



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTADE DE CIENCIAS DA SAÚDE

MÁSTER EN ASISTENCIA E INVESTIGACIÓN SANITARIA

ESPECIALIDAD EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Curso académico: 2015-2016

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

**Implicación de los *miARNs* en la
adipogénesis y sensibilidad a la insulina**

Laura Romero Barrenechea

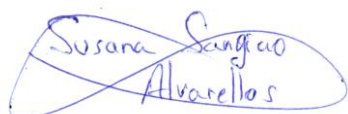
27-6-2016

Dña. Susana Sangiao Alvarellos, profesora contratada Doctora del Área de Fisiología, Departamento de Medicina, en la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de A Coruña,

Certifica:

Que el presente trabajo de fin de grado que lleva por título: “**Implicación de los *miARNs* en la adipogénesis y sensibilidad a la insulina.**”, elaborado por Dña. Laura Romero Barrenechea, ha sido realizado bajo mi dirección y estimo que se encuentra concluido y en condiciones de ser presentado.

Y para que conste, firmo la presente autorización en A Coruña,

A handwritten signature in blue ink, reading "Susana Sangiao Alvarellos". The signature is written in a cursive style with a large, looping initial 'S'.

Fdo.: Susana Sangiao Alvarellos

ÍNDICE

RESUMEN	1
RESUMO	1
SUMMARY.....	1
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 La obesidad	1
1.2 Tejido adiposo	2
1.3 Regulación de la ingesta de alimentos	3
1.4 Ruta metabólica de los lípidos	9
1.5 SOCS3 e IL-6 y su relación con la resistencia a la insulina y a la leptina.....	10
1.6 Los <i>microARNs</i> (<i>miARNs</i>)	12
1.7 Línea Celular 3T3-L1	15
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAL Y MÉTODOS	17
3.1 Programas informáticos	17
3.2 Línea celular	17
3.3 Sobreexpresión de <i>miARNs</i> con lipofectamina.....	17
3.4 Tratamientos con leptina.....	18
3.5 Extracción de ARN y realización de PCRs	18
3.6 Western <i>blot</i>	20
3.7 Cinética enzimática.....	23
4 RESULTADOS	26
4.1 Uso de programas informáticos (Anexos).....	26
4.2 Puesta a punto del cultivo y la diferenciación a adipocitos maduros de la línea celular 3T3-L1	28
4.3 Sobreexpresión de los <i>miARNs</i> (<i>miR-19a-3p</i> , <i>miR-30b-5p</i> , <i>miR-218-5p</i> y <i>miR-200a</i>) en adipocitos maduros de la línea 3T3-L1	32
4.4 Estudio de la expresión proteica de SOCS3 y de FAS	33
4.5 Estudio de la actividad enzimática en células transfectadas con sobreexpresantes para miR-19a, miR-30b y miR-218a.....	36

4.6 Estudio de la expresión proteica de pAKT y de la actividad de enzimas clave en células transfectadas con un sobreexpresante para <i>miR-200a</i>	38
5. DISCUSIÓN	41
6. CONCLUSIONES.....	46
7. BIBLIOGRAFÍA	47
Anexos.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:.....	4
Figura 2:.....	5
Figura 3:.....	6
Figura 4:.....	10
Figura 5:.....	12
Figura 6:.....	13
Figura 7:.....	26
Figura 8:.....	27
Figura 9:.....	29
Figura 10:.....	31
Figura 11:.....	31
Figura 12:.....	32
Figura 13:.....	35
Figura 14:.....	36
Figura 15:.....	37
Figura 16:.....	39
Figura 17:.....	40
Figura 18:.....	51
Figura 19:.....	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I:.....	1
Tabla II:.....	2
Tabla III:.....	18
Tabla IV:.....	19
Tabla V:.....	19
Tabla VI:.....	19
Tabla VII:.....	22
Tabla VIII:.....	29
Tabla IX:.....	30
Tabla X:.....	51

ABREVIATURAS

3T3-L1	Línea celular preadipocítica de ratón
3'-UTR	Regiones 3' no traducidas
6PGDH	6 fosfogluconato deshidrogenasa
µm	Micrómetro
aa	Aminoácido
ACC	Acetil-Coenzima A carboxilasa
Acetil-CoA	Acetil-Coenzima A
ACL	ATP-Citrato liasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADP	Adenosín difosfato
AG	Ácidos grasos
AgPR	Proteína r-agouti
AMP	Adenosín 5´-monofosfato
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
ApocII	Apolipoproteína CII
ARC	Núcleo arcuato
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATCC	Colección de cultivo de tipo americano
ATP	Adenosín 5´trifosfato
BSA	Seroalbúmina bovina

Ca ²⁺	Ión calcio
CART	Tráncrito relacionado con la cocaína-anfetamina
CPTs	Carnitina Palmitoil Transferasas
DMEM	Medio Dulbecco modificado
DTT	Dithiothreitol
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FAS	Ácido graso sintasa
FBS	Suero bovino fetal
G6Pasa	Glucosa 6 fosfatasa
G6PDH	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
GH	Hormona de crecimiento
GTP	Guanosín 5´trifosfato
HK	Hexoquinasa
IBMX	3-Isobutil-1-Metil xantina
INSR	Receptor de la insulina
IL-6	Interleuquina-6
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
IRS 1 y 2	Sustrato del receptor de la insulina tipo 1 y 2
IMC	Índice de masa corporal
INS	Insulina

JAK2	Janus Quinasa 2
KO	Ratón <i>knock-out</i>
LPL	Lipoproteína lipase
Malonil-Coa	Malonil coenzima A
MCD	Malonil-Coenzima A descarboxilasa
<i>miARNs</i>	<i>MicroARNs</i>
mTOR	Diana de la rapamicina en células de mamíferos
NADPH	β -Nicotinamida adenina dinucleotide 2'-fosfato forma reducida
NPY	Neuropéptido Y
OSBLP-8	oxysterol binding protein-like 8
pAKT	Fosfo-proteína quinasa B
Palmitoil-CoA	Palmitoil coenzima A
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
Pre- <i>miARN</i>	Precursor de <i>miARN</i>
POMC	Pro-opiomelano-cortina
PTP1 β	Proteína tirosina fosfatasa 1- β
PKA	Proteína quinasa A
P/S	Penicilina/estreptomicina
RICTOR	Compañero de mTOR insensible a la rapamicina

LEPR	Receptor de la leptina
RSTN	Resistina
RT	Retro-transcripción
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS
SNC	Sistema nervioso central
SOCS1 y 3	Supresor de señalización de citoquinas 1 y 3
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
TBS	Tampón tris-salino
TNF α	Factor de necrosis tumoral α
PI3K/Akt	Fosfatidilinositol 3 quinasa
VMN	Núcleo ventromedial hipotalámico
WB	Western <i>Blot</i>

RESUMEN

En este trabajo de fin de máster usamos distintos algoritmos informáticos para identificar posibles *microARNs* relacionados con la ruta de señalización de la insulina y con el desarrollo de la diabetes *mellitus* tipo II. Una vez identificados, elegimos cuatro de ellos y los sobreexpresamos en la línea celular 3T3-L1 (modelo característico de adipocitos maduros). A continuación, estudiamos moléculas y enzimas clave en la ruta de señalización de la insulina para ver si están alteradas por la sobreexpresión, tanto en condiciones basales como estimuladas con insulina o leptina.

RESUMO

Neste traballo de fin de mestrado, empregamos distintos algoritmos informáticos para identificar posibles *microARNs* relacionados coa ruta de sinalización da insulina e co desenvolvemento da diabetes *mellitus* tipo II. Unha vez identificados, eliximos catro deles e sobreexpresámoslos na liña celular 3T3-L1 (modelo característico de adipocitos maduros). A continuación, estudamos moléculas e encimas clave na ruta de sinalización da insulina para ver se están alteradas pola sobreexpresión, tanto en condicións basais como estimuladas con insulina ou leptina.

SUMMARY

In this work of end-of-master, we use different informatic algorithms to identify potential *microRNAs* related with the insulin signaling pathway and the development of diabetes *mellitus* type II. Once identified, we chose four of them and were overexpressed in the cell line 3T3-L1 (characteristic model of mature adipocytes) and we studied key molecules and enzymes in the insulin signaling pathway to see if they are altered by overexpression both in basal conditions as stimulated with insulin or leptin.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La obesidad

Se define como una acumulación anormal o excesiva de grasa corporal, debida a una alteración en el balance energético, que ocurre cuando la ingesta es mayor que el gasto. Cuando la obesidad es sostenida durante largos periodos de tiempo es perjudicial para la salud asociándose con una mayor prevalencia de condiciones patológicas crónicas, tales como la hipertensión arterial, *diabetes mellitus*, cáncer, enfermedades respiratorias, etc. Las complicaciones de la obesidad la han convertido en la segunda causa de mortalidad prematura por detrás del tabaco ⁽¹⁾.

1.1.1 Diagnóstico clínico de la obesidad

Epidemiológicamente, se considera que una persona es obesa si su peso es un 25% superior al indicado para su constitución física en el caso de varones y superior a 33% en el caso de mujeres o si tiene un índice de masa corporal (IMC) por encima de 30 Kg/m² (Tabla I) ⁽²⁾. El IMC se calcula según la fórmula, $IMC = \text{Peso [Kg]} / \text{altura}^2 [\text{m}^2]$.

Tabla I: Criterios de la OMS para definir la obesidad en diferentes grados en función del IMC ⁽³⁾.

Grado	Clasificación	IMC	Riesgo comorbilidad
	Normopeso	18,5-24,9	Normal
I	Sobrepeso	25-29,9	Incrementado
II	Obesidad leve	30-34,9	Moderado
III	Obesidad Moderada	35-39,9	Alto
IV	Obesidad severa	Más de 40	Muy alto

Existen algunos índices antropométricos para diagnosticar la obesidad ⁽⁴⁾:

- Índice cintura/muslo: se considera anormal un valor superior a 1,6 en varones y 1,4 en mujeres.

- Índice cintura/cadera: predice mucho mejor que el índice cintura/muslo los riesgos de mortalidad y morbilidad. Se considera normal cuando la relación es inferior a 1 en varones y a 0,85 en mujeres. Este índice ha sido muy cuestionado ya que la grasa que se acumula en la región de las caderas varía mucho y eso puede conducir a error ⁽⁵⁾.

Aunque actualmente se siguen utilizando estos índices, se considera que el perímetro de la cintura (Tabla II) es uno de los mejores indicadores de obesidad ⁽⁵⁾.

Tabla II: Datos antropométricos para la evaluación del perímetro de la cintura ⁽⁶⁾.

Medición (cm)	Estado nutricional	Riesgo de comorbilidad
Hasta 80	Normal	Sin riesgo
De 80 a 88	Pre obesidad abdominal	Riesgo incrementado
Más de 88	Obesidad abdominal	Alto riesgo

1.2 Tejido adiposo

El tejido adiposo es una variedad de tejido conjuntivo que está formado por un grupo de células que reciben el nombre de adipocitos que están especializadas en almacenar grasas o lípidos y producen numerosas moléculas, denominadas adipoquinas, entre las que destaca la leptina. Este tejido se constituye por la unión, mediante fibras reticulares (colágeno tipo III) de los adipocitos. Las células adiposas al unirse constituyen los lóbulos adiposos ⁽⁷⁾.

Podemos encontrar dos variedades de tejido adiposo: la grasa blanca o amarilla y la grasa parda ⁽⁷⁾.

- Tejido adiposo blanco o amarillo: denominado también unilocular, ya que los lípidos se almacenan, en un solo compartimento (*locus*), en el interior de las células como una gota citoplasmática. El color de grasa varía en función de la ingesta del individuo. Estas células uniloculares son grandes entre 50-60 μm . Presentan una forma esférica al encontrarse aisladas pero adoptan formas poliédricas al formar los lóbulos adiposos ⁽⁸⁾.

- Tejido adiposo pardo: su nombre se debe al color pardo que presentan las células, este color se debe a la cantidad apreciable de citocromos que contienen las numerosas mitocondrias que existen en los adipocitos, también se denomina multilocular debido a que las células que almacenan los lípidos en forma de pequeñas vesículas se distribuyen por todo el citoplasma ⁽⁸⁾.

1.3 Regulación de la ingesta de alimentos

El comportamiento alimentario es un aspecto muy importante en el mantenimiento del peso corporal, que se puede ver influenciado por factores medioambientales, socioeconómicos, nivel cultural y otros factores relacionados con el estilo de vida. Esto hace que en ocasiones la cantidad de energía ingerida no se correlacione con el gasto energético diario. El control de la ingesta se diferencia en dos sistemas: a corto plazo y a largo plazo ⁽⁸⁾.

1.3.1 Sistema de regulación a largo plazo

La regulación a largo plazo se lleva a cabo a través de señales periféricas de adiposidad, que son proporcionales al tamaño de las reservas energéticas en forma de grasa. Dentro de este sistema destacan tres hormonas: insulina, leptina y ghrelina ⁽⁹⁾ (Figura 1).

La leptina y la insulina son hormonas que circulan en proporción con la adiposidad corporal y activan las neuronas anorexigénicas pro-opiomelano-cortina (POMC) y el tránsito regulado por la cocaína anfetamina (CART) mientras que inhibe a los neuropéptidos orexigénicos (NPY/AGRP), promoviendo así la pérdida de peso. En contraste, la hormona ghrelina gástrica estimula las neuronas NPY/AGRP y promueve la ganancia de peso ⁽⁹⁾.

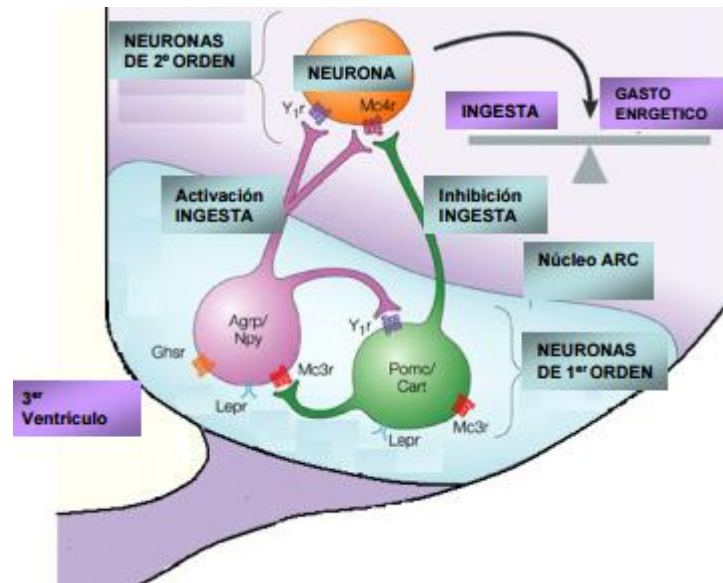


Figura 1: Vías de regulación a largo plazo ⁽¹⁰⁾.

1.3.1.1 Leptina

La leptina es un péptido de 16 KDa y que consta de 167 aminoácidos (aa). Es una hormona secretada por el tejido adiposo en función de la cantidad total de masa grasa, del tamaño de los adipocitos y de su contenido en triglicéridos, por lo que, aumenta en obesos y disminuye con la pérdida de peso ⁽¹¹⁾.

Mecanismo de acción de la leptina

Diversos estudios en roedores han descubierto que una de las principales acciones de la leptina es favorecer la reducción de la ingesta de los alimentos y el aumento del gasto energético, esto es así, porque el receptor de leptina se expresa en dos poblaciones neuronales del núcleo arcuato (ARC) hipotalámico, claves en la regulación de la ingesta: uno de los cuales secreta NPY/AgRP y el otro POM/CART. Así, la leptina estimula la producción de neuropéptidos anorexigénicos y suprime los niveles de los orexigénicos como se demuestra en casos de déficit de niveles de leptina tales como el ayuno, en los que se estimula la ingesta mediante la supresión de la síntesis de la POMC/CART y el aumento de los niveles de expresión de NPY/AgRP (Figura 2) ⁽¹²⁾.

Además puede ejercer su acción sobre las neuronas POMC mediante la disminución del ácido γ -aminobutírico y sobre las neuronas NPY/AgRP, disminuyendo la secreción de la proteína r-agouti (AgRP), mediante la activación de canales de potasio sensibles al ATP (K^+ -ATP) (13).

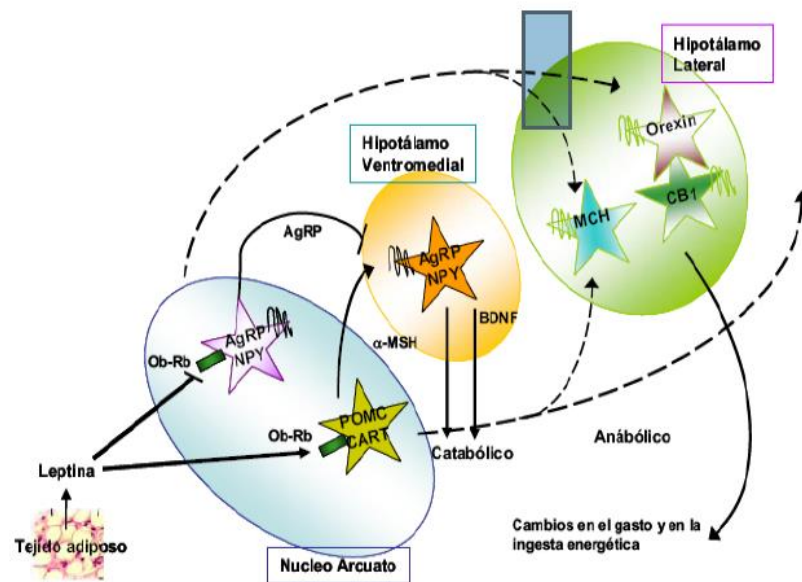


Figura 2: Mecanismos de acción de la leptina en la regulación de la ingesta y el gasto energético. (10)

Se sabe que los valores de leptina son mayores en mujeres, en obesos y que aumentan ante estímulos como la glucosa, la insulina, la sobrealimentación o por los niveles de estradiol, mientras que son menores en varones y es inhibida por la testosterona y por el consumo de dietas ricas en grasas ya que éstas inducen un descenso de la insulina (14).

La leptina influye en muchos parámetros del metabolismo energético como la estimulación del transporte de glucosa, síntesis de glucógeno, lipogénesis, inhibición de la lipólisis y de la activación de la proteína quinasa A (PK-A), así como de la síntesis de proteínas en células diana sensibles a la insulina (15).

En algunos casos se ha encontrado también una posible conexión entre leptina y resistina (RSTN), indicando que la leptina puede mejorar la sensibilidad a la insulina mediante una vía que interaccione y suprima los efectos de la resistina ⁽¹⁶⁾.

Así, publicaciones recientes indican que la RSTN a nivel central puede causar resistencia a la insulina en el hígado mediante acciones a nivel hipotalámico ⁽¹⁷⁾. Se observó que esta resistencia a la insulina en el hígado se produjo mediante variaciones en los niveles de expresión de neuropéptidos en distintos núcleos hipotalámicos, especialmente con un aumento de NPY en el ARC y el núcleo ventromedial hipotalámico (VMN). La RSTN causa un aumento de interleuquina 6 (IL-6), TNF α y del supresor de señalización de citoquinas 3 (SOCS3), y disminuye la fosforilación del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3), que a su vez provoca un descenso en la sensibilidad a insulina y un incremento en la salida de glucosa ⁽¹⁶⁾.

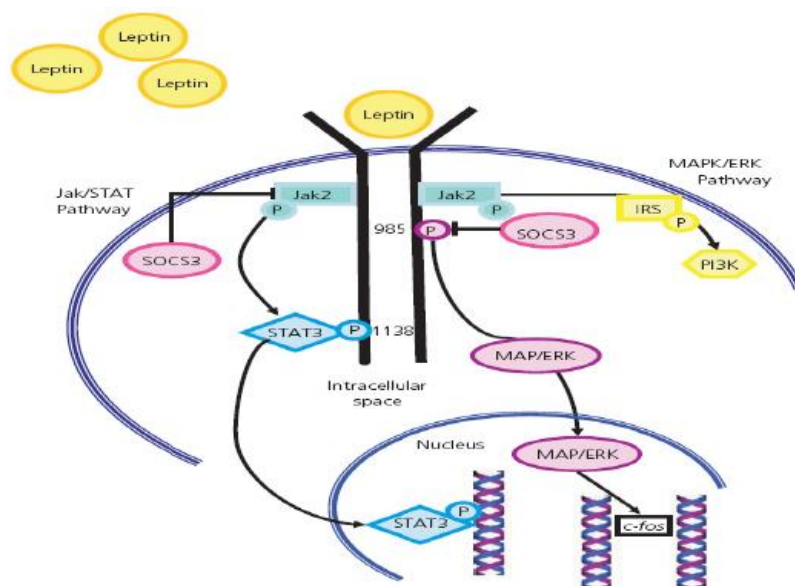


Figura 3: Vía de señalización de la leptina y su regulación negativa por SOCS3 ⁽¹⁰⁾.

Numerosos estudios han demostrado que cuando los niveles de leptina están elevados en la sangre, se induce la expresión génica de SOCS3 a través de la proteína STAT3. El producto proteico de SOCS3 es

capaz de interactuar con el residuo fosforilado Y985 del receptor de la leptina y con el gen janus quinasa 2 (JAK2) bloqueando la señalización activada por la leptina ⁽¹⁸⁾. Por lo tanto, la señalización de la leptina a través de la vía JAK2-STAT3 puede estar regulada mediante un *feedback* negativo ejercido por la proteína supresora de las citocinas SOCS3 y también por la proteína tirosina fosfatasa 1 β (PTP1 β) que tiene un efecto similar a SOCS3 ⁽¹²⁾ (Figura 3).

1.3.1.2 Insulina

Es una hormona peptídica secretada por las células beta del páncreas, tiene un papel muy importante en la regulación del metabolismo. Su principal función es contrarrestar la acción de varias hormonas que generan hiperglucemia y mantener estables los niveles de glucosa. También estimula la lipogénesis, disminuye la lipólisis y, aumenta el transporte de aminoácidos en las células. Sus niveles están elevados en pacientes obesos ⁽¹⁹⁾.

Secreción de la insulina

Se sintetiza como una prehormona en las células- β y su secreción por estas células está regulada por los niveles de glucosa. Un incremento en la entrada de glucosa en estas células- β conduce a un incremento en el metabolismo que lleva a una elevación del ratio de adenosín 5´trifosfato/adenosín difosfato (ATP/ADP). Esto a su vez lleva a la inhibición de un canal K⁺-ATP. Su resultado es, por tanto, una despolarización de la célula llevando a una entrada de iones calcio (Ca²⁺) y a la secreción de insulina ⁽²⁰⁾.

Acciones metabólicas de la insulina

- a)** Acción sobre el hígado: la insulina secretada por las células- β del páncreas, entra de forma directa en el hígado por la vena porta, donde ejerce muchos de sus efectos metabólicos. Estos efectos son la respuesta de la activación del receptor de insulina ⁽²¹⁾.
- b)** Acción sobre el metabolismo de los lípidos: la insulina aumenta el aclaramiento de los triglicéridos de los quilomicrones de la circulación, por

medio de la estimulación de la lipoproteína lipasa, que hidroliza los triglicéridos en ácidos grasos que pueden ser oxidados o almacenados en el músculo y en el tejido adiposo ⁽²¹⁾.

1.3.1.3 Ghrelina

Al igual que la leptina está implicada en el control a corto y a largo plazo de la ingesta. La ghrelina es la única hormona circulante conocida hasta el momento con acción orexigénica y tras su administración tanto a nivel central como periférico aumenta la adiposidad y la ingesta de alimentos ⁽²²⁾. La ghrelina es un potente secretagogo de la hormona de crecimiento (GH), sin embargo, su efecto sobre la adiposidad es independiente de la GH e implica los circuitos neuronales que controlan la ingesta de alimentos, el gasto de energía y la partición de nutrientes ⁽²²⁾.

La ghrelina favorece la ingesta gracias a que estimula péptidos orexígenos como el NPY y la proteína r-agouti (AGPR) aumentando su actividad y al mismo tiempo, inhibe la actividad de POMC y CART ⁽²²⁾.

1.3.2 Sistema de regulación a corto plazo

Este sistema se encarga de regular el apetito, el inicio y finalización de las comidas, y responde principalmente a hormonas gastrointestinales o señales de saciedad que se acumulan durante la alimentación y contribuyen a terminar la ingesta ⁽⁸⁾.

Pueden ser de dos tipos:

- Señales mecánicas: debidas a la digestión gástrica y que son transmitidas a través de las vías aferentes del nervio vago ⁽²¹⁾.
- Señales químicas: provienen de los nutrientes y de los osmosensores del intestino delgado y del hígado y son transmitidas a través de las fibras vagales aferentes. El tacto gastrointestinal en respuesta al alimento secreta gran cantidad de péptidos que inhiben la ingesta en un periodo corto de tiempo ⁽²¹⁾.

1.4 Ruta metabólica de los lípidos

La grasa es la principal forma de almacenamiento de energía en los mamíferos, mientras que los tejidos de almacenamiento más importantes son; el tejido adiposo, y el hígado. Cada uno de estos tejidos tiene la capacidad de almacenar triglicéridos que pueden llegar a ser hidrolizados para la liberación de los ácidos grasos ⁽²³⁾.

Un gran número de lípidos de la dieta se encuentran en forma de triglicéridos que se hidrolizan en el intestino por acción de diferentes lipasas dando lugar a los diacilglicéridos, monoacilglicéridos y ácidos grasos. Estos son absorbidos por la mucosa intestinal y se re-esterifican dando lugar a los triglicéridos ⁽²⁴⁾. Estos, junto con el colesterol, fosfolípidos y algunas apoproteínas, entre la que se encuentra la apolipoproteína CII (apoCII), forman los quilomicrones ⁽²⁵⁾. La apoCII activa la lipoproteína lipasa (LPL), que se sintetiza en la superficie de las células endoteliales del tejido adiposo y muscular. Hidrolizará los triglicéridos en glicerol. La última etapa de formación de triglicéridos implica la formación de un enlace éster entre un acetil-coenzima A (acetil-CoA) y un grupo hidroxilo libre de un diacilglicerol ⁽²⁶⁾.

1.4.1 Síntesis de ácidos grasos

La síntesis de los ácidos grasos *de novo* a partir de la acetil-CoA y de malonil-CoA se lleva a cabo gracias a la acción de la sintasa de ácidos grasos (FAS). La enzima activa es un dímero de dos subunidades idénticas. El principal ácido graso sintetizado por la FAS es el palmitato que es liberado desde la enzima y puede ser desnaturalizado para producir otras moléculas de ácidos grasos ⁽²⁷⁾.

Otros enzimas que regulan la cantidad de malonil-CoA presente en el citosol son: acetil-coenzima A carboxilasa (ACC), malonil-CoA descarboxilasa (MCD) y la carnitín palmitoil transferasa 1 (CPT-1) ⁽²⁸⁾.

ACC está regulada por la fosforilación en sus residuos de serina, siendo fosforilada por PKA y por la proteína quinasa activada por AMP

(AMPK) ⁽²⁹⁾. La fosforilación causa la inactivación de ACC al impedirse el correcto ensamblaje de los monómeros de ACC, aunque mientras que PKA causa una reducción de menos del 15% en su actividad, AMPK disminuye hasta un 90% la actividad de ACC ⁽³⁰⁾.

Se sabe que la insulina y la ghrelina estimulan la síntesis y la actividad de ACC y FAS mientras que el ayuno y la leptina llevan a una disminución en la síntesis y actividad de estas enzimas ⁽³¹⁾.

La conversión de glucosa en ácidos grasos (AG), incluye la entrada del piruvato procedente de la glucólisis al ciclo de Krebs, en la mitocondria. El citrato formado es transportado al citosol donde se convierte a acetil-CoA por la enzima ATP citrato-liasa (ACL). A su vez, la ACC, la primera enzima limitante de la lipogénesis de *nov*o, convierte el acetil-CoA en malonil-CoA, que se transforma en palmitoil-CoA, por acción de FAS ⁽³²⁾ (Figura 4).

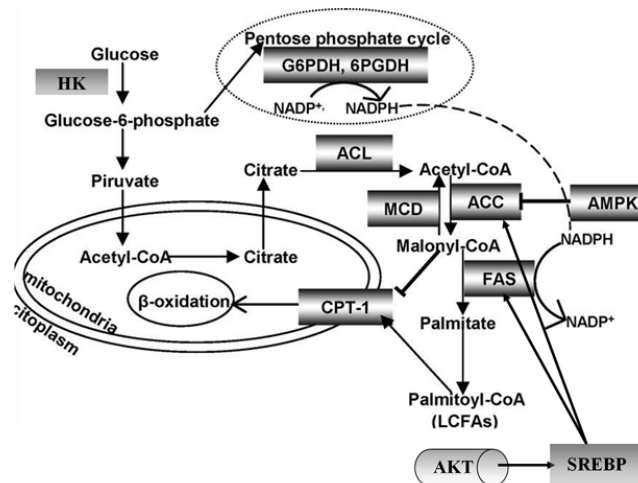


Figura 4: Resumen de las rutas del metabolismo intermediario.

1.5 SOCS3 e IL-6 y su relación con la resistencia a la insulina y a la leptina

Tanto la resistencia a la insulina como a la leptina están relacionadas con la obesidad y el deterioro de su capacidad de transferir información a los receptores ⁽³³⁾.

SOCS3 está implicada en la regulación negativa de la IL-6, leptina, hormona del crecimiento, receptores de quimiocinas e insulina entre otros. El mecanismo por el cual el aumento crónico de IL-6 durante la obesidad causa resistencia a la insulina no está completamente definido, pero se sabe que implica a los niveles basales de diversas proteínas SOCS en tejidos tanto periféricos como a nivel del sistema nervioso central (SNC)⁽³⁴⁾. Se sabe que un aumento de señalización de la IL-6 durante la obesidad provoca un aumento de SOCS1 y de SOCS3 en los principales tejidos periféricos sensibles a la insulina: tejido adiposo blanco, hígado y músculo. A nivel molecular SOCS1 y SOCS3 deterioran la acción de la insulina por unión a IRS1 e IRS2, lo cual a su vez permite su ubiquitinación y degradación. Los ratones *knock-out* (KO) para SOCS3 son letales a nivel embrionario, sin embargo los heterocigotos sobreviven y están protegidos contra el desarrollo de la resistencia a la insulina asociada a la obesidad. Por otra parte la sobreexpresión de SOCS1 y SOCS3 permiten el desarrollo de la resistencia a la insulina puesto que reducen la fosforilación de IRS1 e IRS2, que se requiere para la transducción de la señal de la insulina. IL-6 induce la expresión de SOCS3 en adipocitos 3T3-L1 y a su vez esta sobreexpresión disminuye los niveles de fosforilación de IRS1, así como los niveles de fosforilación de IRS1 e IRS2 estimulados por la insulina⁽³⁴⁾. Esta acción provoca fallos en la señalización de la insulina y disminución de la captación de glucosa en los adipocitos y de la lipogénesis⁽³⁴⁾.

Tanto la leptina como la IL-6 activan la señalización intracelular JAK-STAT3. La activación crónica de la señalización JAK-STAT3 debida a la obesidad provoca un aumento de la expresión de SOCS3 que a su vez, como ya se ha mencionado anteriormente, regula negativamente la señalización de la leptina y la IL-6, pero también regula negativamente la señalización de la insulina (Figura 5), lo que eventualmente permite resistencia a la insulina en la obesidad⁽³⁴⁾.

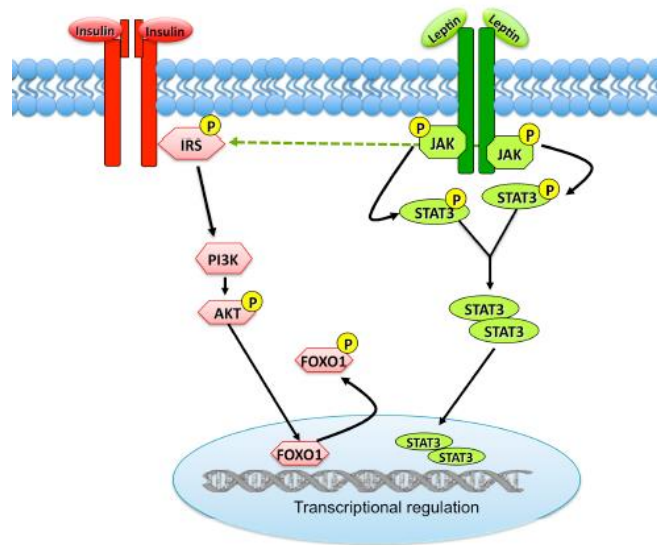


Figura 5: Ruta de señalización de la leptina e insulina a través de las vías JAK/STAT y PIK/AKT.
(20).

1.6 Los *microARNs* (*miARNs*)

Los *miARNs* son pequeños ácidos ribonucleicos (ARNs) endógenos de 18-24 nucleótidos no codificantes puesto que no se traducen a proteína y que tienen la capacidad de reconocer, por complementariedad de bases, ciertas regiones de un ARN mensajero diana (*ARNm*). Su función principal es la regulación postranscripcional de éste por hibridación con sus regiones 3' no traducibles (3'-UTR) ⁽³⁵⁾ (Figura 6).

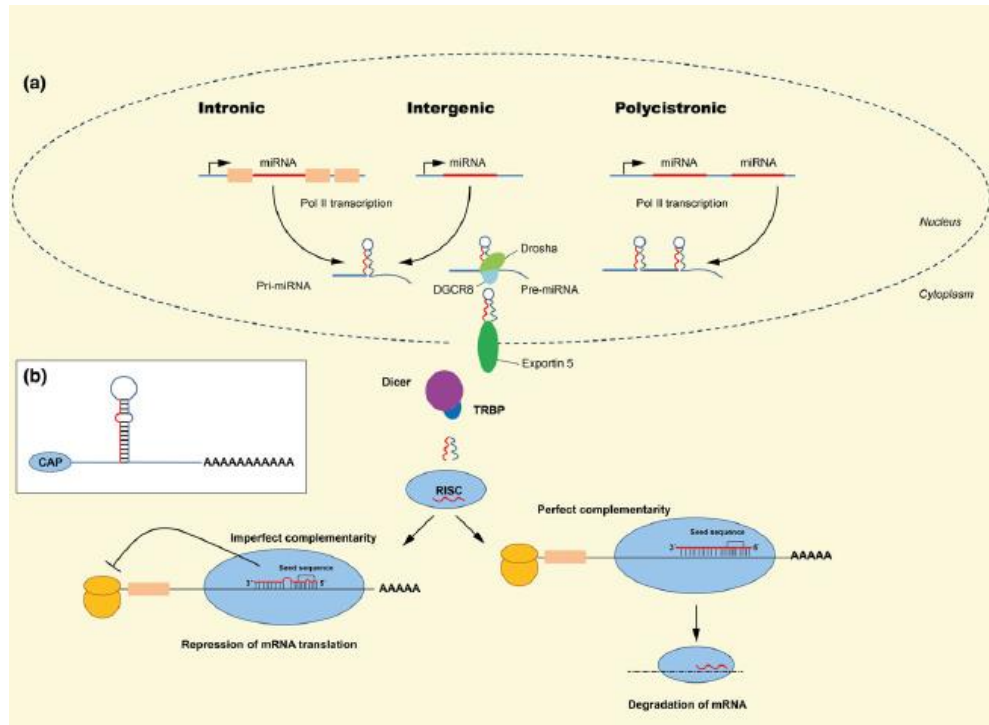


Figura 6: Ruta de síntesis de los *microARNs* ⁽³⁶⁾.

La ruta de síntesis de un *miARN* maduro es un proceso complejo que ocurre en dos etapas. La primera ocurre en el núcleo y la siguiente en el citoplasma, donde se genera un nucleótido maduro de cadena sencilla de aproximadamente 22 nucleótidos ⁽³⁵⁾. Pueden encontrarse en regiones intergénicas o en intrones de genes que codifican proteínas y con una menor frecuencia, en exones. Son transcritos por la polimerasa II, dando lugar a un precursor (*pre-miARN*) que tiene una longitud aproximada entre 100 y 1000 nucleótidos. Este *pre-miARN* es transportado desde el núcleo al citoplasma por el complejo exportina-5/Ran-GTP. Una vez que este entra en el citoplasma es fragmentado por la enzima dicer, dando lugar en el procesamiento a la liberación de una cadena doble de 22 nucleótidos: *miARN-miARN**. Solo una de estas cadenas es la encargada de la represión traslacional del *ARNm* ⁽³⁵⁾ (Figura 6).

Cuando el *miARN* se une a su gen diana puede provocar silenciamiento a través de distintos mecanismos:

1. Bloqueando el inicio y la elongación de la traducción.

Implicación de los *microARNs* en la adipogénesis y sensibilidad a la insulina

2. "Reteniendo" el *ARNm* lejos de la "maquinaria" de traducción transfiriéndolo a cuerpos de procesamiento donde será degradado.
3. También existe un cierto grado de degradación del *ARNm*.
4. Mecanismos alternativos en función del contexto celular.

Los *miARNs* presentan una enorme capacidad reguladora, debido a que puede presentar secuencias de reconocimiento en las regiones 3' no traducidas (3'-UTRs) de una gran variedad de genes, es decir, un mismo *miARN* puede regular hasta cientos de *ARNm* distintos, y a su vez un mismo *ARNm* puede estar regulado por múltiples *miARNs* ⁽³⁵⁾.

Los *miARNs* pueden participar en el control de distintos procesos celulares como la, diferenciación, la proliferación, la apoptosis y el metabolismo. De ahí, que su desregulación o expresión anormal esté relacionada con numerosos entornos patológicos como el cáncer, diabetes y enfermedades neurológicas ⁽³⁷⁾.

Cada vez los *microARNs* están cobrando un mayor interés puesto que se podrían utilizar como biomarcadores ya que se expresan de manera estable en plasma, suero y fluidos corporales ⁽³⁵⁾.

1.6.1 Los *miARNs* y su relación con la obesidad y la diabetes

Aunque no existe un cuadro claro sobre la implicación de los *miARNs* en el desarrollo y/o mantenimiento de la obesidad, se sabe que determinados *miARNs* participan en la homeostasis de la glucosa, metabolismo de lípidos, ruta de señalización de la insulina, desarrollo del páncreas y desarrollo de los islote pancreáticos ⁽³⁶⁾.

A continuación, vamos a citar algunos ejemplos:

La familia *let-7* (unos de los primeros *miARNs* descubiertos) regula el metabolismo de la glucosa en numerosos tejidos. La sobreexpresión de *let-7* en ratones provoca fallos en la tolerancia a la glucosa y un descenso en la secreción de insulina pancreática inducida por la glucosa ⁽³⁸⁾.

Varios estudios han demostrado que tanto como la cantidad, como los niveles de expresión de los *miARNs* varían en las células β -

pancreáticas, en tejidos adiposos y en el músculo esquelético de animales con diabetes *mellitus* tipos I y II. Demostrando, por tanto, que existe una correlación entre el desarrollo de la diabetes y la alteración en la expresión de algunos *microARNs* ⁽³⁸⁾.

También se demostró que tanto *miR-107* como *miR-103* están sobreexpresados a nivel hepático y en el tejido adiposo de ratones obesos y su silenciamiento en estos tejidos mejora la sensibilidad a la insulina y la homeostasis de la glucosa ⁽³⁸⁾.

Un grado bajo de inflamación en el tejido adiposo blanco es una característica clave de la obesidad, y se han encontrado *miARNs* estrechamente asociados con los trastornos metabólicos ocasionados por la obesidad y relacionados con la inmunidad ⁽³⁸⁾.

1.7 Línea Celular 3T3-L1

La línea de fibroblastos 3T3-L1, es una línea de preadipocitos que ante los estímulos adecuados se diferencia a adipocitos y derivada de las células embrionarias de ratón provenientes de cultivo tipo americano (ATCC), obtenida a partir de un extracto continuo de 3T3, caracterizado por ser células unipotentes y que tienen la capacidad de expresar receptores de insulina. Se han utilizado de forma general como modelo para la adipogénesis. L1 es una sublínea de 3T3 desarrollada mediante el aislamiento de un clon. Esta línea se caracteriza por la diferenciación que sufren los preadipocitos a adipocitos cuando pasan de un estado proliferativo a uno de confluencia e inhibición por contacto ⁽³⁹⁾.

2. OBJETIVOS

1. Uso de programas bioinformáticos para buscar los posibles *miARNs* reguladores tanto de SOCS3 como de la ruta de señalización implicada en la diabetes *mellitus* tipo II.
2. Búsqueda de los posibles genes diana de los *miARNs* obtenidos en el punto anterior mediante el uso de programas bioinformáticos.
3. Uso de software Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Ingenuity ® Systems, <http://www.ingenuity.com/>) con la lista de genes del objetivo 2 para agruparlos en vías canónicas, facilitando la creación y el análisis de rutas que ponen en correlación los perfiles de expresión génica con funciones, enfermedades, trayectorias y mecanismos moleculares.
4. Puesta a punto del cultivo y diferenciación a adipocitos maduros de la línea celular 3T3-L1.
5. Sobreexpresar alguno de los *miARNs* obtenidos en el punto 1 en adipocitos maduros de la línea 3T3-L1.
6. Estudio de la expresión proteica de SOCS3 y otras moléculas relacionadas en la ruta de la señalización de la insulina en células transfectadas en el punto 5.
7. Estudio de la actividad de enzimas clave del metabolismo intermediario de células transfectadas en el punto 5.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Programas informáticos

Existe una serie de programas, algoritmos informáticos que nos ayudan a predecir los *miARNs* que pueden regular un *ARNm* o que *ARNs* mensajeros pueden estar regulados por un único *miARN*. En esencia, estos programas lo que hacen es comparar las regiones 7-mer, 8-mer conservadas de los *miARNs* (regiones "semilla") con secuencias de *ARNm*, fundamentalmente en la región 3'-UTR (el lugar más común de los *miARNs* al *ARNm*). Estos programas informáticos están disponibles *on line* de modo gratuito. Si bien no son los únicos programas disponibles en este trabajo usamos: TargetScan: www.targetscan.org/; miRanda: www.microrna.org/microrna/home.do; PicTar: www.pictar.mdc-berlin.de/; Diana Lab: www.diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/ y miRWalk: <http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/> ⁽⁴⁰⁾.

3.2 Línea celular

Se utilizó la línea celular de fibroblastos de ratón 3T3-L1 (preadipocitos).

3.3 Sobreexpresión de *miARNs* con lipofectamina

Cuando las células estuvieron completamente diferenciadas se llevó a cabo la transfección. Para ello, se eliminó el medio de mantenimiento y se lavaron las células con salino, posteriormente se añadió 1 mL del medio de transfección preparado como sigue:

Se diluyó la lipofectamina (RNAiMAX) en medio Opti-MEM en un microtubo. En otro microtubo se diluyó el sobreexpresante comercial de interés o el control negativo en medio Opti-MEM, se dejaron incubando durante 5 min y transcurrido este tiempo se mezclaron ambos tubos, esta mezcla fue añadida a las células que se mantuvieron 2 días con este medio.

Todas las sobreexpresiones se llevaron a cabo en células entre pase 12-15.

3.4 Tratamientos con leptina

Dos días después del comienzo de la transfección, se retiró el medio por medio de recuperación (medio dulbecco modificado (DMEM/F12) + 1% penicilina/estreptomicina (P/S)), al día siguiente se añadió leptina (150 ng/mL) o salino. Transcurridas 2 horas las células se lavaron con suero salino y se levantaron en un tampón de lisis para extracción de proteína (RIPA) o para la extracción de ARN mediante TRizol para realizar posteriormente Western *blot* (WB) y actividad enzimática o reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real respectivamente.

3.5 Extracción de ARN y realización de PCRs

Para los ensayos de *miARNs*, el ARN total se extrajo con TRizol (Invitrogen) siguiendo las especificaciones del fabricante.

La integridad y la calidad/concentración del ARN se determinaron mediante geles de agarosa y un Espectrofotómetro NanoDrop ND-100 (*Thermo Scientific*) respectivamente. Una vez obtenido el ARN, los pasos a seguir fueron los siguientes:

- Preparar la mezcla de retro-transcripción (RT) (Tabla III).
- Realización de RT (Tabla IV).
- Preparar la mezcla de la reacción de la PCR (Tabla V).
- Cargar la placa de PCR con el producto de la RT+ la mezcla de PCR.
- Llevar a cabo la PCR y analizar los datos (Tabla VI).

Tabla III: Preparación de la mezcla de reacción de RT.

Mix de la RT	Volumen por muestra (μ L)
Cebadores de RT	2

DNTPs	0,15
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1
Tampón de RT 10x	1,5
Inhibidor de ARNasas	0.19
H ₂ O libre de nucleasas	5.16

Para cada muestra hay que añadir 10 µL de la mix anterior y 5 ng de ARN (a una concentración de 1 ng/µL). Una vez mezclados todos los componentes las muestras se introducen en un termociclador con el siguiente programa:

Tabla IV: Programa de la RT

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Retrotranscripción	16	45
	42	45
Desnaturalización de enzimas	85	5
Enfriamiento	4	∞

Una vez realizada la RT, el ADN obtenido se diluye quince veces y se prepara la mix para la PCR en tiempo real siguiendo las siguientes cantidades:

Tabla V: Preparación de la mezcla de reacción de la PCR.

Componentes	Volumen para cada placa (µL)
TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG, 2X	8,75
Cebadores para PCR	0,875
H ₂ O libre de nucleasas	5,375

A 2,5 µL del ADNc diluido de cada una de las muestras se le añade 15 µL por muestra de la Mix anterior y se lleva a cabo la PCR en tiempo real siguiendo el siguiente programa:

Tabla VI: Programa de la PCR.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo
--------------	-------------------------	---------------

Activación	50	2 min
Desnaturalización	95	10 min
40 ciclos	95	15 seg
	60	1 min

3.6 Western blot

El análisis mediante WB de la expresión de diversas proteínas implicadas en el metabolismo de los lípidos y en la ruta de señalización de la insulina y se llevó a cabo en base a diferentes protocolos estandarizados por el grupo de investigación.

- Extracción de proteínas.

Este proceso se lleva a cabo en frío para evitar la degradación de las proteínas. Las muestras se homogenizan en tampón de lisis con la ayuda del microdismembrator. Una vez extraídas las proteínas, hay que calcular su cantidad, para ello se usa el método de Bradford y se usa una curva patrón obtenida a partir de concentraciones conocidas de seroalbúmina bovina (BSA). El proceso que se siguió fue el siguiente:

-Se añade tampón de lisis en función de la cantidad de células (tamaño del pocillo) de cada muestra.

*Tampón de lisis: 50 mM TRIS-HCl (pH=7,5), 1% Triton 1% v/v, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF, 5 mM Na₄P₇O₂, 0,5 M Sacarosa, cóctel inhibidor de proteasas y 0,2 mL de β-mercaptoetanol.

--Se introducen las células con el tampón de lisis en el microdesmembrador para lisar las células y extraer las proteínas.

-A continuación se centrifugan las muestras a 13500 rpm a 4°C durante 30 min. El sobrenadante se guarda para utilizar en la determinación de la expresión de proteínas mediante WB, pero previamente se determinó la concentración de proteínas.

-Una vez las células están lisadas se les añade el tampón de carga. En el momento de utilizar las muestras se calientan a 95°C durante 5 min.

- Cuantificación de la proteína

Para llevar a cabo la cuantificación de la concentración de proteínas usamos el método de Bradford, que se basa en utilizar un colorante hidrofóbico el azul de Comassie G-250 cuyas disoluciones acuosas en presencia de ácido fosfórico tienen un color pardo que al entrar en contacto con la parte hidrofóbica del interior de una proteína se fija⁽⁴¹⁾.

Se realizó una curva estándar empleando una proteína patrón a una concentración conocida (BSA). Se prepararon diferentes diluciones de BSA. Se pipetearon 10 µL de cada una de las concentraciones de BSA por duplicado en una placa de 96 pocillos y se añadió a cada una de las muestras 300 µL de Bradford (Biorad).

Posteriormente se midió su absorbancia a una longitud de onda de 595 nm.

- Electroforesis y Transferencia

La separación por peso de las proteínas se realiza por electroforesis en geles *SDS-PAGE* de acrilamida, compuesto por dos fases: fase superior o *stacking* (permite homogenizar la entrada de las proteínas en el gel separador) y la fase inferior o *running* (permite la separación de las proteínas en función del tamaño). En función del peso de la proteína objeto de estudio, los geles se usaron a determinadas concentraciones de acrilamida, cuanto menor sea el peso de la proteína mayor es el porcentaje de acrilamida utilizado.

La cantidad de proteína óptima a cargar en cada gel depende de la expresión de la proteína de interés y de la sensibilidad del anticuerpo primario.

-La electroforesis se lleva a cabo durante 60 min con un voltaje fijo de 130 V.

- Transferencia

La transferencia (semiseca) se realiza sobre una membrana de PVDF (*Millipore*) que debe ser activada previamente (2 min en metanol, 5 min en H₂O y 10 min en Tampón de transferencia). La transferencia se llevó a cabo durante unos 90 min a un amperaje constante de 180 mA.

-Finalizada la transferencia se bloquea la membrana durante 1 hora con BSA al 3% a temperatura ambiente.

- Inmunodetección

-Se deja incubando la membrana toda la noche con el anticuerpo primario a 4°C. La concentración del anticuerpo varía en función de la proteína a estudiar (Tabla VII).

-Al día siguiente se realizan 3 lavados de 10 min con la solución de lavado (TBS-TWEEN al 0,1%).

-Se incuba la membrana durante 2 horas con el anticuerpo secundario.

Tabla VII: Relación de anticuerpos primarios y secundarios y sus correspondientes diluciones.

Anticuerpo primario	Dilución	Casa comercial	Anticuerpo Secundario	Dilución	Casa comercial
FAS	1/1000	Santa Cruz	Anti-rabbit	1/4000	Dako Cytomation
SOCS3	1/1000	Abcam	Anti-rabbit	1/4000	Sigma Aldrich
β-Actina	1/5000	Sigma Aldrich	Anti-mouse	1/5000	Dako Cytomation
Tubulina	1/7000	Sigma Aldrich	Anti-mouse	1/5000	Dako Cytomation
pAKT	1/2000	Cell Signaling	Anti-rabbit	1/5000	Dako Cytomation

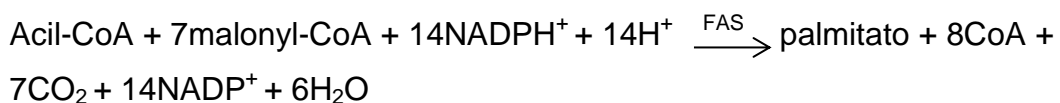
- La detección de las proteínas se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia utilizando una cámara CCD (Fujifilm intelligent dark box LAS-3000) y su cuantificación se llevó a cabo con el software *ImageJ*.

3.7 Cinética enzimática

Para llevar a cabo el análisis de la actividad cinética de una enzima, lo primero que tenemos que hacer es obtener un extracto proteico en el que se encuentre la enzima objeto de estudio. Puesto que todas las enzimas que estudiamos se encuentran en el citosol de la célula, el método para la extracción y cuantificación de proteínas es exactamente igual que para el WB.

Ácido graso sintetasa (FAS EC. 2.1.3.85)

La ácido graso sintasa cataliza la síntesis del ácido palmítico a partir del acetil-CoA y del malonil-CoA en presencia de β -Nicotinamida adenina dinucleotide 2'-fosfato forma reducida (NADPH).



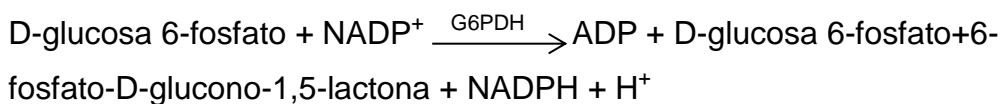
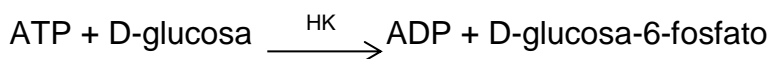
La oxidación de NADPH puede determinarse espectrofotométricamente a una longitud de onda de 340 nm. Para llevar a cabo la medida, en una placa de 96 pocillos se ponen: 20 μL de muestra por duplicado y 250 μL de solución de incubación:

13 mM de K_2HPO_4 , 26 mM de KH_2PO_4 , 1 mM EDTA, 1 mM DTT a pH: 6,8 y se añade por último 0,1 mM NADPH, 0,02 mM acil-CoA, 0,15 mM malonil-CoA (omitido en el control). Durante 15 min se lee la absorbancia de modo continuo. La actividad de FAS se calcula como la diferencia de actividad entre el pocillo con sustrato y sin sustrato (control). La actividad de FAS se define como la cantidad de nmoles de NADPH oxidados/min/mg proteína.

Hexoquinasa (HK, EC. 2.7.1.1)

Es una enzima limitante de la glucólisis, inicia la vía principal de metabolismo de azúcares fosforilando una molécula de glucosa, a partir de ATP.

Para llevar a cabo la medida de la actividad enzimática de HK, acoplamos una reacción auxiliar (G6PDH) que produce NADPH y que podemos detectar espectrofotométricamente a 340 nm.

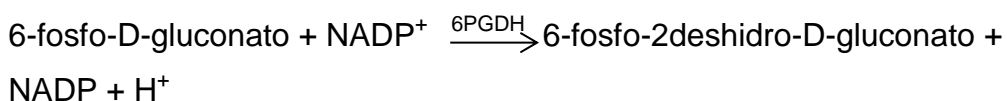
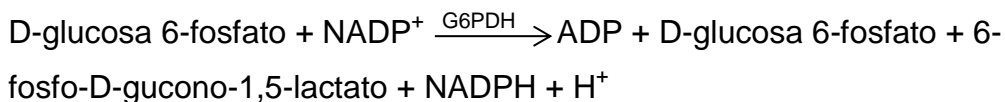


Para llevar a cabo la medida, en una placa de 96 pocillos se ponen: 20µL de muestra por duplicado y 250 µL de solución de incubación:

13 mM de imidazol (pH = 8), 5 mM de MgCl₂, 1 mM de ATP, 5 mM de glucosa (omitida en los controles), 2 mM de NADP⁺, exceso de G6PDH. Durante 10 min se lee la absorbancia de modo continuo. La actividad de HK se calcula como la diferencia de actividad entre el pocillo con sustrato y sin sustrato (control) y se define como la cantidad de nmoles de NADPH reducidos/min/mg proteína.

Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH, EC. 1.1.1.49) y 6-fosfogluconato 2-deshidrogenasa (6PGDH, EC 1.1.1.43,)

Ambas enzimas forman parte de la ruta de las pentosas fosfato y aportan el poder reductor (NADPH) necesario para llevar a cabo la lipogénesis *de novo*, por lo tanto nos dan una idea de ésta.



Solución de medida

100 mM Tris-HCl (pH = 8), 10 mM de $MgCl_2$, 0.3 mM de $NADP^+$, 0,5 mM de glucosa 6-fosfato y 0,5 mM de 6-fosfogluconato (ambos omitidos en los controles). Para llevar a cabo la medida, en una placa de 96 pocillos se ponen: 20 μL de muestra por triplicado y 250 μL de solución de incubación. En dos de los pocillos se ponen los sustratos y el tercero se usará como control. Durante 10 min se lee la absorbancia de modo continuo. La actividad de G6PDH/6PGDH se calcula como la diferencia de actividad entre el pocillo con sustrato y sin sustrato (control) y se define como la cantidad de nmoles de NADPH reducidos/min/mg proteína.

4 RESULTADOS

4.1 Uso de programas informáticos (Anexos)

Tal y como se explicó en la introducción, una de las moléculas más importantes en los procesos de resistencia a la insulina y a la leptina que se producen en estados patológicos como la obesidad y la diabetes *mellitus* tipo II, es la proteína SOCS3, por ello, lo primero que hicimos fue utilizar distintos programas informáticos para buscar posibles *miARNs* reguladores de esta proteína en ratón. Según *TargetScan*, los *miARNs* con mayor probabilidad de regular esta proteína, y que además presentan conservación preferencial a lo largo de la evolución son las familias: *miR-30-5p*, *miR-19-3p* y *miR-218-5p* (Figura 7), para todos ellos el percentil de puntuación fue igual o superior a 97 puntos.

Mouse SOCS3 ENST00000330871.2 3' UTR length: 1455

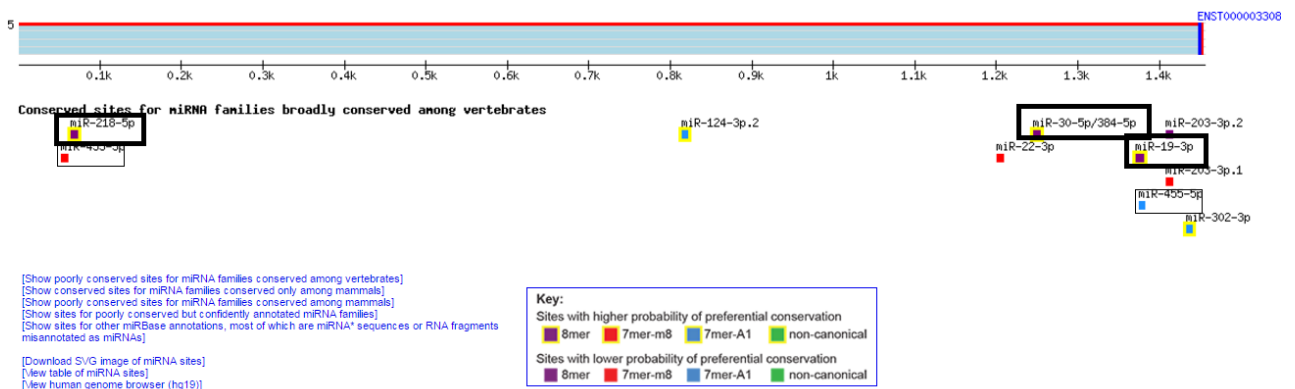


Figura 7: Resultado de la búsqueda de posibles reguladores de SOCS3. La búsqueda fue realizada en *TargetScanHuman 7.0*.

A continuación analizamos cuántas bases de datos distintas predicen que estas familias de *miARNs* son posibles reguladores de SOCS3. Para ello usamos el programa *MirWalk*, que compara a la vez 12 de estas herramientas informáticas (*MirWalk*, *Microt4*, *miRanda*, *mirbridge*, *miRDB*, *miRMap*, *miRNAMap*, *Pictar2*, *PITA*, *RNA22*, *RNAhybrid* y *Targetscan*). De estos 12 algoritmos, 9 de ellos predicen que

las familias de *miARNs* antes citadas son posibles reguladores de SOCS3.

Una vez vistos los posibles reguladores de SOCS3, quisimos hacer una aproximación distinta, y usando nuevamente el programa *MirWalk*, analizamos qué *miARNs* podrían estar implicados en la regulación de la diabetes tipo II. Según *MirWalk 2.0*, *miR-200a* es uno de los principales *miARNs* implicados en la diabetes tipo II (Figura 8).

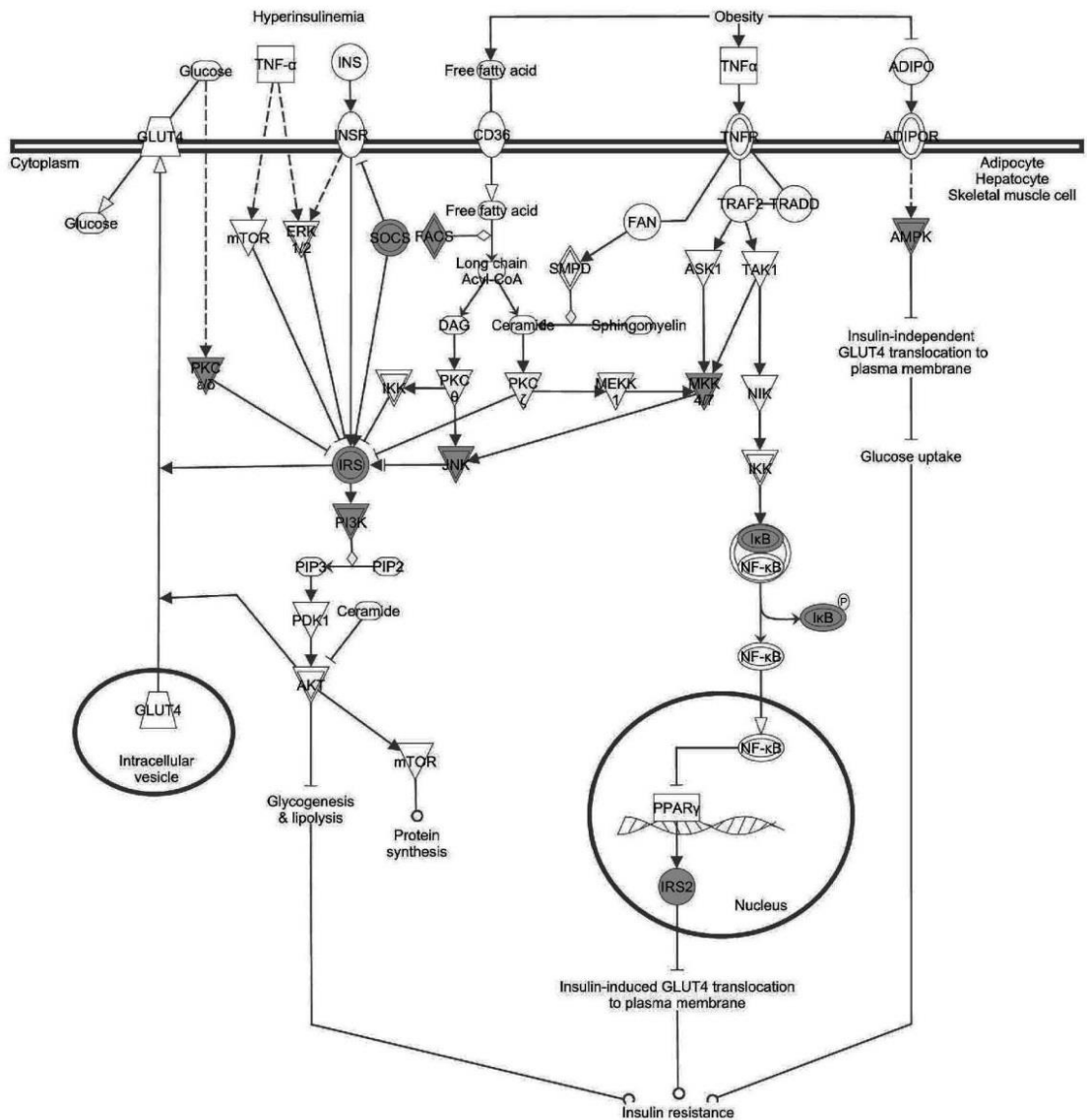


Figura 8: Posibles dianas de miR-200a (moléculas sombreadas) en la ruta implicada en el desarrollo de la resistencia a la insulina en adipocitos, hepatocitos y músculo esquelético. Ruta obtenida con la base de datos *miWalk 2.0*.

A continuación, utilizando el programa *TargetScan*, analizamos todas las posibles dianas de estos *miARNs* (*miR-19a-3p*, *miR-30b-5p*, *miR-218a-5p* y *miR-200a* (elegimos un *miARN* representativo de cada familia)) y aquellas dianas que eran predichas por 4 o más programas bioinformáticos distintos (para esto usamos nuevamente *MiRWalk*) se introdujeron en el programa informático *Ingenuity* para agruparlas en rutas canónicas.

Elegimos estos *miARNs* por varias razones:

- Los datos aportados por los modelos informáticos sugieren que están involucrados en la regulación de las vías de señalización de la leptina, insulina y rutas inflamatorias (Figura 18, Anexos).
- Los modelos informáticos sugieren que están implicados en la diabetes *mellitus* (Tabla X y Figura 19, Anexos).

4.2 Puesta a punto del cultivo y la diferenciación a adipocitos maduros de la línea celular 3T3-L1

Para sobreexpresar estos *miARNs* decidimos utilizar la línea celular 3T3-L1, puesto que uno de los principales tejidos implicados en fallos tanto en la señalización de la leptina y de la insulina, es el tejido adiposo. Tanto el cultivo de esta línea celular como su diferenciación a adipocitos maduros, se tuvo que poner a punto ya que no había sido utilizada previamente por el grupo.

Se llevó a cabo la puesta a punto del método partiendo de protocolos previos⁽⁴²⁾. El cultivo celular de la línea 3T3-L1 se llevó a cabo en medio DMEM, suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10% y P/S al 1%. Las células se incubaron a 37°C hasta que estuvieron confluentes, una vez confluentes al 100% se esperó 48 horas para iniciar el protocolo de diferenciación a adipocitos. Pasadas estas 48 horas se diferencian las células 3T3-L1 a adipocitos maduros añadiendo medio de diferenciación que contiene (Tabla VIII):

Tabla VIII: Composición del medio de diferenciación.

Componentes	Concentraciones
Insulina	4,17 mg/mL
Dexametasona	1 mg/mL
3-Isobutil-1-Metil xantina (IBMX)	10 mg/mL
Rosiglitazona	1 mg/mL
FBS	10%
Antibióticos (P/S)	1%

Pasadas 48 h se cambió el medio de diferenciación por medio de mantenimiento (DMEM/F12 e insulina). Siguiendo protocolos publicados, se cambiaba el medio día sí y día no, retirando 0,8 mL (placas de 12 pocillos) y se añadía 1 mL de medio nuevo, sin embargo las células acabaron levantándose y muriendo antes de diferenciarse tal y como se puede apreciar en la Figura 9.

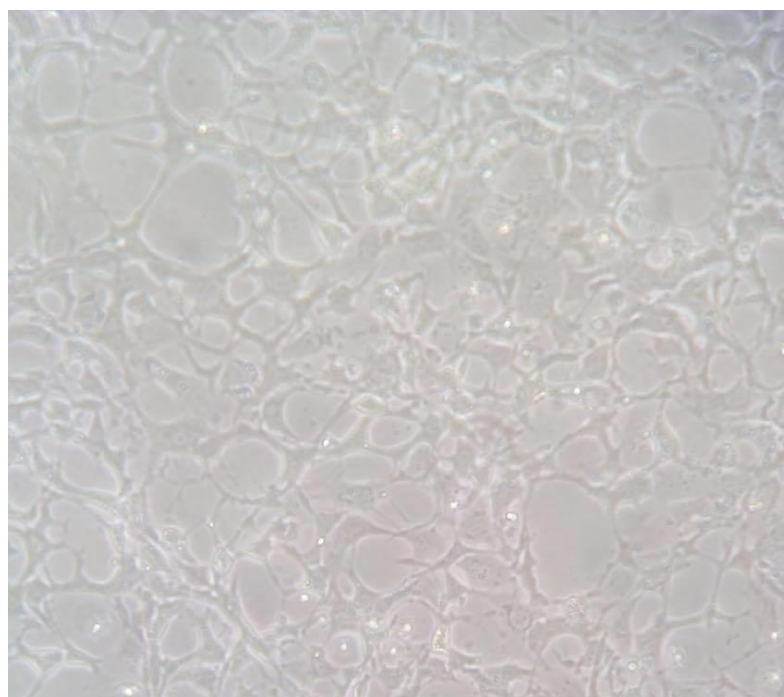


Figura 9: Células levantadas.

Para intentar evitar que las células se levantasen, modificamos diversos puntos de los protocolos existentes, como concentraciones de

reactivos, casa comercial de las placas usadas para el cultivo, número de células sembradas, tiempos de incubación etc. Sin embargo ninguno de los cambios solucionó el problema. En cambio, cuando tras el medio de diferenciación procedimos a retirar el medio de mantenimiento todos los días durante 4 días, y después día sí y día no, siguiendo la siguiente tabla (Tabla IX) conseguimos que las células no se levantasen y se diferenciases correctamente (Figura 11). En la Figura 10 observamos los diferentes días en los que se añade el medio de diferenciación o el de mantenimiento. En la Figura 11 se muestran las células 3T3-L1 a distintos tiempos de diferenciación (adipogénesis). Se puede apreciar que durante el proceso adipogénico ocurrió un notable cambio en la morfología celular, manifestándose ya a los 5 días de diferenciación, las células diferenciadas son de mayor tamaño y se muestran más redondeadas, especialmente a tiempos largos (14 días) de diferenciación, también se observó que las células diferenciadas acumularon gotas de lípidos en su citoplasma.

Tabla IX: Volúmenes de medio de cultivo añadido y retirado en función de la etapa en la que se encuentran las células.

Placas (pocillos)	Etapa de proliferación		Medio de diferenciación		Medio de mantenimiento I		Medio de mantenimiento II	
	Retirar (mL)	Añadir (mL)	Retirar (mL)	Añadir (mL)	Retirar (mL)	Añadir (mL)	Retirar (mL)	Añadir (mL)
12	1	1	1,2	1,5	1,2	1,5	1,2	1,2
6	1,5	1,5	1,5	1,8	1,5	1,8	1,5	1,5

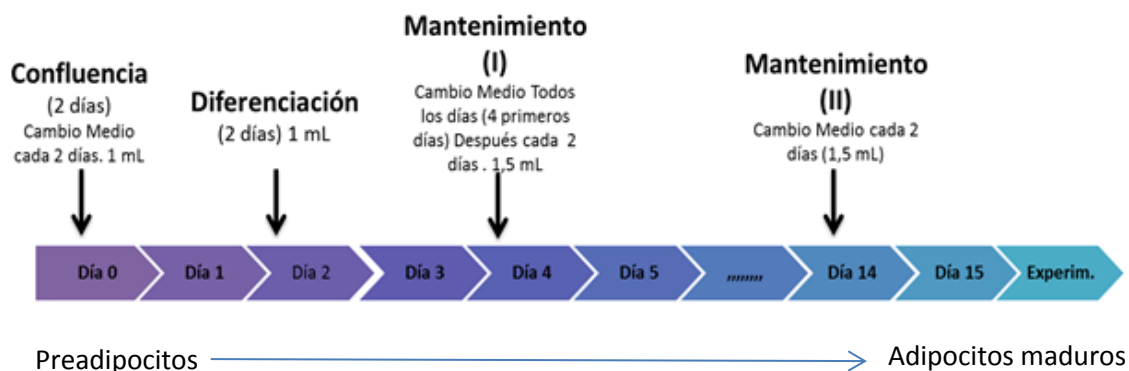


Figura 10: Línea temporal del protocolo utilizado para diferenciar a adipocitos maduros las células 3T3-L1. Se muestran los cambios en los medios de diferenciación y mantenimiento, así como la cantidad que se utiliza de cada uno. Datos para placas de 6 pocillos.

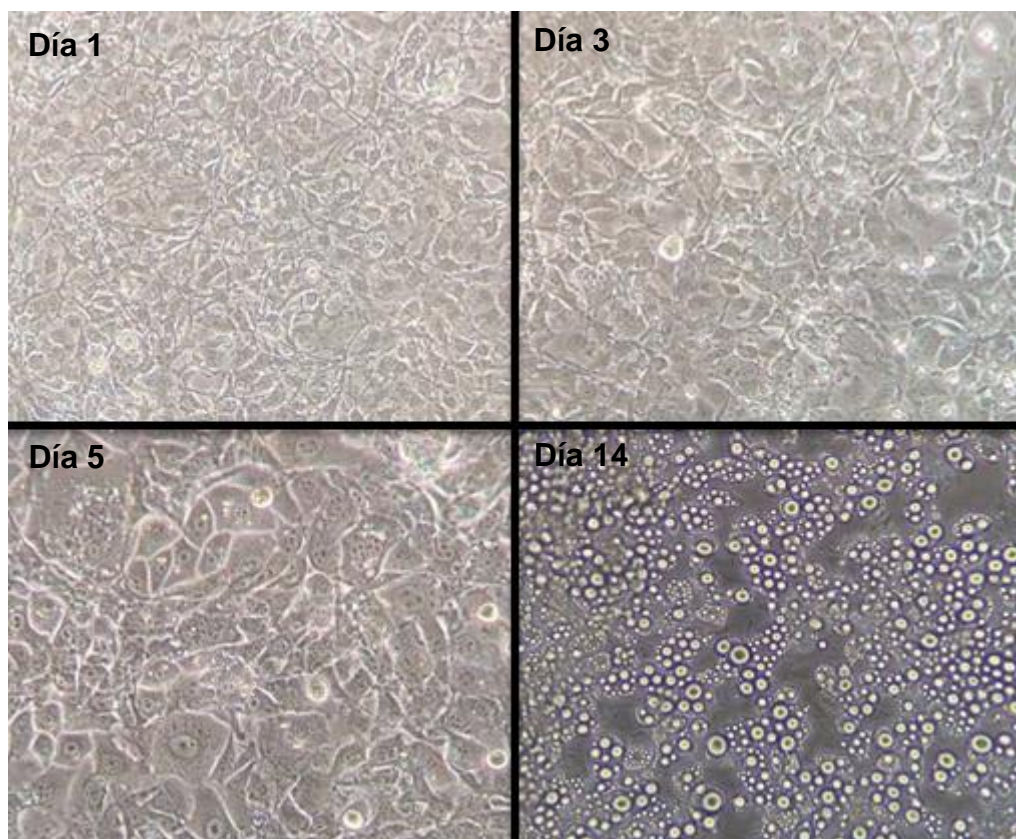


Figura 11: Células 3T3-L1 en diferentes etapas de diferenciación. Las fotografías están tomadas con un iPhone 5S los días 1, 3, 5 y 14 después de añadir el medio de diferenciación.

4.3 Sobreexpresión de los *miARNs* (*miR-19a-3p*, *miR-30b-5p*, *miR-218-5p* y *miR-200a*) en adipocitos maduros de la línea 3T3-L1

Una vez estandarizado el protocolo para diferenciar preadipocitos a adipocitos maduros, lo siguiente que se hizo fue testar el tiempo y la dosis de sobreexpresantes necesarios para conseguir aumentar de manera estadísticamente significativa la expresión de los *miARNs* de interés en los adipocitos maduros. Siguiendo protocolos previos y las recomendaciones del fabricante decidimos empezar con 48 horas de transfección + 30 nM de cada uno de los sobreexpresantes. Una vez completado el protocolo analizamos los niveles de expresión de los *miARNs* de interés. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 12.

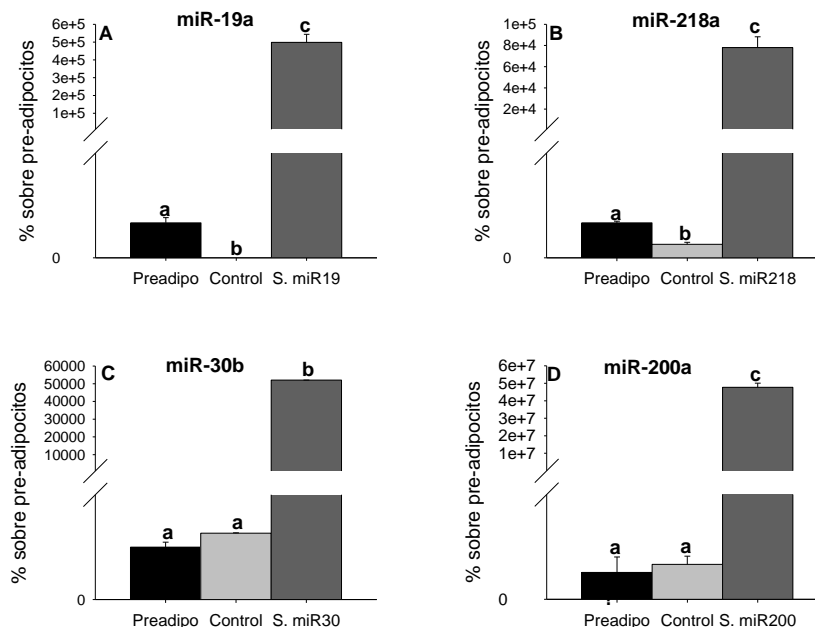


Figura 12: Niveles de expresión de los *miARNs* *miR-19a* (A), *miR-218a* (B), *miR-30b* (C) y *miR-200a* (D), en pre-adipocitos sin diferenciar y sin tratar (preadipo) o adipocitos diferenciados transfectados con un control negativo (control) o con los sobreexpresantes de interés a una dosis de 30 nM durante 48h (S.miR). Las células se recuperaron durante 24h y tras ese periodo se llevó a cabo el estudio de los niveles de expresión. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas (Anova de 1 vía, n=6).

Como se puede ver en la Figura 12 los niveles de *miR-19a* (Figura 12A) disminuyen considerablemente tras la diferenciación al igual que

miR-218a (Figura 12B) mientras que *miR-30b* (Figura 12C) y *miR-200a* (Figura 12D) no cambian entre pre-adipocitos y adipocitos maduros.

Como puede verse en la figura 12 la sobreexpresión funcionó en los cuatro *miARNs* de interés puesto que su expresión aumentó con respecto al control varios órdenes de magnitud, por tanto, podemos concluir que las dosis y tiempos elegidos son adecuados para aumentar la expresión de estos *miARNs*.

También analizamos los niveles de *ARNm* de *AdipoQ*, *FABP4* y *PPAR γ* (todos marcadores de adipogénesis) en pre-adipocitos y adipocitos maduros sin transfectar y transfectadas con el control negativo. Ninguno de estos *ARNm* varió su expresión por la transfección, indicando que la transfección no tiene ningún efecto sobre la adipogénesis (datos no mostrados).

4.4 Estudio de la expresión proteica de SOCS3 y de FAS

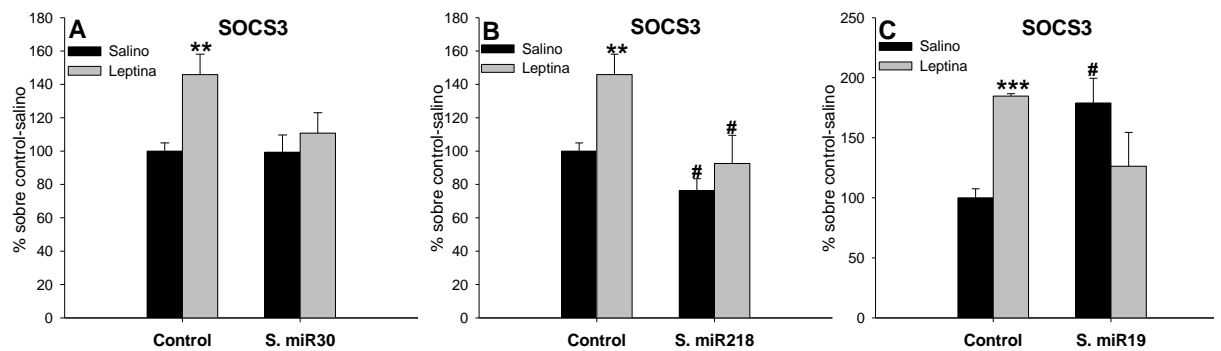
Una vez demostrado que las dosis y tiempos elegidos para sobreexpresar los *miARNs* de interés funcionan adecuadamente, decidimos estudiar el efecto de esta sobreexpresión en los valores de proteína de SOCS3, puesto que al ser potencialmente reguladores de este gen, cabría esperar que la expresión proteica de SOCS3 disminuya al aumentar la expresión de estos *miARNs*. Los resultados pueden verse en la figura 13, donde podemos observar que adipocitos maduros tratados con sobreexpresantes de *miR-218a*, *miR-30b* y *miR-19a*, únicamente disminuyen los valores de expresión proteicos de SOCS3 cuando las células fueron tratadas con los sobreexpresantes para *miR-218a* (Figura 13B), sin que se alteren los valores cuando se trata a las células con sobreexpresantes para *miR-30b* (Figura 13A) o incluso aumentan cuando aumenta la expresión de *miR-19a* (Figura 13C).

A continuación sometimos a las células a tratamientos de leptina ya que, como se explicó en la introducción, se sabe que aumentan los niveles de SOCS3 (Figura 13), por lo tanto, queríamos ver si una

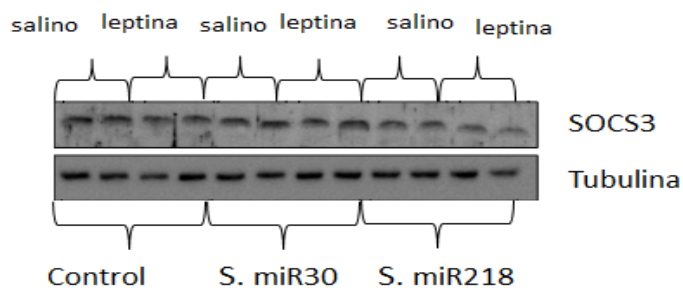
sobreexpresión de los *miARNs* de interés impedía el aumento de esta proteína, independientemente de que las distintas sobreexpresiones alterasen o no sus niveles basales.

Se puede observar que el tratamiento con leptina provocó un aumento en la expresión proteica de SOCS3 en las células transfectadas con el control negativo, sin embargo el tratamiento con los tres sobreexpresantes testados, impidió que se diese este aumento. (Figura 13).

Estos resultados indican que la expresión de SOCS3 está regulada de manera significativa por los *miARNs* testados.



D)



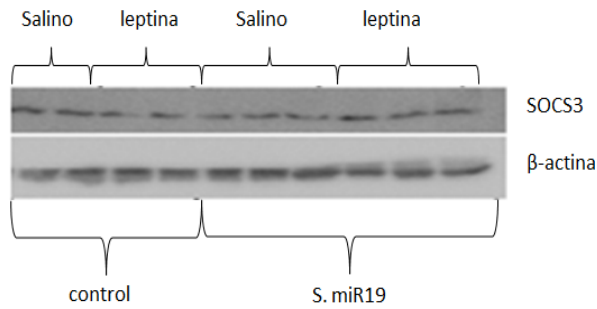
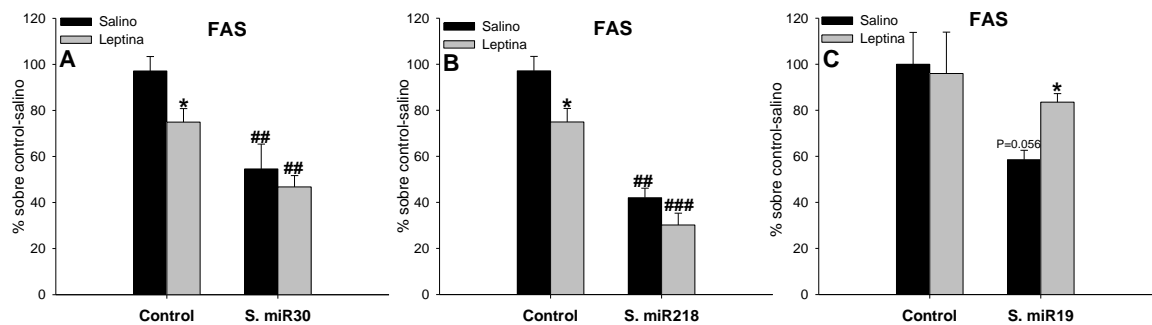


Figura 13: Niveles de expresión de la proteína SOCS3 en adipocitos maduros transfectados con un control negativo o con sobreexpresantes para *miR-30b* (A), *miR-218a* (B) y *miR-19a* (C) durante 48h. Tras 24h de recuperación las células se trataron con leptina durante 2h. Los valores se presentan como la media \pm error. En la figura D se pueden ver Western representativos para SOCS3 y para tubulina o β -actina. La cuantificación de los niveles de proteína se realizó por densitometría y se normalizaron los valores frente a la expresión de tubulina o β -actina. (** $p < 0,01$ vs. salino, # $p < 0,05$ vs. Control= células transfectadas con control negativo, t test). *miR-30b* y *miR-218a* son dos experimentos distintos con $n=2$ y $n=4$ cada uno y *miR-19a* es un único experimento con $n=2$.

Tras la transfección de las células 3T3-L1 con sobreexpresantes para estos *miARNs* se observa que hay una disminución significativa en los niveles de proteína de la enzima FAS, sobre todo en las células transfectadas con los sobreexpresantes para *miR-30b* y *miR-218* en comparación con las células control sugiriendo que la lipogénesis disminuye tras la sobreexpresión con estos *miARNs* (Figura 14).



D)

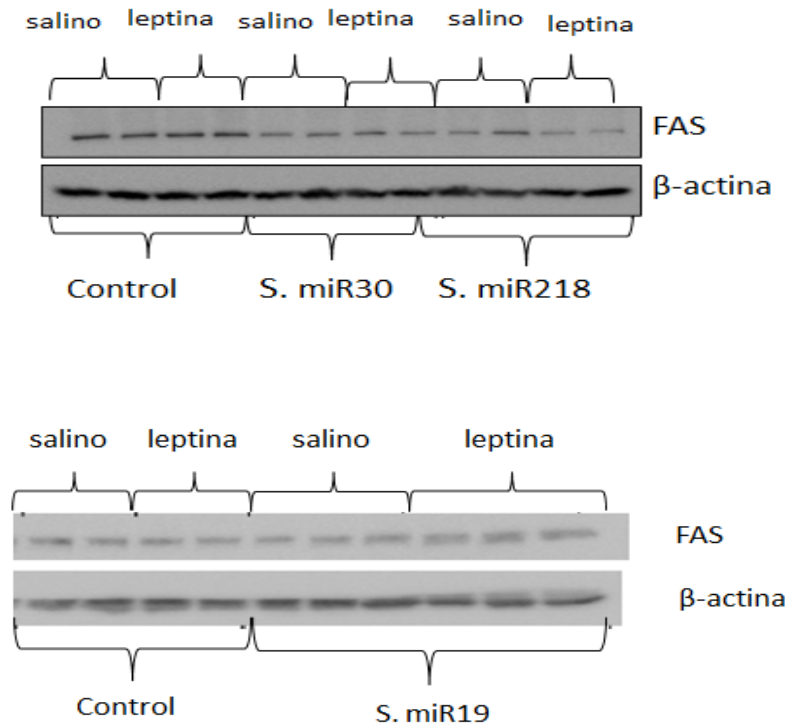


Figura 14: Niveles de expresión de la proteína FAS en adipocitos maduros transfectados con un control negativo o con sobreexpresantes para miR-30b (A), miR-218a (B) y miR-19a (C) durante 48h. Tras 24h de recuperación las células se trataron con leptina durante 2h. Los valores se presentan como la media \pm error. En la figura D se pueden ver Western representativos para FAS y β -actina. La cuantificación de los niveles de proteína se realizó por densitometría y se normalizaron los valores frente a la expresión de β -actina. (* $p < 0,05$ vs. salino, ## $p < 0,01$ vs. Control= células transfectadas con control negativo, t test). miR-30b y miR-218a son dos experimentos distintos con $n=2$ y $n=4$ cada uno y miR-19a es un único experimento con $n=2$.

4.5 Estudio de la actividad enzimática en células transfectadas con sobreexpresantes para miR-19a, miR-30b y miR-218a

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, a continuación se analizó la actividad de algunas de las enzimas claves en el metabolismo intermediario de las células, tales como la glucólisis (HK) y la ruta de las pentosas fosfato (G6PDH y 6PGDH), que aportan el poder reductor necesario para la lipogénesis *de novo*, en las que se comparan células control y células transfectadas con sobreexpresantes para *miR-19a*, *miR-30b* y *miR-218a* (Figura 15).

En la Figura 15, se puede observar que los adipocitos maduros tratados con salino disminuyeron la actividad de la HK (figura 15A) cuando fueron transfectados con el sobreexpresante negativo al igual que sucedió con la actividad de la G6PDH (Figura 15C), sin embargo, este descenso desapareció cuando las células fueron transfectadas con los sobreexpresantes para *miARNs*. El tratamiento con leptina provocó un ligero descenso en la actividad de 6PGDH únicamente en las células sin transfectar (Figura 15B).

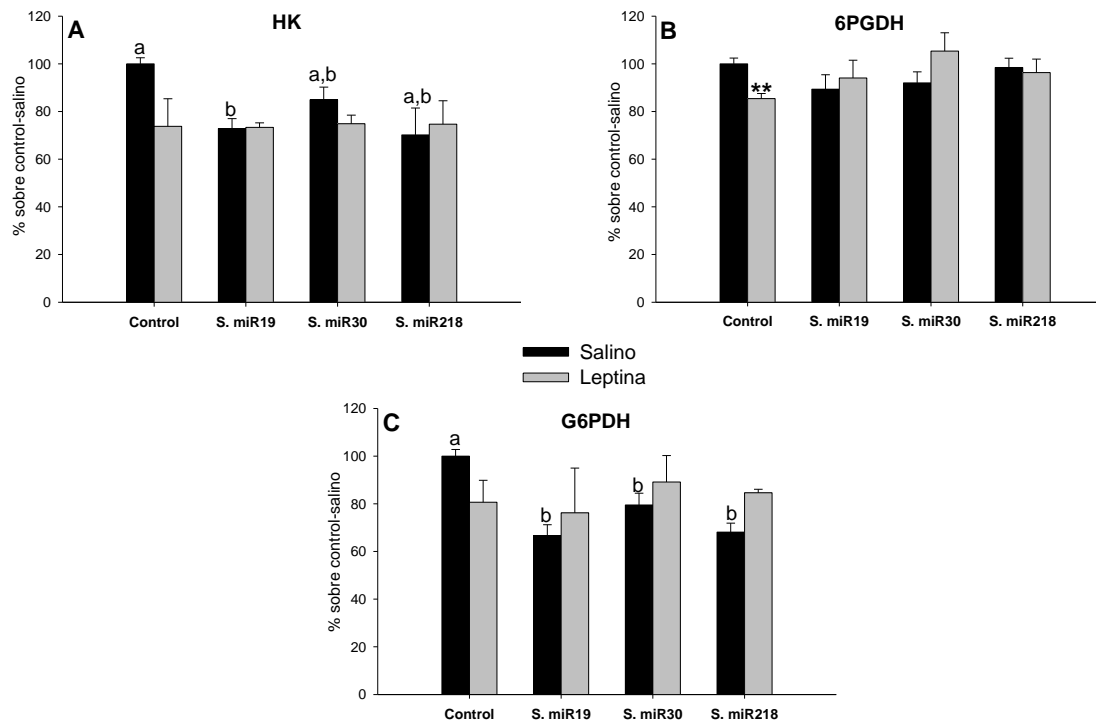


Figura 15: Diferentes actividades enzimáticas HK (A), 6PGDH (B) Y G6PDH (C) en adipocitos maduros transfectados con un control negativo o con sobreexpresantes *miR-30b*, *miR-218a* y *miR-19a* durante 48 h. Tras 24 h de recuperación las células se trataron con leptina durante 2 h. Los valores se presentan como la media \pm error. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$ dentro de las células tratadas o bien con salino o bien con leptina. Anova de 1 vía controles $n=6$, resto $n=4$. ** $p < 0,01$ vs. Control= células transfectadas con control negativo y tratadas con salino, t test).

4.6 Estudio de la expresión proteica de pAKT y de la actividad de enzimas clave en células transfectadas con un sobreexpresante para *miR-200a*

Para comprobar si la sobreexpresión de *miR-200a* altera la ruta de señalización de la insulina, células transfectadas con un control negativo y con un sobreexpresante para *miR-200a* se sometieron a tratamientos crónicos de insulina, 100 nM de insulina durante 24h (insulina crónica), puesto que se sabe que a una concentración fisiológica pueden inducir resistencia a la insulina. Posteriormente la mitad de estas células se trataron con un estímulo agudo de insulina 100 nM (20 min) y se analizó la actividad de enzimas relacionadas con la glucólisis y la lipogénesis *de novo* (Figura 16).

Se puede observar que los adipocitos maduros disminuyeron la actividad de HK y FAS cuando fueron transfectados con el sobreexpresante *miR-200a* y tratadas con salino, lo que sugiere que estas células tienen tanto la glucólisis como la lipogénesis disminuida con respecto a los controles (Figura 16A-B). En los adipocitos sin transfectar la actividad de G6PDH aumentó con el tratamiento de insulina, independientemente del tiempo del tratamiento. Aunque este aumento también se observó en células transfectadas con *miR-200a* no llegó a ser estadísticamente significativo (Figura 16C).

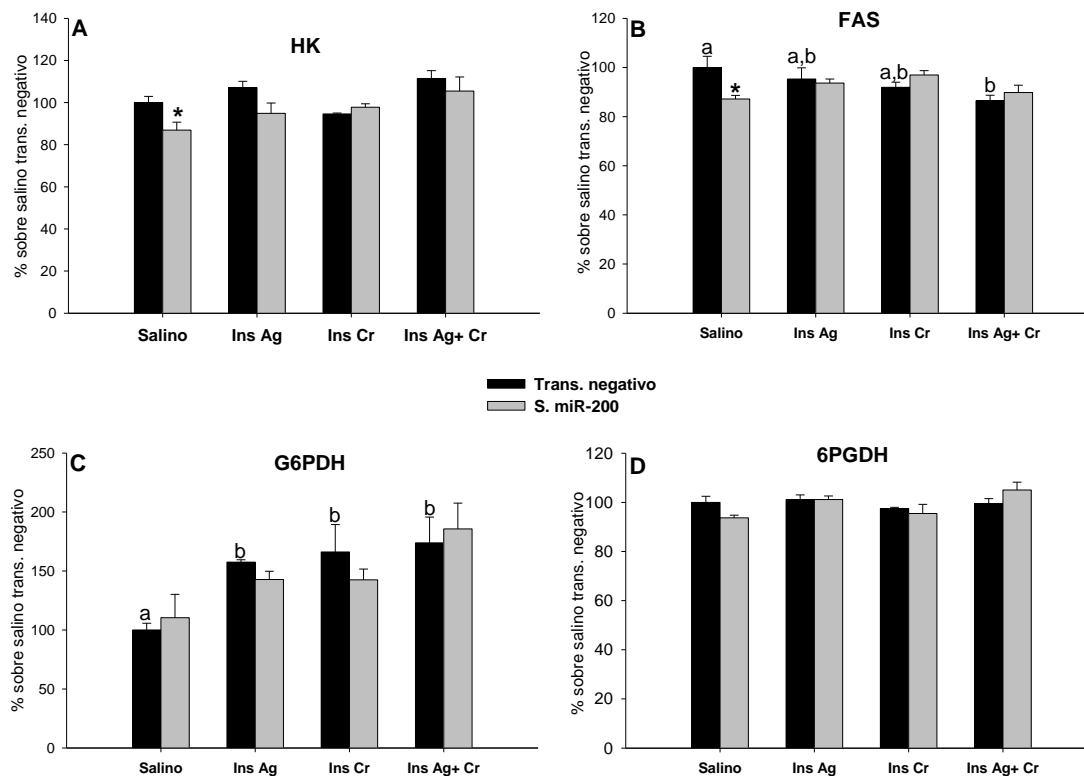


Figura 16: Actividad de los enzimas HK (A), FAS (B), G6PDH (C) y 6PGDH (D) en adipocitos maduros transfectados con un control negativo o con sobreexpresante para *miR-200a* tratados con salino (salino), insulina aguda = insulina durante 20 min (Ins Ag), insulina crónica = insulina durante 24 h (Ins Cr) o insulina aguda y posteriormente insulina crónica (Ins Ag + Cr). Los valores se presentan como la media \pm error. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas dentro de las células transfectadas con un control negativo ($p < 0.05$, Anova de 1 vía test post hoc SNK, $n=4$ excepto el estímulo de insulina aguda donde $n=3$). * = $p < 0,05$ vs. Salino y transfectado negativo, t test.

A continuación analizamos los niveles de expresión proteica de p-AKT puesto que es una enzima que regula varios de los efectos metabólicos de la insulina a través de la fosforilación de una lista creciente de sustratos que propagan la respuesta de la insulina.

Los niveles de p-AKT aumentaron en las células tratadas con insulina aguda independientemente de la transfección. Del mismo modo, se puede observar que el tratamiento crónico con insulina provocó resistencia a la misma, también de un modo independiente de la transfección (Figura 17).

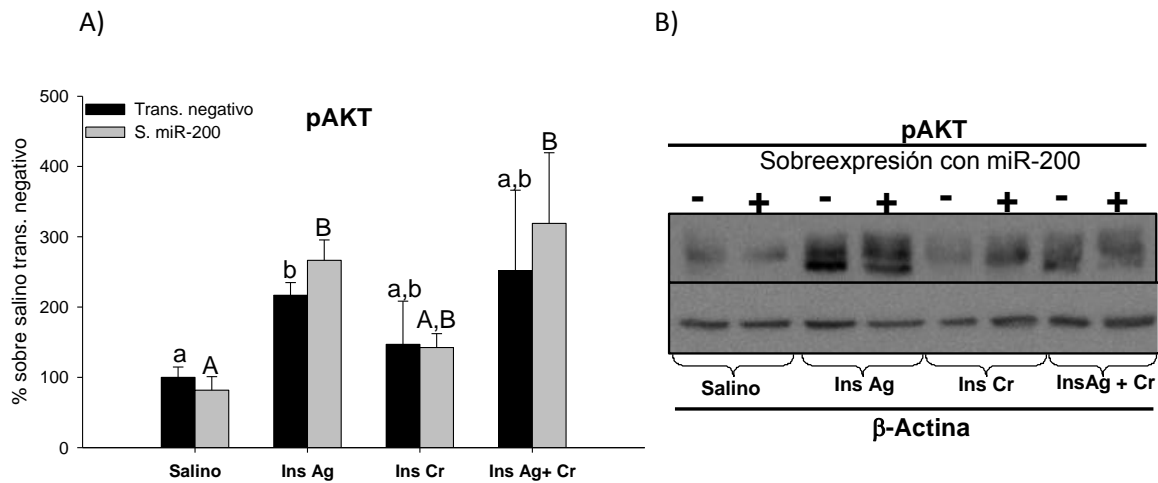


Figura 17: Niveles de expresión de la proteína pAKT en adipocitos maduros transfectados con un control negativo o con sobreexpresante *miR-200a* tratados con salino (salino), insulina aguda = insulina durante 20 min (Ins Ag), insulina crónica = insulina durante 24 h (Ins Cr) o insulina aguda y posteriormente insulina crónica (Ins Ag + Cr). Los valores se presentan como la media \pm error (A). Diferentes letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas dentro de las células tratadas con el control negativo o con el sobreexpresante para *mir-200a* ($p < 0,05$, Anova de 1 vía test post hoc SNK, $n=4$ excepto el estímulo de insulina aguda donde $n=3$). En la figura B se puede ver un Western representativo para pAKT y para β -actina. La cuantificación de los niveles de proteína se realizó por densitometría y se normalizaron los valores frente a la expresión de β -actina.

5. DISCUSIÓN

En muchos hábitats naturales la disponibilidad calórica es escasa e impredecible, por lo tanto, a lo largo de la evolución se han ido desarrollando sistemas para almacenar de forma eficiente la energía. Pero en la sociedad moderna, muy mecanizada y con un bajo coste energético, la demanda calórica se ha ido minimizando, al mismo tiempo que ha ido aumentando la ingesta de comidas altamente energéticas, con una gran cantidad de grasas saturadas. Todos estos factores han impulsado la actual pandemia de la obesidad y todas las comorbilidades que lleva asociadas como el hígado graso, aterosclerosis y la diabetes tipo II. La resistencia a la insulina es una característica común a todas estas enfermedades y se han concentrado muchos esfuerzos en investigar tanto su patogenia como posibles soluciones. El tejido adiposo es un órgano sensible a la insulina que almacena lípidos y secreta hormonas que actúan en órganos distantes para contribuir al control del gasto y captación de energía. Fallos en estas funciones provocan un estado patológico que promueve el desarrollo de la resistencia a la insulina ⁽⁴³⁾.

Se sabe que ciertos *miARNs* presentes en el tejido adiposo juegan un papel en el desarrollo de la obesidad, aunque no se sabe su función principal, se conoce que determinados *miARNs* participan en la homeostasis de la glucosa, metabolismo de lípidos y ruta de señalización de la insulina. Existe una correlación entre el desarrollo de la diabetes y la alteración en la expresión de algunos *miARNs*, ya que ciertos *miARNs* están asociados con la adipogénesis ⁽⁴⁴⁾.

En los adipocitos, cuando se produce un fallo en la señalización de la insulina, se produce un descenso en la captación de glucosa y de la lipogénesis. Una de las características propias de la obesidad, es un aumento en los niveles de IL-6 y de leptina. Ambas adipoquinas, producen un aumento en la expresión de SOCS3, que a su vez reduce los niveles proteicos de IRS1 e IRS2, así como su fosforilación, inhibiendo de

este modo la acción de la insulina y provocando un aumento de los niveles de la misma. Puesto que el tejido adiposo es el principal productor de IL-6 y leptina, también va a ser el principal causante del aumento de SOCS3 en otros tejidos y por lo tanto de la resistencia a la insulina a nivel sistémico e incluso central ⁽³⁹⁾.

En este trabajo, nos propusimos estudiar los *miARNs* que regulan SOCS3, así como *miARNs* relacionados con la diabetes tipo II que no necesariamente tuviesen a esta proteína como diana. Para cumplir nuestro objetivo se emplearon diferentes modelos bioinformáticos que apuntaron que varias familias de *miARNs* ampliamente conservadas a lo largo de la evolución, son posibles reguladoras de SOCS3: *miR-19-3p*, *miR-30-5p* y *miR-218-5p*. Se descartaron aquellas familias que no se conservaron a lo largo de la evolución. Por razones de tiempo y operacionales, centramos nuestro trabajo en un *miARN* representativo para cada una de estas familias, en concreto: *miR-19a-3p*, *miR-30b-5p* y *miR-218a-5p*. Además, también buscamos *miARNs* que tuviesen como diana el mayor número posible de moléculas relacionadas con la resistencia a la insulina, y por lo tanto en el desarrollo de la diabetes tipo II. Según los programas informáticos utilizados en este trabajo, el *miARN* que, en teoría, puede regular un mayor número de moléculas implicadas en esta situación es *miR-200a*, que puede regular las rutas de señalización de la insulina, leptina e inflamación. La participación de este *miARN* en la señalización inflamatoria proporciona un vínculo sostenible con la obesidad, puesto que ésta está considerada como una enfermedad inflamatoria crónica de bajo grado. Tal estado inflamatorio podría contribuir a la resistencia de los efectos de la leptina y la insulina tal y como se presenta en el artículo de Zhang ⁽⁴⁵⁾.

Para poder comprobar qué ocurre realmente en los adipocitos cuando los *miARNs* antes mencionados se alteran, decidimos sobreexpresarlos en células 3T3-L1 una vez diferenciadas a adipocitos, pero para ello antes tuvimos que poner a punto el cultivo de esta línea.

Como concluyeron Leeton y Tellam la diferenciación de células 3T3-L1 conduce a la formación de células especializadas, no sólo en almacenar y movilizar el exceso de grasa acumulada en forma de triacilgliceroles, sino también en desarrollar un papel endocrino importante para la homeostasis del organismo. A nivel molecular, el proceso de adipogénesis implica la activación de una cascada altamente coordinada y regulada por factores de transcripción que, en conjunto, conducen al establecimiento del estado diferenciado ⁽³⁹⁾.

Como se pudo observar en nuestro trabajo las células diferenciadas tienden a adquirir morfología redondeada y comienzan a acumular lípidos, observados como gotas almacenadas en el citoplasma. Estos resultados nos permiten confirmar que nuestro cultivo respondió correctamente al estímulo de diferenciación y que, efectivamente, las células se transformaron en adipocitos maduros. Aunque en la actualidad aún existen inconvenientes por resolver, como por ejemplo, el hecho de que nuestras células tiendan a despegarse de la placa a tiempos prolongados de diferenciación, los resultados mostrados en el presente trabajo nos permite concluir que hemos implementado de manera satisfactoria la puesta a punto del cultivo y la diferenciación a adipocitos maduros de la línea celular 3T3-L1.

Asumiendo un papel represor de *miR-19a*, *miR-30b* y *miR-218a* sobre SOCS3, esperaríamos que al sobreexpresar estos *miARNs* los niveles proteicos de SOCS3 descendiesen, sin embargo, esta situación sólo se produjo en las células transfectadas con el sobreexpresante de *mir-218a*, lo que en principio no parece compatible con la teoría de que SOCS3 es una diana para estos *miARNs*. Pero cuando las células transfectadas con cualquiera de los sobreexpresantes son tratadas con leptina, no se produce el característico aumento en los niveles de SOCS3, que sí observamos en las células controles. Por lo tanto, podemos concluir que *miR-19a*, *miR-30b* y *miR-218a* regulan los niveles de expresión de SOCS3. La razón de porque no disminuyen los niveles

basales, sin estimular, de SOCS3 puede ser atribuible a varios factores: por una parte, debido a la limitación de tiempo de este trabajo el número de réplicas de los experimentos es relativamente bajo y por otra parte, los *miARNs* de una misma familia se sabe que pueden tener acciones redundantes, por lo tanto, al sobreexpresar un único miembro de cada familia, es posible que el resto de miembros alteren su expresión/función, compensando los cambios producidos en uno de sus miembros. No obstante, son necesarios más estudios para poder esclarecer este hecho. Los resultados obtenidos tanto en los valores de proteína de FAS, como en la actividad enzimática para HK y G6PDH, sugieren que en condiciones basales, sin estimular con leptina, las sobreexpresiones de *miR-19a*, *miR-30b* y *miR-218a* provocan un descenso tanto en la glucólisis como en la lipogénesis *de novo*. Tal vez este descenso esté asociado a niveles alterados de AKT activa, sin embargo, en el tiempo de realización de este proyecto no hemos tenido tiempo de estudiar esta teoría, sin embargo existen datos que la apoyan.

Un gran número de estudios experimentales ha demostrado que la resistencia a la insulina y a la leptina están asociadas con un descenso en la actividad de AKT, además de por un aumento de los niveles de SOCS3^(46, 47). Trabajos previos han demostrado que *miR-19a* promueve la proliferación celular y la angiogénesis a través de la regulación de la vía PI3K/AKT⁽⁴⁸⁾ y que los niveles de *miR-218* están relacionados con la inhibición de la fosforilación de AKT^(43, 44). En este contexto, distintos algoritmos informáticos sugieren que tanto las familias *miR-218*, como *miR-30*, *miR-19* y *miR-200a* son posibles reguladores de OSBPL-8 (*oxysterol binding protein-like 8*), una proteína que promueve la activación de AKT estimulada por la insulina⁽⁴⁹⁾. Además, también se ha sugerido que *miR-218* tiene como diana a RICTOR (compañero de mTOR insensible a la rapamicina), que es un componente de mTOR (diana de la rapamicina en células de mamíferos) que a su vez inhibe la fosforilación de AKT^(50, 51). Por lo tanto, alteraciones en cualquiera de estos *miARNs*, podría alterar la resistencia a la insulina y/o leptina además de por la

regulación de SOCS3 también por AKT. Esta última, de forma directa o indirecta a través de RICTOR y OSBPL-8.

Trabajos previos, pero en hepatocitos e hígado, demostraron que la diabetes provoca un descenso en los niveles de *miR-200a*, y que un aumento en los niveles de este *miARN* por el uso de sobreexpresantes, causa un aumento en los niveles de expresión de pAKT y también un descenso en la expresión de *ARNm* de la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa) y la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), sugiriendo que este *miARN* regula la gluconeogénesis a nivel hepático ⁽⁵²⁾.

En este trabajo no se observó que las células sobreexpresadas con *miR-200a* variasen los niveles de expresión de pAKT, independientemente del tratamiento con insulina. Sin embargo la sobreexpresión de *miR-200a*, en estados basales, provocó un descenso en la actividad de HK y FAS, sugiriendo que *miR-200a* regula tanto la glucólisis como la lipogénesis, aunque no parece ser por una vía mediada por AKT.

En conclusión, en este trabajo mostramos que según distintos algoritmos informáticos existen distintas familias de *miARNs* que podrían regular las rutas de señalización de la insulina y la leptina y que la sobreexpresión de *miR-19a*, *miR-30b*, *miR-218a* y *miR-200a* en adipocitos maduros y sin estímulos de ningún tipo disminuye enzimas implicadas en la glucólisis y la lipogénesis *de novo*.

6. CONCLUSIONES

- Según distintos algoritmos bioinformáticos las familias de *miARNs* *miR-19-3p*, *miR-30-5p* y *miR-218-5p* son posibles reguladoras de SOCS3 y *miR-200a* está implicado en la regulación de la diabetes tipo II.
- Entre todas las posibles dianas de los *miARNs* *miR-19a*, *miR-30b*, *miR-218a* y *miR-200a* existen moléculas relacionadas con la obesidad, la diabetes, la inflamación y la señalización de la leptina, adiponectina e insulina entre otras.
- Un cambio de medio más frecuente durante los primeros días después de la inducción de la diferenciación nos permitió diferenciar preadipocitos a adipocitos maduros de una manera eficiente.
- Una dosis de 30 nM y 48 h de transfección, con una recuperación de 24 h permite aumentar la expresión de estos *miARNs* varios órdenes magnitud.
- Los *miARNs* *miR-19a*, *miR-218a* y *miR-30b* regulan los niveles de expresión de la proteína SOCS3 en adipocitos maduros, especialmente cuando son estimulados con leptina.
- La sobreexpresión de estos *miARNs* y *miR-200a* en adipocitos maduros y sin estímulos de ningún tipo disminuye la actividad de enzimas clave de la glucólisis y la lipogénesis *de novo*.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Salas-Salvadó J, Rubio MA, Barbany M, Moreno B, SEEDO Gcdl. Consenso SEEDO 2007 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. *Med clínica*. 2007;128(05):1-2.
2. Bray G, Bouchard C, James W. Definitions and proposed current classifications of obesity. En: Bray G BC, James WPT, editors, editor. New York: Marcel Dekker 1998. 31-40 p.
3. Ricardo YR. Antropometría en el diagnóstico de pacientes obesos; una revisión. *Nutr Hosp*. 2012;27(6):1803-9.
4. Nicola LD, Conte G. Waist: hip ratio is a better predictor of cardiovascular risk than BMI in patients with moderate CKD. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2008;4(11):592-603.
5. Ortega-Azorín C. Interacción genético ambiental en la modulación de adipocitoquinas y marcadores de inflamación en su asociación con obesidad y otros factores de riesgo cardiovascular en población mediterránea. Valencia: Universidad de Valencia; 2011.
6. Wang J, Thornton J, Bari S, Williamson B, Gallagher D, Heymsfield S, et al. Comparisons of waist circumferences measured at 4 sites. *Am J Clin Nutr*. 2003;77(2):379-84.
7. Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, Kim JI, Kim JB. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016;7:30.
8. Guyenet SJ, Schwartz MW. Clinical review: Regulation of food intake, energy balance, and body fat mass: implications for the pathogenesis and treatment of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(3):745-55.
9. Michael W, Schwartz W, Richard G. Rats lighten up with MCH antagonist. *Nature medicine*. 2002;8:779-81.
10. Vázquez-Villar MJ. Regulación de la secreción de GH, la ingesta y el metabolismo lipídico por péptidos derivados del gen de Ghrelin. Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela; 2006.
11. Crujeiras AB, Diaz-Lagares A, Abete I, Goyenechea E, Amil M, Martinez JA, et al. Pre-treatment circulating leptin/ghrelin ratio as a non-invasive marker to identify patients likely to regain the lost weight after an energy restriction treatment. *Journal of endocrinological investigation*. 2014;37(2):119-26.

12. Kwon O, Kim KW, Kim MS. Leptin signalling pathways in hypothalamic neurons. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2016;73(7):1457-77.
13. Cowley MA, Smart J, Rubinstein M, Cerdan M, Diano S, Horvan T, et al. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the acute nucleus. *Nature*. 2001;411:480-4.
14. Isidori AM, Strollo F, More M, Caprio M, Aversa A, Moretti C, et al. Leptin and aging: correlation with endocrine changes in male and female healthy adult populations of different body weights. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(5):1954-62.
15. Burgos-Ramos E, Chowen JA, Arilla-Ferreiro E, Canelles S, Argente J, Barrios V. Chronic central leptin infusion modifies the response to acute central insulin injection by reducing the interaction of the insulin receptor with IRS2 and increasing its association with SOCS3. *J Neurochem*. 2011;117(1):175-85.
16. Moran TH, Ladenheim EE. Adiposity signaling and meal size control. *Physiology & behavior*. 2011;103(1):21-4.
17. Woods S, Seeley R, Cota D. Regulation of food intake through hypothalamic signaling networks involving mTOR. *Annu Rev Nutr*. 2008;28:295-311.
18. Mendieta HZ. Influencia de la alimentación neonatal, dietas con diferente contenido graso y cirugía bariátrica en la homeostasis energética. Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela; 2008.
19. Bedinger DH, Adams SH. Metabolic, anabolic, and mitogenic insulin responses: A tissue-specific perspective for insulin receptor activators. *Mol Cell Endocrinol*. 2015;415:143-56.
20. Nazarians-Armavil A. Effects of insulin resistance on leptin modulation of hypothalamic neurons. Toronto: Universidad de Toronto; 2012.
21. Rocandio AM. El apetito en el control del peso corporal. *Zainak*. 2000;20:123-33.
22. Konturek SJ, Konturek JW, Pawlik T, Brzozowski T. Brain-gut axis and its role in the control of food intake. *J Physiol Pharmacol*. 2004;55(1 Pt 2):137-54.
23. Tong L, Hadwood H. Acetyl-coenzyme A carboxylases: versatile targets for drug discovery. *J Cell Biochem*. 2006;99:1476-88.
24. Frayn KN, Arner P, Yki-Jarvinen H. Fatty acid metabolism in adipose tissue, muscle and liver in health and disease. *Essays Biochem*. 2006;42:89-103.
25. Voet D. *Metabolismo de los lípidos: Médica Panamericana*; 2007.
26. Merkel M, Eckel R, Goldberg I. Lipoprotein lipase: genetic, lipid uptake, and regulation. *J Lipid Res*. 2002;43:1997-2006.
27. Champe P, Harvey R, Ferreir D. *Bioquímica. México*. 2005.

28. Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.* 2005;1(1):15-25.
29. Barber M, Price N, Travers M. Structure and regulation of acetyl-CoA carboxylase genes of metazoan. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1733:1-28.
30. Saggerson D. Malonyl-CoA, a key signaling molecule in mammalian cells. *Annu Rev Nutr.* 2008;28:253-72.
31. Müller TD, Nogueiras R, Andermann ML, Andrews ZB, Anker SD, Argente J, et al. Ghrelin. *Molecular Metabolism.* 2015;4:437-60.
32. Munday MR. Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase. *Biochem Soc Trans.* 2002;30(Pt 6):1059-64.
33. Wunderlich CM, Hovelmeyer N, Wunderlich FT. Mechanisms of chronic JAK-STAT3-SOCS3 signaling in obesity. *JAKSTAT.* 2013;2(2):e23878.
34. Freitas Lima LC, Braga VA, do Socorro de Franca Silva M, Cruz JC, Sousa Santos SH, de Oliveira Monteiro MM, et al. Adipokines, diabetes and atherosclerosis: an inflammatory association. *Frontiers in physiology.* 2015;6:304.
35. Finnegan E, Pasquinelli AE. MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2013;48(1):51-68.
36. Vienberg S, Geiger J, Madsen S, Dalgaard LT. MicroRNAs in Metabolism. *Acta Physiol (Oxf).* 2016.
37. McAlexander M, Phillips M, Witwer K. Comparison of methods for miRNA extraction from plasma and quantitative recovery of RNA from cerebrospinal fluid. *Front Genet.* 2013;4:1-8.
38. Wang Y, Chen S, Deng C, Li F, Wang Y, Hu X, et al. MicroRNA-204 Targets Runx2 to Attenuate BMP-2-induced Osteoblast Differentiation of Human Aortic Valve Interstitial Cells. *Journal of cardiovascular pharmacology.* 2015;66(1):63-71.
39. Leeton LA, Tellam RL. Adipogenesis in mouse 3T3L1 cells: the effects of Rtl1 over-expression. *Funct Integr Genomics.* 2007;7(3):257-61.
40. Gomes CP, Cho JH, Hood L, Franco OL, Pereira RW, Wang K. A Review of Computational Tools in microRNA Discovery. *Front Genet.* 2013;4:81.
41. Gustavo CL, Rozo C, Garay J, Vargas D, Lizcano F. Efecto lipídico del Resveratrol en células 3T3-L1. *Salud Uninorte.* 2008;24(2):1-2.
42. Zebisch K, Voigt V, Wabitsch M, Brandsch M. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Analytical biochemistry.* 2012;425(1):88-90.

43. Samuel V, Shulman G. The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *The Journal of clinical investigation*. 2006;126(1):12-22.
44. Arner P, A k. MicroRNA regulatory networks in human adipose tissue and obesity. *Nature reviews Endocrinology*. 2015;11(5):276-88.
45. Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D. Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell*. 2008;135(1):61-73.
46. Mackenzie RW, Elliott BT. Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy*. 2014;7:55-64.
47. Hay N. Akt isoforms and glucose homeostasis - the leptin connection. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2011;22(2):66-73.
48. Dou L, Meng X, Sui X, Wang S, Shen T, Huang X, et al. MiR-19a regulates PTEN expression to mediate glycogen synthesis in hepatocytes. *Scientific reports*. 2015;5:11602.
49. Jordan SD, Kruger M, Willmes DM, Redemann N, Wunderlich FT, Bronneke HS, et al. Obesity-induced overexpression of miRNA-143 inhibits insulin-stimulated AKT activation and impairs glucose metabolism. *Nature cell biology*. 2011;13(4):434-46.
50. Uesugi A, Kozaki K, Tsuruta T, Furuta M, Morita K, Imoto I, et al. The tumor suppressive microRNA miR-218 targets the mTOR component Rictor and inhibits AKT phosphorylation in oral cancer. *Cancer research*. 2011;71(17):5765-78.
51. Venkataraman S, Birks DK, Balakrishnan I, Alimova I, Harris PS, Patel PR, et al. MicroRNA 218 acts as a tumor suppressor by targeting multiple cancer phenotype-associated genes in medulloblastoma. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(3):1918-28.
52. Guo ST, Jiang CC, Wang GP, Li YP, Wang CY, Guo XY, et al. MicroRNA-497 targets insulin-like growth factor 1 receptor and has a tumour suppressive role in human colorectal cancer. *Oncogene*. 2013;32(15):1910-20.

Anexos

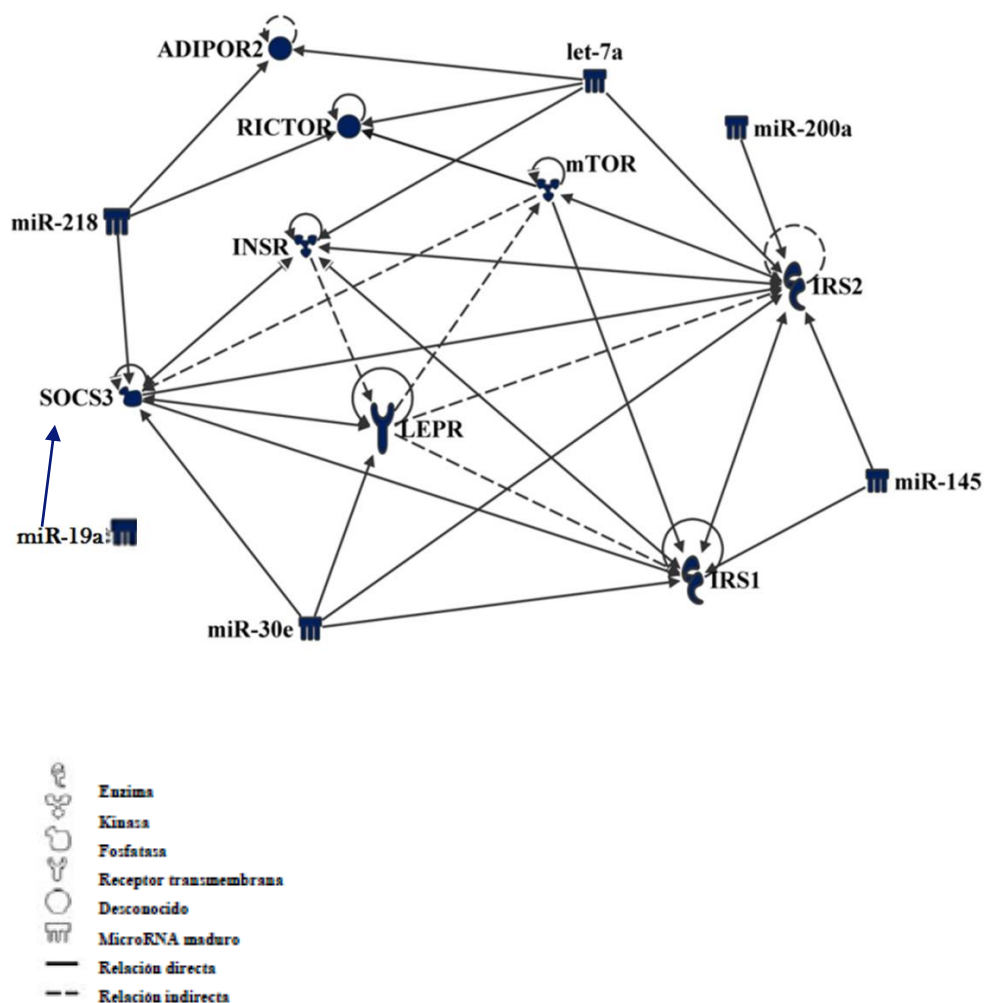


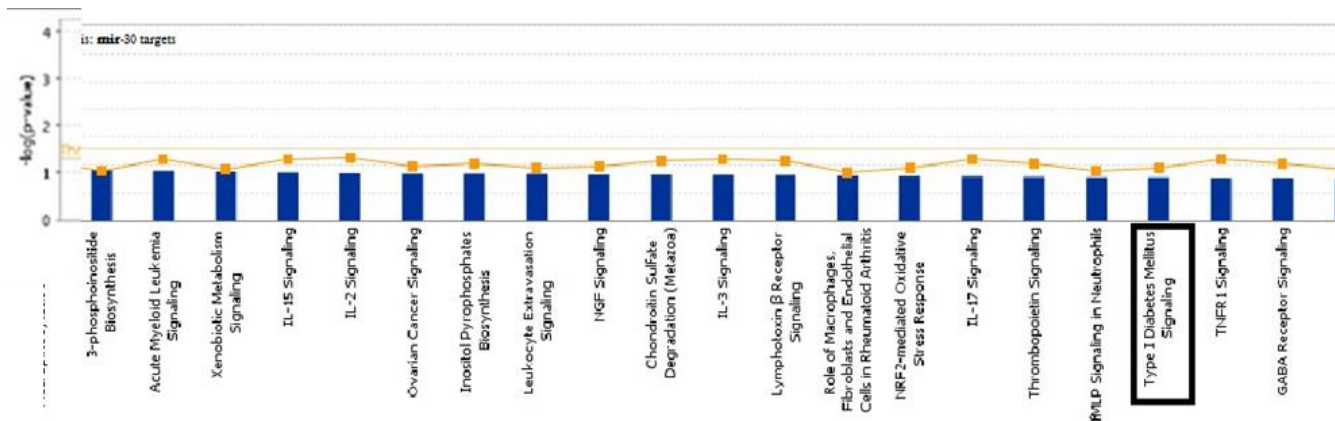
Figura 18: Representación esquemática de la interrelación entre *miR-19a*, *miR-30e*, *miR-200a*, *miR-218* con genes relacionados con las vías de señalización de la insulina y de la leptina. El análisis se realizó con el software *Ingenuity*. INSR, receptor de insulina; IRS1, sustrato del receptor de la insulina tipo 1; IRS2, sustrato del receptor de la insulina tipo 2; LEPR, receptor de la leptina; SOCS3, supresor de la señalización de citoquinas 3. Las flechas indican interacciones positivas y las líneas contiguas interacciones directas.

Tabla X: *miARNs* implicados en la diabetes mellitus y posibles *miARNs* reguladores. Este análisis fue realizado en miRWalk 2.0.

Enfermedad	Genes	<i>miARNs</i>
Diabetes mellitus tipo II	IRS1	<i>hsa-miR-200c-3p</i>
	EP300	<i>hsa-miR-200c-3p</i>
	SHC1	<i>hsa-miR-200a-3p</i>
	SHC1	<i>hsa-miR-200b-3p</i>
	KLF11	<i>hsa-miR-200b-3p</i>

Implicación de los *microARNs* en la adipogénesis y sensibilidad a la insulina

Diabetes <i>mellitus</i> tipo II	SHC1	<i>hsa-miR-200b-3p</i>
	JAG1	<i>hsa-miR-200c-3p</i>
	MSN	<i>hsa-miR-200c-3p</i>
	VEGFA	<i>hsa-miR-200b-3p</i>
	FLT1	<i>hsa-miR-200b-3p</i>
	KEAP1	<i>hsa-miR-200a-3p</i>
	AVPR1A	<i>hsa-miR-200c-3p</i>
	MAPK7	<i>hsa-miR-200c-3p</i>
	SMAD3	<i>hsa-miR-200a-3p</i>
	MAPK14	<i>hsa-miR-200a-3p</i>
	FLT1	<i>hsa-miR-200c-3p</i>
	SRF	<i>hsa-miR-200a-3p</i>
	NEUROD1	<i>hsa-miR-30a-5p</i>
	RORC	<i>hsa-miR-30b-3p</i>
	SOCS3	<i>hsa-miR-30c-5p</i>
	LNPEP	<i>hsa-miR-30e-3p</i>
	ATP5O	<i>hsa-miR-30e-5p</i>
	PSMA6	<i>hsa-miR-30e-5p</i>
	GNAI2	<i>hsa-miR-30e-5p</i>
	P2RX7	<i>hsa-miR-218-1-3p</i>
	CD38	<i>hsa-miR-218-1-3p</i>
	AHI1	<i>hsa-miR-218-5p</i>
	CD38	<i>hsa-miR-218-1-3p</i>
	GFPT1	<i>hsa-miR-218-5p</i>
	CYP24A1	<i>hsa-miR-218-5p</i>
	GLI2	<i>hsa-miR-218-5p</i>
	SOCS3	<i>hsa-miR-19a-3p</i>
	SOCS1	<i>hsa-miR-19b-3p</i>
	SOCS1	<i>hsa-miR-19a-3p</i>
	SOX4	<i>hsa-miR-19a-3p</i>
EIF4A2	<i>hsa-miR-19a-3p</i>	
MAPK1	<i>hsa-miR-19b-3p</i>	



Analysis: miR-200a targets

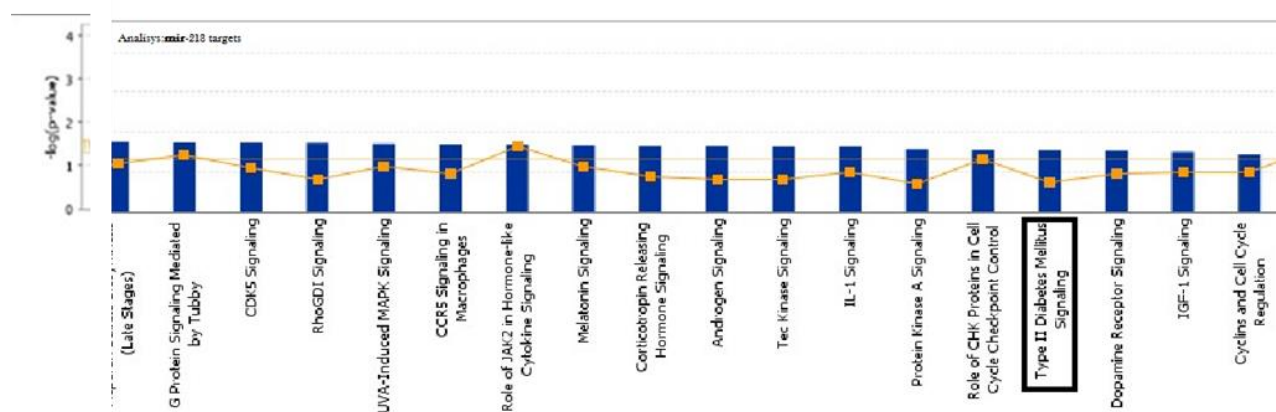
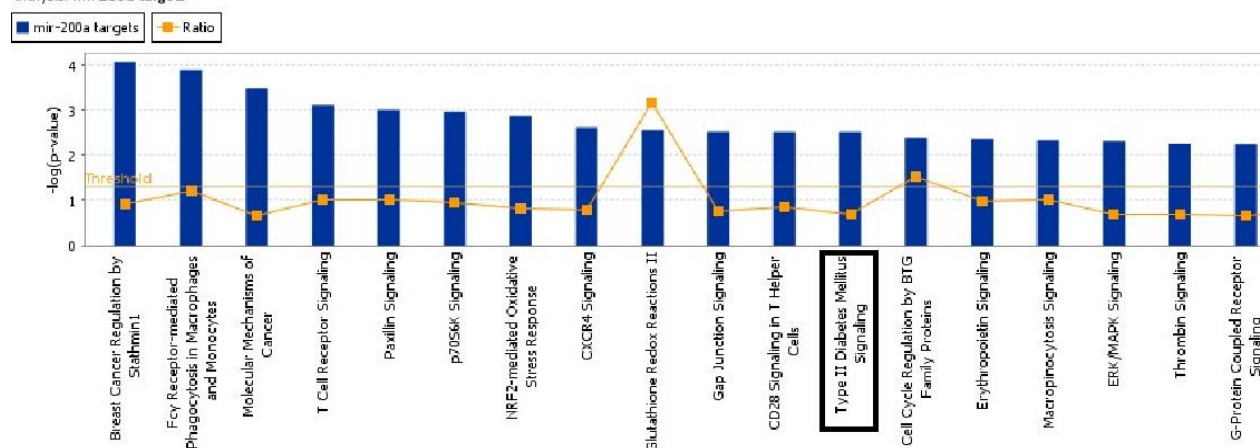


Figura 19: Rutas canónicas con mayor puntuación correspondientes a las dianas identificadas para *miR-30*, *miR-200* y *miR-218*. Este análisis fue realizado con el software Ingenuity (las figuras están recortadas ya que son excesivamente largas).

Implicación de los *microARNs* en la adipogénesis y sensibilidad a la insulina