb en 1973 en Leiden, Países Bajos (Graham y Smiley, 1977). Esta línea celular es comúnmente utilizada en el área de la biología molecular por su gran eficacia en transfección.

Crecimos células HEK 293 en medio DMEM D-Glucosa 25mM (Gibco) suplementado con 10% de FBS, antibiótico-antimicótico x1 y HEPES 25mM a 37°C, 5% CO₂ y atmósfera humidificada en frascos de 75cm² a una densidad inicial de 6.660 cels/cm². Una vez alcanzada una confluencia del 80-90%, levantamos las células con 2ml tripsina-EDTA al 0.25% (Gibco, EEUU) durante 2min a 37°C, y detuvimos la tripsinización añadiendo 4ml de DMEM suplementado. Las células así recogidas se centrifugaron a 400 x g durante 5min y resuspendimos el pellet en DMEM suplementado fresco. Sembramos las células HEK 293 en placa de cultivo celular de 24 pocillos (2cm²/pocillo) a una densidad de 50.000 células/cm², dejándolas crecer durante 20h hasta alcanzar un 80% de confluencia para los experimentos de ensayos de luciferasa.

2. Extracción de ARN y Análisis de expresión génica

2.1. Extracción y purificación de ARN total de cultivos celulares (crecimiento en monocapa)

Homogeneizamos los lisados celulares pasándolos 5-10 veces por una jeringa con aguja de calibre 27Gx1/2, permitiendo también fraccionar el ADN genómico. El ARN total de los lisados de adipocitos primarios o adipocitos SGBS se extrajo y purificó mediante el método de adsorción-desorción sobre membranas de sílica³¹⁷ con el kit *miRCURYTM – Cell&Plant* (Exiqon, Dinamarca) para el análisis de miRNAs, o con *RNeasy MINI KIT* (QIAGEN, Alemania) para el estudio de expresión génica de citoquinas. En ambos protocolos de extracción de ARN incluimos un paso intermedio, entre lavados, de digestión del ADN genómico de la muestra con DNasa I (QIAGEN, Alemania).

Protocolo: *miRCURYTM – Cell&Plant* (Exiqon, Dinamarca)

Preparación de reactivos:

- ❖ **Preparamos *Wash Solution*** añadiendo 90ml de etanol 96-100% a 38ml de *wash solution* = 128ml
- ❖ **Preparamos *Lysis Solution*** añadiendo 10µl de β-mercaptoetanol a 1ml de *lysis solution*.
- ❖ **Preparamos la solución DNasa I (*RNase-Free DNase Set*, QIAGEN)** añadiendo 10µl de DNasa I a 70µl de *buffer RDD* de Qiagen por cada columna.

Procedimiento:

1. Primero añadimos 200µL de etanol 96-100% al lisado celular (monocapa de células/pocillo recogida en 350 µL de *Lysis Solution*) y mezclamos con vórtex durante 10s.
2. A continuación añadimos los 550µL del lisado más etanol a la columna para facilitar la unión del ARN a la misma y centrifugamos durante 1min a 14.000 x g.
3. Después lavamos añadiendo 400µL de *Wash Solution* sobre la columna centrifugando a 14.000 x g durante 2min.
4. En un cuarto paso descartamos el volumen del tubo colector e incubamos durante 15min a T^a ambiente con 80µL de la solución preparada de DNasa I.
5. Después lavamos de nuevo dos veces más con *Wash Solution* como en el paso 3.
6. Seguidamente traspasamos la columna a un tubo de 1.5ml de baja unión a ácidos nucleicos para eluir el ARN con 50µL tampón de elución. Centrifugamos durante 2min a 200 x g, y seguidamente 1min a 14.000 x g.
7. Finalmente determinamos la concentración de ARN (ng/µl) por espectrofotometría a la densidad óptica de 260nm y almacenamos la muestra de ARN a -80°C

Protocolo: RNeasy Mini Kit (QIAGEN, EEUU)

Preparación de reactivos:

- ▶ **Preparamos *Buffer RLT*** añadiendo 10 µl de β-mercaptoetanol por cada mililitro de *Buffer RLT*.
- ▶ **Preparamos *Buffer RPE*** añadiendo 44ml de etanol 96-100%
- ▶ **Preparamos la solución DNasa I (RNase-Free DNase Set, QIAGEN)** añadiendo 10µl de DNasa I a 70µl de *buffer RDD* de Qiagen por cada columna.

Procedimiento

1. Primero añadimos 350µl de etanol al 70% al lisado celular (monocapa de células/pocillo recogida en 350 µL de *Buffer RLT*) y mezclamos por pipeteado.
2. A continuación aplicamos los 700µl de la mezcla de lisado más etanol a la membrana o columna de sílica colocada en un tubo colector de 2 ml y centrifugamos a 14.000 x g durante 15s a T^a ambiente.
3. Después descartamos el volumen eluído y lavamos con 350 µl del reactivo RW1 centrifugando durante 15s a 14.000 x g.
4. En un cuarto paso descartamos el volumen del tubo colector e incubamos durante 15min a T^a ambiente con 80µL de la solución preparada de DNasa I.
5. Tras la incubación repetimos el lavado del paso 3.
6. Seguidamente hicimos un lavado con 500 µl RPE centrifugando a 14.000 x g durante 15s y lavamos de nuevo con 500 µl RPE centrifugando a 14.000 x g durante 2min.
7. Finalmente transferimos la columna a un tubo nuevo de 1.5ml y añadimos 40 µl de agua libre de RNasas y centrifugamos a 8.000 x g durante 1min. Después determinamos la concentración de ARN (ng/µl) por espectrofotometría a la densidad óptica de 260nm y almacenamos las muestras de ARN a -80°C.

2.2 Extracción de ARN de muestras de tejido adiposo

Protocolo: RNeasy LIPID TISSUE MIDI (Qiagen, EEUU)

Preparación de reactivos

- ▶ **Preparamos Buffer RPE** Añadiendo 44 mL de etanol absoluto.
- ▶ **Preparamos la solución DNasa I (RNase-Free DNase Set, QIAGEN)** añadiendo 20µl de DNasa I a 140µl de *buffer RDD* de Qiagen por cada columna.

Procedimiento

1. Inicialmente Pesamos entre 400 y 500 mg de tejido adiposo congelado para la extracción de ARN
2. Luego homogeneizamos la biopsia en 5 ml de QIazol (Qiagen), un reactivo indicado para el lisado de grasa, con el instrumento homogeneizador Ultra Turrax T8 (Sigma-Aldrich, EEUU) e incubamos el homogenado durante 5 min a temperatura ambiente (15-25°C).
3. A continuación centrifugamos a 12.000 x g durante 10min a 2 - 8°C y deseamos la capa de grasa que quedó en la parte superior del tubo.
4. En el siguiente paso añadimos 1 mL de cloroformo y agitamos manual y vigorosamente durante 15 segundos.
5. Volvimos a incubar el homogenado durante 2-3 min a temperatura ambiente (15-25°C) y centrifugamos a 5.000 x g durante 1 5min a 4 °C.
6. Después de la centrifugación se podían observar tres fases: Una fase superior acuosa e incolora que contenía el ARN; una interfase blanquecina; y una fase roja inferior o fase orgánica. En

tejidos con mucha grasa se podía observar una fase extra transparente por debajo de la fase orgánica.

7. A continuación transferimos la fase acuosa superior a un tubo nuevo, recuperando aproximadamente 3 mL y añadimos el mismo volumen de etanol al 70% y mezclamos por vórtex.
8. Posteriormente transferimos hasta 4 mL de muestra a una columna RNeasy Midi Spin colocada en un tubo de 15 mL suministrado con el kit y centrifugar a 5.000 x g durante 5min y a 20-25°C
9. Descartamos el líquido y reutilizamos el tubo para repetir los pasos 10-12 utilizando la muestra restante.
10. En el siguiente paso lavamos con 2 mL de *Buffer RW1* centrifugando a 5.000 x g durante 5min y a 20-25°C.
11. Descartamos el líquido y reutilizamos el tubo para incubar durante 15min a T^a ambiente con 160µL de la solución preparada de DNasa I a temperatura ambiente (20-25°C).
12. Lavamos de nuevo repitiendo el paso 10 con Buffer RW1.
13. Después hicimos un lavado con 2.5 mL del Buffer RPE centrifugando a 5.000 x g durante 2 min y lavamos de nuevo con 2.5 mL del Buffer RPE centrifugando a 5.000 x g durante 5min a T^a ambiente.
14. A continuación transferimos la columna a un nuevo tubo de 15 mL y añadimos la cantidad indicada de agua libre de RNasas directamente a la membrana de la columna (150µl de agua para una cantidad esperada de ARN inferior a 150µg; 250ul de agua si se esperan entre 150µg y 1mg de ARN). Incubamos durante 1 min a temperatura ambiente (20-25°C) y centrifugamos a 3.000-5.000 x g durante 3 min y a 20-25°C.
15. Finalmente repetimos el paso 14 con un segundo volumen de agua libre de RNasas y eluimos en el mismo tubo. Determinamos la

concentración de ARN (ng/ μ l) por espectrofotetría a la densidad óptica de 260nm y almacenamos las muestras de ARN a -80°C .

2.3 Extracción de ARN de muestras de suero de sangre periférica

Previo a la extracción de ARN, determinamos la hemólisis por medición de la absorbancia a 414nm, correspondiente a la hemoglobina, y descartamos las muestras hemolizadas (**figura 14**).

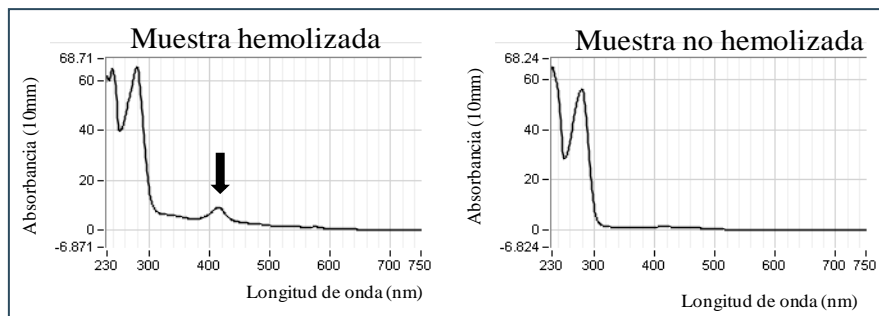


Figura 14. Prueba de detección de hemólisis en muestras de suero. La flecha negra indica el pico de absorbancia a 414nm de una muestra hemolizada.

Protocolo: miRCURY™ RNA Isolation Kit- Biofluids

Preparación de reactivos:

- ❖ **Preparamos Wash Solution 2 BF** añadiendo 100ml de etanol absoluto.

Procedimiento

1. Primero descongelamos las muestras de suero en hielo y las centrifugamos a 3000 x g durante 5 min para precipitar los detritos u otros componentes no solubles.
2. Después transferimos 200 μ l del sobrenadante del paso anterior a un tubo nuevo y añadimos 60 μ l de *Lysis Solution BF*. Vorteamos 5 segundos e incubamos durante 3 min a temperatura ambiente.

3. A continuación añadimos 20µl de *Protein Precipitation Solution BF*. Vorteamos 5 segundos e incubamos 1 min a TA.
4. Luego centrifugamos a 11.000 x g durante 3 min y transferimos el sobrenadante limpio a un nuevo tubo colector de 2ml con tapa.
5. Seguidamente añadimos 270 µl de Isopropanol y vorteamos durante 5 segundos.
6. En el siguiente paso colocamos una columna de membrana de sílica (*Mini Spin Column BF*) en un tubo colector y cargamos la muestra sobre la membrana de sílica de la columna. Incubamos 2 min a T^a ambiente y centrifugamos durante 30 segundos a 11.000 x g. Descartamos el líquido eluido y colocamos la columna en un nuevo tubo colector.
7. A continuación lavamos con 100 µl de *Wash Solution 1 BF* centrifugando a 11.000x g durante 30 segundos. Descartamos el eluato y reutilizamos el mismo tubo colector.
8. Después procedimos a lavar primero con 700 µl de *Wash Solution 2 BF* centrifugando a 11.000 x g durante 30 segundos u luego, en un nuevo tubo colector, con 250 µl de *Wash Solution 2 BF* centrifugando 2 min a 11.000 x g para secar la membrana de sílica.
9. Finalmente transferimos la columna a un nuevo tubo colector de 1,5ml con tapa y añadimos 50 µl de agua libre de nucleasas directamente sobre la membrana de sílica. Incubamos 1 minuto a TA y centrifugar 1 min a 11.000 x g. Después guardamos las muestras del ARN purificado a -80°C hasta su utilización.

2.4 Expresión de miRNAs

Síntesis de ADN complementario (ADNc):

Ajustamos el ARN total (extraído con el kit miRCURYTM – Cell&Plant de Exiqon) a 5ng/µl en agua libre de ribonucleasas (RNAsas).

En el caso del ARN extraído con *miRCURY™ RNA Isolation Kit-Biofluids de Exiqon*, no fue necesario utilizar ninguna concentración ajustada de ARN.

Utilizamos el kit de síntesis de ADNc *miRCURY LNA™ Universal RT miRNA PCR, Polyadenylation and cDNA synthesis kit* (Exiqon, Dinamarca). La mezcla de reacción por cada tubo de PCR se preparó de acuerdo a la **tabla 11**:

| Reactivos | Volumen (µl) por tubo | Tabla 11. Mezcla de reacción de <i>miRCURY LNA™ Universal RT miRNA PCR, Polyadenylation and cDNA synthesis kit</i> (Exiqon, Dinamarca) |
|---------------------------------------|-----------------------|--|
| ARN 5ng/ml | 2 | |
| H ₂ O libre de Rnasas | 5 | |
| <i>cDNA buffer</i> , concentrado 5 x | 2 | |
| <i>cDNA Enzyme</i> , concentrado 10 x | 1 | |
| volumen total | 10 | |

El ARN se retrotranscribió a ADNc de forma automatizada en un termociclador siguiendo el programa térmico que se muestra a continuación:

Retrotranscripción: **42°C 60min**

Inactivación de la retrotranscriptasa: **95°C 5min**

Enfriamiento: **4°C ∞**

Con el kit de síntesis de ADNc de Exiqon, la poliadenilación y la retrotranscripción ocurren en una sola reacción. En primer lugar, una cola de poli-Adenina es añadida al extremo 3' del miRNA maduro. A continuación se sintetiza el ADNc usando un cebador de poli-Timina con un cebador degenerado (que presenta una secuencia que admite más de un nucleótido en ciertas posiciones) en el extremo 3' y una región 5' terminal no complementaria o tag universal (**Figura 15A**)

qRT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real)

Analizamos la expresión de miRNAs por qRT-PCR en un termociclador 7900HT (Applied Biosystems, EEUU) con la química del SYBR® Green I (SG) (*Exilent SYBR® Green Master Mix*, Exiqon, Dinamarca).

En un primer paso, diluímos cada muestra de ADNc 80 veces (40 veces si el ADNc se retrotranscribió a partir de ARN de muestra de suero), por ejemplo 1µl de ADNc en 79ul de H₂O libre de RNasas. Después preparamos la pre-mezcla de reacción que se muestra en la tabla 3. En cada pocillo cargamos 6 µl de mezcla de reacción y 4 µl de ADNc 1:80 (1:40).

| Reactivos | Volumen por pocillo (µl) |
|---------------------------------------|--------------------------|
| <i>ExiLENT SYBR® Green master mix</i> | 5 |
| <i>miRNA LNA™ PCR primer set</i> | 1 |
| Volumen total | 6 |

Tabla 12. Mezcla de reacción *ExiLENT SYBR® Green master mix* más *miRNA LNA™ PCR*

En la **Tabla 13** se encuentran los *sets* de cebadores de miRNAs (*miRNA LNA™ PCR primer set*, Exiqon, Dinamarca) utilizados en el estudio:

| miRNA | Ref. | miRNA | Ref. |
|-----------------|--------|-----------------|--------|
| hsa-miR-1 | 204344 | hsa-miR-191-5p | 204771 |
| hsa-miR-103a-3p | 204063 | hsa-miR-193a-5p | 204665 |
| hsa-miR-126-3p | 204227 | hsa-miR-193b-3p | 204226 |
| hsa-miR-132-3p | 206035 | hsa-miR-19a-3p | 205862 |
| hsa-miR-133b | 206058 | hsa-miR-206 | 206073 |
| hsa-miR-146a-5p | 204688 | hsa-miR-216a-5p | 204167 |
| hsa-miR-146b-5p | 204553 | hsa-miR-222-3p | 204551 |
| hsa-miR-149-5p | 204321 | hsa-miR-23a-3p | 204772 |
| hsa-miR-155-5p | 204308 | hsa-miR-31-5p | 204236 |
| hsa-miR-17-3p | 206008 | hsa-miR-335-5p | 204151 |
| hsa-miR-17-5p | 204771 | hsa-miR-433-3p | 204036 |
| hsa-miR-181a-5p | 206081 | hsa-miR-9-5p | 204513 |
| hsa-miR-181b-5p | 206008 | hsa-let-7g-5p | 204565 |

Tabla 13. Listado de sets de cebadores *miRNA LNATM PCR* de Exiqon.

El programa de ciclos de la qRT-PCR que utilizamos fue el siguiente:

$$\left. \begin{array}{l} 95^{\circ}\text{C}, 10\text{min} \\ 95^{\circ}\text{C } 10\text{s} \\ 60^{\circ}\text{C } 1\text{min} \end{array} \right\} \times 40\text{ciclos}$$

El SG es un compuesto del grupo de las cianinas asimétricas con gran afinidad por el ADN bicatenario ³¹⁸. Una vez unido al ADN tiene la propiedad de emitir fluorescencia de luz verde (pico de longitud de onda o $\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ nm}$) cuando el complejo ADN:SG es excitado con luz azul de $\lambda_{\text{max}} = 497 \text{ nm}$, cuyos niveles de intensidad de fluorescencia son proporcionales a la cantidad de ADN unido ³¹⁹.

Los sets de cebadores *miRNA LNATM PCR* (Exiqon, Dinamarca) incluyen el cebador directo y el cebador inverso. El cebador directo se une específicamente a la región del ADNc correspondiente al *miRNA* maduro,

mientras que el cebador inverso reconoce la región del miRNA, la secuencia de timinas y el tag 5' terminal (**Figura 15B**).

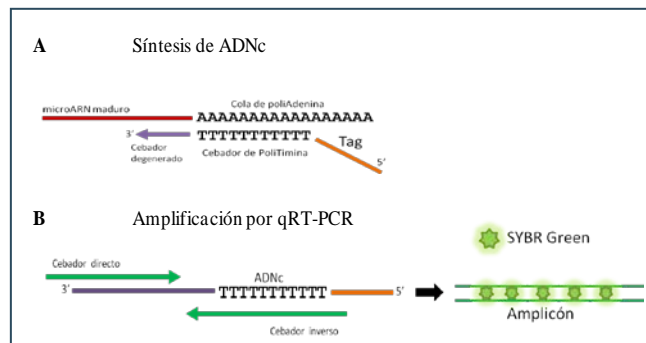


Figura 15. Esquema del sistema miRCURY LNATM RT-PCR de miRNAs. A) Síntesis de ADNc a partir de miRNAs. B) Amplificación de cDNA por qRT-PCR.

Las lecturas de fluorescencia y registros de expresión durante la qRT-PCR las hicimos con el programa *SDS 2.3* (Applied Biosystems, EEUU) y el análisis de los datos con el programa *RQ Manager 1.2* (Applied Biosystems, EEUU). Determinamos la especificidad de la qRT-PCR generando curvas de temperatura de fusión, correspondientes al fragmento que se desea amplificar (**Figura 16**). Normalizamos los resultados del análisis con el ARN pequeño nuclear U6 (snRNA U6) (ref. 203907; Exiqon, Dinamarca) como control endógeno en cultivos celulares o en biopsias de tejido adiposo. En cuanto al análisis de las muestras de suero de las cohortes PIZARRA y Di@bet.es, normalizamos la expresión de los miRNAs con la media aritmética de la expresión de hsa-miR-103-3p y hsa-let-7g-5p. Todos los resultados se expresaron mediante el método comparativo de expresión de Ct: $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$.

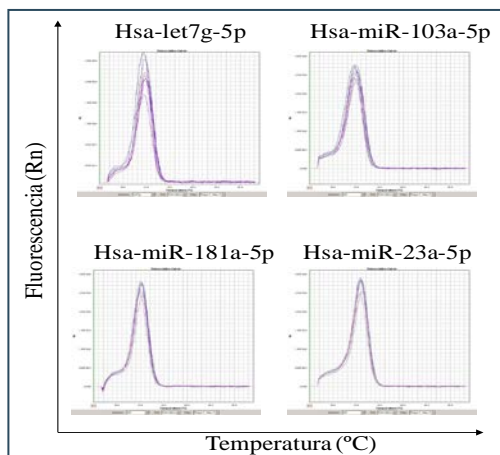


Figura 16. Curvas de temperatura de fusión.

2.5 Expresión génica de citoquinas y marcadores celulares

Síntesis de ADN complementario (ADNc):

El ARN destinado al análisis génico de citoquinas y marcadores celulares fue retrotranscrito a cDNA utilizando el kit *High Capacity RNA-to-cDNA* (Applied Biosystems, EEUU).

En primer lugar ajustamos alícuotas de 500ng de ARN total por 9ul de H₂O libre de RNasas. Después preparamos la mezcla de reacción (Tabla 14), 20μl por tubo de PCR.

| Reactivos | Volumen por tubo (μl) |
|---|-----------------------|
| <i>Enzyme Mix RT</i> | 1 |
| <i>RT Buffer</i> | 10 |
| Ajustar 500ng de ARN en 9μL de H ₂ O | 9 |
| Volumen total | 20 |

Tabla 14. Mezcla de reacción del kit *High Capacity RNA-to-cDNA* (Applied Biosystems, EEUU).

El ARN se retrotranscribió a ADNc de forma automatizada en un termociclador siguiendo el programa térmico que se muestra a continuación:

Retrotranscripción: **37°C 60min**
Inactivación de la retrotranscriptasa: **95°C 5min**
Enfriamiento: **4°C ∞**

qRT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real)

Empleamos 25ng de cDNA por cada muestra para la qRT-PCR en un termociclador 7900HT (Applied Biosystems, EEUU) con el kit de TaqMan Universal PCR Master Mix x2 (Applied Biosystems, EEUU) y con la química de las sondas Taqman (Applied Biosystems, EEUU).

Primero diluimos 1 ul de ADNc en 3 ul de H₂O. Luego preparamos la pre-mezcla de la reacción (**Tabla 15**). En cada pocillo cargamos 16 µl de pre-mezcla de reacción y 4 ul de ADNc 1:4.

| Reactivos | Volumen por pocillo (µl) |
|------------------------------------|--------------------------|
| TaqMan Universal PCR Master Mix x2 | 10 |
| TaqMan Gene Expression Assay | 1 |
| H ₂ O | 5 |
| Volumen total | 16 |

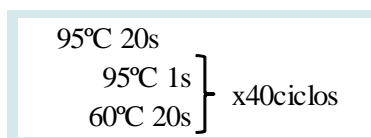
Tabla 15. Pre-Mezcla de reacción TaqMan Universal PCR Master Mix x2 y TaqMan Gene Expression Assay

En la **Tabla 16** se muestra el listado de ensayos de expresión génica Taqman (incluye sondas taqman y cebadores específicos) empleados en el análisis de expresión génica de citoquinas y marcadores celulares.

| Gen | Ensayos <i>Taqman</i> |
|-------------------------------|-----------------------|
| <i>IL6</i> | Hs00985639_m1 |
| <i>IL8</i> | Hs00174103_m1 |
| <i>IL1</i> | Hs01555410_m1 |
| <i>IL10</i> | Hs00961622_m1 |
| <i>TNFα</i> | Hs00174128_m1 |
| <i>MCP-1</i> | Hs00234140_m1 |
| <i>CD206</i> | Hs00267207_m1 |
| <i>Adiponectina</i> | Hs00605917_m1 |

Tabla 16. Listado de ensayos con sondas Taqman de Applied Biosystems.*IL6*: Interleuquina 6; *IL8*: Interleuquina 8; *IL10*: Interleuquina 10, *TNF α* : Factor de necrosis Tumoral *alfa*, *MCP-1*: proteína quimioatrayente de monocitos 1, *CD206*: *cluster* de diferenciación 206.

El programa de ciclos de la qRT-PCR se muestra a continuación:



Las sondas Taqman son oligonucleótidos específicos de una secuencia del gen diana y que están conjugados con un fluoróforo en su extremo 5' y con un inhibidor de fluorescencia o quencher en su extremo 3'. Durante la fase de polimerización de la qRT-PCR, la sonda taqman es degradada por la actividad 5' exonucleasa de la Taq polimerasa, separándose el fluoróforo del quencher, lo que se traduce en una emisión de fluorescencia con una intensidad proporcional a la cantidad de ADN amplificado del gen seleccionado (**Figura 17**)^{320,321}.

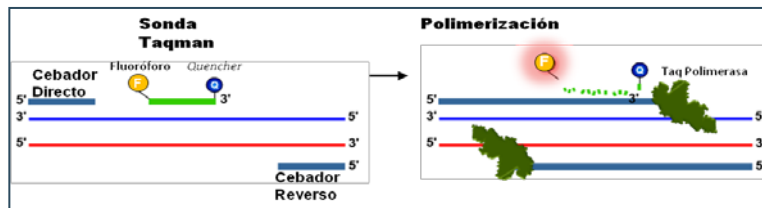


Figura 17. Esquema del sistema de qRT-PCR con ensayos Taqman de Applied Biosystems

Hicimos las lecturas de fluorescencia y registros de expresión durante la qRT-PCR con el programa *SDS 2.3* (Applied Biosystems, EEUU) y el análisis de los datos con el programa *RQ Manager 1.2* (Applied Biosystems, EEUU). Normalizamos los resultados del análisis a la expresión de la Ciclofilina A (CYP o PPIA) (HS9999904_m1. Applied Biosystems, EEUU) como control endógeno. Todos los resultados se expresaron mediante el método comparativo de expresión de Ct: $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$.

3. Búsqueda de potenciales dianas para miRNAs

Para la predicción de potenciales dianas para mir181a y miR23a utilizamos los algoritmos de predicción microT-CDS v5 de Diana Lab (<http://www.miRNA.gr/webServer>) y MiRanda-mirSVR (<http://www.miRNA.org>). Seleccionamos únicamente aquellas dianas que pasaron los filtros de puntuación para cada base de datos en particular, y fueron identificadas por ambos algoritmos simultáneamente.

3.1. Miranda-mirSVR

Miranda^{322,323} es un algoritmo basado en la complementariedad de la semilla (se define semilla cómo las bases en las posiciones entre la 2 a la 8 en la región 5' del miRNA) con su diana en la región 3'UTR del ARNm y la energía libre de la estructura del dúplex miRNA:ARNm, dando un valor de puntuación de la interacción mediante un algoritmo de **regresión de**

3.2. MicroT-CDS. Diana Labs.

Respecto al MicroT-CDS³²⁴⁻³²⁶ se trata de un algoritmo de programación dinámica que identifica la alineación óptima entre la secuencia de semillas del miRNA (esta semilla contabiliza desde el nucleótido 1 al 9 desde el extremo 5' del miRNA) y cada secuencia de 9 nt en la 3'-UTR o en las secuencias codificantes (CDS, por sus siglas en inglés) del ARNm del gen diana. El algoritmo se basa en parámetros que se calculan individualmente para cada miRNA, y para cada elemento de reconocimiento de miRNA (ERM) sobre la secuencia del ARNm diana, dependiendo del grado de unión y conservación evolutiva. Los ERMs deben atender a los siguientes criterios³²⁴:

- La alineación comienza en la posición 1 ó 2 de la semilla del miRNA, a partir de la cual debe haber un mínimo de 4 nucleótidos de unión Watson-Crick (W-C).
- Se permite la presencia de una interacción tipo wobble U:G para alineaciones de más de 6 nucleótidos de unión W-C.
- Se permite una sólo incompatibilidad para ERMs con ocho nucleótidos de unión W-C.

La puntuación total pronosticada (puntuación miTG) de una interacción entre el miRNA y su gen diana es la suma ponderada de ERMs conservados y no conservados de un gen. Se consideran puntuaciones miTG potencialmente eficientes con valores iguales o superiores a 0,7.

A continuación se muestra el ejemplo del resultado de una búsqueda de interacción entre el miR-181a-5p y el gen PTEN. En la interfaz se ofrece información del miRNA y el gen a través del símbolo “i” de información, se detallan los elementos de reconocimiento del miRNA en

base a la alineación y la conservación, y genera un valor miTG de puntuación de la diana (**Figura 19**).

DIANA TOOLS

HOME SOFTWARE PUBLICATIONS CONTACT

Q ENSG00000171862 hsa-miR-101a-5p Filters ?

Results: 1 targets of miRNAs: hsa-miR-101a-5p found in genes: ENSG00000171862. Threshold is set to 0.7.

Page 1

| Ensembl Gene Id | miRNA name | miTG score | Also Predicted |
|--------------------------|-----------------|-------------------|-------------------------------------|
| 1 ENSG00000171862 (PTEN) | hsa-miR-101a-5p | 0.002072965786020 | <input checked="" type="checkbox"/> |

A

Gene details
miRNA details
published links: miRNA | genes | both
UCSC genome

| Region | Binding Type | Transcript position | Score | Conservation |
|--------|--------------|---------------------|---------------------|--------------|
| UTR3 | 6mer | 1261-1207 | 0.00352731750526959 | 0 |

B

Position on chromosome: 10:89726491-89726517
Conserved species: panTro2,rhaMac2,oryCun2,bosTau4,canFam2,danNov2,lohAfr3,monDom5
(T xanves ipv) 3'UTR USAA AVACAVAV 3'

C

Binding areas:

| (miRNA) | 3' | 5' |
|---------|-----------|--------|
| ACU | UACUGA | AUGUU |
| UU | UUUU | UUUUU |
| UGA | GUGGUU | UUUACU |
| | 5'UGGCAAC | |

| Region | Binding Type | Transcript position | Score | Conservation |
|--------|--------------|---------------------|---------------------|--------------|
| UTR3 | 6mer | 1869-1887 | 0.00304429337485369 | 6 |
| UTR3 | 6mer | 2255-2282 | 0.00342675505454804 | 10 |
| UTR3 | 9mer | 2209-2316 | 0.00604439527540524 | 9 |
| UTR3 | 6mer | 2790-2801 | 0.00276714923621771 | 10 |
| UTR3 | 6mer | 3923-3933 | 0.00196770464944760 | 2 |
| UTR3 | 6mer | 4680-4700 | 0.00150881107861829 | 3 |
| UTR3 | 7mer | 5114-5107 | 0.00966227019006659 | 5 |
| UTR3 | 6mer | 5249-5275 | 0.00191863425831845 | 4 |
| UTR3 | 6mer | 5881-5908 | 0.00441789190268493 | 6 |
| UTR3 | 6mer | 6194-6220 | 0.00530798517159198 | 4 |

Figura 19. Interfaz del resultado de búsqueda de la interacción entre un miRNA y una potencial diana en microT-CDS de Diana lab . A. Puntuación miTG de la suma ponderada de los elementos de reconocimiento del miRNA. B. Información del miRNA y del gen diana. C. Información detallada de todos los ERMs.

4. Transfecciones transitorias de miRNAs mediante la técnica de lipotransfección en adipocitos SGBS diferenciados

Empleamos adipocitos SGBS diferenciados a día 9 a la densidad de 30.000 células/cm² (80% de semiconfluencia) para el desarrollo de estudios funcionales induciendo en ellos una sobreexpresión con miRNAs sintéticos (*Mimics*) o silenciamiento transitorios con inhibidores de miRNAs introducidos *in vitro* por la técnica de la lipotransfección

En primer lugar optimizamos el modelo de lipotransfección en adipocitos SGBS empleando en un experimento con diferentes dosis de *Mimic* (5nM y 100nM) y de inhibidor de miRNAs (50nM, 75nM, 100nM y 150nM), en presencia de 0,66µl/cm² de Lipofectamina 2000 (Invitrogen, EEUU) ³²⁷. La Lipofectamina 2000 es un agente de transfección que contiene liposomas formados por lípidos catiónicos que encapsulan ácidos nucleicos u otros elementos, formando complejos de lipotransfección que liberan su contenido en el interior celular ³²⁸. Determinamos la eficiencia de la lipotransfección a 24h cuantificando la expresión de miR-181a-5p y miR-23a-3p por qRT-PCR, relativizada al control negativo de adipocitos no transfectados.

4.1. Preparación de complejos de lipotransfección

La preparación de los Complejos de Lipotransfección (CLT) (700µl por pocillo de 9.64cm²) se realizó a temperatura ambiente en medio reducido en suero Opti-MEM I (Gibco, EEUU) sin antibióticos y en tubos de lipotransfección (4.5ml PS tube sterile, Greiner Bio-One, Austria).

Procedimiento

1. En primer lugar, preparamos *Mimics*, inhibidores o sus respectivos controles negativos en Opti-MEM I de forma individual o en combinación de dos para cotransfección:
 - 1.1. *Preparación individual.* Diluimos 1.75µl de *Mimic*, inhibidor o Control negativo 20µM en 350µl de Opti-MEM I (equivalente a una concentración final del CLT de 50nM). Mezclamos e incubamos durante 5min a T^a ambiente.
 - 1.2. *Preparación en combinación.* Diluimos 1.75 µL de cada uno de los 2 *Mimics* o 2 inhibidores 20µM en 350 µL de Opti-MEM I. Diluimos 3,5 µL de control negativo en 350 µL de Opti-MEM I. Mezclamos e incubamos 5min a T^a ambiente. La cantidad añadida de control negativo, o la suma de dos *Mimics* o dos inhibidores es equivalente a una concentración final de 100nM.
2. Paralelamente, diluimos 9.36 µL de Lipofectamina 2000 en 350 µL de Opti-MEM I (equivalente a una densidad final de 0,66µl/cm² en pocillo de 9.64cm²). Mezclamos e incubamos durante 5min a T^a ambiente.
3. A continuación, mezclamos cuidadosamente las dos partes que contienen los *Mimics* (ó inhibidores) y la lipofectamina 2000 y dejamos incubar durante 20min a T^a ambiente para la formación de CLT. Las concentraciones finales de los *Mimics* y los inhibidores de miRNAs y sus respectivos controles negativos se muestran en la **Tabla 17**.

| miScript miRNA <i>Mimic</i> | | Concentración final |
|--------------------------------|--|---------------------|
| Transfección individual | AllStars Negative Control siRNA (SI03650318) | 50nM |
| | Syn-hsa-miR-181a-5p (MSY0000256) | 50nM |
| | Syn-hsa-miR-23a-3p (MSY0000078) | 50nM |
| Cotransfección | AllStars Negative Control siRNA | 100nM |
| | Syn-hsa-miR-181a-5p + Syn-hsa-miR-23a-3p | 50nM+50nM |
| miScript miRNA Inhibitor | | Concentración final |
| Transfección individual | Negative Control Inhibitor (1027271) | 50nM |
| | Anti-hsa-miR-181a-5p (MIN0000256) | 50nM |
| | Anti-hsa-miR-23a-3p (MIN0000078) | 50nM |
| Cotransfección | Negative Control Inhibitor | 100nM |
| | Anti-hsa-miR-181a-5p + Anti-hsa-miR-23a-3p | 50nM+50nM |

Tabla 17. Listado de *Mimics* e inhibidores de miRNAs miScript (Qiagen, EEUU) y sus respectivos controles negativos empleados en la lipotransfección de adipocitos SGBS.

- En el siguiente paso, lavamos las células con 2 mL de Opti-MEM I por pocillo. Aspiramos el medio medio y añadimos 700µl/pocillo de CLT gota a gota sobre la monocapa de adipocitos SGBS en placa de 6 pocillos. Incubamos 24h a 37°C, 5% CO₂ y atmósfera humidifica durante 24h.
- Pasado el período de lipotransfección, lisamos las células directamente o las tratamos con estímulos y posteriormente las lisamos con tampón de lisis para extracción de proteína (Tris-HCl pH 7,5, 25mM; EDTA, 2mM; SDS, 2% p/v) o tampón de lisis para extracción de ARN del kit de extracción de ARN *miRCURYTM – Cell&Plant de Exiqon* con β-Mercaptoetanol al 1%, dependiendo de la finalidad del experimento.

En el esquema de la **Figura 19** se resume el procedimiento de preparación de complejos de lipotransfección.

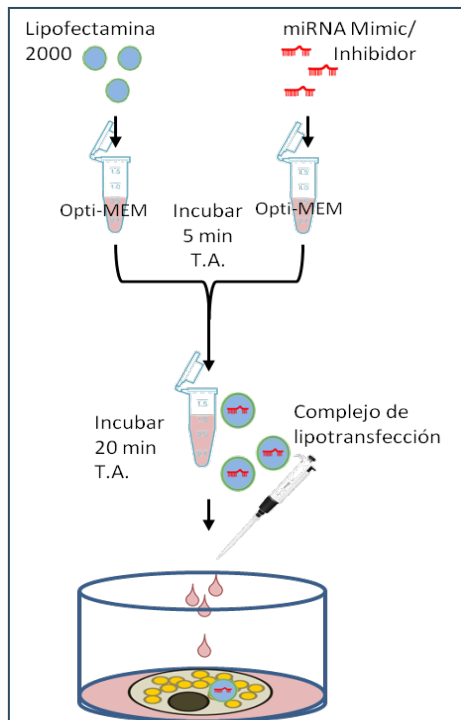


Figura 19. Formación de complejos de Lipotransfección. La Lipofectamina 2000 y los *Mimics* o inhibidores se preparan de forma independiente en volúmenes iguales de medio reducido Opti-MEM (Gibco, EEUU) y sin antibiótico. Posteriormente las dos partes se mezclan por pipeteo, dejando incubarse la mezcla durante 20 minutos a temperatura ambiente (T.A.) y en oscuridad para la formación de los complejos de lipotransfección. La mezcla resultante se añade gota a gota sobre los adipocitos SGBS adheridos a la placa, dejando incubarse durante 24h a 37°C, 5% CO₂ y atmósfera humidificada. Estos complejos se introducen pasivamente en la célula donde liberan su contenido. La entrada de *Mimics* equivale a una sobreexpresión transitoria de miRNAs que pasan a formar parte del RISC inhibiendo sus correspondientes dianas, mientras que los inhibidores reducen la acción de los miRNAs endógenos de la célula, así como sus niveles de expresión.

4.2. Sobreexpresión de miRNAs en adipocitos SGBS previa a tratamiento con Insulina en presencia o ausencia de TNF α

1. Una vez transcurrido el tiempo de lipotransfección con *Mimics*, incubamos los adipocitos SGBS en presencia o ausencia de 50ng/mL TNF α (Preprotech, EEUU) durante 8h, seguido de una estimulación con Insulina 100nM (Actrapid, Irlanda) durante 10 minutos.
2. Posteriormente, lavamos las células con PBS x1 pH 7,4 (Tampón fosfato 0,01M, cloruro potásico 0,0027M, cloruro sódico 0,137M) y las recogimos en 60 μ l por pocillo de tampón de lisis (Tris-HCl pH 7,5, 25mM; EDTA, 2mM; SDS, 2% p/v) para la extracción y cuantificación de proteína.

5. Extracción de proteína y análisis por la técnica del Western Blot

5.1. Extracción de proteína

1. Homogeneizamos los lisados de proteína celular dos veces por choque térmico (congelación a -80°C y descongelación en baño a 37°C) y 3 veces por ultrasonificación (frecuencia: 0,5 ciclos/s; Amplitud al 50%) con un ultrasonicador UP200S (Hielscher Ultrasonics GmbH, Alemania).
2. A continuación centrifugamos los lisados a $14.000 \times g$ durante media hora a 4°C . Recogimos el sobrenadante y los transferimos a nuevos tubos de 1,5ml.

5.2. Cuantificación de proteína

1. Realizamos a la cuantificación de proteína con $2.5\mu\text{l}$ de muestra por duplicado por el método del Ácido Bicinconínico (BCA) con el kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo-Scientific, EEUU).
2. Realizamos las lecturas de absorbancia a 540nm con el colorímetro lector de placas iEMS reader MF (LabsSystems, EEUU). Para la construcción de la curva patrón empleamos concentraciones conocidas (de 0 a 2mg) de albúmina sérica bovina, incluida en el Kit de BCA, a través de la ecuación logística de cuatro parámetros con el programa informático Ascent para lectores iEMS (LabsSystems, EEUU). La ecuación de la curva se utilizó para extrapolar los valores de absorbancia de la muestras y obtener las concentraciones de proteína total en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Protocolo: Pierce BCA Protein Assay

Preparación de reactivos

- ▶ **Preparamos la mezcla de trabajo** mezclando 50 partes de *BCA*TM *Reagent A* con 1 parte de *BCA*TM *Reagent B* (50: 1, Reactivo A: B). Se requieren 200 µl de reactivo mezcla de trabajo por cada pocillo de la microplaca de 96 pocillos.

Procedimiento

1. Primero preparamos por duplicado las muestras problema: 2,5 µL de muestra + 7,5 µL tampón de lisis (dilución 1: 4).
2. En el siguiente paso, preparamos por duplicado las muestras estándar en agua ultrapurificada. Utilizamos diferentes concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina: 2000µg/mL, 1.500µg/mL, 1.000µg/mL, 750µg/mL, 500µg/mL, 250µg/mL, 125µg/mL, 25µg/mL y 0µg/mL (blanco de agua).
3. Después añadimos 10 µL de cada réplica de muestra estándar o muestra desconocida en los pocillos de la placa de 96 pocillos.
4. Seguidamente añadimos 200 µL del reactivo *WR* a cada pocillo con pipeta multicanal automática y mezclamos bien la placa en un agitador de placas durante 30 segundos. Cubrimos la placa con papel de aluminio e incubamos a 37 ° C durante 30 min.
5. Trascurrido el tiempo de incubación, Medimos la absorbancia a 540nm en el colorímetro lector de placas iEMS reader MF (LabsSystems, EEUU), aplicando el factor de dilución 1:4 para las muestras problema.
6. A continuación y empleando el programa informático Ascent para lectores iEMS (LabsSystems, EEUU) restamos blancos y generamos una curva patrón con las concentraciones conocidas

(de 0 a 2mg) de albúmina sérica bovina (muestra estándar), incluida en el Kit de BCA.

7. Finalmente, obtuvimos una ecuación logística de cuatro parámetros a partir de la curva patrón y extrapolamos los valores de absorbancia de las muestras para obtener las concentraciones de proteína total en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de nuestras muestras

5.3. Western blot

1. Una vez conocidas las concentraciones de proteína de nuestras muestras, preparamos cada muestra con $15\mu\text{g}$ de proteína total y $6\mu\text{L}$ de tampón de carga [Tris HCl $0,225\text{M}$ pH 6.8, Glicerol 50% v/v, Dodecilsulfato Sódico (SDS) 10% p/v, Azul de bromofenol 0,05% p/v y β -Mercaptoetanol 5% v/v], en un volumen final de $20\mu\text{L}$.
2. Después desnaturalizamos la proteína a 100°C durante 5 min en un termobloque, dejamos enfriar y cargamos las muestras de proteína en gel de poliacrilamida al 8% con SDS 0,1% p/v (ver preparación en tabla9)
3. A continuación, separamos las bandas de proteína por electroforesis en tampón TGS 1x (Tris 25mM /Glicina 192mM /SDS 0.1% P/V. Bio-Rad) durante aproximadamente una hora y media a 115V de voltaje, en geles de poliacrilamida al 8% (ver preparación de geles en **Tabla 18**).

| Reactivo | Gel acumulador (3mL) | Gel separador (5mL) |
|--|-------------------------|------------------------|
| Acrilamida/Bis-acrilamida (Fisher Scientific, EEUU) | 5% p/v | 8% p/v |
| Tris pH 8,8 (Bio-Rad, EEUU) | 0,39M | -- |
| Tris pH 6,8 (Bio-Rad, EEUU) | -- | 0,39M |
| SDS (Fisher Scientific, EEUU) | 0,1% p/v | 0,1% p/v |
| PSA (Sigma Aldrich, EEUU) | 0,1% p/v | 0,1% p/v |
| TEMED (Sigma Aldrich, EEUU) | 0,06% p/v | 0,06% p/v |

Tabla 18. Preparación de gel de poliacrilamida al 8% y SDS 0,1% en molde de 1mm de grosor (Mini PROTEAN 3 System – Spacer and short plates, Bio-Rad, EEUU). En la tabla se muestran las concentraciones finales de cada reactivo para la preparación de un gel de poliacrilamida. PSA: persulfato amónico; TEMED: tetrametiletilendiamina; p/v: peso (g) por volumen (100ml); M: Molar.

- Rápidamente, transferimos los geles corridos de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa (Trans-Blot Turbo RTA Transfer Kit. Biorad, EEUU) en presencia de tampón de transferencia (Trans-Blot Turbo RTA Transfer Kit. Biorad, EEUU) por el sistema de transferencia semiseca Trans-Blot Turbo (Biorad, EEUU) durante 10 min a 1,3A y 25V.
- En un siguiente paso, comprobamos la eficiencia de la transferencia tiñendo la membrana con solución de 0.1% p/v de ponceau y 5% v/v de ácido acético (Sigma Aldrich, EEUU).
- Después lavamos la membrana en PBS 1x con 0.1% v/v Tween20 (Sigma Aldric, EEUU) (PBS-Tween20), y la bloqueamos con leche en polvo deshidratada (Bio-Rad, EEUU) al 3% p/v en PBS-Tween20 durante una hora a temperatura ambiente y en agitación suave.

7. Mientras tanto preparamos los anticuerpos primarios diluidos en PBS con leche en polvo al 1% p/v a la dilución de trabajo que se indica en la tabla 6.
8. Tras el bloqueo de la membrana, la dejamos incubar en presencia del anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C.
9. Al día siguiente y tras tres lavados rápidos en agua y cinco lavados de 5 min en 1x PBS-Tween20 en agitación intensa, incubamos las membranas con el anticuerpo secundario diluido en PBS con leche en polvo al 1% p/v durante una hora a temperatura ambiente y agitación suave.

La lista de anticuerpos primarios y secundarios empleados en el estudio se muestran en la **Tabla 19**.

| Anticuerpos primarios monoclonales | Ref. | PM | Casa comercial | Origen | DT |
|---|-------------|-------------|-----------------------|---------------|-----------|
| β-Actina | A2228 | 41kDa | Sigma | Ratón | 1:2000 |
| IRS total | 05-1085 | 180kDa | Merck Millipore | Ratón | 1:1000 |
| IRS1 fosfo-tirosina 612 | 09-432 | 180kDa | Merck Millipore | Conejo | 1:1000 |
| Akt total | 9272 | 60kDa | Cell signaling | Conejo | 1:1000 |
| Akt fosfo-serina 473 | 9271 | 60kDa | Cell signaling | Conejo | 1:1000 |
| AS160 total | 2447 | 160kDa | Cell signaling | Conejo | 1:1000 |
| AS160 fosfo-treonina 642 (D27E6) | 8881 | 160kDa | Cell signaling | Conejo | 1:1000 |
| PTEN (26H9) total | 9556 | 54kDa | Cell signaling | Ratón | 1:1000 |
| S6K fosfo-treonina 389 | 9205 | 70 kDa | Cell signaling | Conejo | 1:1000 |
| S6K total | 9202 | 70 y 85 kDa | Cell signaling | Conejo | 1:1000 |

| Anticuerpos secundarios policlonales conjugados a HRP | Ref. | -- | Casa comercial | Origen | DT |
|--|-------------|-----------|-----------------------|---------------|-----------|
| anti-IgG de conejo | 7074 | -- | Cell Signalling | Cabra | 1:2000 |
| anti-IgG de ratón | 7076 | -- | Cell Signalling | Cabra | 1:2000 |

Tabla 19. Lista de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en los experimentos de western blot. Sustrato del Receptor de Insulina (IRS), Proteína quinasa B (AKT), Sustrato de Akt de 160 kDa (AS160), Fosfatasa y homólogo de Tensina (PTEN), Proteína ribosomal S6 Quinasa (S6K), Peroxidasa de Rábano picante (HRP), Inmunoglobulina G (IgG); Peso molecular (PM); Dilución de trabajo (DT).

- 10.** Pasada la hora de incubación con el anticuerpo secundario, lavamos rápidamente las membranas 3 veces en agua y 3 veces por 5 min en PBS-tween20 y agitación.
- 11.** Finalmente revelamos las bandas específicas con el kit de revelado Super Signal West Femto (Thermo Scientific, EEUU) o con el kit Super Signal West Pico en caso de revelar la β -Actina. El primer kit es sensible a niveles de proteína en el rango de femtogramos y el segundo en el rango de picogramos. Realizamos la captación de imágenes con el sistema Versadoc MP4000 (Biorad, EEUU). Cuantificamos las bandas de proteína reveladas por densitometría con el programa Quantity One (Bio-rad, EEUU).

El revelado de las bandas específicas de proteína se basa en la reacción de oxidoreducción de peróxido de hidrógeno y un sustrato quimioluminiscente y la enzima peroxidasa de rábano picante (conjugada al anticuerpo secundario específico de la región constante del anticuerpo primario) que cataliza la reacción. En el proceso de oxidación del sustrato,

éste emite una señal de luz que puede ser registrada con un sistema de captación de imágenes³¹⁸ (**Figura 20**).

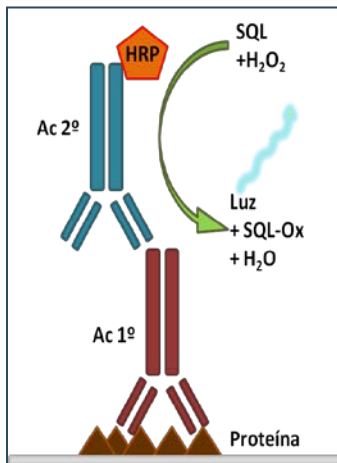


Figura 20. Esquema de inmunodetección indirecta de proteínas en membrana de nitrocelulosa. El anticuerpo primario (Ac1º) reconoce específicamente la proteína de estudio. El Ac1º es reconocido por un anticuerpo secundario (Ac2º) conjugado a la peroxidasa de rábano picante; ésta cataliza la reacción de oxidación de un sustrato quimioluminiscente (SQL) al recibir los electrones del peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Los productos obtenidos son el SQL oxidado (SQL-Ox), agua y una señal luminosa.

6. Ensayos de luciferasa

1. Adquirimos a través de Condalab (Madrid, España) los vectores LightSwitch™ 3'UTR GoClone™ indicadores de la luciferasa RenSP (Active Motif), incluyendo la secuencia completa de la región no traducida 3' (3'UTR) de *PTEN* (ref. S813973) o de *S6K* (ref. S880934). En la **Figura 21** se muestra la estructura del plásmido.

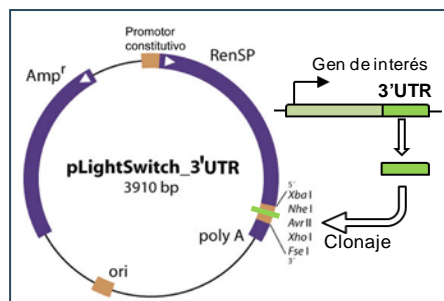


Figura 21. Light-Switch™ 3'UTR GoClone™ indicadores de la luciferasa RenSP. La región 3'UTR del gen de interés está insertado en el plásmido vector y fusionado con la secuencia del gen de la luciferasa RenSP.

2. Sembramos células HEK293 en placas de cultivo de 24 pocillos a una densidad de 50.000 células/cm² en 500 µL de medio DMEM (1x) (Gibco) suplementado con Suero Bovino Fetal al 10% (Sigma), sin antibiótico y sin antimicótico. Incubamos las placas durante 20h hasta alcanzar el 80% de confluencia.
3. Al día siguiente preparamos los complejos de lipotransfección en 300 µL de Opti-MEM (Gibco) por cada pocillo con la siguiente composición y de acuerdo a las combinaciones que se muestran en la **Tabla 20**:
 - 300 ng de Vector indicador de luciferasa conjugada con la 3'UTR de PTEN o S6K.
 - 50nM de Control negativo de miRNAs o *Mimic* de miR-181a-5p o miR-23a-3.

- 4 μL de Lipofectamina 2000 (1mg/ml) por cada 1 μg de ADN plasmídico en 300 μL de Opti-MEM (Gibco) por cada pocillo.

| Pocillo→ | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | Blanco |
|------------------------|---|---|---|---|---|---|--------|
| LFA 2000 | + | + | + | + | + | + | + |
| luc- <i>PTEN</i> 3'UTR | + | + | + | - | - | - | - |
| luc- <i>S6K</i> 3'UTR | - | - | - | + | + | + | - |
| CN | + | - | - | + | - | - | - |
| M181 | - | + | - | - | + | - | - |
| M23 | - | - | + | - | - | - | - |

Tabla 20. Combinaciones de vectores indicadores de luciferasa conjugados a *PTEN* 3'UTR o *S6K* 3'UTR y *Mimics* de miR-181a-5p (M181), miR-23a-3p (M23) o su control negativo de *Mimics* (CN). Lipofectamina 2000: LFA 2000

4. Después Incubamos los complejos de lipotransfección (CLT) durante 20min a T^a ambiente y añadimos 300 μL de CLT a cada pocillo.
5. Transcurridas 6 horas de lipotransfección, retiramos el medio y lo reemplazamos con 500 μL de DMEM suplementado con FBS al 10%.
6. Tras 24h de lipotransfección, retiramos el medio y añadimos 220 μL de PBS 1x. Congelamos la placa a -80°C durante 1 hora para facilitar el lisado de células.
7. Finalmente destinamos 20 μL a la cuantificación de proteína por ensayo BCA empleamos los 200 μL restantes en la cuantificación de luminiscencia con el kit de ensayo de luciferasa de Lightswitch (Active motif) en un luminómetro Varioskan LUX.
 - Realizamos el ensayo de luminiscencia en placas de plástico blanco de 96 pocillos.
 - Primero, Añadimos 100 μL de muestra (células+PBS x1) por pocillo y por duplicado.

- Después Preparamos la solución de ensayo con 1µL de sustrato (coelenterazina) por cada 100 µL de tampón de ensayo.
- A continuación añadimos 100 µL de solución de ensayo pocillo a cada 100ul de muestra con pipeta automática. Dejamos incubar durante 30 min a 25°C mientras la luciferasa RenSP oxida el subtrato de coelenterazina para dar lugar a coelenteramida más luz (**Figura 22**).
- Transcurrida la media hora de incubación, medimos la placa en luminómetro **Varioskan LUX (Thermofisher)** y con una **exposición por pocillo de 1000ms**.

8. Finalmente normalizamos las unidades relativas de luminiscencia (RLU) a la concentración de proteína (µg/ µL)

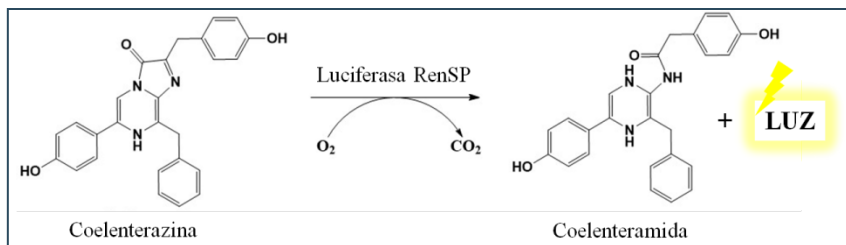


Figura 22. Reacción de luminiscencia. La coelenterazina es oxidada por la luciferasa en presencia de O_2 para producir Coelenteramida, CO_2 y luz.

El significado de este estudio consiste en que el *Mimic* del miRNA con sitios de unión en la secuencia 3'UTR conjugada a la luciferasa bloquea su traducción a proteína, dando lugar a una menor capacidad en catalizar la reacción de luminiscencia, y por tanto una menor emisión de luz con respecto a su control.

7. Estudio poblacional

7.1. Selección de pacientes

Cohorte 1: Biopsias de tejido adiposo visceral y subcutáneo

La selección de pacientes fue descrita en la cohorte de estudio de Vendrell y colaboradores (2010)³²⁹.

En nuestro estudio tuvimos acceso a las biopsias de tejido adiposo subcutáneo y visceral pareado de un total de 58 pacientes, que fueron cedidas por el biobanco del Hospital Universitario Joan XXIII (HUIJ23) de Tarragona. Los pacientes tuvieron un peso estable durante los últimos tres meses de estudio. No se presentaron enfermedades sistémicas, además de obesidad y/o *diabetes mellitus* tipo 2. No presentaron ninguna infección durante el último mes, y los pacientes con enfermedades hepáticas y/o renales fueron excluidos del estudio. Los grupos de estudio fueron emparejados por sexo y edad. Los pacientes se sometieron a una prueba de sobrecarga oral de 75g de glucosa para medir sus niveles de glucosa en sangre a los 120 min y determinar su estado de tolerancia a la glucosa, también conocido como test de tolerancia a la glucosa oral. El estado diabético de los pacientes se determinó de acuerdo al criterio de la Asociación de Diabetes de América de 1999, por el cual se consideran pacientes con DM2 si sus niveles de glucosa en sangre tras 8 horas en ayunas es ≥ 126 mg/dL (7.0 mmol/L), o bien su glicemia es ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L) durante el test de tolerancia a la glucosa. El estudio fue aprobado por el Comité ético de los hospitales y hubo consentimiento informado de todos los pacientes.

La cohorte 1 está formada 28 pacientes con índice de masa corporal (IMC) inferior a 30 (22 normotrelantes y 6 con DM2), y de 30 pacientes

con $IMC \geq 30$ normotolerantes ($n=12$), intolerantes a la glucosa ($n=11$) o diabéticos ($n=7$).

Cohorte 2: Estudio prospectivo PIZARRA

El estudio PIZARRA es un estudio poblacional de carácter prospectivo llevado a cabo en PIZARRA, un pueblo de la provincia de Málaga (España), con el objetivo de estudiar la incidencia de DM2 en el sur de España entre los años 1995 y 2010. El estudio fue financiado durante esos años por diversos proyectos del FIS, y de las consejerías de Salud e Innovación de la Junta de Andalucía ³³⁰.

Del estudio fueron descartados aquellos participantes que estuvieran ingresados en un hospital, estuvieran en gestación o padecieran algún desorden clínico severo o psicológico. El estudio fue aprobado por el Comité ético de investigación clínica del Hospital Carlos Haya. Todos los pacientes fueron debidamente informados y dieron su consentimiento.

Del estudio PIZARRA seleccionamos 48 pacientes con seguimiento a 4 años y con curva normal inicial que se alteraba a partir de los dos años de seguimiento (rango 2-4 años). Como grupo control seleccionamos un número equivalente de sujetos (53 sujetos) equiparable en edad, sexo, IMC y antecedente familiar de DM2, cuyos participantes mantenían un metabolismo hidrocarbonado estrictamente normal tras 4 años de seguimiento.

Cohorte 3: Muestras de suero de pacientes del estudio transversal Di@bet.es

Se trata de un amplio estudio epidemiológico nacional y de carácter transversal desarrollado en todo el territorio español. La investigación incluye el estudio de 5.419 personas mayores de 18 años en 100 centros

de salud. El estudio de campo, desarrollado a lo largo de tres años, ha incluido una detallada encuesta sobre hábitos de salud y otros determinantes sociales de la salud, una historia clínica, una evaluación antropométrica y una extracción sanguínea incluida una sobrecarga oral de glucosa. Del estudio se concluyó que la prevalencia de DM2 global del estudio ha sido del 12% y la de alteraciones hidrocarbonadas en global del 25% de toda la muestra. El 9.9% de los adultos que fueron atendidos en examen médico fueron excluidos del estudio de forma protocolaria por ingreso en hospital, por enfermedad severa, gestación o parto reciente. El estudio fue aprobado por el Comité ético de investigación clínica del Hospital Carlos Haya. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito.³³¹

Para el estudio de miRNAs en suero contamos con 50 sujetos con DM2 y 50 controles normotolerantes a la glucosa emparejados por sexo, edad e IMC, a partir de los datos del estudio Di@bet.es (Epidemiología de la Diabetes en España)³³¹.

7.2. Recolección de muestras

Cohorte 1: Biopsias de tejido adiposo visceral y subcutáneo

Todos los pacientes ayunaron durante al menos 12 horas hasta el momento de la intervención quirúrgica. Las muestras de tejido fueron obtenidas a partir de procedimientos quirúrgicos seleccionados (Colecistectomía, cirugía de hernia abdominal o cirugía bariátrica). El tejido adiposo subcutáneo (TAS) fue obtenido a partir de una incisión en la pared abdominal, mientras que el tejido adiposo visceral (TAV) fue obtenido a partir del omento o epiplón, un repliegue del peritoneo ubicado en el abdomen. Las muestras (1-5g) de tejido adiposo fueron transportadas inmediatamente al laboratorio en hielo, lavadas con PBS y congeladas en

nitrógeno líquido para ser almacenadas en el biobanco del HUIJ23 de Tarragona a -80°C hasta el momento de su procesamiento.

Cohorte 2: muestras de suero del estudio PIZARRA

Se tomaron dos muestras de sangre venosa de cada paciente, la primera entre las 9:00 y las 10:00 de la mañana en estado de ayunas, y la segunda a las 2 horas tras un test de tolerancia a la glucosa, por el cual se suministran 75g de L-Glucosa vía oral y se determinan sus niveles en sangre pasadas las 2 horas. Los pacientes diabéticos se diagnosticaron y clasificaron de acuerdo al criterio de 1999 de la OMS ²⁰

Las muestras se centrifugaron inmediatamente y el suero se congeló a -80°C y se depositó en el BioBanco del CIBERDEM hasta la realización de un posterior análisis.

Cohorte 3: muestras de suero del estudio Di@bet.es

Todos los participantes fueron invitados a un examen médico de su respectivo centro de salud. Se tomaron muestras de sangre basal en ayunas de los pacientes, a los cuales además se les realizó un test de tolerancia a la glucosa, por el cual se suministran 75g de L-Glucosa vía oral y se determinan sus niveles en sangre pasadas las 2 horas. Los pacientes diabéticos se diagnosticaron y clasificaron de acuerdo al criterio de 1999 de la Organización Mundial de la Salud (OMS) ²⁰. Las muestras fueron inmediatamente centrifugadas y el suero fue congelado a -80°C y depositado en el BioBanco del CIBERDEM hasta el momento del análisis.

7.3. Medidas clínicas y antropométricas

En una entrevista a los participantes se tomó nota de su edad, sexo, hábitos de fumador, hábitos de actividad física y de su historia familiar de diabetes. Las medidas de peso, altura, y los perímetros de cintura y cadera fueron obtenidas mediante métodos estandarizados. El IMC se calculó tras dividir el peso (en kilogramos) entre la altura (en metros) al cuadrado. El índice cintura/cadera se calculó al dividir el perímetro de la cintura entre el perímetro de la cadera; este último medido a la altura de la cresta ilíaca de la pelvis. Las medidas de presión arterial sistólica y diastólica fueron tomadas usando un monitor de presión arterial (Hem-703 C, Omron, Barcelona, Spain) o con un esfigmomanómetro, según el estudio.

7.4. Métodos analíticos

Se obtuvieron muestras de sangre a partir de la vena antecubital en tubos con EDTA (1mg/ml) o sin EDTA. Las muestras se centrifugaron a 5000 x g durante 15 min para la separación de suero y plasma. Los niveles plasmáticos de glucosa, triglicéridos (TG) y colesterol total (CT) fueron determinados usando un autoanalizador (Hitachi 737; Roche Molecular Bio-chemicals, Alemania) empleando métodos enzimáticos estándar por el laboratorio del HUIJ23. La insulina plasmática se determinó por radioinmunoanálisis (Coat-A-Count insulin; Diagnostic Products Corp., EEUU) en todos los sujetos, a excepción de los pacientes diabéticos tratados con insulina. El HOMA-IR fue determinado como $[\text{glucosa (mmol/l)} \times \text{insulina (mIU/l)}] / 22.5$ ¹⁷. Los niveles de colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad (Colesterol HDL) se calcularon después de precipitarlo en polietilenglicol a temperatura ambiente (PEG-6000, Merck Schuchardt OHG, Alemania). El colesterol asociado a lipoproteínas de

baja densidad colesterol (LDL) se calculó de forma indirecta a través de la fórmula de *Friedewald* (1972): $LDL = CT - HDL - TG/5.0$ (mg/dL). La Proteína C reactiva plasmática se midió con el kit *highly sensitive immunonephelometry kit* (Dade Behring, Alemania). Los niveles de citoquinas (TNF α y sus receptores R1 y R2, IL-6, Leptina, Adiponectina, FABP4) fueron determinados por inmunoensayo enzimático y medidos en el colorímetro lector de micro placas Versamax (MTX Lab System, Barcelona, España). Los niveles de ferritina sérica, inmunuquimiofluorescencia en el analizador automático Architect I2000[®] (Abbott Laboratories SA, España). Los niveles en suero de creatinina, ácido úrico, hierro (I+II), alanina aminotransferasa (ALAT), aspartato aminotransferasa (ASAT) y gamma-glutamyl aminotransferasa (GGT) se analizaron mediante métodos colorimétricos rutinarios en autoanalizador Architect C8000 (Abbott Laboratories SA, España). Los niveles de la Globulina de Unión a Hormonas Sexuales (SHBG) se midieron por ELISA (*SHBG ELISA*, Demeditec Diagnostics, Alemania). La capacidad antioxidante total en sangre (REDOX) se midió por ELISA (*Antioxidant Assay Kit*, Cayman Chemical, EEUU).

7.5. Procesamiento de las muestras

Procesamiento de las biopsias de tejido adiposo

De las 58 biopsias pareadas de TAS y TAV empleamos entre 400 - 500mg de tejido adiposo congelado para la extracción de ARN. Cada muestra fue homogeneizada en 5ml de Qiazol (Qiagen), un reactivo indicado para el lisado de grasa, con el homogeneizador Ultra Turrax T8 (Sigma-Aldrich). A continuación realizamos la extracción de ARN por el método de adsorción-desorción de ARN en membranas de sílica utilizando el kit RNeasy LIPID TISSUE MIDI (QIAGEN). La

concentración de ARN total fue determinado (ng/ μ l) por espectrofotometría a la densidad óptica de 260nm (**ver apartado 3.2.2**).

Procesamiento de las muestras de suero.

Se nos cedieron 100 sueros del estudio Di@bet.es y 200 sueros del estudio PIZARRA (100 sueros correspondientes a tiempo basal y 100 sueros correspondientes a 4 años de seguimiento) a través del Biobanco del CIBERDEM (centro de investigación biomédica en red). Determinamos la hemólisis por medición de la absorbancia a 414nm, correspondiente a la hemoglobina, y descartamos las muestras hemolizadas. Extrajimos el ARN de suero de cada muestra con el kit de extracción de ARN de biofluidos miRCURY™ (Exiqon, Dinamarca) a partir de 200 μ l de suero (**ver apartado 3.2.3**).

8. Análisis estadístico

8.1. Estudios *in vitro*

Los resultados de los experimentos celulares, replicados de 3 a 5 veces, se presentan como la media \pm E.E. (Error Estándar de la media). Comparamos las medias con el análisis simple de varianza (one-way ANOVA) y el estadístico T de Student-Fischer, considerando diferencias estadísticamente significativas aquellos valores de $p < 0.05$, empleando para ello el programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., EEUU).

8.2. Estudio poblacional

Los datos se muestran como porcentajes (variables categóricas), medias \pm desviación estándar (variables continuas con distribución normal) o medianas con intervalo intercuartil (variables continuas con distribución no normal). Analizamos la normalidad de las variables con el test de Kolmogorov-Smirnoff. Para realizar las comparaciones entre grupos utilizamos el test para muestras independientes y test para datos emparejados para las comparaciones dentro del mismo grupo. Para la comparación de variables categóricas/cualitativas utilizamos el test de la *Chi*-cuadrado, el test de Fisher (muestras pequeñas) o el test de McNemar (datos emparejados). Analizamos las variables continuas de distribución normal con la prueba t de Student o con el análisis simple de varianza (one-way ANOVA) para más de dos grupos. En el caso de las variables continuas que no seguían una distribución normal, primero intentamos

normalizar mediante su transformación logarítmica para poder utilizar pruebas paramétricas; en caso de no conseguirse, se utilizaron pruebas no paramétricas: U de Mann-Whitney para muestras independientes o T de Wilcoxon para los datos emparejados. Analizamos las correlaciones entre variables con los coeficientes de correlación de Pearson o de Spearman, según la normalidad de los datos. En todos los análisis anteriores, la significación estadística se ha asignado únicamente a los valores de $p < 0,05$.

Modelo Univariante

Para evaluar el poder predictivo de miR-181a-5p en suero realizamos un análisis de regresión logística y el cálculo de la curva de la característica operativa del receptor o curva ROC con el programa estadístico SPSS 19.

Modelos multivariantes

Regresión logística multivariante

Desarrollamos un modelo de regresión logística multivariante con el programa estadístico SPSS 19, del cual extrajimos la razón de momios de cada una de las variables introducidas en el modelo. También construimos la curva ROC combinada resultante del análisis para determinar el grado de precisión y sensibilidad del modelo para la predicción de pre-diabetes.

Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA)

En primer lugar transformamos en logaritmo y escalamos las variables del estudio PIZARRA. A continuación evaluamos el potencial predictivo de miR-181a-5p en la estratificación de pacientes del estudio PIZARRA junto a variables antropométricas, clínicas y bioquímicas

aplicando el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), con el lenguaje de programación estadístico R.

El PLS-DA, una extensión del algoritmo de regresión PLS, es un método supervisado de agrupamiento o clasificación de observaciones³³². El PLS-DA proyecta los datos de las variables independientes en un espacio de baja dimensión que maximiza la separación entre diferentes grupos de datos en las primeras dimensiones (también llamadas variables latentes). Estas variables latentes se clasifican en función de cómo explican la variable dependiente^{332,333}.

La capacidad predictiva del modelo se determinó usando un análisis de validación cruzada obteniendo el coeficiente de correlación multivariante o R^2 (fracción de la varianza explicada por un componente), el coeficiente de la capacidad predictiva del modelo o Q^2 (fracción de la varianza total predicha por un componente) y el coeficiente de precisión en la estratificación de los grupos. Estos datos revelan información acerca de la eficacia en la estratificación de los grupos y la calidad predictiva del modelo.

Finalmente, determinamos el peso de cada variable empleada en el componente con valor Q^2 óptimo de acuerdo a las puntuaciones obtenidas en la importancia de la variable en proyección (VIP).

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MICROARNS DESREGULADOS POR ACCIÓN DEL TNFA
EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD Y LA RESISTENCIA A LA INSULINA
Javier Lozano Bartolomé

VI. RESULTADOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MICROARNS DESREGULADOS POR ACCIÓN DEL TNFA
EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD Y LA RESISTENCIA A LA INSULINA
Javier Lozano Bartolomé

1. Selección de miRNAs

La obesidad es una patología que cursa con una inflamación de bajo grado en la que citoquinas, entre ellas el TNF α , están directamente implicadas en la regulación de la sensibilidad a la insulina³³⁴⁻³³⁶. Con estos antecedentes decidimos plantear la primera parte del estudio de miRNAs seleccionando miRNAs desregulados por la inflamación y descritos en el contexto de la obesidad y la RI, ya validados experimentalmente en la literatura científica.

Los términos de búsqueda (de artículos publicados hasta marzo de 2015) en Pubmed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) que utilizamos, se muestran a continuación: “miRNAs”AND/OR “TNF α ” AND/OR “adipocytes” AND/OR “Inflammation” AND/OR” insulin resistance”AND/OR “obesity”.

De acuerdo a los criterios anteriormente señalados, se recabaron 25 miRNAs cuyas funciones y expresión en diferentes procesos biológicos y patologías y tipos celulares se recogen en la **Tabla 21**, dónde los miRNAs aparecen clasificados de acuerdo a su implicación o regulación en procesos inflamatorios descritos en el contexto de la obesidad y la RI, así como el tipo celular o tejido en el que han sido estudiados.

| miRNA | Expresión/Función | Tejido/Tipo celular | Refs. |
|---|--|------------------------------|---------|
| Inflamación | | | |
| miR-149-5p, -23a-3p, -126-3p, -181b-5p, 19a-3p | Reducción en la expresión por estímulo de TNF α . | Células endoteliales humanas | 337-340 |
| miR-103 | | Adipocitos 3T3-L1 | 341 |
| miR-149-5p, -1, -126-3p, 206, 433-3p, 133b-5p | | Mioblastos humanos | 342 |

| | | | |
|--|--|---------------------------------------|--------------|
| miR-155-5p, -222-3p, -17-3p, -17-5p, -191-5p, -31a-5p | Aumento en la expresión por estímulo de TNF α u otros estímulos inflamatorios | Células endoteliales | 261,338, 343 |
| miR-155-5p, -335-5p, -222-3p | | Preadipocitos/adipocitos de ratón | 250,261, 341 |
| miR-155-5p, -146a-5p | | Células epiteliales retinales humanas | 344,345 |
| miR-216-5p | | Mioblastos | 342 |
| miR-9-5p | | Monocitos y granulocitos humanos | 346 |
| miR-149, -19a, -181a, -145 | Reducción por estímulo de LPS | Macrófagos THP-1 | 224 |
| miR-155, -146a | Aumento por estímulo de LPS | Macrófagos THP-1 | 224 |
| miR-155, -132, -22, -17,-31 | Aumento por estimulación con sobrenadante de macrófagos M1 activados con LPS | Adipocitos humanos | 224 |
| miR-132-3p, miR-433-3p | Inversamente asociados a IL-6 | Tejido adiposo humano | 347 |
| miR-132-3p | Activación de NFkB y producción de IL-8 y MCP-1 | Adipocitos | 270 |
| | Asociado a infiltración de macrófagos | Tejido adiposo | 256 |
| miR-145-5p | Aumento de TNF α y lipólisis | Preadipocitos humanos | 251 |
| miR-181a-5p | Inhibición de TNF α | Adipocitos de cerdo | 348 |
| | Función antiinflamatoria ante exposición a LDL oxidadas | Células dendríticas | 349 |
| | Inhibición de IL-1 α | Macrófagos THP-1 | 350 |
| | Inhibición de IL-8 | Fibroblastos humanos | 351 |
| | Inhibición de PTEN | Timocitos de ratón | 352 |
| miR-181b-5p | Inhibición de señalización de NFkB | Células endoteliales HUVEC | 339 |

| | | | |
|--|--|---|---------|
| miR-193b-3p | Afecta secreción de TNF α | Preadipocitos humanos | 251 |
| | Aumenta adiponectina | Adipocitos | 353 |
| | Afecta secreción de MCP-1 | Adipocitos humanos | 226 |
| miR-149-5p | Inhibición de PARP-2/Aumento actividad de Sirt-1 | Mioblastos C2C12 | 354 |
| | Reduce actividad de TNF, IL-1 α e IL-6 | Condrocitos humanos | 355 |
| | Reducido vía TLR4 | Macrófagos alveolares de ratón | 356 |
| miR-23a-3p | Reducido en macrófagos M1 | Macrófagos | 357 |
| | Inhibición de DUB A20/ activación de NF κ B | Macrófagos | 358 |
| miR-155-5p, 146a-5p | Inducción dependiente de NF κ B y AP1 | Macrófagos humanos y de ratón | 271,273 |
| Obesidad/Sensibilidad a la insulina | | | |
| miR-335-5p | Aumentado en obesidad | Tejido adiposo de ratón <i>ob/ob</i> y <i>db/db</i> | 359 |
| miR-222-3p | | Tejido adiposo/ suero | 226 |
| miR-181a-5p | Reducido en obesidad | Monocitos | 226 |
| miR-145-5p | | Tejido adiposo | 266 |
| miR193b-3p | | Tejido adiposo subcutáneo | 227 |
| miR-17-5p | | Tejido adiposo/ sangre | 222,256 |
| miR-193b-3p | | Suero | 360 |
| miR-31a-5p | Aumentado en DM2 | Suero | 361 |
| miR-9-5p | | Suero | 280,362 |
| miR-222-3p | | Suero | 363 |
| miR-146a-5p | | Suero | 280 |
| miR-132-3p | | Tejido adiposo | 256 |
| miR-23a-3p | Reducido en DM2 | Suero | 364 |
| miR-191-5p | | Suero | 365 |

Tabla 21. Lista de miRNAs pre-seleccionados. En la tabla se muestran los 25 miRNAs seleccionados de la literatura, agrupados por tipo celular o tejido y su relevancia en la inflamación, la obesidad y/o la RI.

2. Determinación de perfiles de expresión de los miRNAs seleccionados en adipocitos humanos primarios previamente estimulados con TNF α

El siguiente paso a seguir fue determinar los perfiles de expresión de los 25 miRNAs seleccionados en adipocitos maduros tras un estímulo inflamatorio inducido por TNF α , cómo modelo de RI. Para ello, diferenciamos *in vitro* preadipocitos humanos primarios a adipocitos maduros durante 14 días. El grado de diferenciación y maduración se valoró bajo observación al microscopio óptico según el acúmulo de gotas lipídicas en el citoplasma celular. A día 14, el 90% de las células ya habían alcanzado la diferenciación a adipocito maduro, tal y como se muestra en la **Figura 23A**. En este punto de diferenciación, tratamos los adipocitos con una dosis de 50ng/mL de la citoquina TNF α durante 8h. Los adipocitos así tratados muestran un incremento significativo de la expresión del ARN mensajero (ARNm) de las citoquinas inflamatorias Interleuquina (IL)-6 ($10,8 \pm 1,74$ veces) e IL-8 ($110,3 \pm 14,8$ veces) respecto al control sin tratamiento (S/T), corroborándose así el estado pro-inflamatorio del adipocito (**Figura 23B**). Además, los adipocitos tratados durante 8h con 50ng/mL de TNF α y posteriormente estimulados con 100nM de Insulina durante 10 minutos, presentan desensibilizada la ruta de señalización de la insulina, al detectarse por Western Blot una reducción en la fosforilación tanto de la proteína kinasa B (PKB o AKT), como del Sustrato de AKT de 160 kDa (AS160) respecto a los adipocitos tratados únicamente con insulina (**Figura 23C**). De este modo obtenemos un modelo de RI inducida por TNF α en el adipocito, previamente descrito en la literatura (Liu et al, 1998) y que nos será útil para nuestros estudios posteriores.

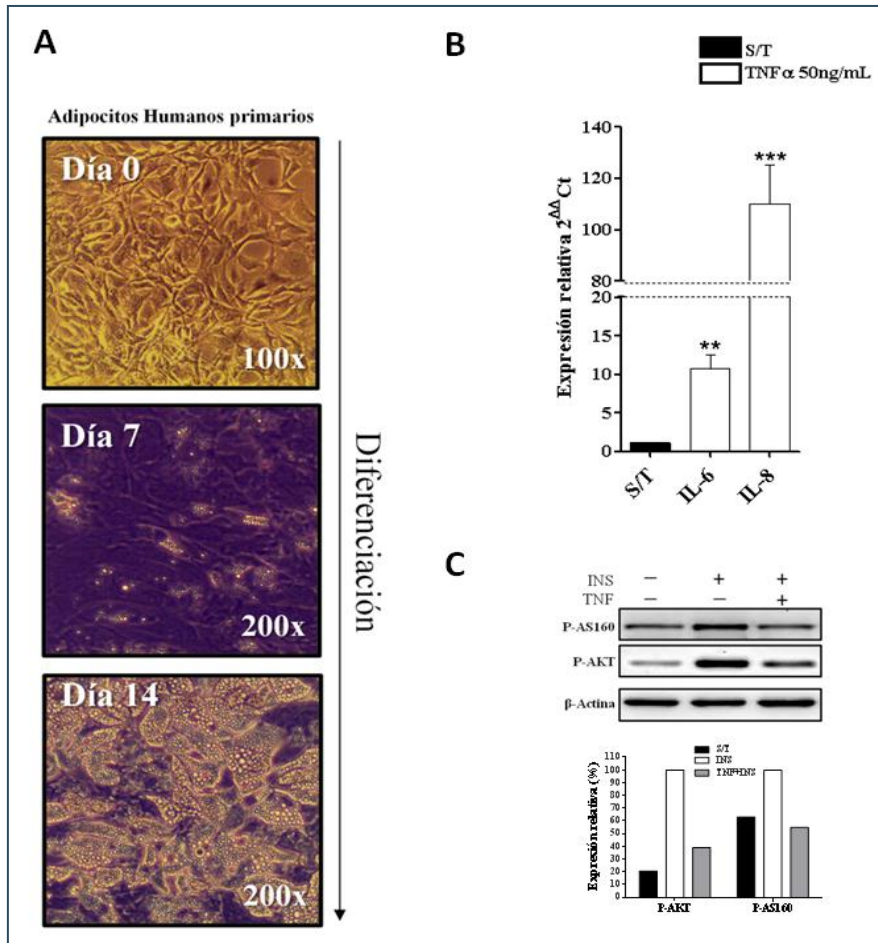


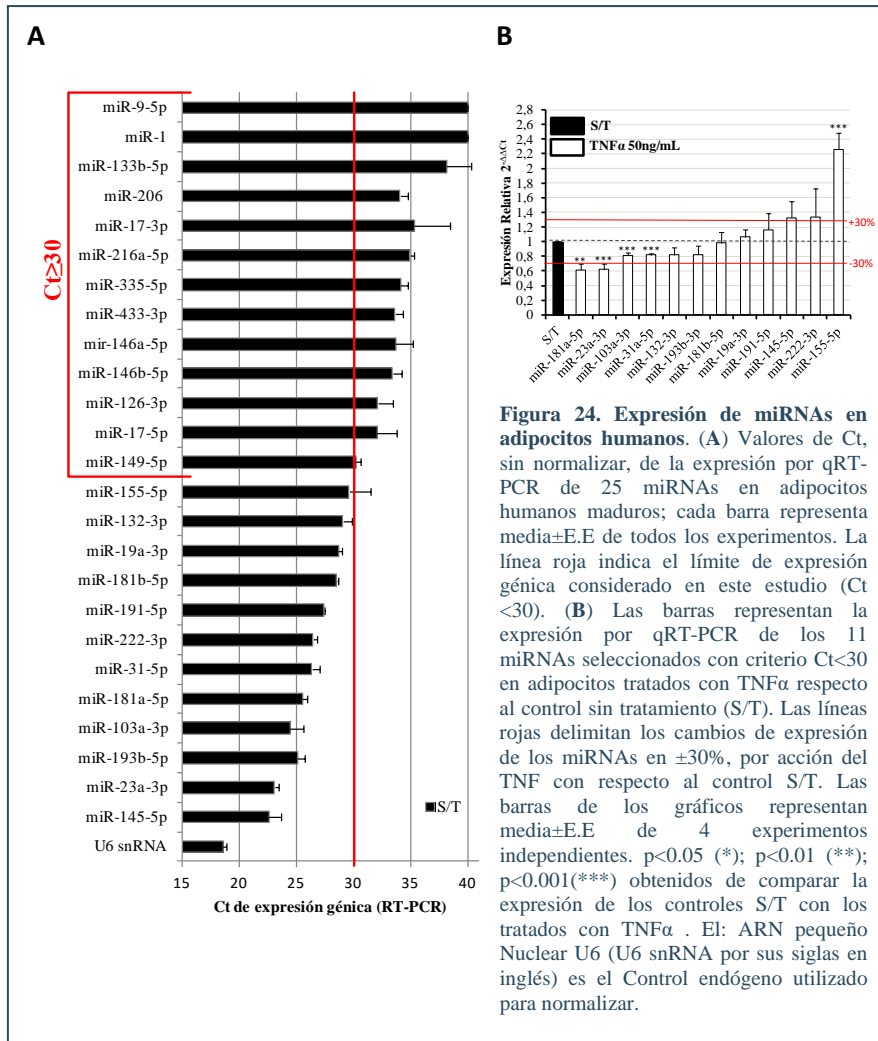
Figura 23. Modelo *in vitro* de RI inducida por TNF α en adipocitos humanos. (A) Imágenes tomadas al microscopio óptico de preadipocitos primarios humanos día 0 (100 x). A día 7: El 10-15% de las células acumulan gotas lipídicas (200 x); adipocitos humanos maduros a día 9: >90% del total de células ya han acumulado gotas lipídicas (200x). (B) Expresión génica $2^{-\Delta\Delta Ct}$ por qRT-PCR de IL-6 e IL-8 en adipocitos humanos maduros tratados con TNF α respecto al control sin tratamiento (S/T). Las barras de los gráficos representan media \pm E.E de 4 experimentos independientes. $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***) obtenidos de comparar la expresión de los controles S/T con los tratados con TNF α . (C) Expresión de proteína por *Western Blot* de AS160 y AKT fosforilados (P-As160 y P-AKT, respectivamente) respecto a β -Actina en adipocitos SGBS diferenciados a día 9 tratados con o sin Insulina 100nM 10min (INS) o con TNF α 50ng/mL 8h (TNF α) +INS de un solo experimento. Los valores de P-AKT y P-AS160 se normalizaron con β -Actina, y se relativizaron al de tratamiento con sólo Insulina (=100%).

A continuación, medimos la expresión de los 25 miRNAs, previamente seleccionados, del ARN obtenido de los experimentos con adipocitos humanos tratados y sin tratar con TNF α . Utilizamos el método de la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real cuantitativa (qRT-PCR) empleando la química asociada al SYBR Green, tal y cómo se ha descrito en la sección de materiales y métodos. Los niveles de expresión de cada miRNA se determinan a partir del ciclo en el cual la intensidad de fluorescencia en fase exponencial cruza el umbral de intensidad definido por el investigador, denominándose ciclo umbral o Ct por sus siglas en inglés. De este modo cuanto menor es el valor de Ct mayor es el nivel de expresión del gen que estamos analizando.

Del análisis cuantitativo por qRT-PCR de los 25 miRNAs, únicamente consideramos aquellos miRNAs con niveles de alta expresión en el adipocito en estado basal, es decir aquellos que presentan un Ct<30, excluyendo aquellos miRNAs con niveles de expresión intermedia ($30 \leq Ct \leq 35$) y baja ($Ct > 35$)³⁶⁶. Aplicando estos criterios, desestimamos 13 de los 24 miRNAs analizados puesto que se expresaron con valores de $Ct \geq 30$. Los 11 miRNAs restantes muestran una expresión de $Ct < 30$ tanto en el adipocito maduro sin tratamiento como en el estimulado por TNF α (**Figura 24A**). Los valores de Ct se relativizaron a la expresión del control endógeno snRNU6 ($Ct_{gen} - Ct_{U6} = \Delta Ct$), ampliamente utilizado en la literatura y recomendado por las casas comerciales³⁶⁷, y al control sin tratamiento ($\Delta Ct_{TNF\alpha} / \Delta Ct_{ctrl} = \Delta \Delta Ct$). Finalmente los datos se transformaron de acuerdo a la siguiente fórmula: $2^{-\Delta \Delta Ct}$ ³⁶⁸.

Finalmente, de los 11 miRNAs, apostamos sólo por aquellos que presentasen cambios significativos superiores a un incremento o reducción del 30% en los niveles de expresión relativa sobre los controles sin tratamiento con TNF α (S/T). Con este nuevo criterio de selección

únicamente tres miRNAs pasaron la criba: miR-181a-5p (-38,4±7,6%),
 miR-23a-3p (-37,9±6,8%) y miR-155-5p (+126±21,9%) (Figura 24B).



3. Expresión de miR-181a-5p, miR-23a-3p y miR-155-5p en línea humana de adipocitos (SGBS) bajo estímulo de TNF α

Para posteriores ensayos funcionales de los miRNAs seleccionados, utilizamos la línea celular inmortalizada SGBS de preadipocitos humanos para diferenciarlos a adipocitos *in vitro* y estimularlos con TNF α .

En primer lugar, quisimos comprobar si los adipocitos derivados de la línea SGBS se comportaban igual que los adipocitos humanos primarios. En este sentido los adipocitos SGBS incubados en presencia o ausencia de 50ng/mL de TNF α durante 8 h muestran un aumento en la transcripción de la IL-6 ($10,06 \pm 1,73$ veces) y la IL-8 ($1.789 \pm 278,07$ veces) respecto al control sin tratamiento (**Figura 25B**), igual que sucede en los adipocitos humanos. Además, la expresión de miR-181a-5p y miR-23a-3p está reducida, en un $-46,0 \pm 14,6\%$ y un $-32,4 \pm 6,1\%$, respectivamente, mientras que miR-155-5p experimentó un aumento de expresión de un $328,61 \pm 83,3\%$ (**Figura 25C**), mostrando un comportamiento muy similar al que tienen en adipocitos humanos sometido al mismo estímulo. Todo ello nos lleva a hipotetizar que estos miRNAs podrían estar desregulados en el tejido adiposo inflamado en obesidad.

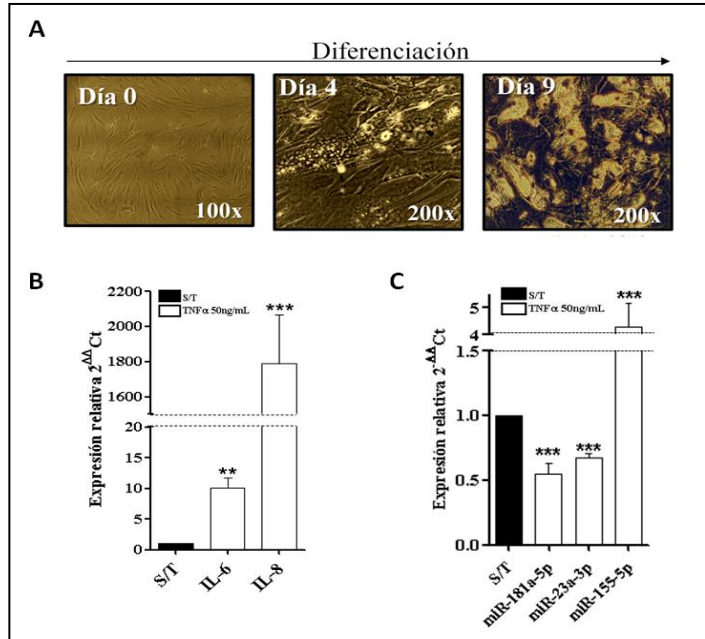


Figura 25. Expresión de miRNAs en SGBS diferenciadas a adipocitos. (A) Imágenes tomadas al microscopio óptico de HpAd de la línea SGBS en proceso de diferenciación: a Día 4; El 10% de las células acumulan gotas lipídicas; a Día 9; >90% del total de células han acumulado gotas lipídicas. 100x y 200x indican el número de aumentos. **(B)** Niveles de expresión cuantificado por qRT-PCR de las citoquinas IL-6 e IL-8 en adipocitos SGBS a día 9 tratados con TNF α respecto al control sin tratamiento (S/T) **(C)** Niveles de expresión cuantificado por qRT-PCR de miR-181a-5p, miR-23a-3p, miR-155-5p en adipocitos SGBS a Día 9. Las barras de los gráficos representan media \pm E.E de 3 experimentos independientes. p <0.05 (*); p<0.01 (**); p<0.001(***), p valor obtenido al comparar la expresión de los controles S/T con los adipocitos SGBS a día 9 tratados con TNF α .

4. Expresión de miRNAs de miR-181a-5p, miR-23a-3p y miR-155-5p en tejido adiposo visceral y subcutáneo humano de pacientes con y sin obesidad

El paso siguiente fue analizar la expresión de miR-181a-5p, miR-23a-3p y miR-155-5p por qRT-PCR en biopsias pareadas de tejido adiposo visceral (**TAV**) y subcutáneo (**TAS**) de pacientes obesos con Índice de Masa Corporal (IMC) ≥ 30 (n=28) y de pacientes no obesos (IMC < 30) (n=30).

En la **Tabla 22** se muestran las características clínicas y antropométricas de la cohorte de estudio. Los sujetos obesos con $IMC \geq 30$ presentan un perfil clínico y metabólico alterado caracterizado por un incremento significativo en los niveles de presión arterial, niveles significativamente alterados de RI, medidos por el índice HOMA-IR, y niveles significativamente más elevados de triglicéridos y colesterol en sangre.

| | IMC<30 (n=28) | IMC≥30 (n=30) | P- valor |
|---|---------------|---------------|----------|
| Edad (años) | 52,67±14,84 | 45,8±7,84 | 0.123 |
| Género (hombre/mujer) | 12/16 | 9/21 | 0.309 |
| IMC (Kg/m²) | 25,74±2,44 | 43,7±4,91 | <0.001 |
| Cintura (cm) | 87,28±11,77 | 127,24±11,44 | <0.001 |
| Cadera (cm) | 97,68±11,53 | 142,16±12,29 | <0.001 |
| Cintura/Cadera | 0,89±0,09 | 0,89±0,09 | 0.515 |
| PAS (mmHg) | 129,57±15 | 140,03±21,84 | 0.044 |
| PAD (mmHg) | 72,89±8,05 | 90,5±10,85 | <0.001 |
| Grupos de tolerancia a la glucosa (NTG/IG/DM2) | 22/0/6 | 12/11/7 | 0.001 |
| Glucosa (mM) | 5,7±1,27 | 5,72±0,99 | 0.413 |
| Insulina (pmol/L) | 51,32±66,67 | 116,95±63,96 | <0.001 |
| HOMA-IR | 1,47±1,15 | 4,26±2,31 | <0.001 |
| Colesterol (mM) | 5,05±1,16 | 4,89±1,17 | 0.486 |
| Colesterol HDL (mM) | 1,32±0,36 | 1,16±0,24 | 0.101 |
| Colesterol LDL (mM) | 3,7±1,03 | 3,69±1,11 | 0,935 |
| Triglicéridos (mM) | 1,3±0,36 | 1,7±1,12 | 0.013 |
| Proteína C reactiva (mg/L) | 0.99±0.56 | 0.89±0.58 | 0.564 |

Tabla 22. Características clínicas y antropométricas de los grupos de estudio clasificados según el Índice de Masa Corporal (IMC) <30 o ≥30. Presión arterial sistólica (PAS), presión arterial diastólica (PAD). Estado de tolerancia a la glucosa: normotolerancia a la glucosa (NTG), intolerancia a la glucosa (IG) y *Diabetes Mellitus* de tipo 2 (DM2). Índice de RI (HOMA-IR, por sus siglas en inglés), Colesterol de lipoproteína de alta densidad (HDL, por sus siglas en inglés), Colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés). Todas las comparaciones entre los dos grupos fueron realizadas por el análisis estadístico *Mann-Whitney*. P-valores<0.05 son considerados como diferencias significativas entre el grupo de pacientes con IMC<30 y el de IMC≥30.

Además, detectamos que la expresión de ARNm de TNF α en el depósito de tejido adiposo visceral de los pacientes con IMC ≥ 30 (n=15) es significativamente mayor en comparación con sus homólogos con IMC <30 (n=7) (**Figura 26**).

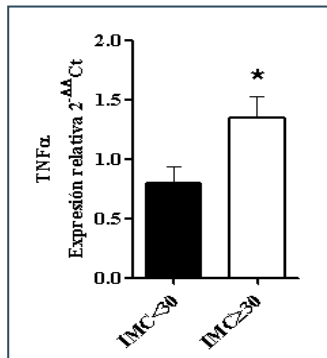


Figura 26. Expresión génica de TNF α . Perfil de expresión génica por qRT-PCR en tejido adiposo visceral de pacientes con IMC ≥ 30 y <30 . La gráfica representa la media \pm E.E. P-valor <0.05 (*) al comparar IMC <30 vs IMC ≥ 30

Inicialmente comparamos la expresión de los miRNAs en función del IMC y tipo de depósito de tejido adiposo. Observamos que la expresión de miR-181a-5p está significativamente más elevada en el depósito visceral (TAV) con respecto al subcutáneo (TAS) tanto en pacientes obesos ($p=0,007$) como en los no obesos ($p<0,001$) (**Figura 27A**). También detectamos una mayor expresión de miR-23a-3p en el TAV respecto al TAS en pacientes obesos ($p=0,008$) y en pacientes no obesos ($p=0,026$) (**Figura 27B**), lo que podría sugerir una mayor implicación de dichos miRNAs en el depósito visceral de grasa. Además, observamos una disminución significativa de los niveles de expresión tanto de miR-181a-5p ($p=0,039$) como de miR-23a-3p ($p<0,001$) en TAV de los individuos obesos respecto a los delgados (**Figuras 27A y B**)

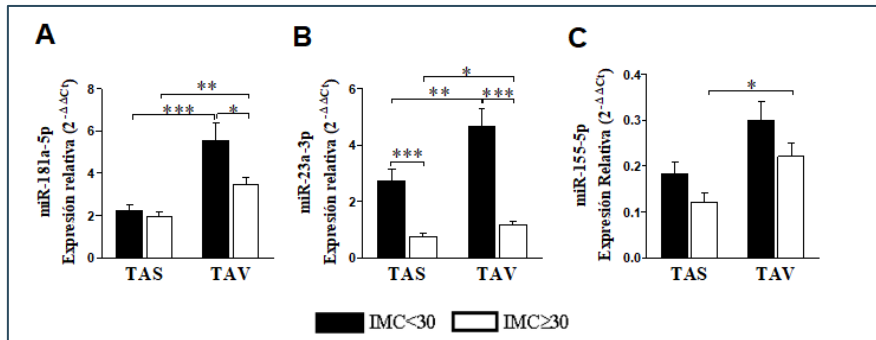


Figura 27. Expresión génica de miRNAs en tejido adiposo subcutáneo (TAS) y visceral (TAV) de pacientes con IMC<30 y ≥30. (A) Expresión relativa de miR-181a-5p. **(B)** Expresión relativa de miR-23a-3p **(C)** Expresión relativa de miR-155-5p. Las gráficas representan las medias±E.E de las muestras. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***)

Por otro lado, en TAS, sólo miR-23a-3p muestra una clara disminución significativa de la expresión en pacientes obesos ($p < 0,001$) (**Figura 27B**), que no se detecta para miR-181a-5p, cuando se compara con los no obesos.

Respecto al miR-155-5p, comprobamos que sus niveles de expresión fueron bajos ($Ct \geq 35$) o indetectables en el 48,3% ($n=28$) de las muestras analizadas. Únicamente consideramos, de forma excepcional, aquellas muestras ($n=30$) que presentaron niveles de expresión al menos intermedia ($30 \leq Ct < 35$). Sólo observamos diferencias significativas cuando comparamos la expresión de miR-155-5p entre TAS y TAV de los pacientes con $IMC \geq 30$ ($p=0.016$), siendo el TAV el que más expresa este miRNA (**Figura 27C**).

4.1. Expresión de miR-181a-5p, miR-23a-3p y miR-155-5p en el tejido adiposo humano en función del grado de tolerancia a la glucosa

Cuando reclasificamos los grupos de acuerdo al estado de tolerancia a la glucosa (**Tabla 2**) y su IMC, encontramos que la expresión de miR-181a-5p en TAV estaba significativamente disminuida en los sujetos con DM2 respecto a los NTG, independientemente de su IMC (**Figura 28B**). También observamos un resultado similar en el TAS, pero solo de sujetos con $IMC < 30$ (**Figura 28A**).

Al analizar la expresión de miR-23a-3p en TAS y VAT de sujetos con $IMC < 30$, detectamos que sus niveles estaban reducidos en sujetos con DM2 en comparación a los sujetos NTG (**Figuras 28C y 28D**). Además, éstos últimos mostraron niveles de miR-23a-3p significativamente superiores a los detectados en pacientes con $IMC \geq 30$, independientemente, en este caso, del estado de tolerancia a la glucosa (**Figuras 28C y 28D**).

Un dato a resaltar acerca de la expresión observada de ambos miRNAs en TAV es que estaban más reducidos en obesos DM2 que en delgados DM2 (**figuras 28B y 28D**), lo que sugiere un efecto combinado de comorbilidad.

Al comparar la expresión de miR-155-5p entre los diferentes subgrupos clasificados en función del grado de tolerancia a la glucosa y su IMC, no se detectaron diferencias significativas tanto en TAS como en TAV (**Figuras 28E y 28F**).

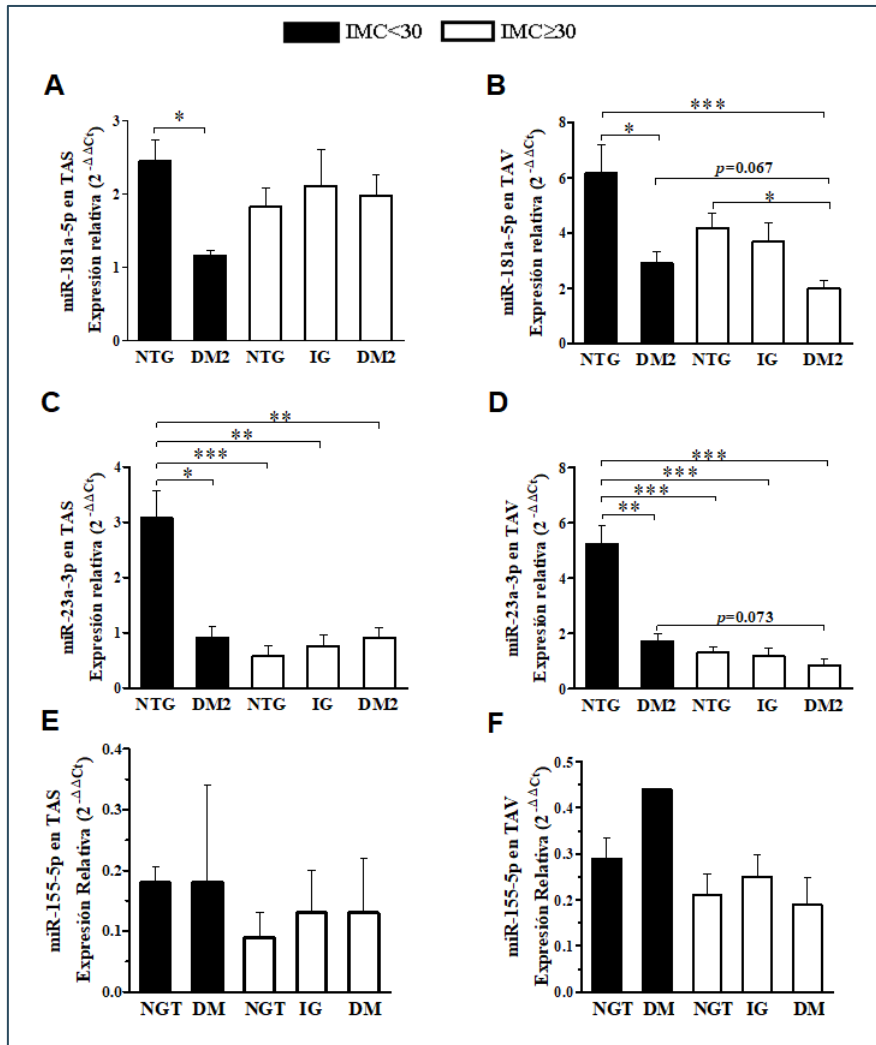


Figura 28. Expresión génica de miRNAs en tejido adiposo subcutáneo (TAS) y visceral (TAV) de pacientes con IMC<30 e IMC≥30 clasificados acorde al grado de tolerancia a la glucosa. Expresión relativa de miR-181a-5p en TAS (A) y TAV (B). Expresión relativa de miR-23a-3p en TAS (C) y TAV (D). Expresión relativa de miR-155-5p en TAS (E) y TAV (F). Las gráficas representan las medias±E.E de las muestras. normotolerancia a la glucosa (NTG) intolerancia a la glucosa (IG) y; *Diabetes Mellitus* de tipo 2. (DM2). Se consideraron p-valores significativos <0'05 (*), <0'01(**), <0'001(***)

4.2. Estudio de correlaciones bivariadas entre el perfil clínico y los datos antropométricos de los pacientes del estudio y la expresión de miR-181a-5p, miR-23a-3p y miR-155-5p en las biopsias de TAS y TAV

Con el propósito de estudiar la asociación entre los datos clínicos y antropométricos de los pacientes y los datos de expresión de miR-181a-5p y miR23a-3p, realizamos un análisis de correlación bivariada por el método *Rho* de *Spearman* (**Tabla 23**).

De este análisis observamos que tanto la expresión de miR-181a-5p como la expresión de miR-23a-3p se correlacionan inversamente con la **adiposidad**, en lo que refiere a IMC y la circunferencia de la cintura en el TAV. También observamos una asociación significativamente inversa entre el perímetro de la cadera y la expresión de miR23a-3p tanto en TAS como en TAV. El miR-155-5p no se encontró asociado a ningún parámetro de adiposidad.

En cuanto a los parámetros de **tensión arterial**, éstos se vieron inversamente correlacionados con la expresión de miR-181a-5p y miR-23a-3p en el tejido adiposo subcutáneo, pero no hallamos ninguna correlación con miR-155-5p (**Tabla 23**).

Interesa destacar que los niveles de miR-181a-5p y miR-23a-3p detectados en TAV se correlacionan inversamente con los **niveles de glucosa**. Los niveles de expresión de miR-23a-3p detectados en TAS y TAV se asocian negativamente con los niveles de insulina en sangre. Además, la expresión de miR-181a-5p del TAV, la expresión de miR-23a-3p de TAS y TAV y la expresión de miR-155-5p en TAS se correlacionan inversamente con el **índice HOMA-IR**, lo que sugiere una vez más una

clara relación entre el metabolismo glucídico y la expresión de los miRNAs del estudio.

En lo que refiere al **perfil lipídico**, observamos que el colesterol HDL se correlaciona positivamente con miR-181a-5p en ambos depósitos adiposos y con miR-23a-3p en el TAV; sin embargo, los niveles de triglicéridos en sangre se correlacionan negativamente con ambos miRNAs en el tejido adiposo subcutáneo, y únicamente con miR-23a-3p en el TAV. Ningun parámetro del perfil lipídico se asocia a miR-155-5p.

En cuanto al **perfil inflamatorio** se dispone de los niveles de expresión génica de TNF α determinados únicamente en el TAV, debido a que el depósito adiposo omental es mayor productor de TNF α que el depósito subcutáneo ³⁶⁹. En nuestro análisis observamos una correlación significativamente inversa entre los niveles de TNF α y los niveles de miR-181a-5p y miR-23a-3p. Sin embargo, entre la expresión de miR-155-5p y la expresión de TNF α , no se detectó una correlación significativa en el TAV ($r = 0,302$; $p = 0,316$).

| | TAS | | | | | | TAV | | | | | |
|--------------------------------------|-------------|--------|------------|--------|------------|-------|-------------|--------|------------|--------|------------|----|
| | miR-181a-5p | | miR-23a-3p | | miR-155-5p | | miR-181a-5p | | miR-23a-3p | | miR-155-5p | |
| | R | p | R | p | R | p | R | p | R | p | R | p |
| IMC (Kg/m ²) | -- | -- | -0,467 | <0,001 | -- | -- | -0,237 | 0,042 | -0,686 | <0,001 | -- | -- |
| Cintura (cm) | -- | -- | -0,546 | <0,001 | -- | -- | -0,269 | 0,028 | -0,651 | <0,001 | -- | -- |
| Cadera (cm) | -- | -- | -0,559 | <0,001 | -- | -- | -- | -- | -0,584 | <0,001 | -- | -- |
| Cintura/Cadera | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -0,400 | 0,003 | -- | -- | -- | -- |
| PAS (mmHg) | -0,277 | 0,040 | -0,378 | 0,007 | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| PAD (mmHg) | -0,278 | 0,039 | -0,615 | <0,001 | -- | -- | -0,391 | 0,002 | -0,506 | <0,001 | -- | -- |
| Glucosa (mM) | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -0,289 | 0,033 | -0,545 | <0,001 | -- | -- |
| Insulina (pmol/L) | -- | -- | -0,497 | <0,001 | -- | -- | -0,289 | 0,033 | -0,672 | <0,001 | -- | -- |
| HOMA-IR | -- | -- | -0,492 | <0,001 | -0,49 | 0,024 | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| Colesterol (mM) | 0,256 | 0,038 | -- | -- | -- | -- | 0,207 | 0,071 | 0,282 | 0,020 | -- | -- |
| Colesterol HDL (mM) | 0,240 | 0,048 | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| Colesterol LDL (mM) | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -0,270 | 0,025 | -- | -- |
| Triglicéridos (mM) | -0,254 | 0,039 | -0,314 | 0,014 | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| Proteína C reactiva (mg/L) | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| <i>Niveles de expresión de ARNm</i> | | | | | | | | | | | | |
| TNF α mRNA | ND | ND | ND | ND | ND | ND | -0,404 | 0,031 | -0,425 | 0,024 | -- | -- |
| <i>Niveles de expresión de miRNA</i> | | | | | | | | | | | | |
| miR-181a-5p TAS | 1,000 | -- | 0,748 | <0,001 | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| miR-23a-3p TAS | 0,748 | <0,001 | 1,000 | -- | -- | -- | -- | -- | 0,537 | <0,001 | -- | -- |
| miR-155-5p TAS | -- | -- | -- | -- | 1,000 | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| miR-181a-5p TAV | -- | -- | -- | -- | -- | -- | 1,000 | -- | 0,675 | <0,001 | -- | -- |
| miR-23a-3p TAV | -- | -- | 0,537 | <0,001 | 0,44 | 0,016 | 0,675 | <0,001 | 1,000 | -- | -- | -- |
| miR-155-5p TAV | -- | -- | -- | -- | 0,351 | 0,067 | -- | -- | -- | -- | 1,000 | -- |

Tabla 23. Correlaciones bivariadas entre los niveles de expresión de miR-181a-5p y miR-23a-3p en tejido adiposo y las características clínicas antropométricas de los pacientes del estudio. Presión arterial sistólica (PAS), presión arterial diastólica (PAD). Índice de Resistencia a la Insulina (HOMA-IR, por sus siglas en inglés), Colesterol de lipoproteína de alta densidad (HDL, por sus siglas en inglés), Colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés), Tejido Adiposo Subcutáneo (TAS), Tejido Adiposo Visceral (TAV). Rho de Spearman (R). P (P valor). No determinado (ND). Correlaciones no significativas (--).

5. Implicación de miR-181a-5p y miR-23a-3p en la ruta de la insulina en adipocitos humanos

Nuestros hallazgos previos sugieren una posible relación entre la expresión de miR-23a-3p y miR-181a-5p y la RI inducida por TNF α en la obesidad. Así pues, con el fin de determinar la contribución de ambos miRNAs en la señalización de la insulina en el adipocito, utilizamos adipocitos SGBS maduros y sobreexpresamos transitoriamente estos miRNAs mediante lipotransfección utilizando miRNAs sintéticos (*Mimics*).

En primer lugar se comprobó la eficacia de la lipotransfección de miRNAs en el adipocito SGBS. Se utilizaron dos dosis de *Mimic* miR-181a-5p 5nM y 50nM, y se lipotransfectaron durante 24h para comprobar la sobreexpresión. Comprobamos que tanto a 5nM como a 50nM de *Mimic*, los niveles del miRNA medidos por qRT-PCR se aprecian 9.3 veces elevados en el interior de las SGBS en la dosis de 5nM y 28.5 veces elevados en la dosis de 50nM en comparación con el adipocito tratado únicamente con *Allstars negative control siRNA*, como control negativo de *Mimics* (CN) (**Figura 29**), por lo tanto se determinó la dosis de 50nM a usar en los consiguientes estudios funcionales.

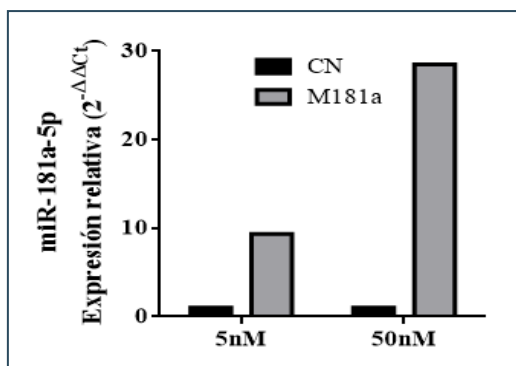


Figura 29. Experimento dosis-respuesta en adipocitos SGBS transfectados con dosis de 5 y 50nM de *Mimic* miR-181a-5p (M181a). Los datos muestran la expresión relativa de miR181a-5p, representados respecto al control negativo de mimics (CN).

Después de lipotransfectar con 50nM de *Mimic* (de miR-181a-5p o miR-23a-3p) al adipocito, éste se sometió a un estímulo de insulina de 100nM durante 10 min. Mediante la técnica del western blot, determinamos si se producían cambios en los niveles de fosforilación de tres moléculas directamente implicadas en la correcta señalización de la insulina: el sustrato de receptor de insulina 1 (IRS-1), la proteína Kinasa B (PKB o AKT) y Sustrato de AKT de 160 kDa (AS160). Observamos que bajo el estímulo de insulina, miR-181a-5p incrementa significativamente la fosforilación de AKT y AS160 un $27,53 \pm 7,95\%$ y un $36,0 \pm 8,23\%$, respectivamente, sobre el CN (**Figura 30**). Sin embargo no observamos cambios significativos en la fosforilación de IRS1 (P-IRS) por acción de miR181a-5p ($108,8 \pm 13,79\%$) al compararlo con el CN. De forma similar a lo observado con miR-181a-5p, miR-23a-3p incrementa la molécula de AKT fosforilada (P-AKT) un $31,30 \pm 4,69\%$ y la de AS160 fosforilado (P-AS160) un $34,68 \pm 14,21\%$, por encima del estado de fosforilación detectado en el control negativo de transfección (**Figura 30**), mientras que no detectamos modificados los niveles de P-IRS ($113,4 \pm 32,99\%$) al compararlos con el CN.

Cuando se evaluó el efecto de la participación simultánea de ambos miRNAs sobre la señalización de la insulina en el adipocito, se observó un aumento significativo de la fosforilación en AKT ($19,10 \pm 6,51\%$) y también en AS160 ($29,28 \pm 29,04\%$) sobre el CN, no detectándose cambios en P-IRS1. Sin embargo el efecto de la cotransfección de ambos miRNAs simultáneamente observado sobre AKT y AS160 comparado con el efecto de la transfección individual de mimics de miRNAs individuales, no mejoró, puesto que no se observa un efecto sumatorio de los dos miRNAs sobre estas moléculas en la ruta de la insulina (**Figura 30**).

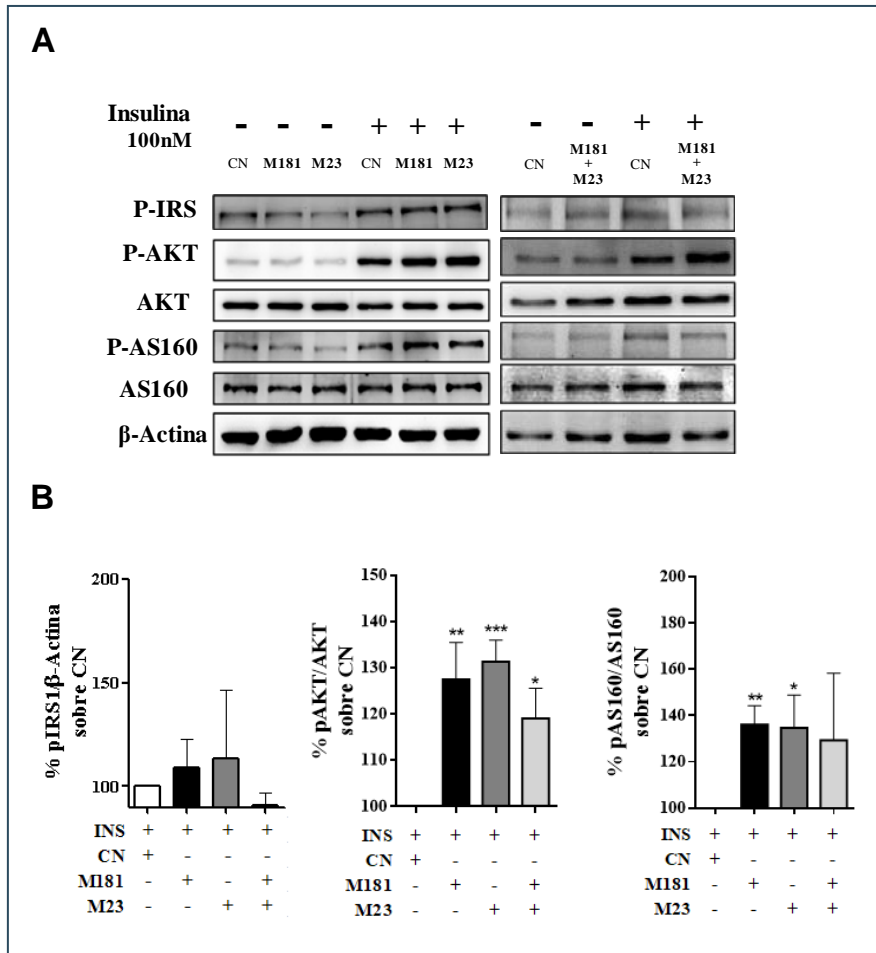


Figura 30. Efecto del miR-181a-5p y miR-23a-3p en la ruta de la insulina en adipocitos (A) Western Blots representativos de los niveles de expresión de IRS1 fosforilado en el residuo de tirosina 612 (P-IRS1), AKT fosforilado en el residuo de la Serina 473 (P-AKT), AKT total (60KDa), AS160 fosforilado en el residuo de la treonina 642 (P-AS160), AS160 total (160KDa) y β-Actina (42KDa) en adipocitos SGBS lipotransfectados con miRNAs sintéticos (*Mimics*) de miR-181a-5p y miR-23a-3p o miR-181a-5p + miR-23a-3p (de forma individual o en combinación) a día 9 de la diferenciación de los adipocitos SGBS, y seguidamente tratados con o sin 100nM Insulina durante 10 min. (B) Las gráficas muestran la media±E.E de los porcentajes de fosforilación de AKT y AS160 (P-AKT/AKT y P-AS160/AS160, respectivamente) respecto al Control Negativo de *Mimics* (=100%), de 5 experimentos independientes $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) vs CN. *Mimic* miR-181a-5p (M181a); *Mimic* miR-23a-3p (M23a); Insulina 100nM (INS); Control Negativo de *Mimics* (CN).

5.1. Evaluación del efecto preventivo de miR-181a-5p y miR-23a-3p sobre RI inducida por TNF α en adipocitos humanos *in vitro*

Con el fin de determinar el papel preventivo de dichos miRNAs en la RI inducida por TNF α en adipocitos, sobreexpresamos estos miRNAs en adipocitos derivados de la línea SGBS y que se sometieron a un estímulo de TNF α durante 8h seguido de un estímulo de insulina 100nM de 10 min. En estas condiciones observamos que cuando se sobreexpresa miR-181a-5p, se evita, en parte, la RI inducida por TNF α medida como una supresión de la fosforilación inducida por insulina al aumentar significativamente los niveles de P-AKT ($132,6 \pm 7,77\%$), así como los niveles de P-AS160 mostraron una clara tendencia a la regulación positiva ($132,5 \pm 14,79\%$) (**Figura 31**).

Por lo que respecta a miR-23a-3p, también presenta un moderado efecto preventivo aunque no de forma significativa ($p=0.094$ para P-AKT). Sin embargo y en lo referente a los niveles de P-IRS, no detectamos un efecto significativamente preventivo de la RI ni por parte de miR-181a-5p y ni por parte de miR-23a-3p con respecto al CN de la transfección (**Figura 31**).

También evaluamos el efecto preventivo de la cotransfección simultánea con ambos miRNAs sobre la RI inducida por TNF α y observamos que la acción simultánea de ambos miRNAs incrementa significativamente el estado de fosforilación de AKT ($135,8 \pm 52,23\%$), pero sólo se observa una tendencia en el aumento de P-AS160 ($162,41 \pm 26,24\%$), y ningún efecto sobre el P-IRS ($93,76 \pm 37,55\%$). Este dato se podría traducir en que la suma de ambos miRNAs podría prevenir el efecto de la RI inducida por TNF α , al menos a nivel de AKT, puesto que podrían estar compartiendo dianas en la misma ruta. (**Figura 31**).

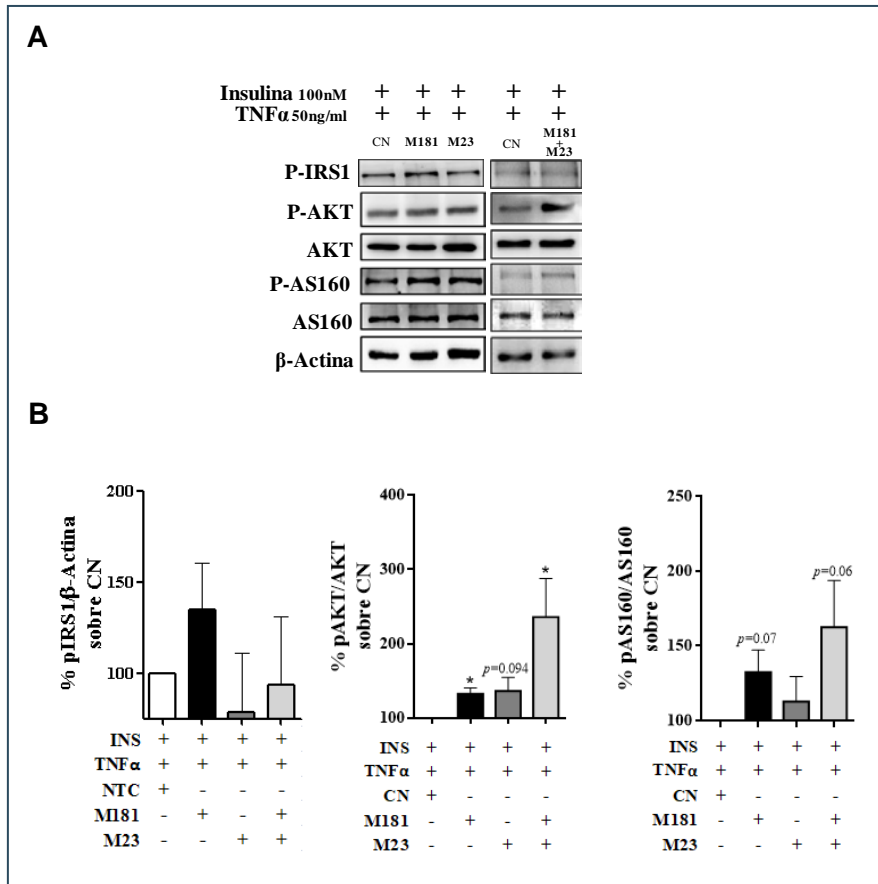


Figura 31. Efecto preventivo del mir-181a-5p y mir-23a-3p sobre la RI inducida por tnfa en adipocitos (A) Western Blots representativos de los niveles de expresi3n de IRS1 fosforilado en el residuo de tirosina 612 (P-IRS1), AKT fosforilado en el residuo de la Serina 473 (P-AKT), AKT total (60KDa), AS160 fosforilado en el residuo de la treonina 642 (P-AS160) , AS160 total (160KDa) y β -Actina (42KDa) en adipocitos SGBS lipotransfectados con miRNAs sintéticos (*Mimics*) de miR-181a-5p y miR-23a-3p (de forma individual o en combinaci3n) a d3a 9 de diferenciaci3n de los adipocitos SGBS, y posteriormente tratados con 50ng/ml TNF α durante 8h seguido de un est3mulo de 100nM Insulina durante 10 min. **(B)** La gr3fica muestra la media \pm E.E de los porcentajes de fosforilaci3n de AKT y AS160 (P-AKT/AKT y P-AS160/AS160, respectivamente) relativos al Control Negativo (CN=100%), de 3 experimentos independientes. P<0'05 (*), P<0'01(**), P<0'001 (***) vs CN. *Mimic* miR-181a-5p (M181a) y *Mimic* miR-23a-3p (M23a); Insulina 100nM (INS); Control Negativo (CN).

5.2. PTEN y S6K se identifican como genes diana para miR-181a-5p y miR-23a-3p

Mediante el uso de algoritmos de predicción de dianas para miRNAs a través de las herramientas **MicroT-CDS** de [Diana-Tools](#) y **Mirvana-mirSVR** de [microRNA.org](#), buscamos posibles dianas de miR-181a-5p y miR-23a-3p en genes moduladores de la ruta de insulina.

En el análisis predictivo hallamos al **Homólogo de Fosfatasa y Tensina (PTEN)** y la **Quinasa S6 Ribosomal (S6K)** como dianas compartidas de alta puntuación, en relación al grado de alineación con la región 3'UTR del mensajero y su grado de conservación entre especies, para ambos miRNAs, miR-181a-5p y miR-23a-3p (**Figura 32A**). Ambos genes tienen un importante papel en la regulación de señalización de la insulina (**Figura 32B**).

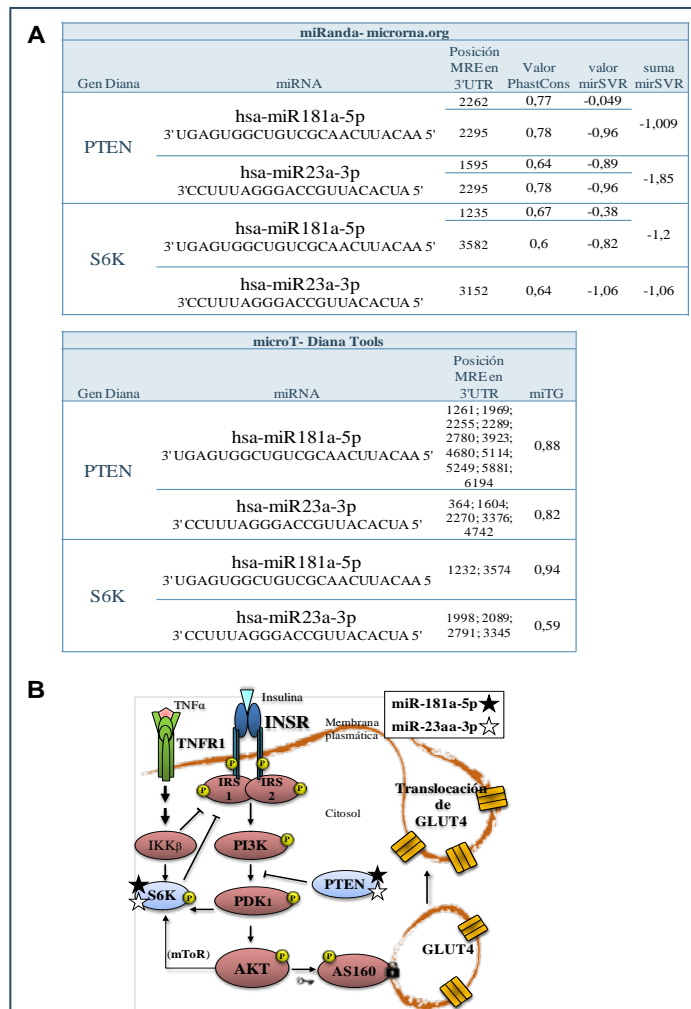


Figura 32. Análisis de predicción de posibles dianas de miR-181a-5p y miR-23a-3p en la ruta de señalización de la insulina. (A) Elementos de reconocimiento de los miRNAs (MRE) miR-181a-5p y miR-23a-3p en las regiones 3' UTR de PTEN y S6K, predichos por los algoritmos miRanda-mirSVR de microrna.org y microT-CDS v5 de Diana Tools (B) Representación esquemática del mecanismo de acción propuesto para miR-181a-5p y miR-23a-3p en la ruta señalización de la insulina, con dianas en la fosfatasa y homólogo de tensina (PTEN) y en la proteína quinasa S6 ribosomal (S6K). Receptor de la insulina (INSR); sustrato del receptor de la insulina (IRS); fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K); quinasa 1 dependiente de fosfatidilinositol (PDK1); proteína quinasa B (AKT); sustrato de Akt de 160 kDa (AS160); transportador de glucosa de tipo 4 (GLUT4); diana de rapamicina en mamíferos (mTOR); factor de necrosis tumoral alfa (TNF α); receptor de TNF α de tipo 1 (TNFR1); subunidad beta del inhibidor de la quinasa del factor nuclear kappa-B (IKK2).

Para comprobar el reconocimiento e inhibición de las dianas predichas en los genes *PTEN* y *S6K* por los miRNAs de estudio, inducimos la sobreexpresión de ambos miRNAs en células HEK 293. Añadimos 50 nM *mimic* [miR-181a-5p, miR-23a-3p o Control Negativo de *mimics* (CN)], en cotransfección con 300 ng de vector indicador de luciferasa (luc) fusionada a las regiones no traducidas 3' (3' UTR) de *PTEN* (**luc-PTEN 3'UTR**) o *S6K* (**luc-S6K 3'UTR**) a las HEK 293. Como se muestra en la **Figura 35A**, la actividad luciferasa de luc-PTEN 3'UTR se vio significativamente reducida por la acción de miR-181a-5p ($-36,46 \pm 10,36\%$) y de miR-23a-3p ($-21,94 \pm 4,96\%$), y también se observó una reducción significativa en luc-S6K 3'UTR con miR-181a-5 ($-45,44 \pm 8,23\%$) y con miR-23a-3p ($-46,52 \pm 6,57\%$).

De acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos de luciferasa, nos propusimos comprobar si esta acción de los miRNAs sobre las dianas tenía un efecto inhibitorio sobre la expresión endógena de proteína de PTEN y S6K en el adipocito. Para ello inducimos una vez más una sobreexpresión transitoria de miR-181a-5p y miR-23a-3p de manera individual o simultánea en el adipocito. Los resultados obtenidos mostraron que la expresión proteica de PTEN se reducía de forma significativa únicamente con miR-181a-5p ($-32,33 \pm 11,22\%$), pero no observamos cambios significativos en cuanto al efecto de miR-23a-3p ($-9,22 \pm 6,95\%$). La cotransfección de ambos miRNAs también disminuyó significativamente la traducción de PTEN ($-21,33 \pm 4,69\%$) (**Figura 35B**). Por lo que respecta a la diana S6K, sólo se observó una disminución significativa al sobreexpresar simultáneamente ambos miRNAs ($-20,30 \pm 7,24\%$) (**Figura 35B**). Este efecto además repercute moderadamente en el estado de fosforilación de S6K (**Figura 33**).

Con el fin de verificar el efecto inhibitorio de los miRNAs sobre la expresión endógena de las dianas del estudio, utilizamos inhibidores específicos de miR-181a-5p y miR-23a-3p. La efectividad de los inhibidores de miRNAs se testó previamente en los experimentos de dosis, siendo la dosis de 50nM suficientemente potente como para anular la expresión de un miRNA durante al menos 24h (**Figura 34**).

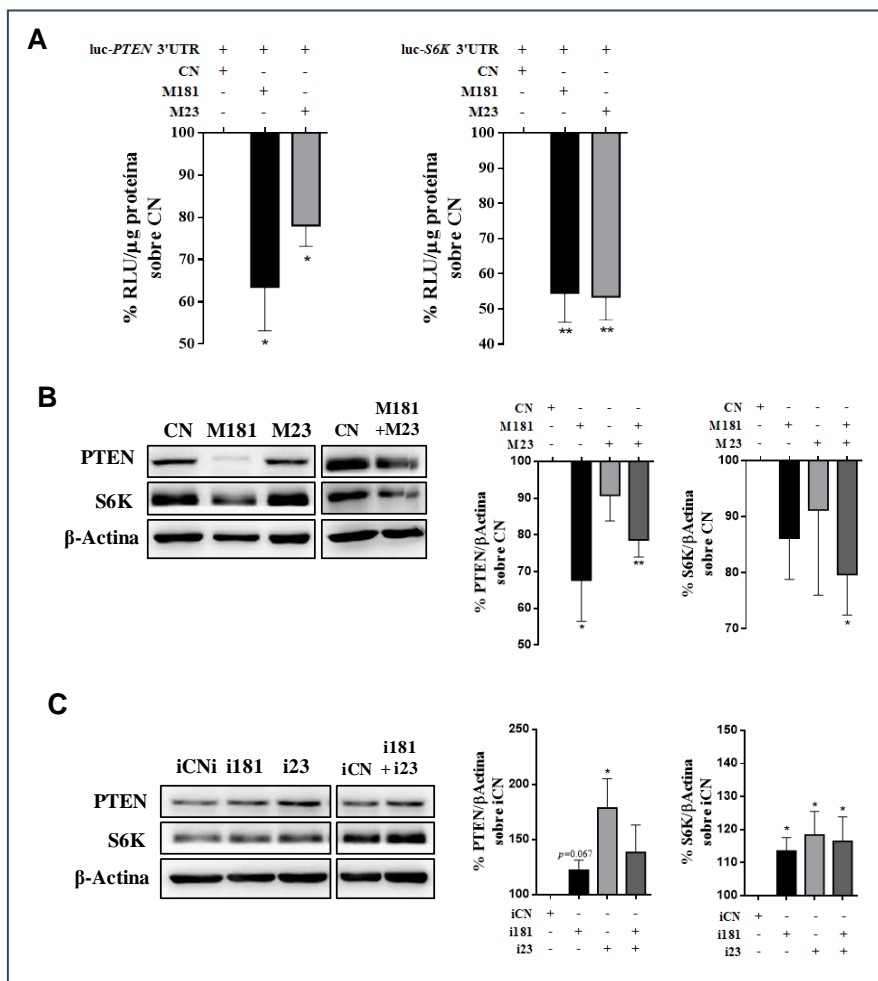


Figura 35. Validación de las dianas PTEN y S6K para miR-181a-5p y miR-23a-3p. (A) Células HEK293 se cotransfectaron con vectores indicadores de

luciferasa (luc) -*PTEN* 3'UTR o luc-*S6K* 3'UTR y 50nM *mimic* miR-181a-5p, miR-23a-3p o control negativo de *mimics* (CN) durante 24 h. La actividad relativa de luciferasa renSP se expresa como media \pm SEM de 3 experimentos independientes normalizados a CN + luc-*PTEN* (o luc-*S6K*) 3'UTR en Unidades Relativas de Luz (RLU) por μ g de proteína (= 100%): NTC + luc-*PTEN* 3'UTR RLU / μ g proteína 5.848 \pm 848; NTC + luc-*S6K* 3'UTR RLU / μ g proteína 9.014 \pm 1.577. * P <0.05; ** P <0'01. **(B)** [Izquierda] Western blot representativo de los niveles de expresión de PTEN (54KDa) y S6K (70KDa) en adipocitos SGBS lipotransfectados con miRNAs sintéticos (*Mimics*) de miR-181a-5p y miR-23a-3p (de forma individual o en combinación); [Derecha] La gráfica muestra la media \pm E.E de los porcentajes de expresión de PTEN y S6K (PTEN/ β -actina y S6K/ β -actina, respectivamente) relativos al Control Negativo de *mimics* (CN=100%), de 3 experimentos independientes. p <0'05 (*), p<0'01(**), p<0'001 (***) vs CN. *Mimic* miR-181a-5p (M181a) y *mimic* miR-23a-3p (M23a). **(C)** [Izquierda] Western blot representativo de los niveles de expresión de PTEN (54KDa) y S6K (70KDa) en adipocitos SGBS lipotransfectados con inhibidores de miR-181a-5p y miR-23a-3p (de forma individual o en combinación); [Derecha] La gráfica muestra la media \pm E.E de los porcentajes de expresión de PTEN y S6K (PTEN/ β -actina y S6K/ β -actina, respectivamente) relativos al Control Negativo del Inhibidor (iCN=100%), de 3 experimentos independientes. p- <0'05 (*), p<0'01(**), p<0'001 (***) vs iCN. Inhibidor de miR-181a-5p (i181a); inhibidor de miR-23a-3p (i23a); Control Negativo del Inhibidor (iCN).

Lipotransfectamos los adipocitos SGBS con 50nM de inhibidor de miR-181a-5p y/o con 50nM inhibidor de miR-23a-3p. Tras la inhibición, observamos un aumento del 22,30 \pm 8,94% no significativo en la expresión de PTEN por inhibición de miR-181a-5p de forma individual, y un aumento de 38,30 \pm 24,99% significativo sobre su expresión basal cuando aplicamos la inhibición simultánea de miR-181a-5p conjuntamente con miR-23a-3p (**Figura 35C**). Hay que señalar que la inhibición individual de miR-23a-3p eleva significativamente la expresión de PTEN hasta un 78,70 \pm 26,52% por encima de los niveles normales. Respecto a la diana de S6K, observamos que la expresión de proteína se incrementa significativamente tras la inhibición individual de miR-181a-5p (13,50 \pm 4,11%) y de miR-23a-3p (18,40 \pm 7,13%), así como con la inhibición simultánea con ambos miRNAs (16,50 \pm 7,38%) en comparación con el control negativo del inhibidor (iCN) (**Figura 35C**).

Figura 33. Niveles de fosforilación de S6K en respuesta a la inhibición de S6K por la contranfección de miR-181a-5p y miR-23a-3p. Western blot representativo de los niveles de proteína de S6K fosforilada (pS6K) en adipocitos SGBS contranfeccionados durante 24h con 50nM miR-181a-5p y 50nM miR-23a-3p (M181+M23), y tratados con 50ng/ml de TNF α durante 8h y 100nM de Insulina durante 10min. La gráfica muestra los valores relativos (media \pm E.E.) de dos experimentos independientes. El cociente pS6K/ β Actina se normalizó al control negativo de mimics 100nM (CN 2x)

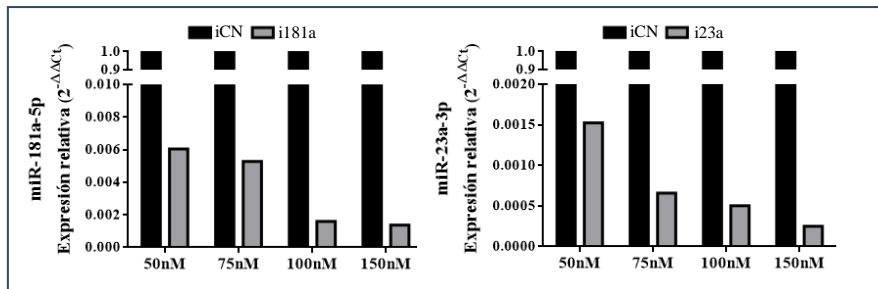
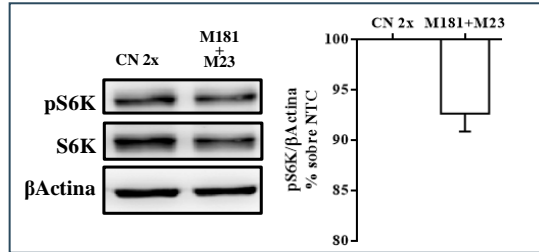


Figura 34. Experimento dosis respuesta en adipocitos SGBS lipotransfectados con dosis de 50, 75, 100 y 150nM de inhibidor de miR-181a-5p o inhibidor de miR-23a-3p. Los datos muestran la expresión relativa de miR181a-5p [Izquierda] y miR-23a-3p [Derecha], representados respecto al control negativo de inhibidores de miRNAs (iCN).

6. Análisis de los niveles circulantes en suero de miR-181a-5p y miR-23a-3p

6.1. En pacientes del estudio PIZARRA, que desarrollan prediabetes después de 4 años de seguimiento. Estudio prospectivo.

Con el objetivo de estudiar la expresión de miRNAs aplicada al pronóstico de prediabetes seleccionamos 48 pacientes del estudio **PIZARRA** con seguimiento a 4 años y con curva normal de glucosa al inicio del estudio. Como grupo control seleccionamos un total de 53 sujetos normotolerantes equiparables en edad, sexo, IMC y sin antecedentes familiares de DM2, que mantienen un metabolismo hidrocarbonado estrictamente normal tras 4 años de seguimiento.

En la **Tabla 24** se reúnen los datos clínicos y antropométricos de los 2 grupos de pacientes del estudio PIZARRA en la fase inicial (basal) y a los 4 años de seguimiento.

A nivel basal se observa que el grupo de casos presenta niveles de insulinemia a los 120 minutos tras la ingestión oral de glucosa (Insulina 120') significativamente superiores con respecto al grupo normotolerante control; sin embargo, ambos grupos presentan niveles de Insulina 120' dentro del rango normal (111-1,153 pmol/L). El colesterol plasmático de lipoproteína de baja densidad (HDL, por sus siglas en inglés) se detecta significativamente más aumentado en el grupo de los controles que en el de los casos, mientras que los niveles de triglicéridos tienden a mostrarse más aumentados en el grupo de los casos. Además, se observa que la adiponectina, aparece significativamente reducida en el grupo de los casos en comparación con los controles, por lo que respecta a la proteína C reactiva, ésta se muestra significativamente elevada en el grupo de los casos.

| | | Casos | Controles | p-valor |
|-----------------------------------|--------|-------------------|-------------------|---------|
| n | | 48 | 53 | |
| Edad (años) | | 51.1 (12.4) | 51.4 (11.7) | 0.930 |
| Género (M/F) (n) | | 20/28 | 20/33 | 0.687 |
| Fumadores (n, %) | | | | |
| | Inicio | 15 | 14 | 0.592 |
| | 4 años | 12* | 9* | 0.273 |
| Obesidad (n, %) | | | | |
| | Inicio | 25 | 22 | 0.607 |
| | 4 años | 28* | 22 | 0.215 |
| Hipertensión (n, %) | | | | |
| | Inicio | 26 | 32 | 0.528 |
| | 4 años | 30* | 26 | 0.137 |
| Dislipidemia (n, %) | | | | |
| | Inicio | 7 (14.6) | 15 (28.3) | 0.095 |
| | 4 años | 7 (14.6) | 9 (17.0)* | 0.742 |
| <i>Parámetros antropométricos</i> | | | | |
| Peso (kg) | | | | |
| | Inicio | 78.6 (14.3) | 77.7 (13.2) | 0.730 |
| | 4 años | 80.8 (15.5)* | 78.3 (13.6) | 0.409 |
| IMC (kg/m ²) | | | | |
| | Inicio | 30.4 (5.0) | 30.3 (4.7) | 0.944 |
| | 4 años | 31.4 (5.6)* | 30.8 (5.0)* | 0.579 |
| Cintura (cm) | | | | |
| | Inicio | 104.1 (10.5) | 102.7 (11.6) | 0.519 |
| | 4 años | 101.7 (11.6)* | 98.8 (12.3)* | 0.229 |
| Cintura/Cadera | | | | |
| | Inicio | 0.99 (0.92-1.03) | 0.97 (0.92-1.01) | 0.846 |
| | 4 años | 0.92 (0.90-0.96)* | 0.90 (0.86-0.97)* | 0.129 |
| <i>Presión arterial</i> | | | | |
| PAS (mmHg) | | | | |
| | Inicio | 135.4 (17.5) | 132.9 (19.5) | 0.498 |
| | 4 años | 138.4 (17) | 131.9 (19.3) | 0.06 |
| PAD (mmHg) | | | | |
| | Inicio | 82.5 (10.7) | 80.6 (10.5) | 0.350 |
| | 4 años | 81.5 (11.5) | 74.6 (11.5) | 0.002 |
| <i>Perfil Lipídico</i> | | | | |
| Colesterol total (mmol/L) | | | | |
| | Inicio | 6.4 (1.3) | 6.6 (1.2) | 0.187 |
| | 4 años | 5.2 (1)* | 5.5 (1)* | 0.407 |
| Colesterol HDL (mmol/L) | | | | |
| | Inicio | 1.5 (0.3) | 1.9 (0.5) | 0.002 |
| | 4 años | 1.3 (0.3)* | 1.4 (0.3)* | 0.065 |
| Colesterol LDL (mmol/L) | | | | |
| | Inicio | 4.2 (1.2) | 4.2 (1.1) | 0.879 |
| | 4 años | 3.2 (0.9)* | 3.4 (0.9)* | 0.583 |
| Triglicéridos (mmol/L) | | | | |
| | Inicio | 1.3 (0.8-1.8) | 1 (0.8-1.3) | 0.051 |
| | 4 años | 1.3 (0.9-1.9) | 1.1 (0.7-1.6) | 0.156 |

| | | Casos | Controles | p-valor |
|-------------------------------------|--------|--------------------|---------------------|---------|
| Perfil Glicémico | | | | |
| Glucosa basal (mmol/L) en suero | Inicio | 5.3 (0.5) | 5.3 (0.5) | 0.450 |
| | 4 años | 5.9 (0.7)* | 5.1 (0.4)* | <0.001 |
| Glucosa 120' (mmol/L) en suero | Inicio | 5.5 (1.4) | 5.1 (1.4) | 0.168 |
| | 4 años | 8.5 (2.3)* | 5.1 (1.4) | <0.001 |
| Insulina basal (pmol/L) en suero | Inicio | 51.6 (34.7-93.7) | 48.6 (31.2-62.5) | 0.184 |
| | 4 años | ND | ND | |
| Insulina 120' (pmol/L) en suero | Inicio | 319.5 (131.9-53.8) | 131.9 (90.28-298.6) | 0.001 |
| | 4 años | ND | ND | |
| HOMA-IR | Inicio | 2.35 (1.8) | 2 (1.7) | 0.262 |
| | 4 años | ND | ND | |
| Ácido úrico (μM) | Inicio | 299.5 (111) | 279 (76) | 0.474 |
| | 4 años | 297.6 (84) | 278 (82.2) | 0.211 |
| Parámetros inflamatorios | | | | |
| Leptina (pg/mL) | Inicio | 14.7 (12.16) | 14 (10.5) | 0.964 |
| | 4 años | ND | ND | |
| Adiponectina (μg/mL) | Inicio | 7.6 (5-10.7) | 10.7 (7.1-15.4) | 0.003 |
| | 4 años | ND | ND | |
| Receptor TNF 80 (pg/mL) | Inicio | 7.1 (4.4-10.4) | 7.4 (5-10.3) | 0.771 |
| | 4 años | ND | ND | |
| Receptor TNF 60 (pg/mL) | Inicio | 2.3 (1.7-4.8) | 2.2 (1.6-2.9) | 0.195 |
| | 4 años | ND | ND | |
| TNFα (pg/mL) | Inicio | 0 (0-6.4) | 0 (0-6.2) | 0.659 |
| | 4 años | ND | ND | |
| IL-6 (pg/mL) | Inicio | 2.4 (2.3) | 1.8 (1.5) | 0.475 |
| | 4 años | ND | ND | |
| Proteína C reactiva (mg/L) | Inicio | 0.5 (0.2-1.2) | 0.24 (0.1-0.5) | 0.022 |
| | 4 años | ND | ND | |
| FABP4 (ng/mL) | Inicio | 27 (16.1-34.3) | 28.2 (18.5-36.8) | 0.586 |
| | 4 años | ND | ND | |
| SHBG (nmol/L) | Inicio | 32.4 (21.7-48.5) | 42.4 (22.7-63.4) | 0.068 |
| | 4 años | ND | ND | |
| REDOX (pg/mL) | Inicio | 1.3 (1.1) | 1.2 (1.1) | 0.398 |
| | 4 años | ND | ND | |
| Ferritina (μg/L) | Inicio | 60.1 (24.4-115.8) | 56.4 (28.3-149.2) | 0.733 |
| | 4 años | ND | ND | |
| Expresión relativa de miRNAs | | | | |
| miR-181a-5p | Inicio | 0.76 (0.26) | 0.98 (0.43) | 0.028 |
| | 4 años | 0.96 (0.4)* | 1.35 (0.83)* | 0.039 |
| miR-23a-3p | Inicio | 0.94 (0.29) | 0.96 (0.44) | 0.622 |
| | 4 años | 0.85 (0.56) | 1.08 (0.55) | 0.047 |

Tabla 24. Características clínicas y antropométricas de los pacientes del estudio prospectivo PIZARRA. Los valores se muestran como media (D.E.) o mediana (Q1-Q3) según corresponda. P<0.05 (*) entre los valores al inicio de estudio y después de 4 años de seguimiento Índice de Masa Corporal (IMC); Índice de RI (HOMA-IR); Presión arterial sistólica (PAS); Presión arterial Diastólica (PAD); Lipoproteína de baja densidad (LDL); Lipoproteína de alta

densidad (HDL); Cuarta Isoforma de la Proteína de unión y transporte de ácidos grasos 4 (FABP4); Globulina de unión a hormonas sexuales (SHBG); Niveles de oxidación en sangre (REDOX).

El resto de parámetros que se incluyen en la **Tabla 24** en relación a las medidas antropométricas, el perfil de tensión arterial, el perfil lipídico, el perfil glucémico y el perfil de expresión de citoquinas en sangre no muestran cambios significativos entre casos y controles al inicio del estudio (basal).

A los 4 años de seguimiento, se observa que, a diferencia del grupo control, en el grupo de casos los niveles de glucosa, tanto a nivel basal como a las 2 horas tras ingerir 75g de glucosa (glucosa 120'), aumentan significativamente, clasificando estos pacientes como prediabéticos de acuerdo a los criterios de la OMS de 1998 ²⁰. En cuanto al perfil de presión arterial, el grupo de los controles presenta niveles de tensión arterial diastólica y sistólica inferiores con respecto a los casos, aumentando significativamente la frecuencia de aparición de hipertensión en el último grupo pasados los 4 años de seguimiento.

Los resultados obtenidos tras la medición de los niveles séricos de miR-181a-5p y miR-23a-3p en esta subpoblación del estudio PIZARRA, y después de la normalización con miR-103-5p y Let7g como controles endógenos, observamos que sólo los niveles de miR-181a-5p, y no los de miR-23a-3p, aparecían significativamente alterados ($p=0,028$) entre los grupos a nivel basal, lo que le otorga a miR-181a-5p un posible valor pronóstico de prediabetes (**Figura 36**).

También, a los 4 años de seguimiento se observan niveles menores de expresión de miR-23a-3p en el grupo de casos con respecto al grupo control ($p=0,047$) (**Figura 36**). Lo mismo sucede con el miR-181a-5p ($p=0,039$).

Además, los niveles de miR-181a-5p se ven aumentados a los 4 años tanto entre los casos ($p=0,03$) como entre los controles ($p=0,036$) (Figura 36).

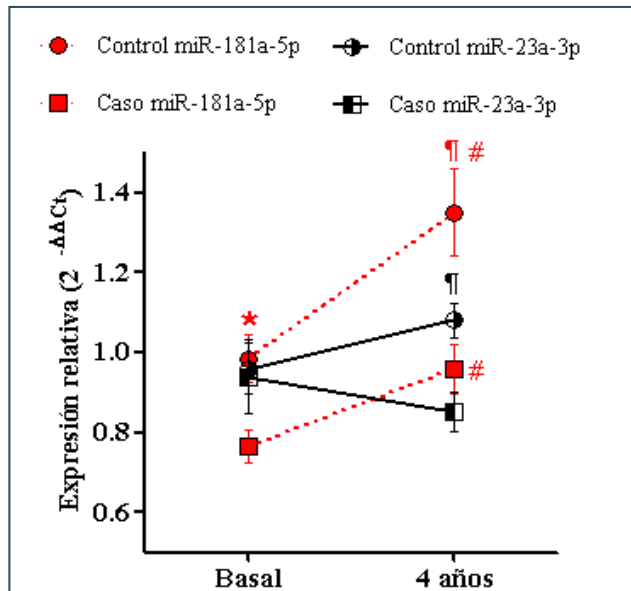


Figura 36. Niveles circulantes de miR-181a-5p en suero de pacientes de estudio prospectivo PIZARRA. Niveles miR181a-5p and miR23a-3p en suero en pacientes con prediabetes y controles normotolerantes al inicio y a los 4 años de seguimiento. * $p<0.05$ entre casos y controles al inicio, ¶ $p<0.05$ entre casos y controles a los 4 años y # $p<0.05$ entre los niveles miRNAs al inicio y a los 4 años.

6.1.1. Estudio de correlaciones bivariadas entre variables clínicas y antropométricas a tiempo basal y niveles circulantes de miR-181a-5p y miR-23a-3p

Con el propósito de estudiar las relaciones entre la expresión de los miRNAs circulantes a tiempo basal y los parámetros clínicos y antropométricos de los pacientes del estudio PIZARRA, realizamos una correlación bivariada aplicando el test no paramétrico de correlación *Rho* de *Spearman* (**Tabla 25**). De todos los resultados que aparecen en la **Tabla 25**, lo más destacable es la asociación significativamente negativa entre la expresión de miR-181a-5p a tiempo basal y los niveles de glucosa basal a los cuatro años, lo que reforzaría su potencial valor pronóstico para prediabetes. Algunos parámetros antropométricos (peso, perímetro de la cintura e IMC), la presión arterial diastólica y los niveles de ácido úrico a los 4 años también se correlacionan inversamente con los niveles de miR-181a-5p medidos a tiempo basal.

Ningún parámetro clínico ni antropométrico de los pacientes se correlacionó con los niveles circulantes de miR-23a-3p a tiempo basal (**Tabla 25**).

| | <i>fase</i> | miR-181a-5p basal | | miR-23a-3p basal | |
|-----------------------------------|-------------|-------------------|----------|------------------|----------|
| | | R | <i>p</i> | R | <i>p</i> |
| Parámetros antropométricos | | | | | |
| Peso (kg) | basal | -- | -- | -- | -- |
| | 4 años | -0,26 | 0,01 | -- | -- |
| IMC (kg/m ²) | basal | -- | -- | -- | -- |
| | 4 años | -0,21 | 0,039 | -- | -- |
| Cintura (cm) | basal | -- | -- | -- | -- |
| | 4 años | -0,21 | 0,043 | -- | -- |
| Cintura/Cadera | basal | -- | -- | -- | -- |
| | 4 años | -- | -- | -- | -- |
| Presión arterial | | | | | |
| PAS (mmHg) | basal | -- | -- | -- | -- |
| | 4 años | -- | -- | -- | -- |
| PAD (mmHg) | basal | -0,27 | 0,009 | -- | -- |
| | 4 años | -0,4 | <0,001 | -- | -- |
| Perfil Lipídico | | | | | |
| Colesterol total (mmol/L) | basal | -- | -- | -- | -- |
| | 4 años | -- | -- | -- | -- |
| Colesterol HDL (mmol/L) | basal | -- | -- | -- | -- |
| | 4 años | -- | -- | -- | -- |
| Colesterol LDL (mmol/L) | basal | -- | -- | -- | -- |
| | 4 años | -- | -- | -- | -- |
| Triglicéridos (mmol/L) | basal | -- | -- | -- | -- |
| | 4 años | -- | -- | -- | -- |
| Perfil Glicémico | | | | | |
| Glucosa basal (mmol/L) en suero | basal | -- | -- | -- | -- |
| | 4 años | -0,31 | -0,002 | -- | -- |
| Glucosa 120' (mmol/L) en suero | basal | -- | -- | -- | -- |
| | 4 años | -- | -- | -- | -- |
| Insulina basal (pmol/L) en suero | basal | -- | -- | -- | -- |
| Insulina 120' (pmol/L) en suero | basal | -- | -- | -- | -- |
| HOMA-IR | basal | -- | -- | -- | -- |
| Ácido úrico (μM) | basal | -- | -- | -- | -- |
| | 4 años | -0,2 | 0,044 | -- | -- |

| <i>Parámetros inflamatorios</i> | | | | | |
|--|--------|----|----|----|----|
| Leptina (pg/mL) | basal | | | -- | -- |
| Adiponectina (µg/mL) | basal | -- | -- | -- | -- |
| Receptor TNF 80 (pg/mL) | basal | -- | -- | -- | -- |
| Receptor TNF 60 (pg/mL) | basal | -- | -- | -- | -- |
| TNFα (pg/mL) | basal | -- | -- | -- | -- |
| IL-6 (pg/mL) | basal | -- | -- | -- | -- |
| Proteína C reactiva (mg/L) | basal | -- | -- | -- | -- |
| FABP4 (ng/mL) | basal | -- | -- | -- | -- |
| SHBG (nmol/L) | basal | -- | -- | -- | -- |
| REDOX (pg/mL) | basal | -- | -- | -- | -- |
| Ferritina (µg/L) | basal | -- | -- | -- | -- |
| <i>Expresión relativa de microARNs</i> | | | | | |
| miR-181a-5p | basal | -- | -- | -- | -- |
| | 4 años | -- | -- | -- | -- |
| miR-23a-3p | basal | -- | -- | -- | -- |
| | 4 años | -- | -- | -- | -- |

Tabla 25. Correlación de Spearman entre los niveles de miR-181a-5p y miR-23a-3p a tiempo basal y las variables clínicas y antropométricas del estudio prospectivo PIZARRA. Índice de Masa Corporal (IMC); Índice de RI (HOMA-IR); Presión arterial sistólica (PAS); Presión Arterial Diastólica (PAD); Lipoproteína de baja densidad (LDL); Lipoproteína de alta densidad (HDL); Cuarta Isoforma de la Proteína de unión y transporte de ácidos grasos 4 (FABP4); Globulina de unión a hormonas sexuales (SHBG). Rho de Spearman (R). P (p valor). Correlaciones no significativas (--).

6.1.2. Estudio del valor potencial de miR-181a-5p en el pronóstico de prediabetes

Con el fin de explorar el potencial valor pronóstico de miR-181a-5p circulante en suero como posible biomarcador de prediabetes, llevamos a cabo un análisis de **Característica Operativa del Receptor (ROC)** para determinar el peso que ejerce el parámetro de expresión de miR-181a-5p sobre el riesgo de desarrollar prediabetes. El Área Bajo la Curva (AUC, por sus siglas en inglés) de la curva ROC es de $0,633 \pm 0,06$ con un Intervalo de Confianza (IC) del 95% entre 0,048 y 0,6320 ($p=0,028$), es decir la probabilidad de que el diagnóstico realizado a un caso sea más correcto que el de un control escogido al azar es de un 63,3%. Utilizando

este modelo únicamente podemos clasificar el 55,32% de los pacientes con una sensibilidad y una especificidad del 82,7% y 33,3%, respectivamente (**Figura 37**).

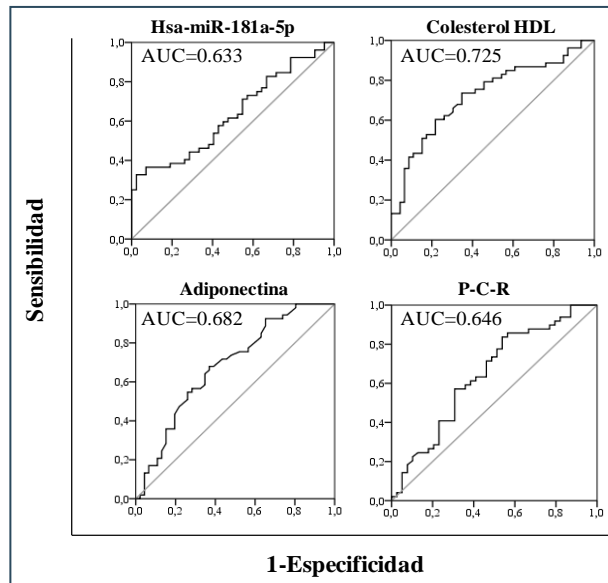


Figura 37. Curvas ROC de de miR-181a-5p, Colesterol HDL, Adiponectina y P-C-R en el estudio PIZARRA. AUC: área bajo la curva.

6.1.3. Modelos multivariantes de predicción de prediabetes

Se construyó un modelo multivariante de predicción de prediabetes considerando de manera conjunta variables independientes que mostraron diferencias significativas al aplicar las comparaciones bivariantes entre casos y controles 4 años antes de la aparición de prediabetes: colesterol HDL, miR-181a-5p, Proteína C Reactiva (P-C-R) y adiponectina. Aplicamos un análisis ROC para cada una de las variables restantes antes de introducirlas en el análisis multivariante. El colesterol HDL arrojó el mayor área bajo la curva (AUC=0.725±0,051; IC95%=0,625-0,825; p-

valor = 0,00012; Sensibilidad = 82,6% y Especificidad = 52,8%), seguido de la adiponectina (AUC = 0,682±0,054; IC95% = 0,576-0,788; p-valor=0,002; Sensibilidad = 80,4% y Especificidad = 43,4%) y la P-C-R (AUC = 0,643±0,06; IC95% = 0,529-0,764; p-valor = 0,019; Sensibilidad = 82,1% y Especificidad = 26,5%), por delante de miR-181a-5p (**Figura 37**).

A continuación aplicamos un análisis de **regresión logística (RL) multivariante** con las variables independientes miR-181a-5p, adiponectina, Colesterol HDL y P-C-R. En el análisis de RL multivariante obtuvimos la razón de momios (RM) de cada variable independiente. Sólo el Colesterol HDL (IC95 = 0,92-0,98) y miR-181a-5p (IC95 = 0,05-0,82) se mostraron como factores con valor significativamente protector (OR<1) en este modelo (**Figura 38A**). La curva ROC resultante del análisis con las cuatro variables (miR-181a-5p, adiponectina, Colesterol HDL y P-C-R), arrojó un AUC de 0,793±0,05 (IC95 = 0,69-0,89; $p < 0,001$) (**Figura 38B**). El modelo de RL multivariante propuesto puede clasificar correctamente el 72,3% de los casos 4 años antes de la aparición de prediabetes con una sensibilidad del 80% y una especificidad del 72,9%.

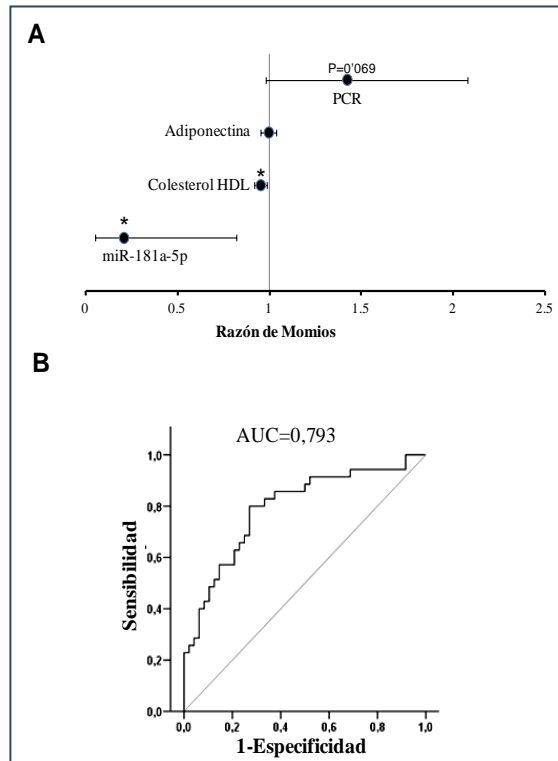


Figura 38. Análisis de regresión logística multivariante. (A) Gráfico de razón de momios e intervalos de confianza al 95% de las variables independientes del modelo de regresión logística multivariante. P-valor<0,05 (*) (B). Resultados del análisis de Característica Operativa del Receptor (ROC) empleando los niveles de miR-181a-5p, Colesterol HDL, Proteína C Reactiva (P-C-R) y adiponectina al inicio del estudio. AUC: área bajo la curva.

Paralelamente, desarrollamos un modelo de análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (**PLS-DA**) para evaluar la capacidad de miR-181a-5p en la estratificación de los pacientes. El modelo se construyó teniendo en cuenta la variable de expresión de miR-181a-5p a tiempo basal junto a las variables antropométricas, clínicas y bioquímicas que se indican a continuación: Tipo de Paciente (Caso o control); miR-23a-3p; miR-181a-5p; Edad; IMC; Ratio cintura/cadera; Presión arterial sistólica; Presión arterial diastólica; Colesterol total; Triglicéridos; Colesterol HDL; Colesterol LDL; Ácido úrico; Glucosa basal; Glucosa

120'; HOMA-IR ; Insulina basal; Insulina 120'; Receptor de TNF 60kDa (TNFR60 o TNFR1); Receptor de TNF 80kDa (TNFR80 o TNFR2); Interleuquina 6 (IL-6); Leptina; Adiponectina; Proteína C Reactiva (P-C-R); Nivel de oxidación en sangre (REDOX); Globulina de unión a hormonas sexuales (SHBG); Proteína de unión a ácidos grasos 4; (FABP4); Resistina; Ferritina.

Determinamos la capacidad predictiva de nuestro modelo aplicando un análisis de validación cruzada obteniendo los coeficientes R^2 y Q^2 de cada componente, los cuales dan información sobre la capacidad estratificadora y predictora del modelo, respectivamente, así como el coeficiente de precisión en la estratificación de los grupos (**Figura 39A**). Los puntos de corte de los coeficientes para considerar un modelo eficientemente aceptable y con un valor predictivo relevante deben ser los siguientes: precisión~1, $R^2 \geq 0,15$ y $Q^2 > 0$ (preferiblemente $Q^2 > 0,5$)³⁷⁰. El primer componente, que presenta el valor de Q^2 más alto (-0,024) entre los 5 componentes (C1-C5), podría predecir únicamente el 10,1% de la varianza total entre los casos con una precisión del 54,9%. Pudiendo clasificar correctamente el 16,7% de los casos si aplicamos el modelo de dos componentes (componente 1 + componente 2) (**Figura 39B**).

Con respecto al peso de cada variable empleada en nuestro modelo, las puntuaciones de la importancia de la variable en proyección (VIP) del primer componente sitúan las variables colesterol HDL, adiponectina y P-C-R como las más relevantes en este modelo, ocupando miR-181a-5p el cuarto puesto en importancia, por encima de la insulina o la glucosa 120' (**Figura 39C**).

Estos datos indican que aunque la precisión diagnóstica de los modelos multivariantes sea moderada para todos los índices que examinamos, las cuatro firmas serológicas (HDL, P-C-R, adiponectina y

miR-181a-5p) podrían representar un posible panel de biomarcadores putativo que permitiera el diagnóstico precoz de pacientes pre-diabéticos.

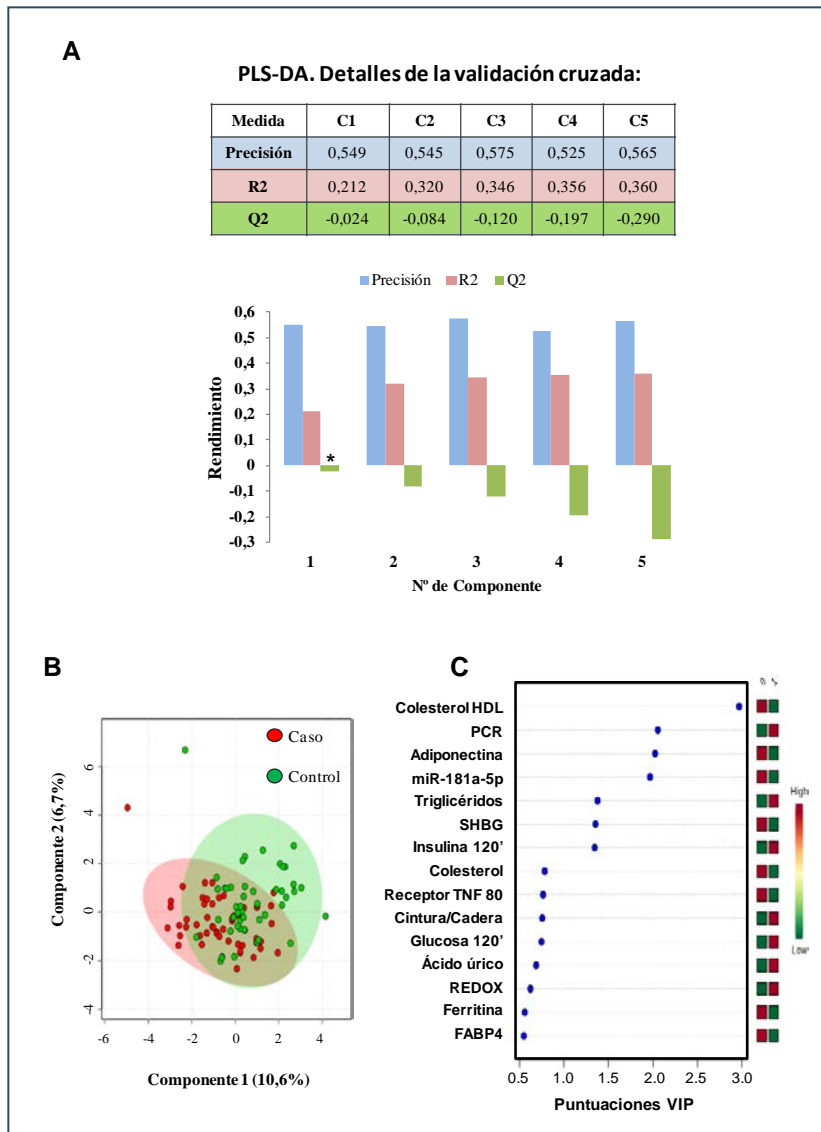


Figura 39. Modelos de predicción de diabetes para miR-181a-5p. (A) Modelo de Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA) de hasta 5 componentes (C1-C5) para la estratificación de casos y controles utilizando miR-181a-5p y algunas variables bioquímicas, antropométricas y clínicas del estudio PIZARRA. R2: Coeficiente de correlación multivariante Q2: coeficiente de predicción. (C) PLS-DA para miR-181a-5p con dos componentes. (B)

Puntuaciones de la importancia de la variable en proyección (VIP) en el modelo PLS-DA. Proteína C Reactiva (P-C-R), Globulina de unión a hormonas sexuales (SHBG), Proteína de unión de ácidos grasos (FABP4), Capacidad de oxidación total en sangre (REDOX)

6.2. En pacientes con DM2 del estudio di@bet.es. Estudio transversal

Con el fin de evaluar si la presencia de DM2 provoca o no cambios en los niveles circulantes de miR-181a-5p y miR-23a-3p en suero, partimos de una muestra de 100 pacientes del estudio di@bet.es, del cual también se dispone de variables antropométricas, nutricionales y analíticas (bioquímica básica, niveles de insulina y lípidos) de toda la muestra. Evaluamos los niveles circulantes de los miRNAs, miR-181a-5p y miR-23a-3p en los 100 pacientes, emparejados por sexo, edad e IMC, de los cuales 50 sujetos presentaban DM2 y 50 eran sujetos controles sanos.

En la **Tabla 26** se muestran las características clínicas y antropométricas de los sujetos de estudio. Podemos observar que el grupo de sujetos control y el grupo de pacientes con DM2 se diferencian entre sí, principalmente, por su perfil glucídico, puesto que los pacientes con DM2 presentan niveles de glucosa e insulina en sangre significativamente más elevados, y por consiguiente también mayores valores de HOMA-IR en comparación con los pacientes controles normotolerantes. Además, también se observa que los niveles de γ -Glutamyl Transferasa (GGT) y P-C-R están más elevados en el grupo de pacientes con DM2 (**Tabla 26**).

| | N | CASOS | N | CONTROLES | p-valor |
|--|----|------------------|----|------------------|---------|
| Edad (años) | 50 | 63,96 ± 10,35 | 50 | 65,45 ± 13,17 | 0,338 |
| Sexo (H/M) (n) | 50 | 27 / 23 | 50 | 27 / 23 | 0,424 |
| <i>Parámetros antropométricos</i> | | | | | |
| Peso (Kg) | 50 | 76,071 ± 13,39 | 50 | 76,555 ± 11,536 | 0,896 |
| IMC (kg/m ²) | 50 | 29,868 ± 3,567 | 50 | 29,73 ± 3,398 | 0,667 |
| Cintura (cm) | 50 | 103,16 ± 11,575 | 50 | 100,529 ± 8,864 | 0,117 |
| Cadera (cm) | 50 | 105,26 ± 8,717 | 50 | 106,294 ± 7,611 | 0,605 |
| Cintura/Cadera | 50 | 0,981 ± 0,084 | 50 | 0,948 ± 0,076 | 0,085 |
| <i>Presión arterial</i> | | | | | |
| PAS (mmHg) | 50 | 151,102 ± 22,325 | 50 | 143,725 ± 18,466 | 0,147 |
| PAD (mmHg) | 50 | 82,49 ± 13,861 | 50 | 81,647 ± 8,775 | 0,59 |
| <i>Función renal</i> | | | | | |
| Creatinina (µM) | 45 | 71,227 ± 18,213 | 49 | 71,214 ± 14,175 | 0,555 |
| <i>Función hepática</i> | | | | | |
| GGT (µKat/L) | 45 | 0,799 ± 0,976 | 49 | 0,407 ± 0,284 | 0,026 |
| ASAT (µKat/L) | 45 | 0,342 ± 0,248 | 49 | 0,299 ± 0,088 | 0,952 |
| ALAT (µKat/L) | 45 | 0,257 ± 0,158 | 48 | 0,238 ± 0,157 | 0,457 |
| Hierro (II+III) (µmol/L) | 45 | 14,284 ± 5,202 | 49 | 15,451 ± 4,272 | 0,267 |
| <i>Perfil glucémico</i> | | | | | |
| Glucosa basal (mmol/L) en suero | 45 | 7,507 ± 1,708 | 49 | 5,117 ± 0,516 | <0.001 |
| Insulina basal (pmol/L) en suero | 43 | 84,219 ± 49,207 | 49 | 64,722 ± 34,031 | 0,04 |
| HOMA-IR | 43 | 3,904 ± 2,483 | 49 | 2,146 ± 1,203 | <0.001 |
| <i>Perfil lipídico</i> | | | | | |
| Triglicéridos (mg/dl) | 45 | 1,972 ± 1,349 | 49 | 1,396 ± 0,499 | 0,09 |
| Colesterol (mmol/L) | 45 | 5,222 ± 1,304 | 49 | 5,249 ± 0,832 | 0,575 |
| Colesterol-HDL (mmol/L) | 45 | 1,212 ± 0,278 | 49 | 1,324 ± 0,272 | 0,037 |
| Colesterol-LDL (mmol/L) | 45 | 2,793 ± 0,925 | 49 | 2,854 ± 0,671 | 0,54 |
| <i>Parámetros inflamatorios</i> | | | | | |
| Proteína C reactiva (mg/L) | 45 | 5,027 ± 5,691 | 49 | 3,215 ± 5,195 | 0,032 |
| Ferritina (ng/ml) | 45 | 131,26 ± 178,244 | 49 | 97,342 ± 78,937 | 0,47 |
| <i>Expresión relativa de microARNs</i> | | | | | |
| miR-23a-3p | 50 | 1,78 ± 1,04 | 48 | 1,94 ± 1,31 | 0,86 |
| miR-181a-5p | 42 | 3,82 ± 4,66 | 45 | 3,24 ± 3,97 | 0,53 |

Tabla 26. Características clínicas y antropométricas de los pacientes del estudio transversal Di@bet.es. La comparación de medias±D.E. P <0.05 entre casos y controles. Índice de Masa Corporal (IMC); Gama Glutamil Transferasa (GGT); Aspartato Aminotransferasa (ASAT); Alanina Aminotransferasa (ALAT); Índice de RI (HOMA-IR), Lipoproteína de baja densidad (LDL); Lipoproteína de alta densidad (HDL).

Después de cuantificar los niveles circulantes de miR181a-5p y miR-23a-3p en suero en esta población y una vez normalizados con miR-103-5p y Let-7g, seleccionados como controles endógenos, observamos que ni miR181a-5p ni miR-23a-3p presentan cambios en los sujetos con DM2 respecto a los controles, lo que indica que la presencia de DM2 parece no afectar a los niveles de estos miRNAs en nuestra cohorte de estudio (Figura 40).

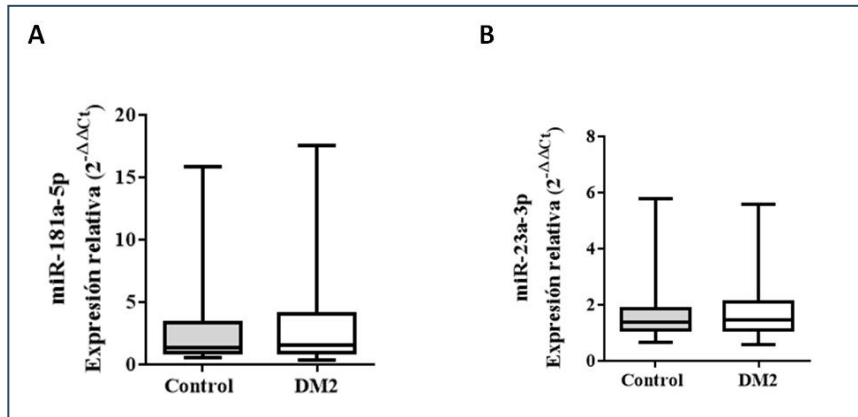


Figura 40. Niveles en suero de miR-181a-5p y miR-23a-3p en pacientes con y sin DM. (A) Expresión de miR-181a-5p. (B) Expresión de miR-23a-3p en suero de pacientes con DM y pacientes controles seleccionados del estudio Di@bet.es. Los diagramas de cajas y bigotes representan los cuartiles Q1, Q2 y Q3, así como los valores máximo y mínimo de cada grupo. DM2; *diabetes mellitus* tipo 2.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MICROARNS DESREGULADOS POR ACCIÓN DEL TNFA
EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD Y LA RESISTENCIA A LA INSULINA
Javier Lozano Bartolomé

VII. DISCUSIÓN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MICROARNS DESREGULADOS POR ACCIÓN DEL TNFA
EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD Y LA RESISTENCIA A LA INSULINA
Javier Lozano Bartolomé

La obesidad, posee un componente inflamatorio de bajo grado⁸¹. El estrés reticular y mitocondrial asociado al exceso de ingesta de alimentos, entre otros, son factores determinantes en la aparición de inflamación de bajo grado en sujetos obesos, que se caracteriza por la producción de radicales libres capaces de inducir hipertrofia de las células adipocitarias, incremento en la concentración de ácidos grasos libres circulantes y citoquinas proinflamatorias tales como TNF α , IL-6 o IL-1 β , entre otras. Todos estos factores proinflamatorios poseen la capacidad de interferir en la señalización del receptor de insulina en las distintas células diana^{371,372}.

Se ha demostrado que la citoquina TNF α está directamente involucrada en mecanismos que conducen a la aparición de RI en el tejido adiposo en la obesidad^{82,373}, y además es capaz de producir efectos sistémicos en otros órganos metabólicos tales como el músculo esquelético³⁷⁴.

La RI es un estado alterado de las células por el cual éstas no responden adecuadamente a la señalización de la insulina. La insulina es una hormona peptídica secretada por las células *beta* del páncreas que actúa interaccionando con su receptor (INSR), induciendo diferentes funciones dependiendo del órgano o tejido sobre el que actúe. Particularmente, en el adipocito, la insulina induce la captación de glucosa y la lipogénesis, a la vez que inhibe la lipólisis³⁷⁵. Cuando la insulina se une a INSR, éste se autofosforila y recluta y fosforila los residuos de tirosina de su sustrato IRS-1. IRS-1 fosforilado activa la PI3K que convierte PI(3,4)P₂ en PI(3,4,5)P₃, cuya acumulación en la membrana plasmática recluta la quinasa AKT donde es activada por la PDK1⁶⁵. La activación de AKT en el adipocito, entre otras funciones, provoca un aumento de la captación de glucosa mediante la fosforilación e inhibición de la molécula AS160, favoreciendo así la translocación del transportador

de glucosa GLUT4 a la membrana plasmática en respuesta a la insulina

376

La ruta de señalización de la insulina es un proceso altamente regulado. El INSR e IRS1 son regulados por la fosfatasa PTP1B y miembros de la familia SOCS^{71,72}. La fosforilación de residuos de serina y treonina en el IRS-1 es un mecanismo de inhibición de esta molécula en el que participan serin quinasas como JNK, IKK β , mTOR o S6K^{155-158,377}. S6K es activada por la acción de mTOR, y éste por la acción de AKT, actuando como un mecanismo de retroalimentación negativa. Otro importante regulador negativo de la vía de la insulina, es la fosfatasa PTEN, que cataliza la misma reacción de la PI3K pero en sentido inverso (PI(3,4,5)P₃ → PI(3,4)P₂)⁷⁵, o defosforilando los residuos de tirosina de IRS-1⁷⁶. Otra fosfatasa que actúa a nivel de la PI3K es SHIP-2, que también reduce la acumulación de PI(3,4,5)P₃⁷⁷. Se han descrito también inhibidores de AKT como las fosfatasas PHLPP y PP2A^{78,79}.

En la identificación de los mecanismos moleculares subyacentes a la obesidad y sus complicaciones asociadas, como los implicados en el desarrollo de la RI en los tejidos metabólicos, es de crucial importancia estudiar elementos reguladores. En este escenario juegan un papel importante los miRNAs, puesto que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional reprimiendo de forma específica la traducción de ARNm y/o induciendo su deadenilación y degradación^{200,201}. Se ha demostrado que los miRNAs desempeñan un importante papel regulador de diversos procesos biológicos relacionados con la obesidad, como la adipogénesis e incluso la RI^{243,244,250,258,259,264}.

Así pues, los miRNAs pueden suponer un nexo de asociación entre la inflamación en obesidad y la RI. Como TNF α juega un papel fundamental en la iniciación de la inflamación, y ya que se ha demostrado que puede

inducir de forma significativa cambios de expresión de miRNAs en diversos contextos^{338,341,342}, trazamos la estrategia de seleccionar, a través de una búsqueda bibliográfica, miRNAs afectados por tratamiento con TNF α u otros estímulos inflamatorios, o bien implicados en procesos inflamatorios en diferentes tipos celulares, con el fin comprobar el estado de expresión de estos miRNAs seleccionados en un contexto de RI en respuesta a un microambiente inflamatorio, tal y como ocurre en el tejido adiposo obeso. Para ello utilizamos un modelo de RI *in vitro* estimulando adipocitos humanos con TNF α . Es ya conocido que TNF α induce RI mediante la activación de serina quinasas que inhiben a IRS-1 (JNK, IKK2, SOCS3 y S6K)^{155-158,377}. Además, TNF α activa la vía de NF- κ B a través del cual inhibe la expresión de genes necesarios para la captación de glucosa por las células como PPAR γ , INSR, IRS-1 y GLUT4¹⁵²⁻¹⁵⁴. En esta situación de RI inducida por TNF α , el adipocito muestra claramente un estado proinflamatorio puesto que se detecta un aumento en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias tales como IL-6 e IL-8, hecho ya descrito en la literatura³⁷⁸⁻³⁸⁰, así como un estado de RI reflejado por la reducción de la fosforilación de dos moléculas claves en la ruta de la insulina AKT y AS160^{376,381}.

En el modelo arriba descrito de RI, observamos que TNF α afecta significativamente la expresión de 3 de los 25 miRNAs seleccionados en nuestro estudio, miR-181a-5p, miR-23a-3p y miR-155-5p tanto en adipocitos humanos cómo en la línea celular de adipocitos humanos SGBS. Mientras que ya está descrito que miR-155-5p se induce por la activación de TNF α vía NF- κ B en adipocitos²⁶², la reducción en la expresión de miR-181a-5p y mir-23a-3p en el adipocito humano estimulado con TNF α es un dato totalmente novedoso y que se muestra por primera vez en nuestro estudio³⁸².

Dado que el estado de expresión de miR-181a-5p y miR-23a-3p en tejido adiposo humano en situación de obesidad y RI no había sido descrito hasta la fecha en ningún otro estudio previo, nuestro siguiente objetivo fue determinar la expresión de miR-181a-5p, miR-23a-3p en biopsias pareadas de tejido adiposo procedente de los dos depósitos más representativos de tejido adiposo blanco en humanos: tejido adiposo subcutáneo (TAS) y el tejido adiposo visceral (TAV). Para ello seleccionamos una cohorte de pacientes macheados por edad y sexo y estratificados de acuerdo a su $IMC < 30$ (no obesos) e $IMC \geq 30$ (obesos), y con distinto grado de tolerancia a la glucosa. Los individuos obesos mostraban claramente un perfil clínico y metabólico alterado reflejado por la presencia de hipertensión, índice de RI elevado (determinado por el HOMA-IR) y niveles aumentados de colesterol y triglicéridos. En primer lugar, observamos que tanto miR-181a-5p como miR-23a-3p se expresaban más en TAV que en TAS. Este resultado podría indicar que tanto miR-181a-5p como miR-23a-3p podrían tener una mayor repercusión en el depósito visceral, donde las alteraciones que experimenta éste depósito graso en la obesidad explican buena parte de la etiología de las comorbilidades que la acompañan ³⁸³⁻³⁸⁹.

La expresión tanto de miR-181a-5p y miR-23a-3p en el TAV se encuentra significativamente reducida en individuos con $IMC \geq 30$ respecto a los de $IMC < 30$. Es más, detectamos un efecto aun más pronunciado en sujetos que además de presentar obesidad, también habían desarrollado DM2, lo que sugiere que los niveles de expresión de estos miRNAs se ven significativamente afectados en un contexto de comorbilidad (obesidad+DM2). Esta observación se ve aun más reforzada cuando aplicamos el análisis de correlación de *Spearman*, puesto que encontramos que la expresión de miR-181a-5p y miR-23a-3p en el TAV se relaciona inversamente con el grado de RI, medido por HOMA-IR, los niveles de

glucosa en sangre y la adiposidad, esta última representada por la circunferencia de la cintura y el IMC.

Por otro lado observamos que la expresión de los niveles de ARNm de TNF α en TAV de nuestros pacientes se correlaciona a la inversa con los niveles de expresión de miR-181a-5p y miR-23a-3p del mismo depósito adiposo. En nuestro estudio la expresión de TNF α está significativamente aumentada en las biopsias de TAV de individuos obesos, tal y como ya se había descrito ³⁶⁹, y que advierte del estado inflamatorio del TAV en nuestra cohorte de estudio. Este hecho es de especial interés, puesto que no sólo la obesidad podría estar afectando a la expresión de miR-181a-5p y miR-23a-3p en el tejido adiposo, sino que también podría afectarles el ambiente inflamatorio inducido por TNF α , lo cual es un dato a favor de la posible implicación de estos miRNAs en la RI del tejido adiposo obeso.

Ante estos datos observacionales *in vivo* en tejido adiposo humano, y a fin de estudiar la función de estos miRNAs en la ruta de la insulina, nos propusimos comprobar qué sucedería si la expresión de estos miRNAs aumentara en el adipocito, puesto que ya habíamos observado que estos miRNAs se mostraban reducidos en el modelo *in vitro* del adipocito RI. La sobreexpresión transitoria en el adipocito de miR-181a-5p y miR-23a-3p, seguida de un estímulo de insulina, provoca un modesto cambio significativo al alza, de más del 25%, del estado de fosforilación de AKT y AS160 sobre el control negativo, ambas moléculas adaptadoras necesarias para la señalización de la ruta de la insulina y la captación de glucosa por el adipocito, respectivamente. Sin embargo, no se detectan cambios en el estado de fosforilación del residuo de tirosina 612 de IRS-1, lo cual apunta a que estos miRNAs están actuando a un nivel de la cascada señalizadora del INSR entre IRS-1 y AKT.

Hay que resaltar que no sólo observamos que la sobre-expresión de dichos miRNAs tiene un efecto en la ruta de la insulina, sino que además comprobamos que miR-181a-5p es capaz por sí solo de contrarrestar, en parte, el efecto inhibitor del TNF α sobre la vía de señalización de la insulina, puesto que permite recuperar de forma parcial, el grado de fosforilación de AKT y AS160 en el adipocito tratado con TNF α e insulina³⁸².

Puesto que tanto miR-181a-5p como miR-23a-3p tienen dianas compartidas en la ruta de la insulina, la siguiente cuestión a resolver fue comprobar si la sobreexpresión combinada de miR-181a-5p y miR-23a-3p podría ejercer un efecto sumatorio potenciador de la señalización de insulina. El resultado de la sobreexpresión sumatoria (miR-181a-5p + miR-23a-3p) provocó aumento en la fosforilación de AKT y AS160 en el adipocito pero este aumento en la fosforilación de AKT y AS160 no fue superior al provocado de manera individual por cada miRNA. Este hecho se podría aducir a que el estímulo de insulina, sumado al efecto potenciador de estos miRNAs podría haber provocado un estado de saturación en la fosforilación de AKT y AS160 en este modelo celular. No obstante, sí que observamos un efecto sumatorio significativamente protector frente a la acción de RI inducida por TNF α cuando transfectamos simultáneamente miR-181a-5p y miR-23a-3p. Esto indica claramente que miR-181a-5p y miR-23a-3p están cooperando de forma protectora en la vía de la insulina.

Con el objetivo de esclarecer los mecanismos que pudieran explicar la implicación de estos miRNAs en la acción señalizadora de la insulina, iniciamos una búsqueda de dianas compartidas para miR-181a-5p y miR-23a-3p en reguladores negativos de la vía de la insulina, utilizando algoritmos de predicción de dianas para miRNAs (MIRANDA-mirSVR y Diana-microT-CDS). Esta búsqueda dio como fruto dianas potenciales en

dos moléculas PTEN y S6K, ambos reguladores negativos de la vía de la insulina.

PTEN, cómo ya hemos indicado anteriormente, es una fosfatasa que revierte la transformación de PI(3,4)P₂ en PI(3,4,5)P₃ por la PI3K, inhibiendo en definitiva la activación de AKT⁷⁵. Por otro lado, S6K es una quinasa activada por mTOR y PDK1 que actúa a través de un mecanismo de retroalimentación negativa de la vía de la insulina, fosforilando residuos de serina en IRS-1 y, promoviendo su degradación^{390,391}. S6K además se activa por IKKβ y se ha propuesto como uno de los mecanismos a través de los cuales TNFα, mediante activación de IKKβ, induce RI³⁷⁷.

La validación de dianas se puede realizar usando diferentes aproximaciones: 1) la sobreexpresión o inhibición transitoria de miRNAs para comprobar su acción represora sobre los niveles endógenos de ARNm y proteína del gen diana y el efecto global en la ruta; 2) la validación de los sitios de unión del miRNA con su diana, mediante la utilización de indicadores de expresión como el gen de la luciferasa conjugado a la región 3'UTR del gen diana, que si la diana es real se produce una disminución en la actividad de la luciferasa.

En nuestro estudio validamos los sitios de unión de miR-181a-5p y miR-23a-3p sobre *PTEN* y *S6K*, utilizando cómo modelo *in vitro* las células HEK293. HEK293 es una línea celular obtenida de la transformación de células epiteliales de riñón embrionario humano³⁹² y es habitualmente utilizada en este tipo de estudio por su gran eficiencia de transfección³⁹³. Puesto que observamos un elevado número de elementos de reconocimiento de miRNA (MRE) predichos para cada gen diana (*PTEN* y *S6K*), no incluimos controles MRE mutados individuales en los experimentos de luciferasa; así pues el efecto que consideramos es el

efecto global los MRE en la diana, a fin de detectar el efecto absoluto. Cuando cotransfectamos las células HEK293 con plásmidos que expresaban luciferasa conjugada a la región 3'UTR del gen de *PTEN* o *S6K*, como un indicador de expresión, comprobamos que tanto la sobreexpresión de miR-181a-5p como la de miR-23a-3p reconocían sitios de unión en la región 3'UTR de *S6K* o *PTEN*, reprimiendo de forma significativa su correspondiente expresión, medida a través de la actividad de la luciferasa, lo cual nos indica que ambos miRNAs tienen dianas en los genes *PTEN* y *S6K*.

Comprobamos además, mediante la sobreexpresión combinada de miR-181a-5p y miR-23a-3p en el adipocito y mediante la sobreexpresión individual de miR-181a-5p que hay una clara disminución de la expresión de proteína de PTEN, dato que refuerza claramente que estos miRNAs están actuando reprimiendo la expresión PTEN.

El efecto de miR-23a-3p sobre PTEN únicamente se evidenció de forma significativa cuando inhibimos la expresión de miR-23a-3p, y no cuando lo sobreexpresamos. ¿Cómo explicamos este efecto? miR-23a-3p se ha descrito como inhibidor validado de la deubiquitina A20³⁵⁷, que regula el complejo de transcripción de NF- κ B³⁹⁴, y como NF- κ B es a su vez un regulador negativo de la expresión génica de PTEN³⁹⁵; pensamos que la inhibición de miR-23a-3p podría traducirse en una pérdida de la acción represora de NF- κ B sobre la expresión de PTEN, y como consecuencia veríamos un efecto potenciador de la expresión de PTEN.

Por lo que respecta a la proteína S6K el efecto de la sobreexpresión combinada de miR-181a-5p y miR-23a-3p ejerce una disminución en su expresión a nivel de la proteína total de S6K, y así cómo de forma más moderada sobre su estado de fosforilación (pS6K). Estos datos se vieron reforzados al comprobar que tanto la inhibición individual de miR-181a-

5p y miR-23a-3p como la inhibición conjunta de ambos, provocan un aumento de los niveles de expresión de la proteína S6K.

Claramente, con todos los datos obtenidos hasta ahora, podemos confirmar que estos miRNAs tienen una participación en la señalización de la insulina en el adipocito *in vitro*, puesto que hemos validado estos hallazgos experimentalmente por tres técnicas: mediante sobre-expresión de los miRNAs, mediante la pérdida de función utilizando inhibidores y mediante la interacción miRNA:ARNm. No obstante, somos conscientes de que se trata de un efecto, aun siendo significativo, leve y es conveniente ser precavidos al trasladar los resultados que se obtienen *in vitro* a un contexto *in vivo*, ya que los cambios en los niveles de un miRNA en tejido o sangre no siempre se traducen en efectos fisiológicos observables ³⁹⁶.

A pesar de que los estudios *in vitro* tienen la limitación de no poder reflejar de forma directa la complejidad de los procesos biológicos que suceden en una patología *in vivo* en cuestión, nosotros hemos utilizado adipocitos humanos en unas condiciones patológicas que pueden presentarse en el tejido adiposo obeso humano para, en cierto modo, poder establecer un paralelismo lo más cercano posible a lo observado *in vivo* en humanos.

No cabe duda que nuestros hallazgos respecto a la acción de miR181a y miR23a en la RI en adipocitos humanos son novedosos. Sin embargo, dentro del contexto de metabolismo ya hay datos de estos miRNAs. Hulsmans y colaboradores encontraron reducida la expresión de miR-181a en monocitos de sangre periférica de pacientes con obesidad, con síndrome metabólico y en pacientes con enfermedad coronaria arterial, asociándose su expresión negativamente con el HOMA-IR, la presión sistólica, los triglicéridos, la IL-6 y la P-C-R. Los autores de este mismo

estudio encontraron aumentada la ruta de señalización de TLR/NF- κ B en estos monocitos y sugieren una potencial acción represora de miR-181a en dicha ruta a través de un análisis *in silico* con algoritmos de predicción de dianas para miRNAs, aunque no llegaron a validar las dianas específicas de miR-181a²⁶⁶. Por otra parte, se ha detectado aumentada la expresión de miR-181a-5p en placas aterogénicas en humanos, implicándolo en la disfunción endotelial por estrés oxidativo mediante la acción en la diana bcl-2³⁹⁷. miR-181a también se ha estudiado en adipocitos de cerdo donde su sobreexpresión aminora el efecto antiadipogénico del TNF α reprimiendo directamente su expresión³⁴⁸. También se ha descrito la implicación de miR-181a-5p en adipogénesis de adipocitos 3T3-L1 de ratón, al actuar sobre las vías de señalización de TGF β /Smad y Wnt a través de la regulación de sus dianas Smad7 y Tcf712 (del inglés, *Transcription factor 7-like 2*)³⁹⁸. En otro estudio, Chu y colaboradores han observado que miR-181a regula el metabolismo lipídico en ratones transgénicos que sobreexpresan de manera constitutiva miR-181a, en los cuales reduce la acumulación de triglicéridos y colesterol total, aun alimentando a estos ratones con una dieta rica en grasa. Los autores de este trabajo han observado que miR-181a inhibe la síntesis de lípidos e incrementa la β -oxidación a través de inhibir la isocitrato deshidrogenasa 1 (IDH1), una enzima del ciclo de Krebs³⁹⁹

En un estudio reciente, se ha observado que miR181a está aumentado en sangre y en hígado de pacientes con estatois hepática no alcohólica, y concluyen que miR-181a afecta negativamente la homeostasis de la glucosa, a través de su diana SIRT1, y la homeostasis lipídica en el hepatocito⁴⁰⁰. De hecho en un estudio previo ya se comprobó que la inhibición de miR-181a en hepatocitos mejoraba el estado de sensibilidad hepática a la insulina al verse aumentada la expresión de SIRT1⁴⁰¹. Aunque SIRT1 ejerce un efecto protector del metabolismo glucídico en el

hígado, SIRT1 tiene un papel diferente en el adipocito. SIRT1 inhibe la adipogénesis a través de la deacetilación e inhibición del gen PPAR γ , y se ha comprobado que ratones a los que se les suprimió el gen sirt-1 en su tejido adiposo son más tolerantes a la glucosa, más sensibles a la insulina y presentan un menor grado de inflamación que los ratones control ante una dieta rica en grasas de larga duración ⁴⁰². En este sentido, es de esperar que la acción de miR-181a-5p sobre SIRT1 tenga un efecto sensibilizador a la insulina en el adipocito, aunque este dato está pendiente de validar en este tipo celular, lo cual podría ser otro mecanismo a través del cual la sobreexpresión de miR-181a-5p mejoraría la sensibilidad a la insulina en adipocitos, como muestran nuestros resultados.

Diversos estudios ya han investigado la función de miR-181a-5p en otros contextos distintos al metabólico. Por ejemplo en el timo, donde se encontraba altamente expresado, y han determinado que tiene un papel en la regulación de la maduración de los timocitos ⁴⁰³. En linfocitos B en la médula ósea, miR181 está altamente expresado y su función está dirigida a promover la diferenciación de estas células ⁴⁰⁴. En cerebro miR-181a también se halla sobre-expresado con implicaciones directas en la función cognitiva del hipocampo ⁴⁰⁵, en la neurodegeneración cerebelar ⁴⁰⁵ y en la inflamación neuronal en el contexto del infarto cerebral isquémico ⁴⁰⁶.

Por lo que respecta a miR-23a-3p, se conoce poco sobre su implicación en el contexto metabólico. Se ha observado que la melatonina alivia el estrés de retículo endoplasmático en un modelo de esteatosis hepática *in vitro* al inhibir la expresión de miR-23a-3p ⁴⁰⁷. Se ha descrito que miR-23a-3p está implicado en la progresión de la enfermedad arterial coronaria por irrumpir en la función angiogénica de células endoteliales al inhibir el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) ⁴⁰⁸. También se ha publicado que la inhibición de miR-23a, con diana en la glutaminasa

mitocondrial, protege la función cardiaca del daño inducido por isquemia al verse restaurado el metabolismo de la glutamina ⁴⁰⁹.

En el contexto dónde miR-23a-3p está más estudiado es en cáncer. Por ejemplo, en trabajos recientes se ha implicado a miR-23a en el desarrollo de metástasis en cáncer de mama ⁴¹⁰, de páncreas ⁴¹¹ y en melanoma ⁴¹². Además, miR-23a-3p es un regulador de la invasión y migración de células de osteosarcoma a través de su acción represora sobre PTEN ⁴¹³. En este sentido nuestro estudio muestra la acción reguladora que miR-23a-3p ejerce sobre PTEN, por primera vez, en la señalización de la insulina en el adipocito.

La detección de miRNAs en biofluidos posiciona a estas moléculas como biomarcadores muy interesantes de diagnóstico no invasivo y de monitorización de enfermedades debido a su gran estabilidad en biopsias líquidas, además de su fácil detección mediante qRT-PCR ^{414,415}. El análisis de miRNAs circulantes normalmente se realiza en plasma o suero de sangre periférica y, en menor medida, en esputo, orina, leche materna, saliva, semen y líquido cefalorraquídeo. Los miRNAs circulantes han sido extensamente estudiados a fin de proponer nuevos biomarcadores en numerosos tipos de cáncer para su diagnóstico, el pronóstico de aparición de metástasis o la predicción en respuesta a tratamientos de quimioterapia ^{297,416}. También han sido estudiados en enfermedades infecciosas para la observación de la evolución de una infección o la monitorización de la respuesta a antibióticos o tratamientos antivirales ⁴¹⁷. En DM2 se han identificado diferentes paneles de miRNAs desregulados por la presencia de DM2 ^{280,299,302,307,418}, aunque estos estudios no son lo suficientemente consistentes unos con otros en cuanto a los miRNAs identificados, probablemente, debido a la falta de estandarización de los métodos de extracción y procesamiento de las muestras ²⁹⁶.

Puesto que en nuestro estudio hemos registrado una implicación de miR-181a-5p y miR-23a-3p en la señalización de la insulina y los hemos detectado desregulados en un contexto de RI, consideramos dar un paso más allá y analizar los niveles circulantes de estos miRNAs en suero a fin de estudiar su posible utilidad como biomarcadores en el pronóstico de la aparición de prediabetes.

Dado que los estudios de miRNAs como biomarcadores de pronóstico en estudios poblacionales de tipo epidemiológico transversal suelen carecer de la capacidad de trasladar causalidad a los biomarcadores explorados, aunque son indicativos de asociación, incluimos en nuestro análisis suero de pacientes de un estudio prospectivo denominado PIZARRA (53 controles y 48 casos), que por su carácter prospectivo orientado a la detección de DM2, confiere una mayor capacidad de pronóstico a los biomarcadores analizados. Los pacientes que seleccionamos de la cohorte PIZARRA tienen seguimiento a 4 años. A todos los pacientes se les administró una sobrecarga oral de glucosa al inicio y a los 4 años. De esta cohorte contamos con los datos clínicos (perfil glicémico, perfil lipídico y presión arterial) y antropométricos tanto a nivel basal como a los 4 años, así como parámetros inflamatorios a tiempo basal que incluyen P-C-R, adiponectina, receptores de TNF α , IL-6, leptina, entre otros.

Una vez analizados miR-181a-5p y miR-23a-3p en suero de casos y controles de la cohorte PIZARRA, encontramos de especial relevancia que los niveles circulantes de miR-181a-5p no solo están significativamente reducidos en los pacientes con prediabetes, sino que además esta reducción ya aparece 4 años antes de manifestarse la patología, sugiriendo su utilidad como un posible factor de pronóstico de prediabetes. En línea con nuestros resultados, se ha publicado un trabajo reciente en el que se utiliza una cohorte de tamaño similar (43 casos y 43

controles) dónde los niveles circulantes de miR-181a-5p también están disminuidos en pacientes con prediabetes y 3 años antes de la aparición de la enfermedad, asociándose la reducción de los niveles de miR-181a-5p con la disfunción progresiva de las células β del páncreas ⁴¹⁹. Además, en este estudio argumentan que dicha asociación puede ser debida a que el factor de transcripción Prox1 (del inglés, *Prospero Homeobox protein 1*) es una diana de miR-181a-5p, aunque los autores de este trabajo no llegan a corroborar este dato ⁴²⁰. Prox1 se ha asociado con DM2 y es un regulador negativo de la ruta de la transición epitelial mesenquimal ⁴²¹⁻⁴²³, la cual está implicada activamente en la formación de células endocrinas del páncreas durante la embriogénesis ⁴²⁴.

Por lo que respecta a miR-23a-3p, también hemos detectado niveles reducidos en suero de forma significativa en los sujetos con prediabetes de nuestro estudio PIZARRA, un hallazgo previamente registrado en el estudio de una cohorte con menos pacientes (N=20) ³⁵⁸. En un reciente estudio de una cohorte de 9 pacientes normotolerantes a la glucosa, 9 intolerantes a la glucosa y 9 diabéticos de tipo 2, se han encontrado también reducidos los niveles circulantes de miR-23a-3p en suero de pacientes intolerantes a la glucosa, pero solo en aquellos (N=4) que no progresaron hacia el desarrollo de DM2 durante los siguientes 12 meses desde el test de tolerancia oral a la glucosa ⁴²⁵.

A diferencia de lo observado con miR-181a-5p, no detectamos diferencias de expresión de miR-23a-3p respecto a los controles en la fase inicial del estudio, es decir antes de la aparición de prediabetes, lo cual indica que la alteración en los niveles de miR-23a-3p ocurre en algún punto a lo largo de los 4 años previos a la aparición de prediabetes.

Dado que sólo miR-181a-5p experimenta cambios a tiempo basal en la cohorte PIZARRA, procedimos a explorar su valor pronóstico

individual a través de un análisis de curva ROC. Observamos que utilizando sólo miR-181a-5p, la sensibilidad y especificidad del modelo univariante resultante era demasiado baja (82,7% y 33,3%, respectivamente) como para aplicarse en una sola prueba de diagnóstico de exclusión, no obstante podría tener utilidad como biomarcador de apoyo a un diagnóstico positivo de prediabetes.

Además, desarrollamos un modelo de regresión logística bivariada incluyendo a miR-181a-5p junto a otras variables que también mostraron cambios significativos entre casos y controles cuatro años antes de la aparición de prediabetes, que son el colesterol HDL, la adiponectina y la P-C-R. Estas variables, al igual que miR-181a-5p, de forma individual no se ajustaban a un modelo predictivo eficiente. Sin embargo, al introducir las cuatro variables (miR-181a-5p, colesterol HDL, adiponectina y P-C-R) en el modelo de regresión logística, obtuvimos una curva ROC con un poder predictivo mayor (AUC=0,793), permitiendo clasificar correctamente el 72% de los casos. Al calcular la razón de momios (RM) de cada variable en este modelo, únicamente miR-181a-5p y la adiponectina mostraron un efecto significativamente protector.

De forma paralela, en el modelo multivariante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), donde se consideraron los niveles circulantes de miR-181a-5p a tiempo basal y todos los datos clínicos y antropométricos del paciente, se obtuvo una precisión del 54.9%, lo cual indica que sólo permite estratificar el 54.9% de los casos de prediabetes^{332,333}. Sin embargo, el análisis de puntuación VIP del primer componente del modelo PLS-DA situó a miR-181a-5p como la cuarta variable más importante, con mayor impacto incluso que la insulina o la glucosa 120' tras una sobrecarga oral de glucosa. Por tanto, aunque la precisión de pronóstico es moderada para todos los índices que examinamos, las cuatro firmas serológicas (colesterol HDL, PCR, adiponectina y miR-181a-5p)

podrían representar un posible panel de biomarcadores que permita el diagnóstico precoz de pacientes prediabéticos.

Por último quisimos evaluar los niveles circulantes de miR-181a-5p y miR-23a-3p en un estudio transversal de diabetes, seleccionando pacientes del estudio Di@bet.es (Epidemiología de la diabetes en España), a fin de corroborar los datos obtenidos en el estudio PIZARRA. El estudio Di@bet.es, es un amplio estudio epidemiológico nacional que se ha desarrollado a lo largo de 3 años en todo el territorio español y concluye que la prevalencia de DM2 es del 12% y el de las alteraciones hidrocarbonadas en global del 25% con respecto a toda la muestra³³¹.

Al analizar los niveles circulantes de miR-181a-5p y miR-23a-3p en sueros 100 individuos (50 DM2 y 50 controles) del estudio Di@bet.es no detectamos diferencias significativas entre controles y DM2 para ninguno de los dos miRNAs.

miR-181a-5p se ha descrito aumentado en suero de niños con *diabetes mellitus* de tipo 1^{426,427}, un tipo de diabetes iniciada por un proceso de autoinmunidad contra las células *beta* del páncreas⁴²⁸, pero hasta la fecha no se ha publicado nada con respecto a los niveles circulantes de miR-181a-5p en sueros de pacientes con DM2. Mientras que los niveles de miR-23a-3p ya se había observado reducidos en suero de pacientes con DM2³⁵⁸.

Aunque el potencial diagnóstico de miR181a-5p de momento es limitado, puesto que el tamaño de nuestra cohorte (48 casos y 50 controles) es relativamente pequeño, es necesario validar los datos en estudios poblacionales que incluyan cohortes de mayor tamaño muestral a fin de comprobar el potencial de nuestro hallazgos.

En conclusión, los resultados presentados en esta tesis describen un papel regulador para miR-181a-5p y miR-23a-3p en la RI relacionada con el TNF α en los adipocitos humanos. También demostramos que miR-181a-5p está desregulado antes de la aparición de prediabetes, lo que posiciona a miR-181a-5p como posible biomarcador de prediabetes.

En un futuro, una forma de profundizar más en el papel de miR-181a en la RI sería a través del estudio de la familia mir181 (miR-181a1/b1, miR-181a2/b2 y miR-181c/d) en dicho contexto. Esta familia desempeña un papel fundamental como reguladora positiva de la señalización de PI3K al inhibir PTEN en el desarrollo de timocitos de ratón, y la delección del clúster miR-181a1/b1 da lugar a una disminución en la captación de glucosa, una menor capacidad glicolítica y un alterado estado metabólico de las células ³⁵². En este sentido sería esperable que la supresión completa de la familia miR-181 en adipocitos, mediante la técnica de edición génica CRISPR-Cas9 ⁴²⁹, podría dar lugar a un fenotipo metabólico marcadamente alterado, lo cual podría desvelar nuevas funciones de dicha familia en el contexto de la obesidad y la resistencia a la insulina que aún se desconocen.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MICROARNS DESREGULADOS POR ACCIÓN DEL TNFA
EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD Y LA RESISTENCIA A LA INSULINA
Javier Lozano Bartolomé

VIII. CONCLUSIONS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MICROARNS DESREGULADOS POR ACCIÓN DEL TNFA
EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD Y LA RESISTENCIA A LA INSULINA
Javier Lozano Bartolomé

Conclusions

Clinical studies

- ▶ We have identified two miRNAs, miR-181a-5p and miR-23a-3p, whose expression is significantly lower in the VAT of obese patients ($BMI \geq 30$) than of non-obese patients ($BMI < 30$), and this reduction is more pronounced in the presence of T2DM, which points to a combined comorbidity effect.
- ▶ The expression of miR-181a-5p and miR-23a-3p is inversely related to adiposity and IR.
- ▶ The expression of miR-181a-5p and miR-23a-3p in the VAT is inversely related to the mRNA levels of $TNF\alpha$, which argues in favor of their possible role in IR in this tissue.
- ▶ Serum levels of miR-181a-5p are significantly decreased in subjects 4 years before the development of prediabetes, suggesting a prognostic relevance.
- ▶ Although the prognostic utility of serum miR-181a-5p levels for prediabetes is moderate, it could be included in a panel of biomarkers with HDL cholesterol, CRP and adiponectin, for the early diagnosis of prediabetes.

In vitro studies

- ▶ The expression of miR-181a-5p and miR-23a-3p is negatively regulated by $TNF\alpha$ in human adipocytes.
- ▶ Overexpression of miR-181a-5p and/or miR-23a-3p in human adipocytes improves insulin sensitivity, in part by increasing phosphorylation of two key elements of the insulin pathway: AKT and AS160.
- ▶ Cotransfection of both miRNAs in adipocytes prevents $TNF\alpha$ -induced IR, with greater efficiency than with individual miRNAs.

- ▶ PTEN and S6K are potential targets of both miR-181a-5p and miR-23a-3p in adipocytes

General conclusions

miR-181a-5p and miR-23a-3p have a potential regulatory role in obesity-related TNF α -induced IR in adipocytes.

The serum signature of miR-181a-5p in combination with that of HDL cholesterol, CRP and adiponectin could be a possible prognostic indicator of prediabetes.

Conclusiones

Estudios poblacionales

- ▶ Hemos identificado dos miRNAs: miR-181a-5p y a miR-23a-3p cuya expresión está significativamente disminuida en TAV de pacientes obesos ($IMC \geq 30$), respecto a los pacientes no obesos ($IMC < 30$); y esta reducción se acentúa con la presencia de DM2, lo que apunta a un efecto combinado de comorbilidad.
- ▶ La expresión de miR-181a-5p y de miR-23a-3p está inversamente relacionada con la adiposidad y con la RI
- ▶ En TAV, la expresión de miR-181a-5p y miR-23a-3p está inversamente relacionada con los niveles de ARNm de TNF α , lo cual es un argumento a favor de su posible papel en la RI en este tejido.
- ▶ Los niveles en suero de miR-181a-5p están significativamente disminuidos en los sujetos 4 años antes del desarrollo de prediabetes, lo que le otorga un posible papel pronóstico.
- ▶ Aunque la utilidad de pronóstico de miR181a-5p en suero de forma individual para prediabetes es moderada, junto con los biomarcadores: colesterol HDL, P-C-R y Adiponectina, podría representar un posible panel de diagnóstico precoz de prediabetes.

Estudios *in vitro*

- ▶ La expresión de miR-181a-5p y miR-23a-3p está regulada negativamente por TNF α en adipocitos humanos
- ▶ La sobreexpresión de miR-181a-5p y/o miR-23a-3p en adipocitos humanos mejora la sensibilidad a la insulina provocando un aumento en la fosforilación de dos elementos claves de la ruta de la insulina: AKT y AS160

- ▶ La cotransfección de ambos miRNAs en adipocitos minimiza el efecto de RI inducida por TNF α , con mayor eficiencia que la obtenida al sobreexpresar los miRNAs de forma individual.
- ▶ PTEN y S6K son dianas de miR-181a-5p y miR-23a-3p en el adipocito.

Conclusiones generales

miR-181a-5p y miR-23a-3p tienen un posible papel regulador en la obesidad relacionada con la RI inducida por TNF α en los adipocitos.

Niveles séricos disminuidos de miR-181a-5p podrían ser, junto con marcadores como colesterol HDL, P-C-R y adiponectina, un posible indicador de pronóstico de prediabetes.

IX. BIBLIOGRAFÍA

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MICROARNS DESREGULADOS POR ACCIÓN DEL TNFA
EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD Y LA RESISTENCIA A LA INSULINA
Javier Lozano Bartolomé

1. Di Cesare, M. *et al.* Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: A pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *Lancet* **387**, 1377-1396 (2016).
2. González-Muniesa, P. *et al.* Obesity. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **3**, 17034 (2017).
3. WHO. *Obesity: preventing and managing the global epidemic Report of a WHO Consultation (WHO Technical Report Series 894)*. (2000).
4. Nishida, C., Ko, G. T. & Kumanyika, S. Body fat distribution and noncommunicable diseases in populations: overview of the 2008 WHO Expert Consultation on Waist Circumference and Waist-Hip Ratio. *Eur. J. Clin. Nutr.* **64**, 2-5 (2010).
5. Emmanuel, J. J. & Coppack, S. W. en *Obesity, Bariatric and Metabolic Surgery* (ed. Agrawal, S.) 29-38 (Springer International Publishing, 2016). doi:10.1007/978-3-319-04343-2_4
6. Reaven, G. M. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* **37**, 1595-1607 (1988).
7. Kaur, J. A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. *Cardiol. Res. Pract.* **2014**, 1-21 (2014).
8. Huang, P. L. A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Dis. Model. Mech.* **2**, 231-237 (2009).
9. Wilcox, G. Insulin and Insulin Resistance. *Clin. Biochem. Rev.* **26**, 19-39 (2005).
10. DeFronzo, R. A. *et al.* Type 2 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **1**, 1-23 (2015).
11. FID. Informe Mundial de la diabetes. *Organ. Mund. la Salud* **4** (2016). doi:10.18004/rvspmi/2312-3893/2016.03(02)71-076
12. Chadt, A., Scherneck, S., Joost, H.-G. & Al-Hasani, H. Molecular links between Obesity and Diabetes: «Diabesity». *Endotext* (2014). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279051/>. (Accedido: 1.º enero 2014)
13. Papatheodorou, K., Papanas, N., Banach, M., Papazoglou, D. & Edmonds, M. Complications of Diabetes 2016. *J. Diabetes Res.* **2016**, 6989453 (2016).
14. DeFronzo, R. A., Tobin, J. D. & Andres, R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am. J. Physiol.* **237**, E214-23 (1979).
15. Singh, B. Surrogate markers of insulin resistance: A review. *World J. Diabetes* **1**, 36 (2010).
16. Antuna-Puente, B. *et al.* How can we measure insulin sensitivity/resistance? *Diabetes Metab.* **37**, 179-188 (2011).
17. Matthews, D. R. *et al.* Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* **28**, 412-9 (1985).
18. 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 Endocr. Disord.* **13**, 47 (2013).
19. Gerstein, H. C. *et al.* Annual incidence and relative risk of diabetes in

- people with various categories of dysglycemia: a systematic overview and meta-analysis of prospective studies. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **78**, 305-12 (2007).
20. Alberti, K. G. & Zimmet, P. Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet. Med.* **15**, 539-553 (1998).
 21. Schipper, H. S., Prakken, B., Kalkhoven, E. & Boes, M. Adipose tissue-resident immune cells: key players in immunometabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* **23**, 407-415 (2012).
 22. Silva, K. R. *et al.* Characterization of stromal vascular fraction and adipose stem cells from subcutaneous, preperitoneal and visceral morbidly obese human adipose tissue depots. *PLoS One* **12**, e0174115 (2017).
 23. *Adipose Tissue Biology*. (Springer New York, 2012). doi:10.1007/978-1-4614-0965-6
 24. Cannon, B. & Nedergaard, J. A. N. Brown Adipose Tissue : Function and Physiological Significance. 277-359 (2018).
 25. Timmons, J. A. *et al.* Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 4401-4406 (2007).
 26. Enerbäck, S. Brown adipose tissue in humans. *Int. J. Obes.* **34**, S43-S46 (2010).
 27. Klingenspor, M. *et al.* en *Adipose Tissue Biology* (ed. Symonds, M. E.) 39-69 (Springer International Publishing, 2012). doi:10.1007/978-3-319-52031-5_3
 28. Cui, X. & Chen, S. White adipose tissue browning and obesity. **31**, 1-2 (2017).
 29. Sanchez-gurmaches, J. & Guertin, D. A. Biochimica et Biophysica Acta Adipocyte lineages : Tracing back the origins of fat ☆. *BBA - Mol. Basis Dis.* **1842**, 340-351 (2014).
 30. Thyagarajan, B. & Foster, M. T. Beiging of white adipose tissue as a therapeutic strategy for weight loss in humans. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* **31**, 1-13 (2017).
 31. Rigamonti, A., Brennand, K., Lau, F. & Cowan, C. A. Rapid Cellular Turnover in Adipose Tissue. **6**, (2011).
 32. Rodeheffer, M. S. Identification of White Adipocyte Progenitor Cells In Vivo. 240-249 (2008). doi:10.1016/j.cell.2008.09.036
 33. Rosen, E. D. & MacDougald, O. A. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 885-896 (2006).
 34. Farmer, S. R. Transcriptional control of adipocyte formation. 263-273 (2006). doi:10.1016/j.cmet.2006.07.001
 35. Tamori, Y., Masugi, J., Nishino, N. & Kasuga, M. Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* **51**, 2045-55 (2002).
 36. Imai, T. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse. **101**, 4543-4547 (2004).

37. Laudes, M. Role of WNT signalling in the determination of human mesenchymal stem cells into preadipocytes. (2009). doi:10.1530/JME-10-0169
38. Ross, S. *et al.* Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science* (80-). **289**, 950-953 (2000).
39. Cawthorn, W. P. & Sethi, J. K. TNF- α and adipocyte biology. *FEBS Lett.* **582**, 117-131 (2008).
40. Tong, Q. *et al.* Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition. *Science* **290**, 134-8 (2000).
41. Tong, Q., Tsai, J., Tan, G., Dalgin, G. & Hotamisligil, G. S. Interaction between GATA and the C/EBP family of transcription factors is critical in GATA-mediated suppression of adipocyte differentiation. *Mol. Cell Biol.* **25**, 706-15 (2005).
42. Cederberg, A. *et al.* FOXC2 is a winged helix gene that counteracts obesity, hypertriglyceridemia, and diet-induced insulin resistance. *Cell* **106**, 563-73 (2001).
43. Nakae, J. *et al.* The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Dev. Cell* **4**, 119-29 (2003).
44. Wolfrum, C., Besser, D., Luca, E. & Stoffel, M. Insulin regulates the activity of forkhead transcription factor Hnf-3beta/Foxa-2 by Akt-mediated phosphorylation and nuclear/cytosolic localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 11624-9 (2003).
45. Stephane, G. & Ronald, K. C. en *Adipose Tissue Biology* (ed. Symonds, M. E.) (Springer International Publishing, 2012). doi:10.1007/978-3-319-52031-5_3
46. Ibrahim, M. M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes. Rev.* **11**, 11-18 (2010).
47. Van Harmelen, V. *et al.* Leptin secretion from subcutaneous and visceral adipose tissue in women. *Diabetes* **47**, 913-7 (1998).
48. Wajchenberg, B. L. & Cohen, R. *Adipose Tissue and Adipokines in Health and Disease (Nutrition and Health)*. *Adipose Tissue and Adipokines in Health and Disease (Nutrition and Health)* (2014). doi:10.1007/978-1-62703-770-9
49. Weisberg, S. P. *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **112**, 1796-1808 (2003).
50. Lemieux, I. *et al.* Elevated C-reactive protein: another component of the atherothrombotic profile of abdominal obesity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**, 961-7 (2001).
51. Björntorp, P. «Portal» adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. *Arteriosclerosis* **10**, 493-6 (1990).
52. Girard, J. & Lafontan, M. Impact of visceral adipose tissue on liver metabolism and insulin resistance. Part II: Visceral adipose tissue production and liver metabolism. *Diabetes Metab.* **34**, 439-445 (2008).
53. Gray, S. L. & Vidal-Puig, A. J. Adipose tissue expandability in the maintenance of metabolic homeostasis. *Nutr. Rev.* **65**, S7-12 (2007).
54. Virtue, S. & Vidal-Puig, A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective. *Biochim. Biophys. Acta* **1801**, 338-49 (2010).
55. Slawik, M. & Vidal-Puig, A. J. Lipotoxicity, overnutrition and energy

- metabolism in aging. *Ageing Res. Rev.* **5**, 144-64 (2006).
56. Estadella, D. *et al.* Lipotoxicity: Effects of Dietary Saturated and Transfatty Acids. *Mediators Inflamm.* **2013**, 1-13 (2013).
 57. Simha, V. & Garg, A. Inherited lipodystrophies and hypertriglyceridemia. *Curr. Opin. Lipidol.* **20**, 300-308 (2009).
 58. Semple, R. K. *et al.* Postreceptor insulin resistance contributes to human dyslipidemia and hepatic steatosis. *J. Clin. Invest.* **119**, (2009).
 59. Sims, E. A. H. Are there persons who are obese, but metabolically healthy? *Metabolism* **50**, 1499-1504 (2001).
 60. Tchernof, A. & Després, J.-P. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol. Rev.* **93**, 359-404 (2013).
 61. Zhang, Y. *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425-432 (1994).
 62. Mohamed-Ali, V., Pinkney, J. H. & Coppack, S. W. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **22**, 1145-58 (1998).
 63. Fain, J. N., Madan, A. K., Hiler, M. L., Cheema, P. & Bahouth, S. W. Comparison of the Release of Adipokines by Adipose Tissue, Adipose Tissue Matrix, and Adipocytes from Visceral and Subcutaneous Abdominal Adipose Tissues of Obese Humans. *Endocrinology* **145**, 2273-2282 (2004).
 64. Kershaw, E. E. & Flier, J. S. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 2548-2556 (2004).
 65. Boucher, J., Kleinridders, A. & Kahn, C. R. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, (2014).
 66. Sakamoto, K. & Holman, G. D. Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **295**, E29-37 (2008).
 67. Düvel, K. *et al.* Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol. Cell* **39**, 171-83 (2010).
 68. Tzivion, G., Dobson, M. & Ramakrishnan, G. FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1813**, 1938-45 (2011).
 69. Haeusler, R. A., McGraw, T. E. & Accili, D. Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 31-44 (2018).
 70. Haeusler, R. A., McGraw, T. E. & Accili, D. Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 31-44 (2017).
 71. Ukkola, O. & Santaniemi, M. Protein tyrosine phosphatase 1B: a new target for the treatment of obesity and associated co-morbidities. *J. Intern. Med.* **251**, 467-75 (2002).
 72. Howard, J. K. & Flier, J. S. Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. *Trends Endocrinol. Metab.* **17**, 365-71 (2006).
 73. Desbuquois, B., Carré, N. & Burnol, A.-F. Regulation of insulin and type 1 insulin-like growth factor signaling and action by the Grb10/14 and SH2B1/B2 adaptor proteins. *FEBS J.* **280**, 794-816 (2013).
 74. Shah, O. J., Wang, Z. & Hunter, T. Inappropriate activation of the

- TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies. *Curr. Biol.* **14**, 1650-6 (2004).
75. Morley, T. S., Xia, J. Y. & Scherer, P. E. Selective enhancement of insulin sensitivity in the mature adipocyte is sufficient for systemic metabolic improvements. *Nat. Commun.* **6**, 7906 (2015).
76. Shi, Y. *et al.* PTEN is a protein tyrosine phosphatase for IRS1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 522-7 (2014).
77. Clément, S. *et al.* The lipid phosphatase SHIP2 controls insulin sensitivity. *Nature* **409**, 92-7 (2001).
78. Brognard, J. & Newton, A. C. PHLiPPing the switch on Akt and protein kinase C signaling. *Trends Endocrinol. Metab.* **19**, 223-30 (2008).
79. Ugi, S. *et al.* Protein phosphatase 2A negatively regulates insulin's metabolic signaling pathway by inhibiting Akt (protein kinase B) activity in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 8778-89 (2004).
80. Cildir, G., Akincilar, S. C. & Tergaonkar, V. Chronic adipose tissue inflammation: All immune cells on the stage. *Trends Mol. Med.* **19**, 487-500 (2013).
81. Wellen, K. E. & Hotamisligil, G. S. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **112**, 1785-1788 (2003).
82. Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S. & Spiegelman, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science (80-.)*. **259**, 87-91 (1993).
83. Hotamisligil, G. S., Arner, P., Caro, J. F., Atkinson, R. L. & Spiegelman, B. M. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **95**, 2409-2415 (1995).
84. Makki, K., Froguel, P. & Wolowczuk, I. Adipose Tissue in Obesity-Related Inflammation and Insulin Resistance: Cells, Cytokines, and Chemokines. *ISRN Inflamm.* **2013**, 1-12 (2013).
85. Clément, K. *et al.* Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects. *FASEB J.* **18**, 1657-69 (2004).
86. Fain, J. N., Madan, A. K., Hiler, M. L., Cheema, P. & Bahouth, S. W. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* **145**, 2273-82 (2004).
87. Trayhurn, P. & Wood, I. S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br. J. Nutr.* **92**, 347 (2004).
88. Gregor, M. F. & Hotamisligil, G. S. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 415-45 (2011).
89. Poon, I. K. H., Lucas, C. D., Rossi, A. G. & Ravichandran, K. S. Apoptotic cell clearance: Basic biology and therapeutic potential. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 166-180 (2014).
90. Koliwad, S. K. *et al.* DGAT1-dependent triacylglycerol storage by macrophages protects mice from diet- induced insulin resistance and inflammation. *J. Clin. Invest.* **120**, 756-797 (2010).
91. Kosteli, A. *et al.* Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. *J Clin Invest* **120**, 3466-3479 (2010).
92. Cinti, S. *et al.* Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J. Lipid Res.* **46**,

- 2347-2355 (2005).
93. Spencer, M. *et al.* Adipose tissue macrophages in insulin-resistant subjects are associated with collagen VI and fibrosis and demonstrate alternative activation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **299**, E1016-27 (2010).
 94. Panee, J. Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) in obesity and diabetes. *Cytokine* **60**, 1-12 (2012).
 95. Blüher, M. Adipose tissue dysfunction contributes to obesity related metabolic diseases. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **27**, 163-77 (2013).
 96. Wynn, T. A., Chawla, A. & Pollard, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* **496**, 445-55 (2013).
 97. Amano, S. U. *et al.* Local proliferation of macrophages contributes to obesity-associated adipose tissue inflammation. *Cell Metab.* **19**, 162-171 (2014).
 98. Haase, J. *et al.* Local proliferation of macrophages in adipose tissue during obesity-induced inflammation. *Diabetologia* **57**, 562-571 (2014).
 99. Gordon, S. & Taylor, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 953-64 (2005).
 100. Ohashi, K. *et al.* Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype. *J. Biol. Chem.* **285**, 6153-60 (2010).
 101. Lumeng, C. N., Bodzin, J. L. & Saltiel, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* **117**, 175-184 (2007).
 102. Klimcakova, E. *et al.* Macrophage gene expression is related to obesity and the metabolic syndrome in human subcutaneous fat as well as in visceral fat. *Diabetologia* **54**, 876-87 (2011).
 103. Aron-Wisniewsky, J. *et al.* Human adipose tissue macrophages: m1 and m2 cell surface markers in subcutaneous and omental depots and after weight loss. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **94**, 4619-23 (2009).
 104. Canello, R. *et al.* Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes* **54**, 2277-86 (2005).
 105. Dalmas, E., Clément, K. & Guerre-Millo, M. Defining macrophage phenotype and function in adipose tissue. *Trends Immunol.* **32**, 307-314 (2011).
 106. Klöting, N. & Blüher, M. Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **15**, 277-287 (2014).
 107. Reilly, S. M. & Saltiel, A. R. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nat. Rev. Endocrinol.* **13**, 633-643 (2017).
 108. Erridge, C., Attina, T., Spickett, C. M. & Webb, D. J. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: Evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *Am. J. Clin. Nutr.* **86**, 1286-1292 (2007).
 109. Cani, P. D. *et al.* Original Article. *Diabetes* **56**, 1761-1772 (2007).
 110. Amar, J. *et al.* Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *Am. J. Clin. Nutr.* **87**, 1219-23 (2008).
 111. Saad, M. J. A., Santos, A. & Prada, P. O. Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and Insulin Resistance. *Physiology* **31**, 283-293

- (2016).
112. Creely, S. J. *et al.* Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **292**, 740-747 (2007).
 113. Kallio, K. A. E. *et al.* Endotoxemia, nutrition, and cardiometabolic disorders. *Acta Diabetol.* **52**, 395-404 (2015).
 114. Jayashree, B. *et al.* Increased circulatory levels of lipopolysaccharide (LPS) and zonulin signify novel biomarkers of proinflammation in patients with type 2 diabetes. *Mol. Cell. Biochem.* **388**, 203-210 (2014).
 115. Nguyen, M. T. A. *et al.* A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J. Biol. Chem.* **282**, 35279-35292 (2007).
 116. Lee, J. Y. *et al.* Saturated Fatty Acid Activates but Polyunsaturated Fatty Acid Inhibits Toll-like Receptor 2 Dimerized with Toll-like Receptor 6 or 1. *J. Biol. Chem.* **279**, 16971-16979 (2004).
 117. Shi, H. *et al.* TLR4 links innate immunity and fatty acid – induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **116**, 3015-3025 (2006).
 118. Himes, R. W. & Smith, C. W. Tlr2 is critical for diet-induced metabolic syndrome in a murine model. *FASEB J.* **24**, 731-9 (2010).
 119. Vitseva, O. I. *et al.* Inducible Toll-like receptor and NF-kappaB regulatory pathway expression in human adipose tissue. *Obesity (Silver Spring)*. **16**, 932-7 (2008).
 120. Dasu, M. R., Devaraj, S., Park, S. & Jialal, I. Increased Toll-Like Receptor (TLR) Activation and TLR Ligands in Recently Diagnosed Type 2 Diabetic Subjects. *Diabetes Care* **33**, 861-868 (2010).
 121. Strissel, K. J. *et al.* Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes* **56**, 2910-2918 (2007).
 122. Giordano, A. *et al.* Obese adipocytes show ultrastructural features of stressed cells and die of pyroptosis. *J. Lipid Res.* **54**, 2423-2436 (2013).
 123. Jin, C. & Flavell, R. A. Innate sensors of pathogen and stress: Linking inflammation to obesity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **132**, 287-294 (2013).
 124. Vandanmagsar, B. *et al.* The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat. Med.* **17**, 179-189 (2011).
 125. Lee, H.-M. *et al.* Upregulated NLRP3 Inflammasome Activation in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes* **62**, 194-204 (2013).
 126. Pasarica, M. *et al.* Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity. *Diabetes* **58**, 718-725 (2009).
 127. Ye, J. Adipose Tissue Vascularization: Its Role in Chronic Inflammation. *Curr Diab Rep.* **11**, 203-210 (2011).
 128. Rius, J. *et al.* NF-κB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1α. *Nature* **453**, 807-811 (2008).
 129. Vincent, H. K. & Taylor, A. G. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int. J. Obes.* **30**, 400-418 (2006).
 130. Wellen, K. E. & Thompson, C. B. Cellular Metabolic Stress: Considering How Cells Respond to Nutrient Excess. *Mol. Cell* **40**, 323-332 (2010).

131. Manna, P. & Jain, S. K. Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* **13**, 423-444 (2015).
132. Le Lay, S., Simard, G., Martinez, M. C. & Andriantsitohaina, R. Oxidative Stress and Metabolic Pathologies: From an Adipocentric Point of View. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**, 1-18 (2014).
133. Ozcan, U. *et al.* Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* **306**, 457-61 (2004).
134. Pagliassotti, M., Moran, G., Estrada, A. & Foster, M. T. en *Adipose Tissue and Adipokines in Health and Disease* (eds. Fantuzzi, G. & Braunschweig, C.) 105-114 (Springer Science+Business Media, 2014). doi:10.1007/978-1-62703-770-9_8
135. Kawasaki, N., Asada, R., Saito, A., Kanemoto, S. & Imaizumi, K. Obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes chronic inflammation in adipose tissue. *Sci. Rep.* **2**, 1-7 (2012).
136. Liu, Z. *et al.* Adiponectin reduces ER stress-induced apoptosis through PPAR α transcriptional regulation of ATF2 in mouse adipose. *Cell Death Dis.* **7**, e2487 (2016).
137. Suzuki, T. *et al.* ER Stress Protein CHOP Mediates Insulin Resistance by Modulating Adipose Tissue Macrophage Polarity. *Cell Rep.* **18**, 2045-2057 (2017).
138. Liang, S. & Lappas, M. Endoplasmic reticulum stress is increased in adipose tissue of women with gestational diabetes. *PLoS One* **10**, 1-18 (2015).
139. Zhong, J. en *Type 1 Diabetes* (eds. Escher, A. P. & Li, A.) (InTech, 2013). doi:10.5772/52644
140. Raimo, T. Di. Adipokines and their Involvement as a Target of New Drugs. *J. Pharmacovigil.* **3**, (2015).
141. Leal, V. de O. & Mafra, D. Adipokines in obesity. *Clin. Chim. Acta* **419**, 87-94 (2013).
142. Arner, E. *et al.* Ceruloplasmin is a novel adipokine which is overexpressed in adipose tissue of obese subjects and in obesity-associated cancer cells. *PLoS One* **9**, 1-5 (2014).
143. Grünberg, J. R. *et al.* Overexpressing the novel autocrine/endocrine adipokine WISP2 induces hyperplasia of the heart, white and brown adipose tissues and prevents insulin resistance. *Sci. Rep.* **7**, 1-15 (2017).
144. Tan, X. *et al.* SFRP5 correlates with obesity and metabolic syndrome and increases after weight loss in children. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. **81**, 363-369 (2014).
145. Kern, P. A. *et al.* The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J. Clin. Invest.* **95**, 2111-2119 (1995).
146. Weisberg, S. *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **112**, 1796-1808 (2003).
147. Itai, T., Tanaka, M. & Nagata, S. Processing of tumor necrosis factor by the membrane-bound TNF-alpha-converting enzyme, but not its truncated soluble form. *Eur. J. Biochem.* **268**, 2074-2082 (2001).
148. Hube, F., Birgel, M., Lee, Y. M. & Hauner, H. Expression pattern of tumour necrosis factor receptors in subcutaneous and omental human

- adipose tissue: role of obesity and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur. J. Clin. Invest.* **29**, 672-8 (1999).
149. Uysal, K. T., Wiesbrock, S. M. & Hotamisligil, G. S. Functional Analysis of Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptors in TNF- α -Mediated Insulin Resistance in Genetic Obesity¹. *Endocrinology* **139**, 4832-4838 (1998).
 150. Sethi, J. K. *et al.* Characterisation of receptor-specific TNF α functions in adipocyte cell lines lacking type 1 and 2 TNF receptors. *FEBS Lett.* **469**, 77-82 (2000).
 151. Hube, F. & Hauner, H. The Two Tumor Necrosis Factor Receptors Mediate Opposite Effects on Differentiation and Glucose Metabolism in Human Adipocytes in Primary Culture 1. *Endocrinology* **141**, 2582-2588 (2000).
 152. Stephens, J. M., Lee, J. & Pilch, P. F. Tumor Necrosis Factor- α -induced Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes Is Accompanied by a Loss of Insulin Receptor Substrate-1 and GLUT4 Expression without a Loss of Insulin Receptor-mediated Signal Transduction. *J. Biol. Chem.* **272**, 971-976 (1997).
 153. Ruan, H. *et al.* Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor- α : implications for insulin resistance. *Diabetes* **51**, 3176-88 (2002).
 154. Ruan, H., Hacohen, N., Golub, T. R., Van Parijs, L. & Lodish, H. F. Tumor necrosis factor- α suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: Nuclear factor- κ B activation by TNF- α is obligatory. *Diabetes* **51**, 1319-1336 (2002).
 155. Hirosumi, J. *et al.* A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* **420**, 333-336 (2002).
 156. Werner, E. D., Lee, J., Hansen, L., Yuan, M. & Shoelson, S. E. Insulin resistance due to phosphorylation of insulin receptor substrate-1 at serine 302. *J. Biol. Chem.* **279**, 35298-35305 (2004).
 157. Gao, Z. *et al.* Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor κ B kinase complex. *J. Biol. Chem.* **277**, 48115-48121 (2002).
 158. Emanuelli, B. *et al.* SOCS-3 Inhibits Insulin Signaling and Is Up-regulated in Response to Tumor Necrosis Factor- α in the Adipose Tissue of Obese Mice. *J. Biol. Chem.* **276**, 47944-47949 (2001).
 159. Cawthorn, W. P., Heyd, F., Hegyi, K. & Sethi, J. K. Tumour necrosis factor- α inhibits adipogenesis via a β -catenin/TCF4(TCF7L2)-dependent pathway. *Cell Death Differ.* **14**, 1361-1373 (2007).
 160. Chen, X., Xun, K., Chen, L. & Wang, Y. TNF- α , a potent lipid metabolism regulator. *Cell Biochem. Funct.* **27**, 407-16 (2009).
 161. Sears, B. & Perry, M. The role of fatty acids in insulin resistance. *Lipids Health Dis.* **14**, 121 (2015).
 162. Dahlman, I. *et al.* Downregulation of electron transport chain genes in visceral adipose tissue in type 2 diabetes independent of obesity and possibly involving tumor necrosis factor- α . *Diabetes* **55**, 1792-9 (2006).
 163. Esposito, K. *et al.* Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. *Circulation* **106**, 2067-72 (2002).

164. Houstis, N., Rosen, E. D. & Lander, E. S. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* **440**, 944-8 (2006).
165. Peter, M. E. Targeting of mRNAs by multiple miRNAs: The next step. *Oncogene* **29**, 2161-2164 (2010).
166. Wu, S. *et al.* Multiple microRNAs modulate p21Cip1/Waf1 expression by directly targeting its 3' untranslated region. *Oncogene* **29**, 2302-2308 (2010).
167. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843-54 (1993).
168. Reinhart, B. J. *et al.* The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **403**, 901-906 (2000).
169. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W. & Tuschl, T. Identification of novel genes Coding for RNAs of Small expressed RNAs. *Science (80-.)*. **294**, 853-858 (2001).
170. Griffiths-Jones, S. MiRBase: MicroRNA sequences and annotation. *Curr. Protoc. Bioinforma.* **34**, 1291-12910 (2010).
171. Griffiths-Jones, S., Saini, H. K., Van Dongen, S. & Enright, A. J. miRBase: Tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res.* **36**, 154-158 (2008).
172. Lai, X. & Vera, J. en *Encyclopedia of Systems Biology* 1310-1314 (Springer New York, 2013). doi:10.1007/978-1-4419-9863-7_1121
173. Altuvia, Y. *et al.* Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Res.* **33**, 2697-2706 (2005).
174. Concepcion, C. P., Bonetti, C. & Ventura, A. The MicroRNA-17-92 family of MicroRNA clusters in development and disease. *Cancer J. (United States)* **18**, 262-267 (2012).
175. Wang, Y., Luo, J., Zhang, H. & Lu, J. MicroRNAs in the Same Clusters Evolve to Coordinately Regulate Functionally Related Genes. *Mol. Biol. Evol.* **33**, 2232-2247 (2016).
176. Oszolak, F., Poling, L., Wang, Z., Liu, H. & XS. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev.* **23**, 3172-3183 (2008).
177. Monteys, A. M. *et al.* Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *Rna* **16**, 495-505 (2010).
178. Lee, Y. *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* **23**, 4051-4060 (2004).
179. Ha, M. & Kim, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 509-524 (2014).
180. Lee, Y. *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**, 415-419 (2003).
181. Wu, H., Xu, H., Miraglia, L. J. & Crooke, S. T. Human RNase III is a 160-kDa protein involved in preribosomal RNA processing. *J. Biol. Chem.* **275**, 36957-36965 (2000).
182. Denli, A. M., Tops, B. B. J., Plasterk, R. H. A., Ketting, R. F. & Hannon, G. J. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* **432**, 231-5 (2004).
183. Gregory, R. I. *et al.* The Microprocessor complex mediates the genesis of

- microRNAs. *Nature* **432**, 235-240 (2004).
184. Bohnsack, M. T., Czaplinski, K. & Gorlich, D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* **10**, 185-91 (2004).
185. Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E. & Kutay, U. Nuclear Export of MicroRNA. *Science (80-.)*. **303**, 95-98 (2004).
186. Ketting, R. F. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* **15**, 2654-2659 (2001).
187. Knight, S. W. & Bass, B. L. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **293**, 2269-71 (2001).
188. Tsutsumi, A., Kawamata, T., Izumi, N., Seitz, H. & Tomari, Y. Recognition of the pre-miRNA structure by *Drosophila*-Dicer-1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 1153-1158 (2010).
189. Park, J. E. *et al.* Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. *Nature* **475**, 201-205 (2011).
190. Tian, Y. *et al.* A Phosphate-Binding Pocket within the Platform-PAZ-Connector Helix Cassette of Human Dicer. *Mol. Cell* **53**, 606-616 (2014).
191. Zhang, H., Kolb, F. A., Jaskiewicz, L., Westhof, E. & Filipowicz, W. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* **118**, 57-68 (2004).
192. Hammond, S. M., Boettcher, S., Caudy, A. A., Kobayashi, R. & Hannon, G. J. Argonaute2, a linke between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science (80-.)*. **293**, 1146-1150 (2001).
193. Chendrimada, T. P. *et al.* TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* **436**, 740-744 (2005).
194. Wilson, R. C. *et al.* Dicer-TRBP complex formation ensures accurate mammalian microRNA biogenesis. *Mol. Cell* **57**, 397-407 (2015).
195. Schirle, N. T. & MacRae, I. J. The Crystal Structure of Human Argonaute2. *Science (80-.)*. **336**, 1037-1040 (2012).
196. Frank, F., Sonenberg, N. & Nagar, B. Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature* **465**, 818-22 (2010).
197. Kawamata, T., Seitz, H. & Tomari, Y. Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 953-960 (2009).
198. Yoda, M. *et al.* ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 17-24 (2010).
199. Kawamata, T. & Tomari, Y. Making RISC. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 368-376 (2010).
200. Pasquinelli, A. E. MicroRNAs and their targets: Recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 271-282 (2012).
201. Bartel, D. P. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* **136**, 215-233 (2009).
202. Ameres, S. L. & Zamore, P. D. Diversifying microRNA sequence and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 475-488 (2013).
203. Djuranovic, S., Nahvi, A. & Green, R. miRNA-Mediated Gene Silencing.

- 336**, 237-241 (2012).
204. Béthune, J., Artus-Revel, C. G. & Filipowicz, W. Kinetic analysis reveals successive steps leading to miRNA-mediated silencing in mammalian cells. *EMBO Rep.* **13**, 716-723 (2012).
 205. Mathonnet, G. *et al.* MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science (80-)*. **317**, 1764-1767 (2007).
 206. Ricci, E. P. *et al.* Activation of a microRNA response in trans reveals a new role for poly(A) in translational repression. *Nucleic Acids Res.* **39**, 5215-5231 (2011).
 207. Chekulava, M. *et al.* MiRNA repression involves GW182-mediated recruitment of CCR4-NOT through conserved W-containing motifs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 1218-1226 (2011).
 208. Braun, J. E., Huntzinger, E., Fauser, M. & Izaurralde, E. GW182 proteins directly recruit cytoplasmic deadenylase complexes to miRNA targets. *Mol. Cell* **44**, 120-133 (2011).
 209. Huntzinger, E. *et al.* The interactions of GW182 proteins with PABP and deadenylases are required for both translational repression and degradation of miRNA targets. *Nucleic Acids Res.* **41**, 978-994 (2013).
 210. Meijer, H. a *et al.* Translational repression and eIF4A2 activity are critical for microRNA-mediated gene regulation. *Science* **340**, 82-5 (2013).
 211. Jackson, R. J., Hellen, C. U. T. & Pestova, T. V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 113-127 (2010).
 212. Behm-Ansmant, I. *et al.* mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4: NOT deadenylase and DCP1: DCP2 decapping complexes. *Genes Dev.* **20**, 1885-1898 ST-MRNA degradation by miRNAs and GW1 (2006).
 213. Eulalio, A. *et al.* Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *RNA* **15**, 21-32 (2009).
 214. Chen, C. Y. A., Zheng, D., Xia, Z. & Shyu, A. Bin. Ago-TNRC6 triggers microRNA-mediated decay by promoting two deadenylation steps. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 1160-1166 (2009).
 215. Nishihara, T., Zekri, L., Braun, J. E. & Izaurralde, E. MiRISC recruits decapping factors to miRNA targets to enhance their degradation. *Nucleic Acids Res.* **41**, 8692-8705 (2013).
 216. Witkos, T. M., Koscińska, E. & Krzyżosiak, W. J. Practical Aspects of microRNA Target Prediction. *Curr. Mol. Med.* **11**, 93-109 (2011).
 217. Reyes-Herrera, P. H. & Ficarra, E. One decade of development and evolution of microRNA target prediction algorithms. *Genomics. Proteomics Bioinformatics* **10**, 254-63 (2012).
 218. Peterson, S. M. *et al.* Common features of microRNA target prediction tools. *Front. Genet.* **5**, 1-10 (2014).
 219. Arner, P. & Kulyté, A. MicroRNA regulatory networks in human adipose tissue and obesity. *Nat. Rev. Endocrinol.* **11**, 276-288 (2015).
 220. Zaiou, M., El Amri, H. & Bakillah, A. The clinical potential of adipogenesis and obesity-related microRNAs. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* (2017). doi:10.1016/j.numecd.2017.10.015

221. Iacomino, G. & Siani, A. Role of microRNAs in obesity and obesity-related diseases. *Genes Nutr.* **12**, 23 (2017).
222. Heneghan, H. M., Miller, N., McAnena, O. J., O'Brien, T. & Kerin, M. J. Differential miRNA expression in omental adipose tissue and in the circulation of obese patients identifies novel metabolic biomarkers. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, 846-850 (2011).
223. Martinelli, R. *et al.* miR-519d overexpression is associated with human obesity. *Obesity (Silver Spring)*. **18**, 2170-6 (2010).
224. Ortega, F. J. *et al.* Inflammation triggers specific microRNA profiles in human adipocytes and macrophages and in their supernatants. *Clin. Epigenetics* **7**, 49 (2015).
225. Keller, P. *et al.* Gene-chip studies of adipogenesis-regulated microRNAs in mouse primary adipocytes and human obesity. *BMC Endocr. Disord.* **11**, 7 (2011).
226. Arner, E. *et al.* Adipose tissue microRNAs as regulators of CCL2 production in human obesity. *Diabetes* **61**, 1986-93 (2012).
227. Meerson, A. *et al.* Human adipose microRNA-221 is upregulated in obesity and affects fat metabolism downstream of leptin and TNF- α . *Diabetologia* **56**, 1971-9 (2013).
228. Capobianco, V. *et al.* miRNA and protein expression profiles of visceral adipose tissue reveal miR-141/YWHAG and miR-520e/RAB11A as two potential miRNA/protein target pairs associated with severe obesity. *J. Proteome Res.* **11**, 3358-69 (2012).
229. 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).
230. Diawara, M. R. *et al.* Adaptive expression of microRNA-125a in adipose tissue in response to obesity in mice and men. *PLoS One* **9**, e91375 (2014).
231. Oger, F. *et al.* Cell-specific dysregulation of microRNA expression in obese white adipose tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **99**, 2821-33 (2014).
232. 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).
233. Mysore, R. *et al.* MicroRNA-192* impairs adipocyte triglyceride storage. *Biochim. Biophys. Acta* **1861**, 342-51 (2016).
234. 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).
235. Pang, L. *et al.* miR-1275 inhibits adipogenesis via ELK1 and its expression decreases in obese subjects. *J. Mol. Endocrinol.* **57**, 33-43 (2016).
236. Pek, S. L. T. *et al.* Circulating and visceral adipose miR-100 is down-regulated in patients with obesity and Type 2 diabetes. *Mol. Cell. Endocrinol.* **427**, 112-23 (2016).
237. Roos, J. *et al.* miR-146a-mediated suppression of the inflammatory response in human adipocytes. *Sci. Rep.* **6**, 38339 (2016).
238. de Ferranti, S. & Mozaffarian, D. The Perfect Storm: Obesity, Adipocyte

- Dysfunction, and Metabolic Consequences. *Clin. Chem.* **54**, 945-955 (2008).
239. Armani, A. *et al.* Cellular models for understanding adipogenesis, adipose dysfunction, and obesity. *J. Cell. Biochem.* **110**, 564-72 (2010).
240. McGregor, R. A. & Choi, M. S. microRNAs in the regulation of adipogenesis and obesity. *Curr. Mol. Med.* **11**, 304-16 (2011).
241. Chen, L. *et al.* MicroRNAs regulate adipocyte differentiation. *Cell Biol. Int.* **37**, 533-546 (2013).
242. Kim, Y. J., Hwang, S. J., Bae, Y. C. & Jung, J. S. MiR-21 regulates adipogenic differentiation through the modulation of TGF-beta signaling in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. *Stem Cells* **27**, 3093-102 (2009).
243. Mei, Y. *et al.* MiR-21 modulates the ERK-MAPK signaling pathway by regulating SPRY2 expression during human mesenchymal stem cell differentiation. *J. Cell. Biochem.* **114**, 1374-1384 (2013).
244. Zaragosi, L. E. *et al.* Small RNA sequencing reveals miR-642a-3p as a novel adipocyte-specific microRNA and miR-30 as a key regulator of human adipogenesis. *Genome Biol.* **12**, (2011).
245. Wang, J. *et al.* miR-30e reciprocally regulates the differentiation of adipocytes and osteoblasts by directly targeting low-density lipoprotein receptor-related protein 6. *Cell Death Dis.* **4**, (2013).
246. Karbiener, M. *et al.* MicroRNA-30c promotes human adipocyte differentiation and co-represses PAI-1 and ALK2. *RNA Biol.* **8**, 850-60 (2011).
247. Karbiener, M. *et al.* microRNA miR-27b impairs human adipocyte differentiation and targets PPAR γ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **390**, 247-251 (2009).
248. Kim, S. Y. *et al.* miR-27a is a negative regulator of adipocyte differentiation via suppressing PPAR γ expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **392**, 323-328 (2010).
249. Lee, E. K. *et al.* miR-130 Suppresses Adipogenesis by Inhibiting Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Expression. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 626-638 (2011).
250. Liu, S., Yang, Y. & Wu, J. TNF α -induced up-regulation of miR-155 inhibits adipogenesis by down-regulating early adipogenic transcription factors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **414**, 618-624 (2011).
251. Lorente-Cebrián, S. *et al.* MicroRNAs regulate human adipocyte lipolysis: Effects of miR-145 are linked to TNF-?? *PLoS One* **9**, 1-10 (2014).
252. Ling, H. Y. *et al.* MiRNA-21 reverses high glucose and high insulin induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes through targeting phosphatase and tensin homologue. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **120**, 553-559 (2012).
253. Zhang, N. *et al.* Adipokines and free fatty acids regulate insulin sensitivity by increasing microRNA-21 expression in human mature adipocytes. *Mol. Med. Rep.* **16**, 2254-2258 (2017).
254. Chen, Y. H. *et al.* Mirna-93 inhibits glut4 and is overexpressed in adipose tissue of polycystic ovary syndrome patients and women with insulin resistance. *Diabetes* **62**, 2278-2286 (2013).

255. Chuang, T.-Y. *et al.* MicroRNA-223 Expression Is Upregulated in Insulin Resistant Human Adipose Tissue. *J. Diabetes Res.* **2015**, 1-8 (2015).
256. Klötting, N. *et al.* MicroRNA expression in human omental and subcutaneous adipose tissue. *PLoS One* **4**, 2-7 (2009).
257. Xu, G. *et al.* Modulation of hsa-miR-26b levels following adipokine stimulation. *Mol. Biol. Rep.* **40**, 3577-82 (2013).
258. Xu, G. *et al.* MiR-26b modulates insulin sensitivity in adipocytes by interrupting the PTEN/PI3K/AKT pathway. *Int. J. Obes.* **39**, 1523-1530 (2015).
259. Trajkovski, M. *et al.* MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity. *Nature* **474**, 649-653 (2011).
260. Ling, H.-Y. *et al.* Changes in microRNA (miR) profile and effects of miR-320 in insulin-resistant 3T3-L1 adipocytes. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **36**, e32-9 (2009).
261. Zhu, L. L. L. *et al.* MiR-335, an Adipogenesis-Related MicroRNA, is Involved in Adipose Tissue Inflammation. *Cell Biochem. Biophys.* **68**, 283-290 (2014).
262. Karkeni, E. *et al.* Obesity-associated inflammation induces microRNA-155 expression in adipocytes and adipose tissue: Outcome on adipocyte function. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **101**, 1615-1626 (2016).
263. Kim, C. *et al.* TNF α -induced miR-130 resulted in adipocyte dysfunction during obesity-related inflammation. *FEBS Lett.* **587**, 3853-3858 (2013).
264. Zhang, M., Zhou, Z., Wang, J. & Li, S. MiR-130b promotes obesity associated adipose tissue inflammation and insulin resistance in diabetes mice through alleviating M2 macrophage polarization via repression of PPAR- γ . *Immunol. Lett.* **180**, 1-8 (2016).
265. Shi, C. *et al.* IL-6 and TNF- α Induced Obesity-Related Inflammatory Response Through Transcriptional Regulation of miR-146b. *J. Interf. Cytokine Res.* **34**, 342-348 (2014).
266. Hulsmans, M. *et al.* Decreased miR-181a Expression in Monocytes of Obese Patients Is Associated with the Occurrence of Metabolic Syndrome and Coronary Artery Disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **97**, E1213-E1218 (2012).
267. Wu, D. *et al.* miR-146a-5p inhibits TNF- α -induced adipogenesis via targeting insulin receptor in primary porcine adipocytes. *J. Lipid Res.* **57**, 1360-1372 (2016).
268. Peng, J. *et al.* MiR-377 promotes white adipose tissue inflammation and decreases insulin sensitivity in obesity via suppression of sirtuin-1 (SIRT1). *Oncotarget* **8**, 70550-70563 (2017).
269. Sun, X. *et al.* MicroRNA-181b improves glucose homeostasis and insulin sensitivity by regulating endothelial function in white adipose tissue. *Circ. Res.* **118**, 810-821 (2016).
270. Strum, J. C. *et al.* MicroRNA 132 regulates nutritional stress-induced chemokine production through repression of SirT1. *Mol. Endocrinol.* **23**, 1876-1884 (2009).
271. Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K.-J. K.-J. & Baltimore, D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 12481-6 (2006).

272. Hulsmans, M., van Dooren, E., Mathieu, C. & Holvoet, P. Decrease of miR-146b-5p in monocytes during obesity is associated with loss of the anti-inflammatory but not insulin signaling action of adiponectin. *PLoS One* **7**, (2012).
273. Elton, T. S., Selemon, H., Elton, S. M. & Parinandi, N. L. Regulation of the MIR155 host gene in physiological and pathological processes. *Gene* **532**, 1-12 (2013).
274. Kauppinen, A., Suuronen, T., Ojala, J., Kaarniranta, K. & Salminen, A. Antagonistic crosstalk between NF- κ B and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders. *Cell. Signal.* **25**, 1939-48 (2013).
275. Lynn, F. C. *et al.* MicroRNA expression is required for pancreatic islet cell genesis in the mouse. *Diabetes* **56**, 2938 (2007).
276. Melkman-Zehavi, T. *et al.* miRNAs control insulin content in pancreatic β -cells via downregulation of transcriptional repressors. *EMBO J.* **30**, 835-45 (2011).
277. Poy, M. N. *et al.* A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* **432**, 226-30 (2004).
278. Poy, M. N. *et al.* miR-375 maintains normal pancreatic α - and β -cell mass. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 5813-5818 (2009).
279. Plaisance, V. *et al.* MicroRNA-9 controls the expression of Granuphilin/Slp4 and the secretory response of insulin-producing cells. *J. Biol. Chem.* **281**, 26932-42 (2006).
280. Kong, L. *et al.* Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: A clinical study. *Acta Diabetol.* **48**, 61-69 (2011).
281. Belgardt, B.-F. *et al.* The microRNA-200 family regulates pancreatic beta cell survival in type 2 diabetes. *Nat. Med.* **21**, 619-627 (2015).
282. Gallagher, I. J. *et al.* Integration of microRNA changes in vivo identifies novel molecular features of muscle insulin resistance in type 2 diabetes. *Genome Med.* **2**, 1-18 (2010).
283. Zhang, Y. *et al.* MicroRNA-106b induces mitochondrial dysfunction and insulin resistance in C2C12 myotubes by targeting mitofusin-2. *Mol. Cell. Endocrinol.* **381**, 230-240 (2013).
284. Sebastian, D. *et al.* Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 5523-5528 (2012).
285. Agarwal, P., Srivastava, R., Srivastava, A. K., Ali, S. & Datta, M. MiR-135a targets IRS2 and regulates insulin signaling and glucose uptake in the diabetic gastrocnemius skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1832**, 1294-1303 (2013).
286. Ryu, H. S., Park, S. Y., Ma, D., Zhang, J. & Lee, W. The induction of microrna targeting IRS-1 is involved in the development of insulin resistance under conditions of mitochondrial dysfunction in hepatocytes. *PLoS One* **6**, (2011).
287. Jordan, S. D. *et al.* Obesity-induced overexpression of miRNA-143 inhibits insulin-stimulated AKT activation and impairs glucose metabolism. *Nat. Cell Biol.* **13**, 434-448 (2011).
288. Liu, W. *et al.* Hepatic miR-378 targets p110 α and controls glucose and

- lipid homeostasis by modulating hepatic insulin signalling. *Nat. Commun.* **5**, 5684 (2014).
289. Sohel, M. H. Extracellular/Circulating MicroRNAs: Release Mechanisms, Functions and Challenges. *Achiev. Life Sci.* **10**, 175-186 (2016).
290. Thomou, T. *et al.* Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues. *Nature* **542**, 450-455 (2017).
291. Kogure, T., Lin, W. L., Yan, I. K., Braconi, C. & Patel, T. Intercellular nanovesicle-mediated microRNA transfer: A mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth. *Hepatology* **54**, 1237-1248 (2011).
292. Montecalvo, A. *et al.* Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* **119**, 756-766 (2012).
293. Valadi, H. *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* **9**, 654-9 (2007).
294. Ying, W. *et al.* Adipose Tissue Macrophage-Derived Exosomal miRNAs Can Modulate in Vivo and in Vitro Insulin Sensitivity. *Cell* **171**, 372-384.e12 (2017).
295. Zhang, Y. *et al.* Adipocyte-derived microvesicles from obese mice induce M1 macrophage phenotype through secreted miR-155. **8**, 1-13 (2016).
296. Párrizas, M. & Novials, A. Circulating microRNAs as biomarkers for metabolic disease. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **30**, 591-601 (2016).
297. Cheng, G. Circulating miRNAs: roles in cancer diagnosis, prognosis and therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **81**, 75-93 (2015).
298. Thompson, M. D., Cismowski, M. J., Serpico, M., Pusateri, A. & Brigstock, D. R. Elevation of circulating microRNA levels in obese children compared to healthy controls. *Clin. Obes.* **7**, 216-221 (2017).
299. 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).
300. Wang, F. *et al.* Atherosclerosis-Related Circulating miRNAs as Novel and Sensitive Predictors for Acute Myocardial Infarction. *PLoS One* **9**, e105734 (2014).
301. Kim, J.-M. *et al.* Atherosclerosis-Related Circulating MicroRNAs as a Predictor of Stroke Recurrence. *Transl. Stroke Res.* **6**, 191-197 (2015).
302. Wu, L. *et al.* Profiling peripheral microRNAs in obesity and type 2 diabetes mellitus. *APMIS* **123**, 580-585 (2015).
303. Prats-Puig, A. *et al.* Changes in circulating microRNAs are associated with childhood obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **98**, E1655-60 (2013).
304. Shah, R. *et al.* Extracellular RNAs Are Associated With Insulin Resistance and Metabolic Phenotypes. *Diabetes Care* **40**, 546-553 (2017).
305. Wang, R. *et al.* Elevated circulating microRNA-122 is associated with obesity and insulin resistance in young adults. *Eur. J. Endocrinol.* **172**, 291-300 (2015).
306. Giardina, S. *et al.* Changes in circulating miRNAs in healthy overweight and obese subjects: Effect of diet composition and weight loss. *Clin.*

- Nutr.* (2017). doi:10.1016/j.clnu.2017.11.014
307. Karolina, D. S. *et al.* Circulating miRNA Profiles in Patients with Metabolic Syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **97**, E2271-E2276 (2012).
 308. Li, Z. & Rana, T. M. Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* **13**, 622-38 (2014).
 309. van Rooij, E. & Kauppinen, S. Development of microRNA therapeutics is coming of age. *EMBO Mol. Med.* **6**, 851-64 (2014).
 310. Rupaimoole, R. & Slack, F. J. MicroRNA therapeutics: Towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 203-221 (2017).
 311. Christopher, A. *et al.* MicroRNA therapeutics: Discovering novel targets and developing specific therapy. *Perspect. Clin. Res.* **7**, 68 (2016).
 312. Esau, C. *et al.* miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab.* **3**, 87-98 (2006).
 313. Andersson, P. *et al.* Plasma levels of liver-specific miR-122 is massively increased in a porcine cardiogenic shock model and attenuated by hypothermia. *Shock* **37**, 234-8 (2012).
 314. Ortega, F. J. *et al.* Targeting the circulating microRNA signature of obesity. *Clin. Chem.* **59**, 781-92 (2013).
 315. Wabitsch, M. *et al.* Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation. *Int. J. Obes.* **25**, 8-15 (2001).
 316. Fischer-Posovszky, P., Newell, F. S., Wabitsch, M. & Tornqvist, H. E. Human SGBS Cells – a Unique Tool for Studies of Human Fat Cell Biology. *Obes. Facts* **1**, 184-189 (2008).
 317. Vogelstein, B. & Gillespie, D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 615-619 (1979).
 318. Schneppenheim, R. & Rautenberg, P. A Luminescence western blot with enhanced sensitivity for antibodies to human immunodeficiency virus. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **Vol.6, No.**, 49-51 (1991).
 319. Karlsen, F., Steen, H. B. & Nesland, J. M. SYBR Green I DNA staining increases the detection sensitivity of viruses by polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* **55**, 153-156 (1995).
 320. Bustin, S. A. Absolute quantification of mrna using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* **25**, 169-193 (2000).
 321. Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R. & Gelfand, D. H. Detection of Specific Polymerase Chain-Reaction Product By Utilizing the 5'-3' Exonuclease Activity of *Thermus-Aquaticus* Dna-Polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 7276-7280 (1991).
 322. Betel, D., Wilson, M., Gabow, A., Marks, D. S. & Sander, C. The microRNA.org resource: Targets and expression. *Nucleic Acids Res.* **36**, 149-153 (2008).
 323. Enright, A. J. *et al.* MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol.* **5**, R1 (2003).
 324. Reczko, M., Maragkakis, M., Alexiou, P., Grosse, I. & Hatzigeorgiou, A. G. Functional microRNA targets in protein coding sequences. *Bioinformatics* **28**, 771-776 (2012).

325. Paraskevopoulou, M. D. *et al.* DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows. *Nucleic Acids Res.* **41**, 169-173 (2013).
326. Maragkakis, M. *et al.* DIANA-microT web server: Elucidating microRNA functions through target prediction. *Nucleic Acids Res.* **37**, 273-276 (2009).
327. Enlund, E. *et al.* Establishment of lipofection for studying miRNA function in human adipocytes. *PLoS One* **9**, 1-8 (2014).
328. Felgner, P. L. *et al.* Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 7413-7 (1987).
329. Vendrell, J. *et al.* Tumor necrosis-like weak inducer of apoptosis as a proinflammatory cytokine in human adipocyte cells: Up-regulation in severe obesity is mediated by inflammation but not hypoxia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **95**, 2983-2992 (2010).
330. Soriguer, F. *et al.* Incidence of type 2 diabetes in southern Spain (Pizarra Study). *Eur. J. Clin. Invest.* **38**, 126-133 (2008).
331. Soriguer, F. *et al.* Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia* **55**, 88-93 (2012).
332. Gromski, P. S. *et al.* A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis - a marriage of convenience or a shotgun wedding. *Anal. Chim. Acta* **879**, 10-23 (2015).
333. Xia, J. & Wishart, D. S. Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst. *Nat. Protoc.* **6**, 743-760 (2011).
334. Cawthorn, W. P. & Sethi, J. K. Europe PMC Funders Group TNF- α and adipocyte biology. *Fed. Eur. Biochem. Soc.* **582**, 117-131 (2015).
335. Heilbronn, L. & Campbell, L. Adipose Tissue Macrophages, Low Grade Inflammation and Insulin Resistance in Human Obesity. *Curr. Pharm. Des.* **14**, 1225-1230 (2008).
336. Hube, F. & Hauner, H. The role of TNF-alpha in human adipose tissue: prevention of weight gain at the expense of insulin resistance? *Horm Metab Res* **31**, 626-631 (1999).
337. Palmieri, D. *et al.* TNF α induces the expression of genes associated with endothelial dysfunction through p38MAPK-mediated down-regulation of miR-149. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **443**, 246-251 (2014).
338. Ruan, W., Xu, J. M., Li, S. B., Yuan, L. Q. & Dai, R. P. Effects of down-regulation of microRNA-23a on TNF- α -induced endothelial cell apoptosis through caspase-dependent pathways. *Cardiovasc. Res.* **93**, 623-632 (2012).
339. Sun, X. *et al.* MicroRNA-181b regulates NF- κ B - mediated vascular inflammation. *J Clin Invest* **122**, 1-18 (2012).
340. Eisenreich, A. & Rauch, U. Regulation of the Tissue Factor Isoform Expression and Thrombogenicity of HMEC-1 by miR-126 and miR-19a. *Cell Biol. Res. Ther.* **2**, 1-6 (2013).
341. Xie, H., Lim, B. & Lodish, H. F. MicroRNAs induced during adipogenesis that accelerate fat cell development are downregulated in obesity. *Diabetes* **58**, 1050-1057 (2009).
342. Meyer, S. U. *et al.* TNF- α and IGF1 modify the microRNA signature in skeletal muscle cell differentiation. *Cell Commun. Signal.* **13**, 4 (2015).

343. Alexy, T., Rooney, K., Weber, M., Gray, W. D. & Searles, C. D. TNF-alpha alters the release and transfer of microparticle-encapsulated miRNAs from endothelial cells. *Physiol Genomics* **46**, 833-840 (2014).
344. Kutty, R. K. *et al.* Differential regulation of microRNA-146a and microRNA-146b-5p in human retinal pigment epithelial cells by interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α , and interferon- γ . *Mol. Vis.* **19**, 737-50 (2013).
345. Kutty, R. K. *et al.* Inflammatory cytokines regulate microRNA-155 expression in human retinal pigment epithelial cells by activating JAK/STAT pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **402**, 390-395 (2010).
346. Bazzoni, F. *et al.* Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 5282-7 (2009).
347. Estep, M. *et al.* Differential expression of miRNAs in the visceral adipose tissue of patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **32**, 487-497 (2010).
348. Li, H. *et al.* MiRNA-181a Regulates Adipogenesis by Targeting Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) in the Porcine Model. *PLoS One* **8**, 1-11 (2013).
349. Wu, C. *et al.* microRNA-181a represses ox-LDL-stimulated inflammatory response in dendritic cell by targeting c-Fos. *J. Lipid Res.* **53**, 2355-63 (2012).
350. Xie, W. *et al.* miR-181a Regulates Inflammation Responses in Monocytes and Macrophages. *PLoS One* **8**, e58639 (2013).
351. Galicia, J. C., Naqvi, A. R., Ko, C.-C., Nares, S. & Khan, A. A. MiRNA-181a regulates Toll-like receptor agonist-induced inflammatory response in human fibroblasts. *Genes Immun.* **15**, 333-7 (2009).
352. Henaoui-Mejia, J. *et al.* The MicroRNA miR-181 Is a Critical Cellular Metabolic Rheostat Essential for NKT Cell Ontogenesis and Lymphocyte Development and Homeostasis. *Immunity* **38**, 984-997 (2013).
353. Belarbi, Y. *et al.* MicroRNA-193b Controls Adiponectin Production in Human White Adipose Tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **100**, E1084-8 (2015).
354. Mohamed, J. S., Hajira, A., Pardo, P. S. & Boriek, A. M. MicroRNA-149 inhibits PARP-2 and promotes mitochondrial biogenesis via SIRT-1/PGC-1 α network in skeletal muscle. *Diabetes* **63**, 1546-1559 (2014).
355. Santini, P., Politi, L., Vedova, P. D., Scandurra, R. & Scotto D'Abusco, A. The inflammatory circuitry of miR-149 as a pathological mechanism in osteoarthritis. *Rheumatol. Int.* **34**, 711-716 (2014).
356. Xu, G. *et al.* MicroRNA-149 negatively regulates TLR-triggered inflammatory response in macrophages by targeting MyD88. *J. Cell. Biochem.* **115**, 919-927 (2014).
357. Peng, P., Li, Z. & Liu, X. Reduced Expression of miR-23a Suppresses A20 in TLR-stimulated Macrophages. *Inflammation* **38**, 1787-1793 (2015).
358. Yang, Z. *et al.* Serum miR-23a, a potential biomarker for diagnosis of pre-diabetes and type 2 diabetes. *Acta Diabetol.* **51**, 823-831 (2014).
359. Nakanishi, N. *et al.* The up-regulation of microRNA-335 is associated

- with lipid metabolism in liver and white adipose tissue of genetically obese mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **385**, 492-496 (2009).
360. Párrizas, M. *et al.* Circulating miR-192 and miR-193b are markers of prediabetes and are modulated by an exercise intervention. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **100**, E407-E415 (2015).
361. Sebastiani, G. *et al.* MicroRNA profiling in sera of patients with type 2 diabetes mellitus reveals an upregulation of miR-31 expression in subjects with microvascular complications. *J. Biomed. Sci. Eng.* **6**, 58-64 (2013).
362. Motawae, T. M., Ismail, M. F., Shabayek, M. I. & Seleem, M. M. MicroRNAs 9 and 370 association with biochemical markers in T2D and CAD complication of T2D. *PLoS One* **10**, 1-9 (2015).
363. Villard, A. & Marchand, L. Diagnostic Value of Cell-free Circulating Micrnas for Obesity and Type 2 Diabetes: A Meta-analysis. *J. Mol. Biomark. Diagn.* **6**, 84-91 (2015).
364. Ma, S. *et al.* A double feedback loop mediated by microRNA-23a/27a/24-2 regulates M1 versus M2 macrophage polarization and thus regulates cancer progression. *Oncotarget* **7**, 13502-13519 (2015).
365. Dangwal, S. *et al.* Impairment of Wound Healing in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus Influences Circulating MicroRNA Patterns via Inflammatory Cytokines. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**, 1480-1488 (2015).
366. Goswami, R. S. *et al.* Optimization and analysis of a quantitative real-time PCR-based technique to determine microRNA expression in formalin-fixed paraffin-embedded samples. *BMC Biotechnol.* **10**, 47 (2010).
367. Bockmeyer, C. L. *et al.* Comparison of different normalization strategies for the analysis of glomerular microRNAs in IgA nephropathy. *Sci. Rep.* **6**, 1-14 (2016).
368. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-8 (2001).
369. Cao, Y. L., Hu, C. Z., Meng, X., Wang, D. F. & Zhang, J. Expression of TNF- α protein in omental and subcutaneous adipose tissue in obesity. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **79**, 214-219 (2008).
370. Chin, W. W. en *Modern methods for business research* (ed. Marcoulides, G. A.) 265-336 (Lawrence Erlbaum Associates, 1998).
371. Kim, C.-S. *et al.* Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters. *Int. J. Obes. (Lond)*. **30**, 1347-55 (2006).
372. Borges, M. *et al.* Imbalance between adipokines and cytokines can promote obesity-related disorders. *Endocrine, Metab. Immune Disord. - Drug Targets* **18**, (2018).
373. Hotamisligil, G. S., Murray, D. L., Choy, L. N. & Spiegelman, B. M. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 4854-4858 (1994).
374. Akash, M. S. H., Rehman, K. & Liaqat, A. Tumor Necrosis Factor-Alpha: Role in Development of Insulin Resistance and Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *J. Cell. Biochem.* **119**, 105-110 (2018).

375. Dimitriadis, G., Mitrou, P., Lambadiari, V., Maratou, E. & Raptis, S. A. Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **93 Suppl 1**, S52-9 (2011).
376. Mfinea, C. P. *et al.* AS160, the Akt substrate regulating GLUT4 translocation, has a functional Rab GTPase-activating protein domain. *Biochem. J.* **391**, 87-93 (2005).
377. Zhang, J., Gao, Z., Yin, J., Quon, M. J. & Ye, J. S6K directly phosphorylates IRS-1 on Ser-270 to promote insulin resistance in response to TNF- α signaling through IKK2. *J. Biol. Chem.* **283**, 35375-35382 (2008).
378. Kobashi, C. *et al.* Inhibitory effect of IL-8 on insulin action in human adipocytes via MAP kinase pathway. *J. Inflamm.* **6**, 25 (2009).
379. Wang, B., Jenkins, J. R. & Trayhurn, P. Expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture: integrated response to TNF-alpha. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **288**, E731-40 (2005).
380. Rotter, V., Nagaev, I. & Smith, U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J. Biol. Chem.* **278**, 45777-84 (2003).
381. Katome, T. *et al.* Use of RNA Interference-mediated Gene Silencing and Adenoviral Overexpression to Elucidate the Roles of AKT/Protein Kinase B Isoforms in Insulin Actions. *J. Biol. Chem.* **278**, 28312-28323 (2003).
382. Lozano-Bartolomé, J. *et al.* Altered Expression of miR-181a-5p and miR-23a-3p Is Associated With Obesity and TNF α -Induced Insulin Resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **103**, 1447-1458 (2018).
383. Fatati, G., Mirri, E. & Coaccioli, S. Effects of visceral fat accumulation in obesity and type 2 diabetes. *Med. J. Nutrition Metab.* **2**, 111-118 (2009).
384. Ozer Cakir, O. & Yildiz, M. Visceral Fat Volume is a Better Predictor for Insulin Resistance than Abdominal Wall Fat Index in Patients with Prediabetes and Type 2 Diabetes Mellitus. *Intern. Med. Open Access* **6**, (2016).
385. von Hafe, P., Pina, F., Pérez, A., Tavares, M. & Barros, H. Visceral fat accumulation as a risk factor for prostate cancer. *Obes. Res.* **12**, 1930-5 (2004).
386. Oh, T.-H. *et al.* Visceral obesity as a risk factor for colorectal neoplasm. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **23**, 411-7 (2008).
387. Abraham, T. M., Pedley, A., Massaro, J. M., Hoffmann, U. & Fox, C. S. Association between visceral and subcutaneous adipose depots and incident cardiovascular disease risk factors. *Circulation* **132**, 1639-47 (2015).
388. Fox, C. S. *et al.* Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* **116**, 39-48 (2007).
389. Park, B. J. *et al.* Visceral adipose tissue area is an independent risk factor for hepatic steatosis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **23**, 900-7 (2008).
390. Magnuson, B., Ekim, B. & Fingar, D. C. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem. J.* **441**, 1-21 (2012).

391. Wang, T. *et al.* Evodiamine inhibits insulin-stimulated mTOR-S6K activation and IRS1 serine phosphorylation in adipocytes and improves glucose tolerance in obese/diabetic mice. *PLoS One* **8**, (2013).
392. Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **36**, 59-74 (1977).
393. Thomas, P. & Smart, T. G. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **51**, 187-200 (2005).
394. Shembade, N., Ma, A. & Harhaj, E. W. Inhibition of nf-kb signaling by a20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes. *Science (80-.).* **327**, 1135-1139 (2010).
395. Vasudevan, K. M., Gurumurthy, S. & Rangnekar, V. M. Suppression of PTEN expression by NF-kappa B prevents apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 1007-21 (2004).
396. Cursons, J. *et al.* Post - transcriptional control of EMT is coordinated through combinatorial targeting by multiple microRNAs. 1-31 (2017).
397. Liu, G., Li, Y. & Gao, X.-G. microRNA-181a is upregulated in human atherosclerosis plaques and involves in the oxidative stress-induced endothelial cell dysfunction through direct targeting Bcl-2. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **20**, 3092-100 (2016).
398. Ouyang, D. *et al.* MiR-181a-5p regulates 3T3-L1 cell adipogenesis by targeting Smad7 and Tcf712. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **48**, 1034-1041 (2016).
399. Chu, B., Wu, T., Miao, L., Mei, Y. & Wu, M. MiR-181a regulates lipid metabolism via IDH1. *Sci. Rep.* **5**, 8801 (2015).
400. Du, X. *et al.* Upregulation of miR-181a impairs hepatic glucose and lipid homeostasis. *Oncotarget* **8**, 91362-91378 (2017).
401. Zhou, B. *et al.* Downregulation of miR-181a upregulates sirtuin-1 (SIRT1) and improves hepatic insulin sensitivity. *Diabetologia* **55**, 2032-43 (2012).
402. Mayoral, R. *et al.* Adipocyte SIRT1 knockout promotes PPAR γ activity, adipogenesis and insulin sensitivity in chronic-HFD and obesity. *Mol. Metab.* **4**, 378-91 (2015).
403. Li, Q. J. *et al.* miR-181a Is an Intrinsic Modulator of T Cell Sensitivity and Selection. *Cell* **129**, 147-161 (2007).
404. Chen, C.-Z., Li, L., Lodish, H. F. & Bartel, D. P. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* **303**, 83-6 (2004).
405. Zhang, S., Chen, J., Zhang, J. & Xu, J. miR-181a involves in the hippocampus-dependent memory formation via targeting PRKAA1. *Sci. Rep.* **7**, 8480 (2017).
406. Li, W. A., Efendizade, A. & Ding, Y. The role of microRNA in neuronal inflammation and survival in the post ischemic brain: a review. *Neurol. Res.* 1-9 (2017). doi:10.1080/01616412.2017.1327505
407. Kim, S.-J. *et al.* Melatonin ameliorates ER stress-mediated hepatic steatosis through miR-23a in the liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **458**, 462-469 (2015).
408. Di, Y., Zhang, D., Hu, T. & Li, D. miR-23 regulate the pathogenesis of patients with coronary artery disease. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 11759-69

- (2015).
409. Kou, Y., Zheng, W.-T. & Zhang, Y.-R. Inhibition of miR-23 protects myocardial function from ischemia-reperfusion injury through restoration of glutamine metabolism. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **20**, 4286-4293 (2016).
 410. Ma, F. *et al.* MiR-23a promotes TGF- β 1-induced EMT and tumor metastasis in breast cancer cells by directly targeting CDH1 and activating Wnt/ β -catenin signaling. *Oncotarget* **8**, 69538-69550 (2017).
 411. Wu, G. *et al.* MicroRNA-23a promotes pancreatic cancer metastasis by targeting epithelial splicing regulator protein 1. *Oncotarget* **8**, 82854-82871 (2017).
 412. Guo, W. *et al.* Down-regulated miR-23a Contributes to the Metastasis of Cutaneous Melanoma by Promoting Autophagy. *Theranostics* **7**, 2231-2249 (2017).
 413. Tian, K., Di, R. & Wang, L. MicroRNA-23a enhances migration and invasion through PTEN in osteosarcoma. *Cancer Gene Ther.* **22**, 351-9 (2015).
 414. Mraz, M., Malinova, K., Mayer, J. & Pospisilova, S. MicroRNA isolation and stability in stored RNA samples. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **390**, 1-4 (2009).
 415. De Guire, V. *et al.* Circulating miRNAs as sensitive and specific biomarkers for the diagnosis and monitoring of human diseases: promises and challenges. *Clin. Biochem.* **46**, 846-60 (2013).
 416. Larrea, E. *et al.* New Concepts in Cancer Biomarkers: Circulating miRNAs in Liquid Biopsies. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 627 (2016).
 417. Correia, C. N. *et al.* Circulating microRNAs as Potential Biomarkers of Infectious Disease. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
 418. Wang, C. *et al.* Increased serum microRNAs are closely associated with the presence of microvascular complications in type 2 diabetes mellitus. *Sci. Rep.* **6**, 20032 (2016).
 419. Belongie, K. J. *et al.* Identification of novel biomarkers to monitor β -cell function and enable early detection of type 2 diabetes risk. *PLoS One* **12**, e0182932 (2017).
 420. Kazenwadel, J., Michael, M. Z. & Harvey, N. L. Prox1 expression is negatively regulated by miR-181 in endothelial cells. *Blood* **116**, 2395-401 (2010).
 421. Hamet, P. *et al.* PROX1 gene CC genotype as a major determinant of early onset of type 2 diabetes in slavic study participants from Action in Diabetes and Vascular Disease. *J. Hypertens.* **35**, S24-S32 (2017).
 422. Lecompte, S. *et al.* Genetic and molecular insights into the role of PROX1 in glucose metabolism. *Diabetes* **62**, 1738-45 (2013).
 423. Paul, L. *et al.* Lack of Prox1 Downregulation Disrupts the Expansion and Maturation of Postnatal Murine β -Cells. *Diabetes* **65**, 687-98 (2016).
 424. Kothari, A. N., Mi, Z., Zapf, M. & Kuo, P. C. Novel clinical therapeutics targeting the epithelial to mesenchymal transition. *Clin. Transl. Med.* **3**, 35 (2014).
 425. de Candia, P. *et al.* A unique plasma microRNA profile defines type 2 diabetes progression. *PLoS One* **12**, e0188980 (2017).
 426. Nielsen, L. B. *et al.* Circulating levels of microRNA from children with

- newly diagnosed type 1 diabetes and healthy controls: evidence that miR-25 associates to residual beta-cell function and glycaemic control during disease progression. *Exp. Diabetes Res.* **2012**, 896362 (2012).
427. Åkerman, L., Casas, R., Ludvigsson, J., Tavira, B. & Skoglund, C. Serum miRNA levels are related to glucose homeostasis and islet autoantibodies in children with high risk for type 1 diabetes. *PLoS One* **13**, e0191067 (2018).
428. Kawasaki, E. Type 1 Diabetes and Autoimmunity. *Clin. Pediatr. Endocrinol.* **23**, 99-105 (2014).
429. Jinek, M. *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**, 816-21 (2012).

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MICROARNS DESREGULADOS POR ACCIÓN DEL TNFA
EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD Y LA RESISTENCIA A LA INSULINA
Javier Lozano Bartolomé

X. PUBLICACIONES OBTENIDAS DURANTE LA TESIS DOCTORAL

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MICROARNS DESREGULADOS POR ACCIÓN DEL TNFA
EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD Y LA RESISTENCIA A LA INSULINA
Javier Lozano Bartolomé

Comunicaciones en congresos

Título: Identification and characterization of miRNAs as potential modulators of TNF-induced insulin resistance in obesity

Autores: Javier Lozano-Bartolomé, Sonia Fernández-Veledo, Antonio Altuna-Coy, Martin Wabistch, Joan Vendrell, Matilde R. Chacón

Tipo de participación: Presentación de póster A-16-603-EASD

Congreso: 52nd Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (EASD). Múnich 2016.

Artículos científicos

Artículo derivado de la tesis doctoral

Título: Altered expression of miR-181a-5p and miR-23a-3p is associated with obesity and TNF α -induced insulin resistance.

Autores: Lozano-Bartolomé J, Llauradó G, Otin MP, Altuna-Coy A, Rojo-Martínez G, Vendrell J, Jorba R, Rodríguez-Gallego E, Chacón MR.

Revista científica: Journal Clinical of Endocrinology and Metabolism

doi: 10.1210/jc.2017-01909.

Posición autoría: primer autor

Estado: Publicado. 01 de abril de 2018

Área: Endocrinología y Metabolismo, posición 20 de 138

1^{er} cuartil. Factor de impacto: 5,455

Otros artículos publicados durante la tesis doctoral

Título: The gut mycobiome composition is linked to carotid atherosclerosis.

Autores: Chacón MR, **Lozano-Bartolomé J**, Portero-Otín M, Rodríguez MM, Xifra G, Puig J, Blasco G, Ricart W, Chaves FJ, Fernández-Real JM.

Revista científica: Beneficial Microbes

doi: 10.3920/BM2017.0029.

Posición autoría: segundo autor (compartido)

Estado: Publicado online .10 de noviembre de 2017

2º cuartil. Factor de impacto: 2,923

Título: Reduced circulating levels of sTWEAK are associated with NAFLD and may affect hepatocyte triglyceride accumulation.

Autores: **Lozano-Bartolomé J**, Llauradó G, Rodriguez MM, Fernandez-Real JM, Garcia-Fontgivell JF, Puig J, Maymó-Masip E, Vendrell J, Chacón MR.

Revista científica: International Journal of obesity

doi: 10.1038/ijo.2016.73.

Posición autoría: primer autor (compartido)

Estado: Publicado. 28 de abril de 2016

Área Endocrinología y Metabolismo – Nutrición y dietética, posición 6 de 80

1^{er} decil. Factor de impacto: 5,337

Altered Expression of miR-181a-5p and miR-23a-3p Is Associated With Obesity and TNF α -Induced Insulin Resistance

Javier Lozano-Bartolomé,¹ Gemma Llauredó,^{2,3} Manel Portero-Otin,⁴ Antonio Altuna-Coy,¹ Gemma Rojo-Martínez,^{2,5} Joan Vendrell,^{1,2} Rosa Jorba,⁶ Esther Rodríguez-Gallego,⁷ and Matilde R. Chacón¹

¹Joan XXIII University Hospital, IISPV, 43007 Tarragona, Spain; ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas, 28029 Madrid, Spain; ³Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital del Mar, Institut d'Investigacions Mèdiques, 08003 Barcelona, Spain; ⁴Department of Experimental Medicine, Universitat de Lleida-IRLleida, 25003 Lleida, Spain; ⁵UGCI of Endocrinology and Nutrition, Instituto de Biomedicina de Málaga, Hospital Regional Universitario, 29010 Málaga, Spain; ⁶Surgery Unit, Joan XXIII University Hospital, 43007 Tarragona, Spain; and ⁷Infectious Diseases and HIV/AIDS Unit, Department of Internal Medicine, Joan XXIII University Hospital, Universitat Rovira i Virgili, 43007 Tarragona, Spain

Context: The proinflammatory cytokine TNF α is a key player in insulin resistance (IR). The role of miRNAs in inflammation associated with IR is poorly understood.

Objective: To investigate miR-181a-5p and miR-23a-3p expression profiles in obesity and to study their role in TNF α -induced IR in adipocytes.

Design: Two separate cohorts were used. Cohort 1 was used in adipose tissue (AT) expression studies and included 28 subjects with body mass index (BMI) <30 kg/m² and 30 with BMI \geq 30 kg/m². Cohort 2 was used in circulating serum miRNA studies and included 101 subjects with 4 years of follow-up (48 case subjects and 53 control subjects). miR-181a-5p and miR-23a-3p expression was assessed in subcutaneous and visceral AT. Functional analysis was performed in adipocytes, using miRNA mimics and inhibitors. Key molecules of the insulin pathway, AKT, PTEN, AS160, and S6K, were analyzed.

Results: Expression of miR-181a-5p and miR-23a-3p was reduced in adipose tissue from obese and diabetic subjects and was inversely correlated to adiposity and homeostasis model assessment of IR index. Overexpression of miR-181a-5p and miR-23a-3p in adipocytes upregulated insulin-stimulated AKT activation and reduced TNF α -induced IR, regulating PTEN and S6K expression. Serum levels of miR-181a-5p were reduced in case vs control subjects at baseline, suggesting a prognostic value. Variable importance in projection scores revealed miR-181a-5p had more effect on the model than insulin or glucose at 120 minutes.

Conclusion: miR-181a-5p and miR-23a-3p may prevent TNF α -induced IR in adipocytes through modulation of PTEN and S6K expression. (*J Clin Endocrinol Metab* 103: 1447–1458, 2018)

Obesity is associated with chronic low-grade inflammation of white adipose tissue (AT), which can subsequently lead to insulin resistance (IR), impaired

glucose tolerance, and, ultimately, diabetes (1). TNF α is a proinflammatory cytokine whose expression in AT is elevated in obesity, where it can contribute to the

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197

Printed in USA

Copyright © 2018 Endocrine Society

Received 28 August 2017. Accepted 26 January 2018.

First Published Online 1 February 2018

Abbreviations: AT, adipose tissue; AUC, area under the curve; BMI, body mass index; CRP, C-reactive protein; DM, type 2 diabetes mellitus; HDL, high-density lipoprotein; IR, insulin resistance; miRNA, microRNA; NGT, normal glucose tolerance; NTC, nontarget control; pAKT, phosphorylated AKT; PLS-DA, partial least squares discriminant analysis; ROC, receiver operating characteristic; SAT, subcutaneous adipose tissue; SGBS, Simpson Golabi Behmel Syndrome; siRNA, small interfering RNA; UTR, untranslated region; VAT, visceral adipose tissue.

modulation of lipid metabolism by altering insulin signaling (2, 3).

microRNAs (miRNAs) are small (17 to 24 nucleotides long) noncoding RNAs that bind to 3'-untranslated regions (3'-UTRs) of target mRNAs to regulate gene expression by translational repression or degradation. miRNAs regulate metabolic processes associated with type 2 diabetes mellitus (DM), including insulin signaling and glucose homeostasis (4), highlighting their potential as therapeutic targets for obesity and metabolic syndrome. Moreover, the finding of circulating miRNAs in biological fluids supports the potential utility of harnessing miRNAs as biomarkers in diseases ranging from cancer to DM (5). Along this line, differential expression of miRNAs in tissues has been reported in obese *vs* nonobese humans and in humans and animals with diabetes (6). However, the function of most miRNAs that are deregulated in obesity and IR is unknown.

miRNAs may provide a link between inflammation in obesity and IR. TNF α is a major initiator of inflammation and differentially regulates miRNA expression in several contexts (7, 8). Although various miRNAs modulated by TNF α have been described in AT, little is known about those directly involved in the regulation of the insulin pathway in mature adipocytes (6, 9, 10). Consequently, the underlying mechanisms linking miRNAs and TNF α -induced IR in adipocytes remain to be deciphered.

A recent microarray analysis identified miR-181a and miR-23a as being deregulated in blood from obese and nonobese subjects with and without DM (11). Furthermore, miR-181a expression has been found to be inversely related to adiponectin levels in AT (12), and its

expression is known to alter hepatic insulin sensitivity (13). In relation to miR-23, diminished expression levels have been detected in the plasma of patients with cardiovascular disease (14) and a recent study has implicated miR-23 in glucose metabolism in the muscle of dogs (15).

Given the scarcity of data on miR-181a-5p and miR23a-3p within the context of obesity and TNF α -induced IR, we aimed in this study to examine the expression of these miRNAs in AT from obese and nonobese subjects, to investigate their role in TNF α -induced IR, and to test their possible functional mechanism in adipocytes. We also explored their potential utility as predictive serum markers of prediabetes in a prospective case-control study.

Methods

Subjects

Cohort 1: AT expression

We recruited 28 subjects with BMI <30 kg/m² and 30 subjects with BMI \geq 30 kg/m², age and sex matched, at Hospital Joan XXIII, Tarragona, Spain (Table 1). All patients were white and reported that their body weight had been stable for at least 3 months before the study. They had no systemic disease other than obesity, and all had been free of any infections in the month before the study. Liver and renal diseases were specifically excluded by biochemical workup. Samples of visceral AT (VAT) and subcutaneous AT (SAT) were obtained from the same patient during elective abdominal surgical procedures. Samples and data from patients included in this study were provided by the BioBanc IISPV (B.0000853+B.0000854) integrated into the Spanish National Biobanks Network, and were processed following standard operating procedures with appropriate approval of the ethics and scientific committees.

Table 1. Baseline Characteristics of the Participants in the Study

| | BMI <30 (n = 28) | BMI \geq 30 (n = 30) | P |
|-----------------------------------|-------------------|------------------------|--------|
| Age, y | 52.67 \pm 14.84 | 45.8 \pm 7.84 | 0.123 |
| Sex, male/female | 12/16 | 9/21 | 0.309 |
| BMI, kg/m ² | 25.74 \pm 2.44 | 43.7 \pm 4.91 | <0.001 |
| Waist, cm | 87.28 \pm 11.77 | 127.24 \pm 11.44 | <0.001 |
| Hip, cm | 97.68 \pm 11.53 | 142.16 \pm 12.29 | <0.001 |
| Waist-to-hip ratio | 0.89 \pm 0.09 | 0.89 \pm 0.09 | 0.515 |
| SBP, mm Hg | 129.57 \pm 15 | 140.03 \pm 21.84 | 0.044 |
| DBP, mm Hg | 72.89 \pm 8.05 | 90.5 \pm 10.85 | <0.001 |
| Glucose tolerance, normal /IGT/DM | 22/0/6 | 12/11/7 | 0.001 |
| Glucose, mM | 5.7 \pm 1.27 | 5.72 \pm 0.99 | 0.413 |
| Insulin, pmol/L | 51.32 \pm 66.67 | 116.95 \pm 63.96 | <0.001 |
| HOMA-IR | 1.47 \pm 1.15 | 4.26 \pm 2.31 | <0.001 |
| Cholesterol, mM | 5.05 \pm 1.16 | 4.89 \pm 1.17 | 0.486 |
| HDL cholesterol, mM | 1.32 \pm 0.36 | 1.16 \pm 0.24 | 0.101 |
| LDL cholesterol, mM | 3.7 \pm 1.03 | 3.69 \pm 1.11 | 0.935 |
| Triglycerides, mM | 1.3 \pm 0.36 | 1.7 \pm 1.12 | 0.013 |
| CRP, mg/L | 0.99 \pm 0.56 | 0.89 \pm 0.58 | 0.564 |

Data given as mean \pm standard deviation, unless otherwise indicated.

Abbreviations: CRP, C-reactive protein; DBP, diastolic blood pressure; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance index; HDL, high-density lipoprotein; IGT, impaired glucose tolerance; NGT, normal glucose tolerance; SBP, systolic blood pressure.

Cohort 2: miRNA circulating serum analysis

We selected 101 subjects from the Pizarra study (16) with 4 years of follow-up (48 incident cases of diabetes and 53 control subjects). The Pizarra study is a population-based prospective study undertaken in a population from southern Spain. The characteristics of the study have been reported elsewhere (16).

Analytical methods

Venous blood samples were collected between 9:00 AM and 10:00 AM or 2 hours after an oral glucose tolerance test. Samples were centrifuged at 4°C, and serum and plasma from each subject were stored at -80°C for later analysis. Plasma glucose, cholesterol, triglyceride, high-density lipoprotein cholesterol, and insulin levels were measured as described previously (17). IR was determined by the homeostasis model assessment of insulin resistance index (HOMA-IR). Cytokines (TNF α and its receptors R1 and R2, and IL-6) were measured by enzyme immunoassay, as described by Rubio-Martín *et al.* (18). Leptin, adiponectin, FABP4, REDOX, sex hormone-binding globulin levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay, as described previously (18).

Cell culture and treatments

Human preadipocytes were purchased from the European Collection of Cell Cultures (Salisbury, United Kingdom). The Simpson Golabi Behmel Syndrome (SGBS) cell line was kindly provided by Dr. M. Wabitsch (University of Ulm, Ulm, Germany). Cells were differentiated to adipocytes as described by Fischer-Posovszky *et al.* (19) and then incubated either with or without 50 ng/mL TNF α for 8 hours. Cell lysates were collected for RNA extraction.

miRNA mimics and inhibitors

Mimic miRNAs (miScript mimic-miR-181a-5p, miScript mimic-miR-23a-3p), nontarget control small interfering RNA (siRNA) and miRNA inhibitors (miScript anti-miR-181a-5p inhibitor and miScript antimir-23a-3p inhibitor), and a negative control inhibitor were all purchased from Qiagen (Madrid, Spain). SGBS adipocytes were transfected at day 9 of differentiation with 50 nM of mimic or 50 nM of inhibitor in 0.66 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain). See Supplemental Methods for dose-response assays. Twenty-four hours after transfection, adipocytes were left either unstimulated or were stimulated with 100 nM insulin (Actrapid; Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark) for 10 minutes. In some experiments, posttransfected adipocytes were stimulated with 50 ng/mL TNF α for 8 hours, followed by a 10-minute stimulus with 100 nM insulin. Cells were then collected for protein analysis.

Luciferase reporter assays

Potential 3'-UTR specific binding sites for miRNAs were predicted by MicroRNA.org and microT-CDS (<http://diana.imis.athena-innovation.gr>), revealing potential sites for miR-181a-5p and miR-23a-3p in *PTEN* and *S6K* genes. LightSwitch 3'-UTR reporter GoClone RenSP (Active Motif, Carlsbad, CA) luciferase reporter constructs with the full-length 3'-UTR sequence of *PTEN* or *S6K* were cotransfected into HEK293 for 24 hours, as detailed in Supplemental Methods.

RNA isolation, complementary DNA synthesis, and real-time polymerase chain reaction

Frozen AT (400 to 500 mg) was homogenized with an Ultra-Turrax 8 (Ika, Staufen, Germany). Tissue total RNA was extracted with the RNeasy Lipid Tissue Midi Kit (Qiagen Science, Hilden, Germany). Adipocyte total RNA was extracted with the miRCURY RNA Isolation Kit-Cell & Plant (Exiqon, Vedbaek, Denmark). RNA quality control was assessed spectrophotometrically by Xpose (Trinean, Gentbrugge, Belgium).

The miRCURY RNA Isolation Kit-Biofluids (Exiqon) was used to extract total miRNA from serum. The Universal cDNA Synthesis Kit II (Exiqon) was used for total RNA retrotranscription. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction gene expression was performed using the Exi-LENT SYBR Green master mix (Exiqon). miRNA expression levels were quantified on the 7900HT Fast Real-Time PCR platform (Applied Biosystems). Data were analyzed by RQ Manager software (Supplemental Methods).

Western blotting

Cellular proteins were subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to nitrocellulose membranes, and western blotting was performed using standard protocols. The following primary antibodies were used: pAKT, AKT, pAS160, AS160, S6K, and PTEN, all from Cell Signaling Technologies (Werfen, Barcelona, Spain). An antibody to β -actin was purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Detailed information is given in Supplemental Methods.

Statistical analysis

For clinical and anthropometrical variables, data are expressed as mean (standard deviation) or median (25th to 75th) quartiles, when appropriate. Differences in clinical or laboratory parameters or expression variables between groups were compared using the Kruskal-Wallis one-way analysis and Mann-Whitney *U* test for nonnormally distributed data or one-way analysis of variance with *post hoc* Bonferroni correction and Student *t* test for normally distributed data. The χ^2 test was used for categorical data to assess differences among groups. For paired plasma samples, Wilcoxon signed-rank test was performed. Spearman Rho test was used to assess the strength of association correlations between variables. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was performed to evaluate the best predictive model. Variable importance in projection analysis and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) models were developed using the R programming platform. For *in vitro* studies, mean comparison was performed by one-way analysis of variance and Student *t* test. Statistical analysis was performed using Statistical Package for the Social Sciences, version 19 (IBM, Armonk, NY). Significance was considered at $P < 0.05$.

Results

miR-181a-5p and miR-23a-3p expression is reduced by TNF α in human adipocytes *in vitro*

TNF α is known to alter the expression of miR-181a-5p and miR-23a-3p in several cell types (20, 21). To determine whether this also occurred in human mature adipocytes, we treated differentiated human primary

preadipocytes with 50 ng/mL TNF α for 8 hours and measured miRNA expression using quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. The expression of both miR-181a-5p and miR-23a-3p was significantly lower in treated than in untreated adipocytes [Fig. 1(a)], whereas the expression of miR-155-5p, a validated TNF α -regulated miRNA (22), was elevated under the same conditions. Identical results were obtained in differentiated SGBS adipocytes [Fig. 1(a)], leading us to hypothesize that these microRNAs may be deregulated in inflammatory-activated obese AT.

miR-181a-5p and miR-23a-3p expression in AT from obese subjects and those with diabetes

To test the aforementioned idea, we compared miR-181a-5p and miR-23a-3p expression in paired VAT and SAT samples from cohort 1. As shown in Table 1, subjects with BMI ≥ 30 kg/m² had a worse metabolic profile than those with BMI < 30 kg/m² concomitant with elevated mRNA levels of TNF α in VAT (Supplemental Fig. 1), as previously described (2). Analysis showed that miR-181a-5p and miR-23a-3p expression was significantly lower in VAT of patients with BMI ≥ 30 kg/m² than in those with BMI < 30 kg/m² [Fig. 1(b)], whereas in SAT, this significant deregulation was observed only for miR-23a-3p. When subjects were reclassified according to glucose tolerance status, we found that miR-181a-5p expression in VAT was significantly lower in subjects with DM than in those with normal glucose tolerance (NGT), irrespective of adiposity [Fig. 1(c)]. A similar result was seen in SAT only in subjects with BMI < 30 kg/m². Analysis of miR-23a-3p expression showed that it was significantly lower in SAT and VAT of patients with DM and with BMI < 30 kg/m² than in subjects with NGT [Fig. 1(d)]. We also observed that only miR-23a-3p expression levels were significantly lower in patients with NGT whose BMI was ≥ 30 kg/m² than in those with BMI < 30 kg/m² [Fig. 1(d)]. Finally, expression of both miRNAs was lower in VAT from patients with DM whose BMI was ≥ 30 kg/m² than in patients with DM and BMI < 30 kg/m², pointing to a combined effect of the comorbidity.

Correlation analysis between miRNA expression and clinical and anthropometrical characteristics revealed that miR-181a-5p and miR-23a-3p expression inversely correlated with adiposity (measured by BMI and waist circumference) in VAT, whereas this correlation was found only for miR-23a-3p in SAT. The same correlation was observed with both miRNAs and HOMA-IR (Table 2). Moreover, the expression of both miRNAs was inversely related to TNF α expression in VAT, where the proinflammatory cytokine plays a prominent role in the development of IR (2). miR-155-5p expression levels

were below detection in the majority of VAT samples; however, in those samples with detectable expression levels ($n = 30$), no significant correlation was observed with TNF α ($r = 0.302$; $P = 0.316$).

miR-181a-5p and miR-23a-3p modulated insulin-stimulated AKT activation and reduced TNF α -induced IR in human adipocytes

Our findings suggest a possible link between miR-23a-3p and miR-181a-5p expression and TNF α -induced IR in obesity. To evaluate the contribution of both miRNAs to insulin signaling, we transiently overexpressed them using miRNA mimics in mature adipocytes, which we then stimulated with insulin or insulin plus TNF α . We then measured phosphorylated (p)AKT and AKT substrate of 160 kDa (pAS160) levels as a surrogate measure of insulin signaling. We observed that individual transfection of miR-181a-5p and miR-23a-3p significantly elevated the insulin-stimulated increase in pAKT levels by up to 28% and 32%, respectively, and in pAS160 levels up to 36% (by miR-181a-5p), with respect to nontarget control (NTC) siRNA [Fig. 2(a)]. Furthermore, overexpression of miR-181a-5p prevented, in part, TNF α -induced IR measured as a suppression of insulin-induced phosphorylation, by significantly increasing pAKT levels up to 32%, and pAS160 levels showed a clear tendency for upregulation [Fig. 2(b)]. By contrast, no preventive effect was detected when miR-23a-3p was overexpressed [Fig. 2(b)].

We next wondered whether combined overexpression of both miRNAs would have additive effect for improving insulin signaling. Cotransfection of both miRNAs in adipocytes significantly upregulated pAKT levels up to 20% after insulin stimulation and we observed a clear tendency for upregulation of pAS160 signaling; however, no improvement over single miRNA transfection was observed [Fig. 2(a)]. Nevertheless, miRNA cotransfection minimized the TNF-induced IR effect with greater efficiency than did individual miRNAs, by upregulating the level of AKT phosphorylation up to 135.8%, and up to 62% for AS160 phosphorylation, although the latter effect did not reach statistical significance [Fig. 2(b)]. These results suggest that both miRNAs may share targets in the insulin pathway regulated by the action of TNF α .

PTEN and S6K are potential targets of miR-181a-5p and miR-23a-3p

Key insulin signaling genes *PTEN* and *S6K* were identified as the best shared predicted targets for both miRNAs (Supplemental Fig. 2) (23, 24). To test these predictions, reporter constructs containing the *Renilla* luciferase gene fused to the *PTEN* 3'-UTR (luc-*PTEN*) or to the *S6K* 3' UTR (luc-*S6K*) were transiently transfected into HEK293 cells jointly with miR-181a-5p or

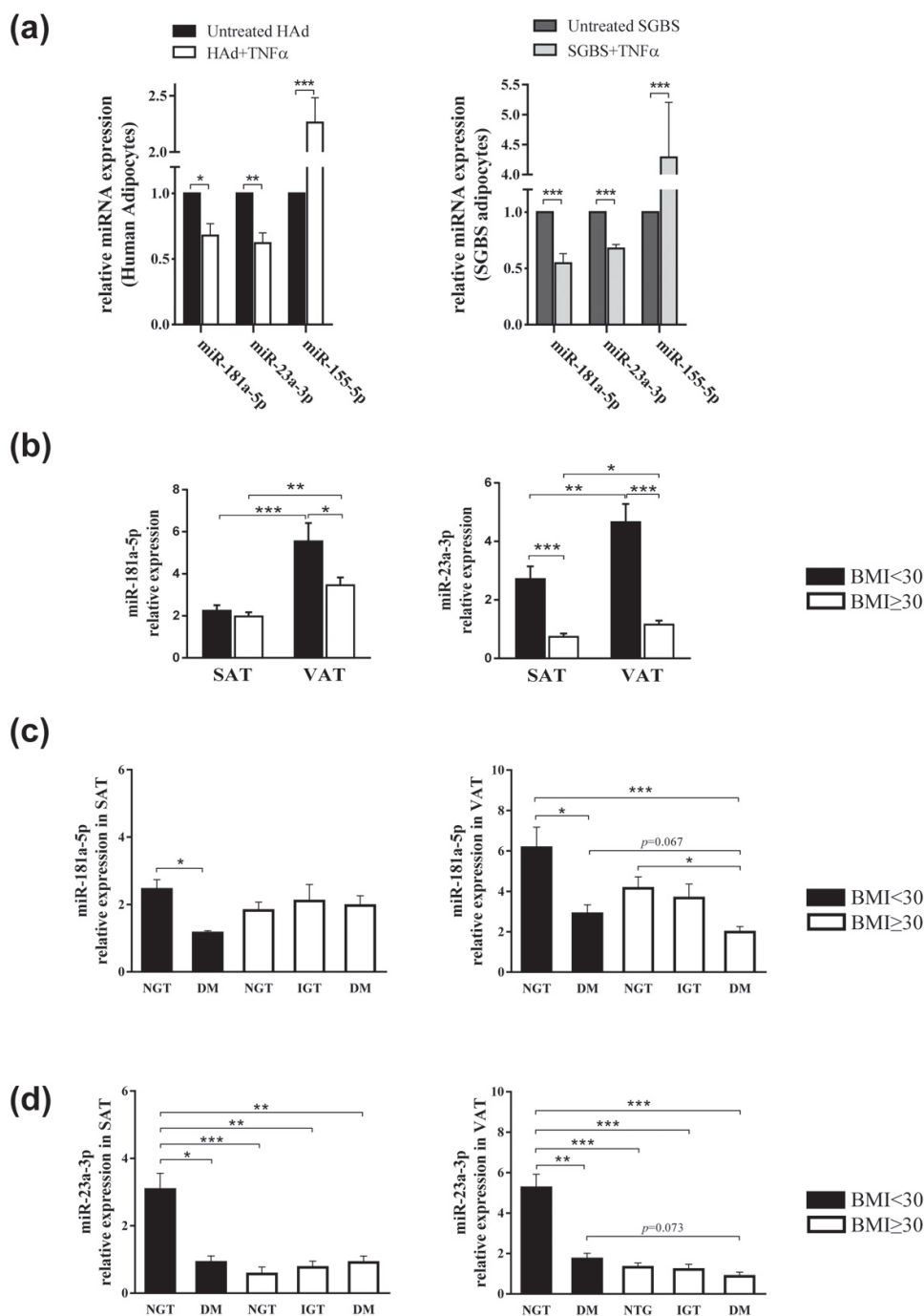


Figure 1. miR-181a-5p and miR-23a-3p expression is reduced in TNF α -treated adipocytes and in obese human AT. (a) miR-181a-5p and miR-23a-3p expression is reduced by TNF α in HAd. Mature HAd and SGBS adipocytes were stimulated at day 9 of differentiation with 50 ng/mL TNF α for 8 hours. Relative levels of miRNAs [mean \pm standard error of the mean (SEM)] from four independent experiments are shown. * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001. (b) Relative levels (mean \pm SEM) of miR-181a-5p and miR-23a-3p expression from SAT and VAT samples stratified according to BMI. * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001. (c) Relative levels (mean \pm SEM) of miR-181a-5p expression from SAT and VAT samples stratified according to BMI and glucose tolerance status (*i.e.*, NGT, impaired glucose tolerance, and DM). * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001. (d) Relative levels (mean \pm SEM) of miR-23a-3p expression from SAT and VAT samples stratified according to BMI and glucose tolerance status * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001. HAd, human adipocyte.

Table 2. Significant Spearman Correlations for Compared Patient Characteristics and miR-181a-5p and miR-23a-3p Expression Levels From SAT and VAT Depots From Studied Patients

| | SAT | | | | VAT | | | |
|-------------------------|-------------|--------|------------|--------|-------------|--------|------------|--------|
| | miR-181a-5p | | miR-23a-3p | | miR-181a-5p | | miR-23a-3p | |
| | R | P | R | P | R | P | R | P |
| BMI | — | — | -0.467 | <0.001 | -0.237 | 0.042 | -0.686 | <0.001 |
| Waist, cm | — | — | -0.546 | <0.001 | -0.269 | 0.028 | -0.651 | <0.001 |
| Hip, cm | — | — | -0.559 | <0.001 | — | — | -0.584 | <0.001 |
| Waist-to-hip ratio | — | — | — | — | -0.400 | 0.003 | — | — |
| SBP, mm Hg | -0.277 | 0.040 | -0.378 | 0.007 | — | — | — | — |
| DBP, mm Hg | -0.278 | 0.039 | -0.615 | <0.001 | — | — | -0.506 | <0.001 |
| Glucose, mM | — | — | — | — | -0.391 | 0.002 | -0.315 | 0.011 |
| Insulin, pmol/L | — | — | -0.497 | <0.001 | — | — | -0.545 | <0.001 |
| HOMA-IR | — | — | -0.492 | <0.001 | -0.289 | 0.033 | -0.672 | <0.001 |
| Cholesterol, mM | 0.256 | 0.038 | — | — | — | — | — | — |
| HDL cholesterol, mM | 0.240 | 0.048 | — | — | 0.207 | 0.071 | 0.282 | 0.020 |
| LDL cholesterol, mM | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Triglycerides, mM | -0.254 | 0.039 | -0.314 | 0.014 | — | — | -0.270 | 0.025 |
| CRP, mg/L | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Gene expression levels | | | | | | | | |
| TNF α mRNA | ND | ND | ND | ND | -0.404 | 0.031 | -0.425 | 0.024 |
| miRNA expression levels | | | | | | | | |
| miR-181a-5p SAT | 1.000 | — | 0.748 | <0.001 | — | — | — | — |
| miR-23a-3p SAT | 0.748 | <0.001 | 1.000 | — | — | — | 0.537 | <0.001 |
| miR-181a-5p VAT | — | — | — | — | 1.000 | — | 0.675 | <0.001 |
| miR-23a-3p VAT | — | — | 0.537 | <0.001 | 0.675 | <0.001 | 1.000 | — |

Abbreviations: CRP, C-reactive protein; DBP, diastolic blood pressure; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance index; HDL, high-density lipoprotein; ND, not determined; SBP, systolic blood pressure.

miR-23a-3p. As shown in Fig. 3(a), luc-PTEN 3'-UTR luciferase activity was significantly reduced by miR-181a-5p (-36.48%) and miR-23a-3p (-21.94%), and a similar reduction in luciferase activity was observed in luc-S6K 3'-UTR with miR-181a-5p (-45.44%) and miR-23a-3p (-46.52%).

Consistent with the results of the *Renilla* reporter assays, a marked reduction of PTEN and S6K protein expression was observed when miR-181a-5p (-32.33%) was overexpressed, but no significant changes were observed for miR-23a-3p [Fig. 3(b)]. However, cotransfection of both miRNAs significantly reduced PTEN expression [-21.33%; Fig. 3(b)]. Reduced S6K expression (-20.3%) was also observed with cotransfection [Fig. 3(b)], moderately affecting its phosphorylation status (Supplemental Fig. 3).

To bolster these findings, we transfected mature adipocytes with inhibitors for miR-181a-5p and miR-23a-3p, either individually or in combination. An increase in PTEN expression was observed when miR-181a-5p was inhibited alone (22.3%) or when both miRNAs were inhibited simultaneously (38.3%); this did not reach statistical significance [Fig. 3(c)]. By contrast, miR-23a-3p inhibition significantly elevated PTEN protein expression up to 78.7% above control levels. S6K protein expression was significantly increased by single-inhibitor miR-181a-5p (13.5%)

and miR-23a-3p inhibition (18.4%). An increase in S6K expression was also observed when both miRNAs were inhibited simultaneously, reaching 16.5% when compared with the inhibitor negative control [Fig. 3(c)].

miR-181a-5p and miR-23a-3p were found circulating in serum

To assess the potential value of miR-181a-5p and miR-23a-3p as prognostic markers, we measured their levels in serum in cohort 2 (Supplemental Table 1). miR-181a-5p levels were significantly reduced in the case subjects vs control subjects at baseline, pointing to the prognostic value of miR-181a-5p [Fig. 4(a)]. We also found significant differences for miR-181a-5p and miR-23a-3p between case and control subjects after 4 years, when prediabetes was already diagnosed [Fig. 4(a)]. Interestingly, we observed that levels of miR-181a-5p increased in both groups after 4 years with respect to baseline levels.

To evaluate the usefulness of circulating miR-181a-5p as a potential prognosis biomarker of prediabetes, we performed an ROC analysis. The ROC curve of miR-181a-5p at baseline yielded an area under the curve (AUC) of 0.633 (95% confidence interval, 0.048 to 0.632; $P = 0.028$) with 82.7% sensitivity and 33.3% specificity [Fig. 4(b)]. We then applied a PLS-DA model

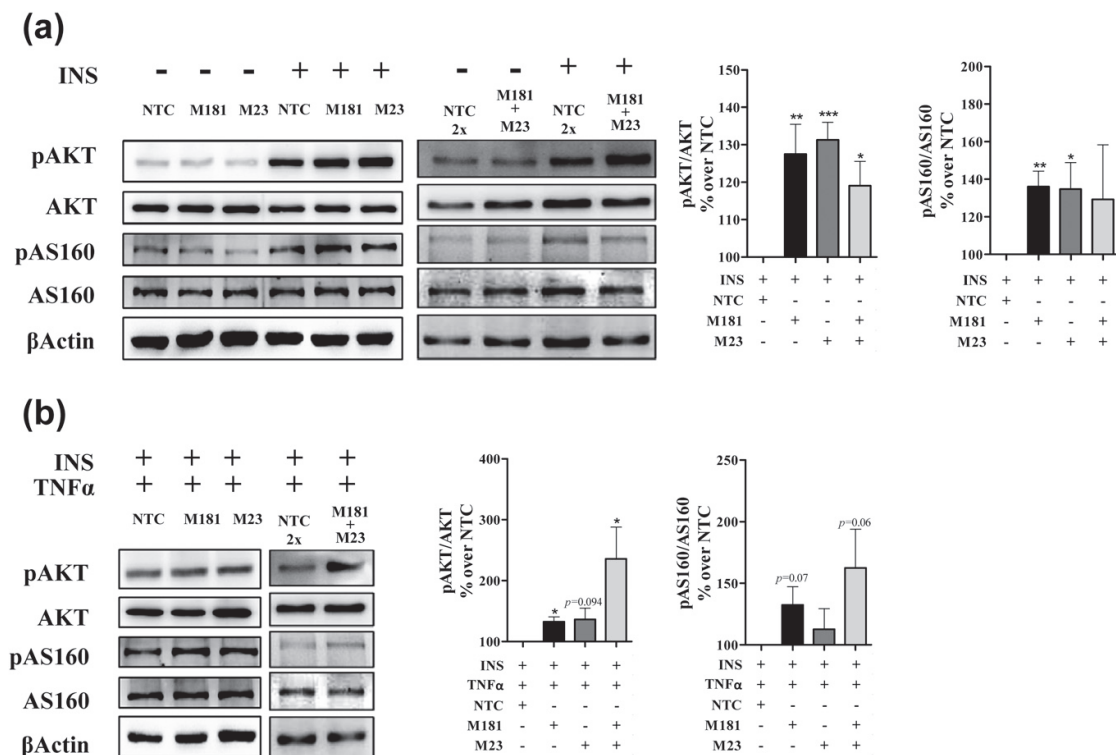


Figure 2. Representative western blots of protein expression levels of pAKT, total AKT, pAS160, total AS160, and β -actin. (a) Single- and double-mimic transfection of SGBS adipocytes under 100 nM insulin treatment. (b) Single- and double-mimic transfection of SGBS adipocytes with 50 ng/mL TNF α plus 100 nM insulin. Graphs show relative expression values [mean \pm standard error of the mean (SEM)] of five independent experiments. pAKT/AKT and pAS160/AS160 ratios were normalized to NTC for single transfection or NTC2 \times for double transfection. The 100% NTC mean \pm SEM relative unit values are for five experiments: NTC+insulin pAKT/AKT, 0.68 \pm 0.31; NTC2 \times +insulin pAKT/AKT, 0.45 \pm 0.13; NTC+insulin pAS160/AS160, 0.71 \pm 0.28; NTC2 \times +insulin pAS160/AS160, 0.53 \pm 0.15; NTC+insulin+TNF α pAKT/AKT, 0.26 \pm 0.08; NTC2 \times +insulin+TNF α pAKT/AKT, 0.25 \pm 0.12; NTC+insulin+TNF α pAS160/AS160, 0.65 \pm 0.31; and NTC2 \times +insulin+TNF α pAS160/AS160, 0.45 \pm 0.12. * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001. INS, insulin; M181, mimic miR-181a-5p; M181+M23, mimic miR-181a-5p + mimic miR-23a-3p; M23, mimic miR-23a-3p; NTC2 \times , double dose (100 nM) of siRNA NTC.

to evaluate the potential of miR-181a-5p in the stratification of patients. The model was constructed using biochemical, anthropometrical, and clinical variables. Cross-validation analyses showed that a one-component model had an accuracy of 54.9% (Supplemental Fig. 4). With regard to the importance of individual variables, scores showed that high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, C-reactive protein (CRP), and adiponectin had high importance in this model, with miR-181a-5p as the fourth most important variable and having more influence in the model than insulin or glucose at 120 minutes [Fig. 4(c)].

Finally, we performed a multivariate logistic regression analysis including miR-181a-3p, HDL cholesterol, CRP, and adiponectin—variables that had shown significantly different levels at baseline between groups (Supplemental Table 1). The resulting ROC curve yielded a larger AUC [AUC, 0.793; 95% confidence interval, 0.693 to 0.893; P < 0.001; Fig. 4(d)] and significantly higher specificity (72.9%), and the multivariate model correctly classified 72.3% of patients.

Discussion

The association between the expression levels of TNF α in AT and obesity and IR has long been recognized (2, 25). In the current study, we identified miR-181a-5p and miR-23a-3p as miRNAs downregulated by TNF α in human adipocytes *in vitro*. This was corroborated in human VAT biopsy specimens from obese subjects with BMI \geq 30 kg/m² and was more pronounced in VAT of obese patients with diabetes. Although both SAT and VAT have been reported to correlate with IR, available data show that the VAT depot more strongly correlates with IR (26). We also show that expression of miR-181a-5p and miR-23a-3p is inversely related to adiposity irrespective of the fat depot and also to IR measured by HOMA-IR. In addition, both miRNAs are inversely related to TNF α expression in VAT, which argues in favor of their possible role in IR.

TNF- α alters the expression of many proteins that are required for insulin-stimulated glucose uptake in

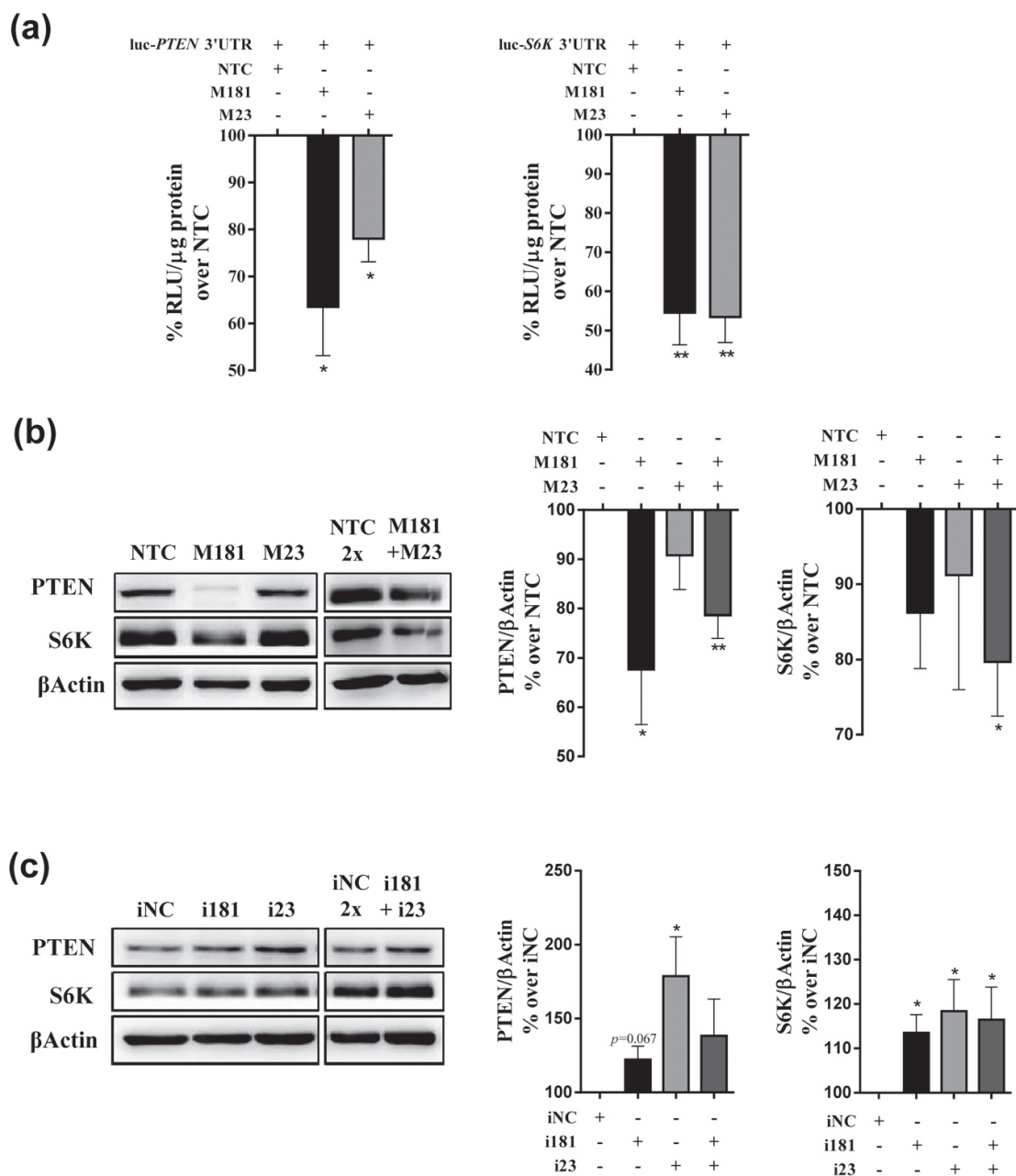


Figure 3. PTEN and S6K are targets for miR-181a-5p and miR-23a-3p in human adipocytes. (a) HEK293 cells were cotransfected with luc-PTEN 3'-UTR or luc-S6K 3'-UTR constructs and 50 nM miR-181a-5p mimic, miR-23a-3p mimic, or siRNA NTC for 24 h. Relative renSP luciferase activity is expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) of three independent experiments normalized to NTC + luc-PTEN (or luc-S6K) 3'-UTR RLU/ μ g protein (100%): NTC + luc-PTEN RLU/ μ g protein, 5,848 \pm 848; NTC + luc-S6K 3'-UTR RLU/ μ g protein, 9,014 \pm 1,577. * P < 0.05; ** P < 0.01. (b) Representative western blots of protein expression levels of PTEN and S6K in SGBS adipocytes transfected for 24 hours with 50 nM M181 and M23, or in combination (M181+M23). (c) Representative western blots of protein expression levels of PTEN and S6K in SGBS adipocytes transfected for 24 hours with 50 nM iM181 or iM23, or combined (iM181+iM23). Relative values (mean \pm SEM) of three independent experiments. PTEN/ β -actin and S6K/ β -actin ratios were normalized to NTC, NTC \times , iNC, or iNC \times , when appropriate. The 100% NTC mean \pm SEM relative unit values for three experiments are given: NTC PTEN/ β -actin, 0.37 \pm 0.09; NTC \times PTEN/ β -actin, 0.51 \pm 0.13; NTC S6K/ β -actin, 1.35 \pm 0.12; and NTC \times S6K/ β -actin, 1.31 \pm 0.28. The 100% iNC mean \pm SEM relative unit values are as follows: iNC PTEN/ β -actin, 0.41 \pm 0.04; iNC \times PTEN/ β -actin, 0.51 \pm 0.06; iNC S6K/ β -actin, 1.02 \pm 0.32; and iNC \times S6K/ β -actin, 1.44 \pm 0.49. * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001. i23, miR-23a-3p inhibitor; i181, miR-181a-5p inhibitor; iNC, inhibitor negative control; iNC \times , double dose (100 nM) of inhibitor negative control; RLU, relative light unit. See Fig. 2 legend for expansion of other abbreviations.

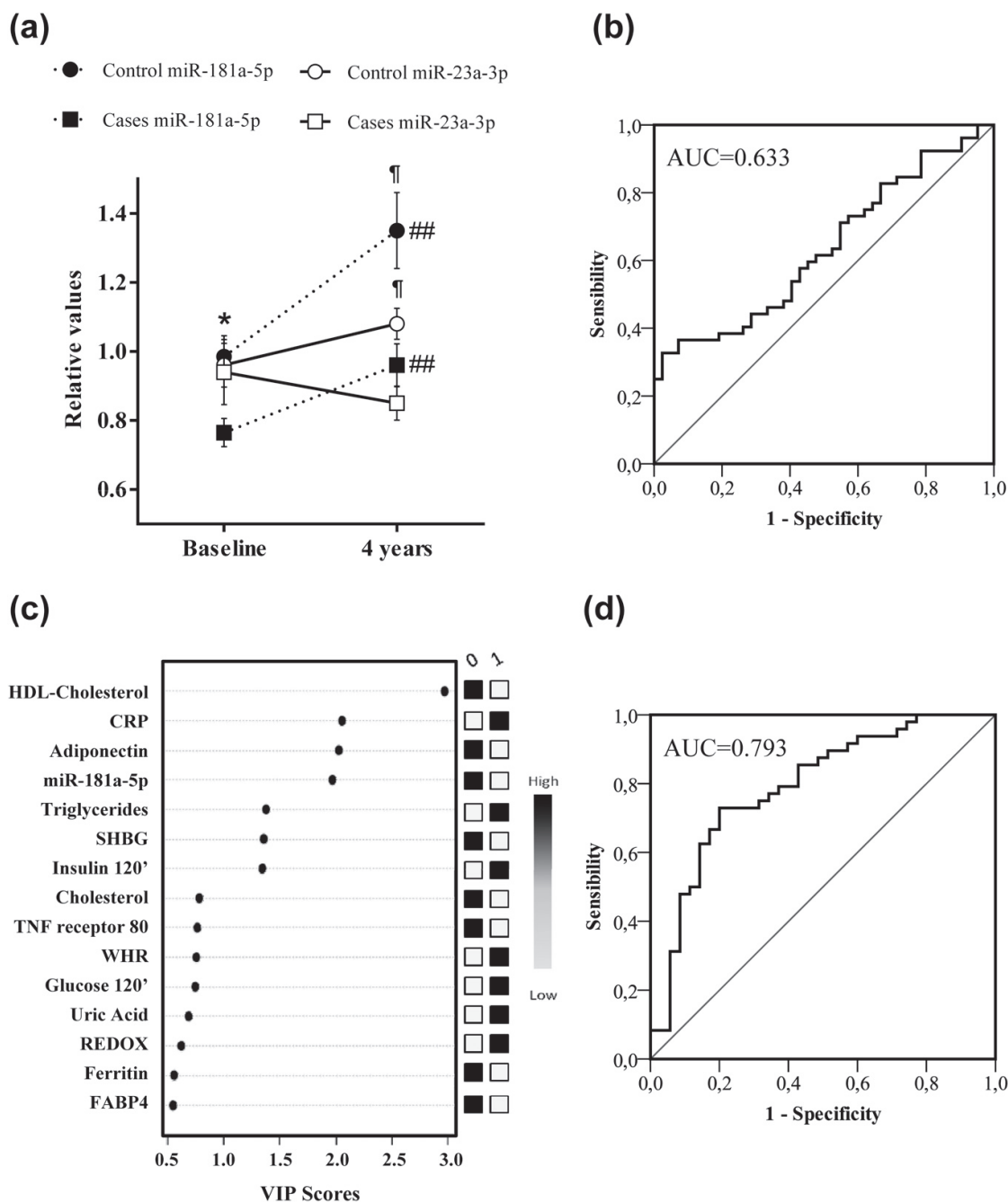


Figure 4. Circulating levels of miR-181a-5p may help identify the prediabetic phenotype. (a) Concentration of miR-181a-5p and miR-23a-3p in serum of control and case subjects at baseline and at 4 years of follow-up. * $P < 0.05$ between case and control subjects at baseline; $^{\dagger}P < 0.05$ between case and control subjects at 4-year follow-up; $^{\#\#}P < 0.01$ for 4-year follow-up vs baseline. (b) Results of ROC for miR-181a-5p levels at baseline. (c) VIP of first component in the discriminating quadratic model. (d) ROC plot using miR-181a-5p, HDL cholesterol, CRP, and adiponectin for the analysis. AUC, area under the curve; CRP, C-reactive protein; FABP4, fatty acid binding protein 4; SHBG, sex hormone-binding globulin; VIP, variable importance in projection representation; WHR, waist-to-hip ratio.

adipocytes, such as the insulin receptor, insulin receptor substrate-1, AKT, and AS160, overall affecting the translocation of the glucose transporter GLUT4 to the plasma membrane (27, 28). Other mechanisms implicated in TNF α -induced IR include the activation of the JNK signaling pathway and the regulation of the adipogenic master regulator, peroxisome proliferator-activated receptor γ (29).

We observed that transient overexpression of miR-181a-5p and miR-23a-3p increased insulin-stimulated pAKT and pAS160 expression in adipocytes to levels >25%, but only miR181a-5p blocked TNF α -induced suppression of pAKT and pAS160. Nevertheless, this rescue effect was augmented when both mimics were overexpressed simultaneously in adipocytes, clearly indicating that miR-181a-5p and miR-23a-3p can cooperate to target insulin pathway regulators.

PTEN regulates phosphatidylinositol 3-kinase-dependent insulin-signaling pathways in adipocytes (30) and S6K (p70S6K), a serine kinase, is involved in negative feedback regulation of insulin action (24). The presence of seed regions in *PTEN* and *S6K* for miR-181a-5p and miR-23a-3p, which could potentially regulate their expression, was validated experimentally in HEK293 cells, as shown by a downmodulation of the luciferase-reporter genes containing the wild-type *PTEN* and *S6K* 3'-UTRs. Analysis of the mechanisms through which these miRNAs interfered with insulin signaling revealed a clear downregulation of PTEN protein expression after combined overexpression of miR-181a-5p and miR-23a-3p, and also when miR-181a-5p alone was overexpressed. The effect of miR-23a-3p on PTEN expression was only evident when inhibition experiments were performed. A possible explanation for this finding is that because miR-23a-3p can target the deubiquitinase A20 (31), which is a negative regulator of NF- κ B (32), its suppression may prevent PTEN inhibition by NF- κ B (33). S6K expression was reduced when miR-181a-5p and miR-23a-3p were overexpressed simultaneously in adipocytes, but not individually. An upregulation of S6K protein after miRNA inhibition confirmed this target in adipocytes.

Despite their rather mild effect on AKT and AS160 phosphorylation targets, our results point to the participation of overexpressed miR-181a-5p and miR-23a-3p in insulin signaling in adipocytes, at least *in vitro*, because these findings were validated by loss of function and by miRNA/mRNA interaction experiments. Nevertheless, one has to be cautious about translating *in vitro* results to an *in vivo* context, because changes in individual miRNA levels in tissue or blood do not always induce observable physiological effects (34).

Many studies have investigated the function of miR-181a in tissues where it is highly expressed, such as

thymus (35) and brain (36). miR-181a has been described as an important negative regulator in hepatic insulin sensitivity (13) and belongs to the miR-181 family cluster, which has a crucial role as a positive regulator of phosphatidylinositol 3-kinase signaling, with PTEN as a target in lymphoid development (37). Accordingly, a robust metabolic phenotype might be expected after suppression of the entire miR-181 cluster in adipocytes, which might unveil new functions in the context of obesity and IR. Although a role for miR-23a-3p in cancer has been reported, by regulating invasion and migration of osteosarcoma cells via its targeting of PTEN (38), to the best of our knowledge, the potential participation of miR-23a-3p in PTEN regulation in adipocyte insulin signaling has not been reported before.

Circulating miRNAs are attractive candidates as biomarkers for disease diagnosis and monitoring (39). The potential involvement of miR-181a-5p and miR-23a-3p in insulin signaling led us to assess their usefulness as serum biomarkers of prediabetes before it is diagnosed. Interestingly, only miR-181a-5p levels were significantly reduced in prediabetic subjects at baseline when compared with control subjects, suggesting a possible prognostic role. Changes to miR-23a-3p levels were also observed with prediabetes, which is in concordance with other findings in a smaller cohort study (40). ROC curve analysis of miR-181a-5p showed that the sensitivity and the specificity were too low for a single diagnostic test; even so, miR-181a-5p could be used as a biomarker to support a positive diagnosis of prediabetes rather than the diagnosis being one of exclusion. Similar data were obtained when PLS-DA analysis was applied using all patient clinical and anthropometrical data and data for miR-181a-5p. In this case, patient stratification had an accuracy of 54.9%. Nevertheless, importance in projection of the first component of the PLS-DA model showed that miR-181a-5p was the fourth most important variable, having more effect than insulin or glucose at 120 minutes. Thus, although the diagnostic accuracy is moderate for all the indexes we examined, the four serum signatures (*i.e.*, HDL cholesterol, CRP, adiponectin, and miR-181a-5p) could represent a potential biomarker panel that could enable early diagnosis of prediabetic patients.

In conclusion, the results presented here outline a potential regulatory role for miR-181a-5p and miR-23a-3p in obesity-related TNF α -associated IR in adipocytes. We also show that miR-181a-5p is deregulated before the onset of prediabetes. Additional studies will be needed to establish the molecular mechanisms through which miR-181a-5p and miR-23a-3p modulate adipocyte insulin signaling.

Acknowledgments

We thank the patients enrolled in this study for their participation and the BioBanc IISPV (B.0000853+B.0000854) integrated in the Spanish National Biobanks Platform (PT13/0010/0029 and PT13/0010/0062) for its collaboration.

Financial Support: This study was supported by a project from the Fondo de Investigación Sanitaria (Grants PI14/00465 and PI17/00877 to M.R.C.), cofinanced by the European Regional Development Fund. M.R.C. is supported by the Research Stabilization Program of the Instituto de Salud Carlos III cofinanced by Institut Català de Salut in Catalonia.

Author Contributions: J.L.-B. and M.R.C. designed the experiments. J.L.-B. and A.A.-C. performed the experiments. G.L., M.P.-O., and E.R.-G. analyzed data. G.R.-M., J.V., and R.J. provided patients and supervised clinical information. M.R.C. drafted the paper and takes the full responsibility for the work as a whole.

Correspondence and Reprint Requests: Matilde R. Chacón, Research Unit, IISPV, University Hospital of Tarragona Joan XXIII, C/ Dr. Mallafré Guasch, 4, 43007 Tarragona, Spain. E-mail: mrch2424@gmail.com.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

- Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1785–1788.
- Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 1995;95(5):2409–2415.
- Hauner H, Petruschke T, Russ M, Röhrig K, Eckel J. Effects of tumour necrosis factor α (TNF α) on glucose transport and lipid metabolism of newly-differentiated human fat cells in cell culture. *Diabetologia.* 1995;38(7):764–771.
- Rottiers V, Näär AM. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders [published correction appears in *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(5)]. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(4):239–250.
- Sebastiani G, Nigi L, Grieco GE, Mancarella F, Ventriglia G, Dotta F. Circulating microRNAs and diabetes mellitus: a novel tool for disease prediction, diagnosis, and staging? *J Endocrinol Invest.* 2017;40(6):591–610.
- Arner E, Mejhert N, Kulyté A, Balwierz PJ, Pachkov M, Cormont M, Lorente-Cebrián S, Ehrlund A, Laurencikienė J, Hedén P, Dahlman-Wright K, Tanti J-F, Hayashizaki Y, Rydén M, Dahlman I, van Nimwegen E, Daub CO, Arner P. Adipose tissue microRNAs as regulators of CCL2 production in human obesity. *Diabetes.* 2012;61(8):1986–1993.
- Meyer SU, Thirion C, Polesskaya A, Bauersachs S, Kaiser S, Krause S, Pfaffl MW. TNF- α and IGF1 modify the microRNA signature in skeletal muscle cell differentiation. *Cell Commun Signal.* 2015;13(1):4.
- Prajapati P, Sripada L, Singh K, Bhatelia K, Singh R, Singh R. TNF- α regulates miRNA targeting mitochondrial complex-I and induces cell death in dopaminergic cells. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852(3):451–461.
- Xu G, Ji C, Song G, Zhao C, Shi C, Song L, Chen L, Yang L, Huang F, Pang L, Zhang N, Zhao Y, Guo X. MiR-26b modulates insulin sensitivity in adipocytes by interrupting the PTEN/PI3K/AKT pathway. *Int J Obes.* 2015;39(10):1523–1530.
- Xu LL, Shi CM, Xu GF, Chen L, Zhu LL, Zhu L, Guo XR, Xu MY, Ji CB. TNF- α , IL-6, and leptin increase the expression of miR-378, an adipogenesis-related microRNA in human adipocytes. *Cell Biochem Biophys.* 2014;70(2):771–776.
- Pek SLT, Sum CF, Lin MX, Cheng AKS, Wong MTK, Lim SC, Tavintharan S. Circulating and visceral adipose miR-100 is downregulated in patients with obesity and type 2 diabetes. *Mol Cell Endocrinol.* 2016;427:112–123.
- Klöting N, Berthold S, Kovacs P, Schön MR, Fasshauer M, Ruschke K, Stumvoll M, Blüher M. MicroRNA expression in human omental and subcutaneous adipose tissue. *PLoS One.* 2009;4(3):e4699.
- Zhou B, Li C, Qi W, Zhang Y, Zhang F, Wu JX, Hu YN, Wu DM, Liu Y, Yan TT, Jing Q, Liu MF, Zhai QW. Downregulation of miR-181a upregulates sirtuin-1 (SIRT1) and improves hepatic insulin sensitivity. *Diabetologia.* 2012;55(7):2032–2043.
- Han H, Qu G, Han C, Wang Y, Sun T, Li F, Wang J, Luo S. MiR-34a, miR-21 and miR-23a as potential biomarkers for coronary artery disease: a pilot microarray study and confirmation in a 32 patient cohort. *Exp Mol Med.* 2015;47(2):e138.
- Herrera Uribe J, Vitrer AD, Ritz C, Fredholm M, Bjørnvad CR, Cirera S. Physical training and weight loss in dogs lead to transcriptional changes in genes involved in the glucose-transport pathway in muscle and adipose tissues. *Vet J.* 2016;208:22–27.
- González-Molero I, Rojo-Martínez G, Morcillo S, Gutiérrez-Repiso C, Rubio-Martín E, Almaraz MC, Oliveira G, Soriguer F. Vitamin D and incidence of diabetes: a prospective cohort study. *Clin Nutr.* 2012;31(4):571–573.
- Vendrell J, Maymó-Masip E, Tinahones F, García-España A, Megia A, Caubet E, García-Fuentes E, Chacón MR. Tumor necrosis-like weak inducer of apoptosis as a proinflammatory cytokine in human adipocyte cells: up-regulation in severe obesity is mediated by inflammation but not hypoxia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(6):2983–2992.
- Rubio-Martín E, Soriguer F, Gutiérrez-Repiso C, Garrido-Sánchez L, de Adana MSR, García-Fuentes E, Morcillo S, Esteva I, Chaves FJ, Rojo-Martínez G. C-reactive protein and incidence of type 2 diabetes in the Pizarra study. *Eur J Clin Invest.* 2013;43(2):159–167.
- Fischer-Posovszky P, Newell FS, Wabitsch M, Tornqvist HE. Human SGBS cells - a unique tool for studies of human fat cell biology. *Obes Facts.* 2008;1(4):184–189.
- Li H, Chen X, Guan L, Qi Q, Shu G, Jiang Q, Yuan L, Xi Q, Zhang Y. MiRNA-181a regulates adipogenesis by targeting tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the porcine model. *PLoS One.* 2013;8(10):e71568.
- Ruan W, Xu JM, Li SB, Yuan LQ, Dai RP. Effects of downregulation of microRNA-23a on TNF- α -induced endothelial cell apoptosis through caspase-dependent pathways. *Cardiovasc Res.* 2012;93(4):623–632.
- Faraoni I, Antonetti FR, Cardone J, Bonmassar E. miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1792(6):497–505.
- Adochio R, Leitner JW, Hedlund R, Draznin B. Rescuing 3T3-L1 adipocytes from insulin resistance induced by stimulation of Akt-mammalian target of rapamycin/p70 S6 kinase (S6K1) pathway and serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1: effect of reduced expression of p85 α subunit of phosphatidylinositol 3-kinase and S6K1 kinase. *Endocrinology.* 2009;150(3):1165–1173.
- Zhang J, Gao Z, Yin J, Quon MJ, Ye J. S6K directly phosphorylates IRS-1 on Ser-270 to promote insulin resistance in response to TNF- α signaling through IKK2. *J Biol Chem.* 2008;283(51):35375–35382.
- Hotamisligil GS, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor α : a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes.* 1994;43(11):1271–1278.
- Preis SR, Massaro JM, Robins SJ, Hoffmann U, Vasan RS, Irlbeck T, Meigs JB, Sutherland P, D'Agostino RB Sr, O'Donnell CJ, Fox CS. Abdominal subcutaneous and visceral adipose tissue and insulin resistance in the Framingham Heart Study. *Obesity (Silver Spring).* 2010;18(11):2191–2198.

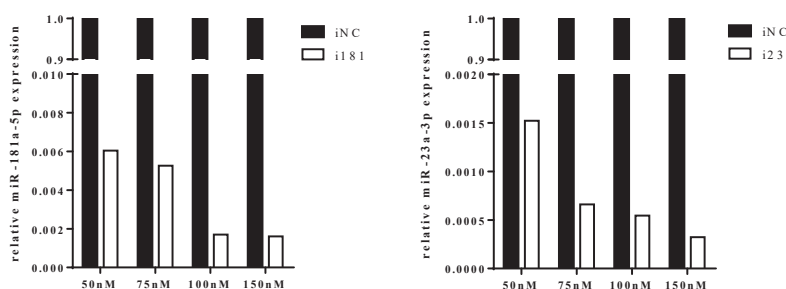
27. Stephens JM, Lee J, Pilch PF. Tumor necrosis factor- α -induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. *J Biol Chem*. 1997;272(2):971–976.
28. Sano H, Kane S, Sano E, Miinea CP, Asara JM, Lane WS, Garner CW, Lienhard GE. Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *J Biol Chem*. 2003;278(17):14599–14602.
29. Ruan H, Hacoohen N, Golub TR, Van Parijs L, Lodish HF. Tumor necrosis factor- α suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor- κ B activation by TNF- α is obligatory. *Diabetes*. 2002;51(5):1319–1336.
30. Ozes ON, Akca H, Mayo LD, Gustin JA, Maehama T, Dixon JE, Donner DB. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR pathway mediates and PTEN antagonizes tumor necrosis factor inhibition of insulin signaling through insulin receptor substrate-1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(8):4640–4645.
31. Peng P, Li Z, Liu X. Reduced expression of miR-23a suppresses A20 in TLR-stimulated macrophages. *Inflammation*. 2015;38(5):1787–1793.
32. Shembade N, Ma A, Harhaj EW. Inhibition of NF- κ B signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes. *Science*. 2010;327(5969):1135–1139.
33. Vasudevan KM, Gurumurthy S, Rangnekar VM. Suppression of PTEN expression by NF- κ B prevents apoptosis. *Mol Cell Biol*. 2004;24(3):1007–1021.
34. Cursons J, Pillman KA, Scheer K, Gregory PA, Foroutan M, Zadeh S, Toubia J, Crampin E, Goodall G, Bracken C, Davis M. Post-transcriptional control of EMT is coordinated through combinatorial targeting by multiple microRNAs. Available at: <https://www.biorxiv.org/content/early/2017/05/16/138024>. Accessed 6 March 2018.
35. Li QJ, Chau J, Ebert PJR, Sylvester G, Min H, Liu G, Braich R, Manoharan M, Soutschek J, Skare P, Klein LO, Davis MM, Chen CZ. miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. *Cell*. 2007;129(1):147–161.
36. Li WA, Efendizade A, Ding Y. The role of microRNA in neuronal inflammation and survival in the post ischemic brain: a review. *Neurol Res*. 2017;6412(May):1–9.
37. Henao-Mejia J, Williams A, Goff LA, Staron M, Licona-Limón P, Kaech SM, Nakayama M, Rinn JL, Flavell RA. The microRNA miR-181 is a critical cellular metabolic rheostat essential for NKT cell ontogenesis and lymphocyte development and homeostasis. *Immunity*. 2013;38(5):984–997.
38. Tian K, Di R, Wang L. MicroRNA-23a enhances migration and invasion through PTEN in osteosarcoma. *Cancer Gene Ther*. 2015;22(7):351–359.
39. De Guire V, Robitaille R, Tétreault N, Guérin R, Ménard C, Bambace N, Sapiéha P. Circulating miRNAs as sensitive and specific biomarkers for the diagnosis and monitoring of human diseases: promises and challenges. *Clin Biochem*. 2013;46(10-11):846–860.
40. Yang Z, Chen H, Si H, Li X, Ding X, Sheng Q, Chen P, Zhang H. Serum miR-23a, a potential biomarker for diagnosis of pre-diabetes and type 2 diabetes. *Acta Diabetol*. 2014;51(5):823–831.

Supplemental materials and methods

Cell culture and treatments

miRNA mimics and inhibitors

Selected doses for mimic transfection on mature adipocytes used have been previously described (1). For inhibitors, a dose-response assay was performed using mature SGBS adipocytes and a dose of 50 nM was established.



Inhibition of miR-181a-5p and miR-23a-3p expression. Graphs show relative expression to negative control inhibitor (iNC) of miR-181a-5p [left] and miR-23a-3p [right] inhibited with their respective inhibitors at different doses: 50, 75, 100 and 150 nM. miR-181a-5p inhibitor (i181). miR-23a-3p inhibitor (i23).

Western blot quantification and Data analysis:

Equal amounts of protein (15 μ g) were submitted to SDS-PAGE and then transferred to nitrocellulose membranes, blocked and incubated with various antibodies (as as specified below). Blots were developed with SuperSignal West Femto chemiluminescent substrate (Pierce Biotechnology, Boston, MA, USA) except for β -actin, which was developed with West Pico (Pierce Biotechnology). Proteins were quantified in a VersaDoc Imaging System using Quantity One software (Bio-Rad, Barcelona, Spain) following manufacturer's instructions.

Phosphorilated density values were the results of dividing the phosphorilated density band by its corresponding unphosphorilated band in each case. For other proteins values were normalized to β actin for each condition. Values were then transformed into percentages by normalizing each treatment condition to its respective non-target control (NTC) that was given a value of 100% in each western blot. Statistical analysis were performed on values obtained for n=3-5 western blot data.

Antibodies

| <i>Primary Antibodies</i> | Catalog# | Commercialized by | Working dilution |
|--------------------------------|-----------------|--------------------------|-------------------------|
| βActin | A2228 | Sigma | 1:2000 |
| AKT | 9272 | Cell Signaling | 1:1000 |
| pAKT Ser 473 | 9271 | Cell Signaling | 1:1000 |
| AS160 | 2447 | Cell Signaling | 1:1000 |
| pAS160-Thr 642 (D27E6) | 8881S | Cell Signaling | 1:1000 |
| PTEN (26H9) | 9556S | Cell Signaling | 1:1000 |
| S6K | 9202 | Cell Signaling | 1:1000 |
| pS6K- Thr 389 | 9205 | Cell Signaling | 1:1000 |
| <i>Secondary antibodies</i> | | | |
| Rabbit -IgG | 7074 | Cell Signaling | 1:2000 |
| Mouse-IgG | 7076 | Cell Signaling | 1:2000 |

Luciferase Reporter Assays

LightSwitch™ 3'UTR GoClone™ RenSP luciferase reporter constructs (Active Motif), including full-length sequence of PTEN 3'UTR or RPS6KB1 3'UTR, were purchased from Condalab (Madrid, Spain). HEK293 cells were plated in 24-well culture plates at 5×10^4 cells/cm² in 500 μ L DMEM high-glucose medium (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma). Cells were transfected 20 h later with 300 ng of LightSwitch™ 3'UTR GoClone™ RenSP luciferase reporter plasmids and 50 nM of non-target control mimic (NTC), miR-181a-5p mimic or miR-23a-3p mimic (Qiagen) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) at 1:3 ratio [DNA (μ g):Lipofectamine 2000 (μ l)] in 300 μ l of Opti-MEM (Gibco) per well. After 6 h of lipofection, medium was replenished at 500 μ l/well with DMEM high-glucose medium

supplemented with 10% fetal bovine serum. Twenty-four hours after lipofection, cells were harvested in 220 μL of PBS. Luminescence was quantified with the LightSwitch Luciferase assay kit (Active Motif), according to the manufacturer's protocol, using a Varioskan LUX System (Thermo Scientific). Relative light units (RLU)/ μl were normalized to protein concentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

Serum miRNA RNA extraction

Serum was thawed on ice and centrifuged at $3000\times g$ for 5 min at 4°C in a microcentrifuge. Spectrophotometric measurement of oxyhemoglobin absorbance at 414 nm was used to assess hemolysis. miRCURYTM RNA Isolation Kit–Biofluids (Exiqon) was used for the extraction. In brief, an 200 μl aliquot of serum per sample was transferred to a new microcentrifuge tube and 60 μl of Lysis mixture containing 1 μg MS2 RNA bacteriophage (Roche Applied Science) was added, followed by 20 μl of Protein Precipitation Solution (Exiqon). The mixture was centrifuged for 3 min at $11,000\times g$ and the supernatant was transferred to a new tube. Then, 270 μL isopropanol was added and the mixture was placed onto a microRNA Mini Spin column, incubated for 2 min and centrifuged for 30 sec at $11,000\times g$. A rinse step (Wash Solution 2 BF) was repeated three times. Total RNA was eluted in 50 μl of RNase-free water and stored at -80°C .

Synthesis of miRNA cDNA genes and real-time PCR

One microliter of RNA eluate obtained from serum was reverse transcribed in 5 μl reactions using the miRCURY LNATM Universal RT cDNA Synthesis Kit (Exiqon). The cDNA was diluted $40\times$ in a low-binding 1.5 ml tubes and assayed in 10 μl PCR reactions. Each microRNA was assayed twice by qPCR. A no-template control of water was purified with the samples and profiled as for the samples. Amplification was performed in a LightCycler7900 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) in 96-well plates. The amplification curves were analyzed using SDS software, both for determination of Ct (by the second derivative method) and for melting curve analysis.

RT-PCR data filtering and analysis

All assays were inspected for distinct melting curves and the T_m was checked to be within known specifications for each particular assay. Furthermore, any sample assay data point had to be detected with 5 Ct less than the corresponding control assay data point, and with a Ct <35, to be included in the data analysis. Data that did not pass these criteria were omitted from any further analysis. The data analysis was performed using RQ manager software (Applied Biosystems). ΔCT and $\Delta\Delta CT$ were calculated using the following mathematical formula: $\Delta CT = CT_{\text{sample}} - CT_{\text{endogenous}}$, $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{case}} - \Delta CT_{\text{control}}$. The geometric mean of 3 selected unchanged miRNAs, hsa-let-7g, hsa-let-7i and hsa-miR-103a-3p, were used as internal controls (normalizing factor). Differential expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. For *in vitro* experiments and AT studies, snRNA-U6 was used as normalizing control miRNA.

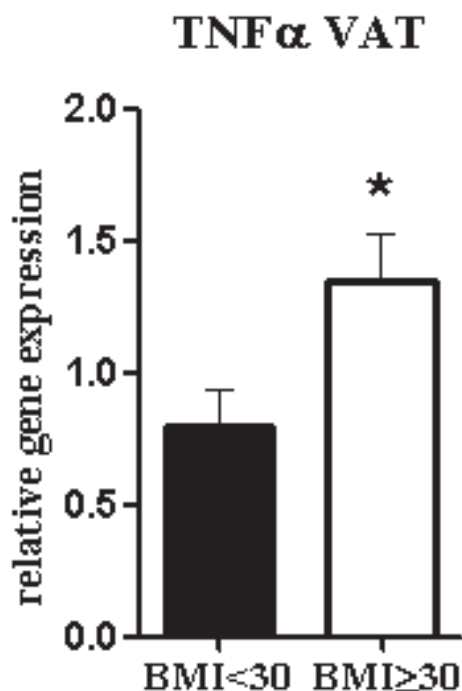
qPCR primers

Primers were all purchased from Exiqon (Vedbaek, Denmark)

| miRNA | Reference |
|-----------------|-----------|
| hsa-miR-23a-3p | 204772 |
| hsa-miR-181a-5p | 206081 |
| hsa-miR-103a-3p | 204063 |
| hsa-let-7g-5p | 204565 |
| snRNA U6 | 203907 |

Supplemental methods References

1. Enlund E, Fischer S, Handrick R, Otte K, Debatin KM, Wabitsch M, Fischer-Posovszky P. Establishment of lipofection for studying miRNA function in human adipocytes. PLoS One 2014;9(5):1–8.

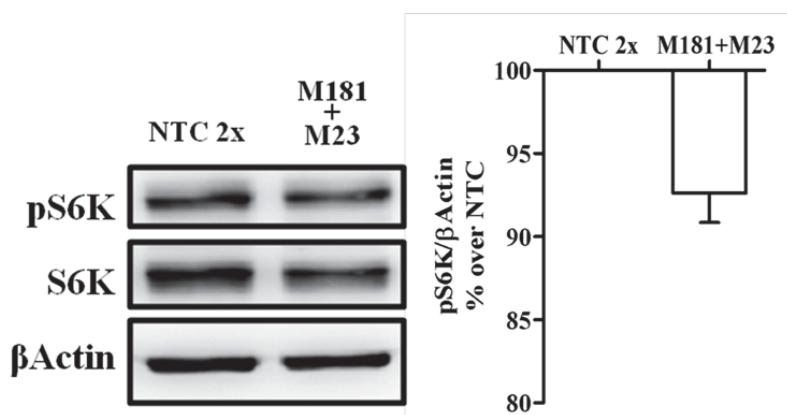


Supplementary Figure 1:

TNF α gene expression is significantly over expressed in visceral adipose tissue (VAT) from obese patients (BMI \geq 30). Bars represents the mean \pm SEM; *P < 0.05. Mann-Whitney test was used to compare groups.

TNF α -mRNA quantification:

Total RNA (500 ng) from adipose tissue biopsies was retrotranscribed using cDNA High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems, #4387406). TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, # 4304437) and TaqMan Gene Expression Assays [PPIA #Hs99999904_m1 (Hk) and TNF #Hs99999043_m1, Applied Biosystems] were used for qRT-PCR expression analysis was performed on an ABI 7900HT Fast qPCR system as indicated in the manufacturer's protocol.

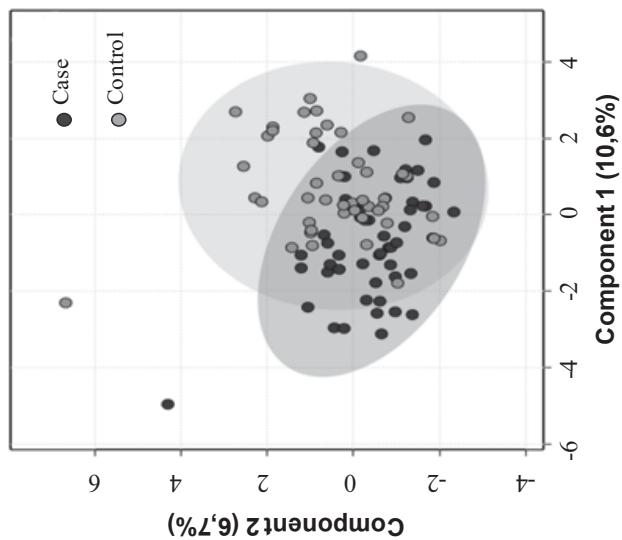
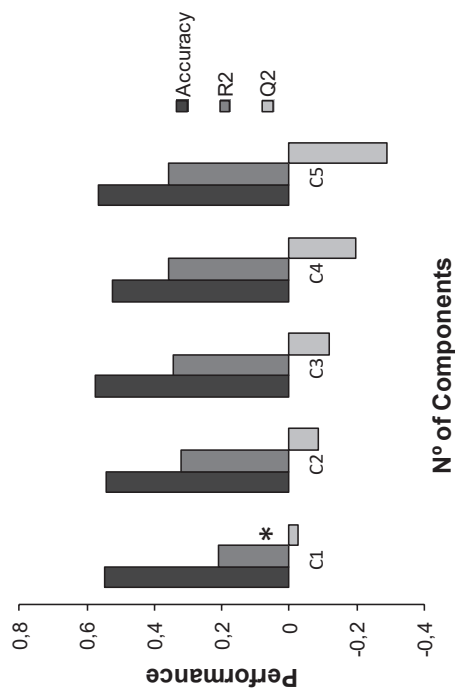


Supplementary Figure 3:

Protein expression levels of pS6K in SGBS adipocytes co-transfected for 24 h with 50 nM miR-181a-5p and 50 nM miR-23a-3p mimics (M181+M23), and treated with 50 ng/ml of TNF α for 8 h and 100 nM of insulin for 10 min. Relative values (mean \pm SEM) of two independent experiments. pS6K/ β Actin ratio was normalized to NTC 2 \times . 100% NTC 2 \times mean \pm SEM relative units: 1.14 \pm 0.14.

PLS-DA Cross validation details:

| Measure0 | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 |
|----------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Accuracy | 0.549 | 0.545 | 0.575 | 0.525 | 0.565 |
| R2 | 0.212 | 0.320 | 0.346 | 0.356 | 0.360 |
| Q2 | -0.024 | -0.084 | -0.120 | -0.197 | -0.290 |



Supplementary Figure 4: Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) model for miR-181a-5p-stratification of cases and control subjects characterized by biochemical, anthropometrical and clinical variables.

Supplementary Table 1. Clinical and anthropometrical characteristics of *Pizarra* cohort

| | | Cases | Controls | p-value |
|------------------------------------|-----------------|--------------------|---------------------|----------------|
| n | | 48 | 53 | |
| Age (yrs.) | | 51.1 (12.4) | 51.4 (11.7) | 0.930 |
| Gender (M/F) (n) | | 20/28 | 20/33 | 0.687 |
| Active smokers (n, %) | | | | |
| | Baseline | 15 | 14 | 0.592 |
| | 4 years | 12* | 9* | 0.273 |
| Obesity (n, %) | | | | |
| | Baseline | 25 | 22 | 0.607 |
| | 4 years | 28* | 22 | 0.215 |
| Hypertension (n, %) | | | | |
| | Baseline | 26 | 32 | 0.528 |
| | 4 years | 30* | 26 | 0.137 |
| Dyslipidemia (n, %) | | | | |
| | Baseline | 7 (14.6) | 15 (28.3) | 0.095 |
| | 4 years | 7 (14.6) | 9 (17.0)* | 0.742 |
| Anthropometric measurements | | | | |
| Weight (kg) | | | | |
| | Baseline | 78.6 (14.3) | 77.7 (13.2) | 0.730 |
| | 4 years | 80.8 (15.5)* | 78.3 (13.6) | 0.409 |
| BMI (kg/m²) | | | | |
| | Baseline | 30.4 (5.0) | 30.3 (4.7) | 0.944 |
| | 4 years | 31.4 (5.6)* | 30.8 (5.0)* | 0.579 |
| Waist (cm) | | | | |
| | Baseline | 104.1 (10.5) | 102.7 (11.6) | 0.519 |
| | 4 years | 101.7 (11.6)* | 98.8 (12.3)* | 0.229 |
| WHR | | | | |
| | Baseline | 0.99 (0.92-1.03) | 0.97 (0.92-1.01) | 0.846 |
| | 4 years | 0.92 (0.90-0.96)* | 0.90 (0.86-0.97)* | 0.129 |
| Blood pressure | | | | |
| SBP (mmHg) | | | | |
| | Baseline | 135.4 (17.5) | 132.9 (19.5) | 0.498 |
| | 4 years | 138.4 (17) | 131.9 (19.3) | 0.06 |
| DBP (mmHg) | | | | |
| | Baseline | 82.5 (10.7) | 80.6 (10.5) | 0.350 |
| | 4 years | 81.5 (11.5) | 74.6 (11.5) | 0.002 |
| Lipid profile | | | | |
| Total cholesterol (mmol/L) | | | | |
| | Baseline | 6.4 (1.3) | 6.6 (1.2) | 0.187 |
| | 4 years | 5.2 (1)* | 5.5 (1)* | 0.407 |
| HDL-cholesterol (mmol/L) | | | | |
| | Baseline | 1.5 (0.3) | 1.9 (0.5) | 0.002 |
| | 4 years | 1.3 (0.3)* | 1.4 (0.3)* | 0.065 |
| LDL-cholesterol (mmol/L) | | | | |
| | Baseline | 4.2 (1.2) | 4.2 (1.1) | 0.879 |
| | 4 years | 3.2 (0.9)* | 3.4 (0.9)* | 0.583 |
| Triglycerides (mmol/L) | | | | |
| | Baseline | 1.3 (0.8-1.8) | 1 (0.8-1.3) | 0.051 |
| | 4 years | 1.3 (0.9-1.9) | 1.1 (0.7-1.6) | 0.156 |
| Glucose Profile | | | | |
| Fasting Glucose (mmol/L) | | | | |
| | Baseline | 5.3 (0.5) | 5.3 (0.5) | 0.450 |
| | 4 years | 5.9 (0.7)* | 5.1 (0.4)* | <0.001 |
| Glucose 120' (mmol/L) | | | | |
| | Baseline | 5.5 (1.4) | 5.1 (1.4) | 0.168 |
| | 4 years | 8.5 (2.3)* | 5.1 (1.4) | <0.001 |
| Fasting insulin (pmol/L) | | | | |
| | Baseline | 51.6 (34.7-93.7) | 48.6 (31.2-62.5) | 0.184 |
| | 4 years | ND | ND | |
| Insulin 120' (pmol/L) | | | | |
| | Baseline | 319.5 (131.9-53.8) | 131.9 (90.28-298.6) | 0.001 |
| | 4 years | ND | ND | |
| HOMA-IR | | | | |
| | Baseline | 2.35 (1.8) | 2 (1.7) | 0.262 |
| | 4 years | ND | ND | |
| Uric acid (μM) | | | | |
| | Baseline | 299.5 (111) | 279 (76) | 0.474 |

| | | | | |
|--------------------------------|----------|-------------------|-------------------|-------|
| | 4 years | 297.6 (84) | 278 (82.2) | 0.211 |
| <i>Inflammatory parameters</i> | | | | |
| Leptin (pg/mL) | Baseline | 14.7 (12.16) | 14 (10.5) | 0.964 |
| | 4 years | ND | ND | |
| Adiponectin (µg/mL) | Baseline | 7.6 (5-10.7) | 10.7 (7.1-15.4) | 0.003 |
| | 4 years | ND | ND | |
| TNF receptor 80 (pg/mL) | Baseline | 7.1 (4.4-10.4) | 7.4 (5-10.3) | 0.771 |
| | 4 years | ND | ND | |
| TNF receptor 60 (pg/mL) | Baseline | 2.3 (1.7-4.8) | 2.2 (1.6-2.9) | 0.195 |
| | 4 years | ND | ND | |
| TNFα (pg/mL) | Baseline | 0 (0-6.4) | 0 (0-6.2) | 0.659 |
| | 4 years | ND | ND | |
| IL-6 (pg/mL) | Baseline | 2.4 (2.3) | 1.8 (1.5) | 0.475 |
| | 4 years | ND | ND | |
| CRP (mg/L) | Baseline | 0.5 (0.2-1.2) | 0.24 (0.1-0.5) | 0.022 |
| | 4 years | ND | ND | |
| FABP4 (ng/mL) | Baseline | 27 (16.1-34.3) | 28.2 (18.5-36.8) | 0.586 |
| | 4 years | ND | ND | |
| SHBG (nmol/L) | Baseline | 32.4 (21.7-48.5) | 42.4 (22.7-63.4) | 0.068 |
| | 4 years | ND | ND | |
| REDOX (pg/mL) | Baseline | 1.3 (1.1) | 1.2 (1.1) | 0.398 |
| | 4 years | ND | ND | |
| Ferritin (µg/L) | Baseline | 60.1 (24.4-115.8) | 56.4 (28.3-149.2) | 0.733 |
| | 4 years | | | |
| <i>miRNA relative units</i> | | | | |
| miRNA-181a-5p | Baseline | 0.76 (0.26) | 0.98 (0.43) | 0.028 |
| | 4 years | 0.96 (0.4)* | 1.35 (0.83)* | |
| miRNA-23a-3p | Baseline | 0.94 (0.29) | 0.96 (0.44) | 0.622 |
| | 4 years | 0.85 (0.56) | 1.08 (0.55) | |

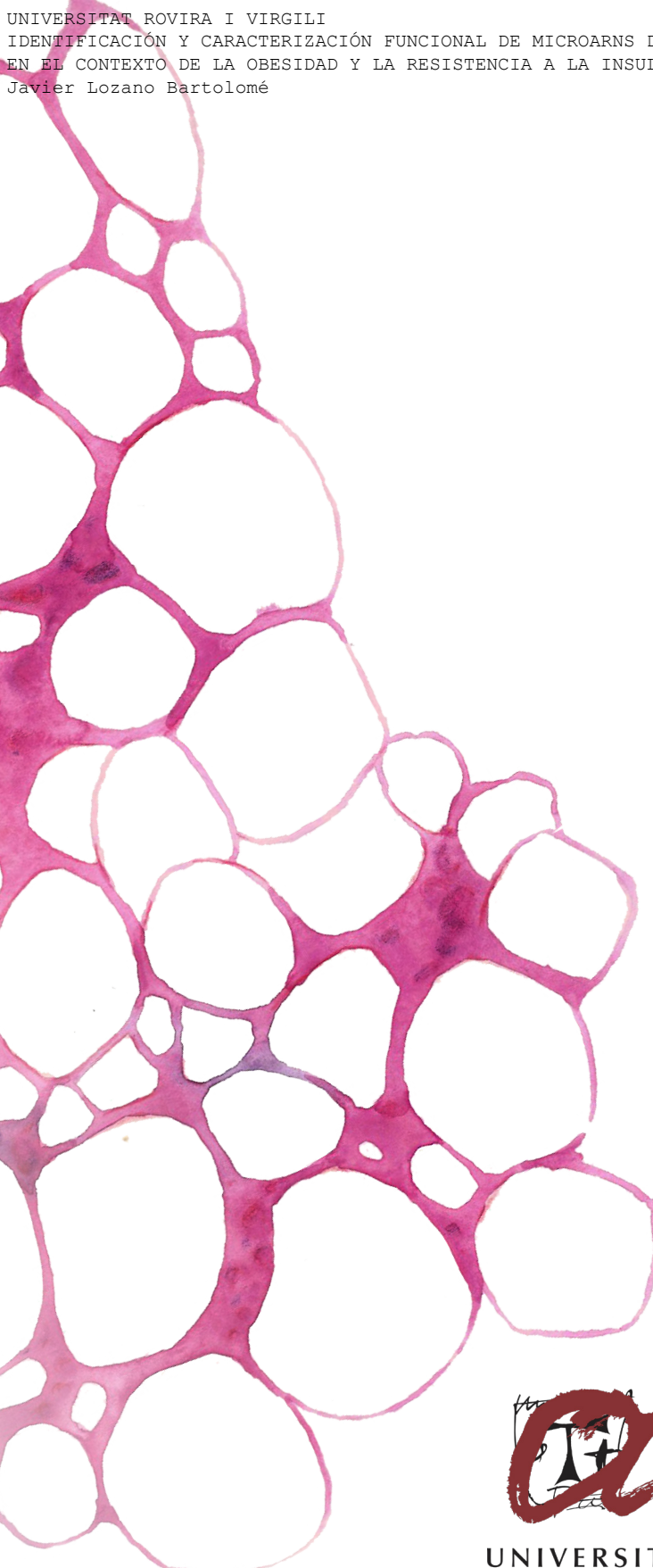
Data are expressed as mean (SD) or median (25th-75th) percentiles as appropriate.

* $p < 0.005$ for 4-year follow-up vs. baseline. Systolic Blood Pressure (SBP), Diastolic Blood Pressure (DBP), High density lipoprotein (HDL-) cholesterol, LDL, Low-density lipoprotein, HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance index, C-reactive protein (CRP), fatty acid binding protein 4 (FABP4), Sex Hormone Binding Globulin (SHBG), ND: not determined

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MICROARNS DESREGULADOS POR ACCIÓN DEL TNFA
EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD Y LA RESISTENCIA A LA INSULINA
Javier Lozano Bartolomé

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MICROARNS DESREGULADOS POR ACCIÓN DEL TNFA
EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD Y LA RESISTENCIA A LA INSULINA
Javier Lozano Bartolomé

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MICROARNS DESREGULADOS POR ACCIÓN DEL TNFA
EN EL CONTEXTO DE LA OBESIDAD Y LA RESISTENCIA A LA INSULINA
Javier Lozano Bartolomé



UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI