



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
FACULTAD DE CIENCIAS
Máster en Biología Molecular, Celular y Genética



TRABAJO FIN DE MÁSTER

Implicaciones de *miR-19a* y *miR-19b* en la adipogénesis

Implicacións de *miR-19a* e *miR-19b* na adipoxénese

Implications of *miR-19a* and *miR-19b* in adipogenesis



Por
Yocastia de Jesús Arámboles

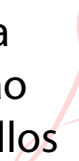
Directora
Susana Sangiao Alvarellos

A Coruña, España
24 Julio 2018

Dra. Susana Sangiao Alvarellos en calidad de directora del trabajo "**Implicaciones de miR-19a y miR-19b en la adipogénesis**" autoriza a Yocastia de Jesús Arámboles su presentación ante el Tribunal Evaluador.

En A Coruña, a 18 de Julio de 2018.

Susana
Sangiao
Alvarellos



Firmado digitalmente por
Susana Sangiao Alvarellos
Nombre de reconocimiento
(DN): cn=Susana Sangiao
Alvarellos
Fecha: 2018.07.17 20:54:58
+02'00'

VºBº Tutor
Fdo.: Susana Sangiao Alvarellos

Fdo.: Yocastia de Jesús Arámboles

Agradecimientos

Siempre es difícil dar los primeros pasos, pero la perseverancia y fuerza de voluntad siguientes son determinantes para lograr grandes cosas. Llegar a este punto posee un valor incalculable, que compensa los sacrificios del camino que fueron necesarios para lograrlo. Debido a esto, siempre será difícil plasmar en palabras todo aquello por lo que una persona se puede sentir agradecido, sobre todo, porque suelen ser muchas las razones para estarlo. En primer lugar agradezco a Dios, porque en su misericordia me permitió alcanzar mi meta.

Al grupo de grupo de Fisiopatología Endocrina, Nutricional y Médica (FENM); a pesar de que era todo un terreno nuevo para mí, me dieron la oportunidad de formar parte de su grupo lo cual significó mucho. A mi tutora, Dra. Susana Sangio Alvarellos, por su paciencia (sobre todo cuando pipeteaba mal un pocillo), comprensión, y apoyo continuo; sus correcciones y consejos permitieron que esta fuera una etapa de mucho aprendizaje, que inició con aprender a usar la pipeta, por lo cual le estoy sumamente agradecida. De forma especial a Bárbara Varela, en ti encontré una gran amiga, casi una hermana, siempre me animabas y no tengo como agradecer por cada momento que me alentaste y por las cosas que me enseñaste, espero que cuando me visites hacerte sentir tal y como lo hiciste conmigo, aunque estoy consciente que será una difícil tarea llegar a tu nivel, espero compensar por lo menos todo el cariño que me ofreciste. A Paula Juárez; desde que te conocí fuiste una motivación para mí, porque vi en ti un ejemplo de superación, y siempre por más difícil que estuviera el ambiente, tu carisma lo hacía divertido y llevadero, y por supuesto por la “bolita”, que me ayudó bastante durante el invierno. Gracias a ustedes he podido ampliar mis conocimientos, sobre todo los prácticos; sus consejos, enseñanzas y la calidad humana que me brindaron en cada momento, fueron un gran estímulo y facilitaron mi adaptación y aprendizaje en el laboratorio. También a los profesores de la facultad, por adaptar las diferencias culturales y profesionales al proceso de enseñanza.

Además, de forma especial agradezco a esos amigos que no esperaba encontrar, que Dios puso en mi camino, y que no importando la situación, siempre estuvieron para tenderme una mano, escucharme y dar el mejor consejo en el momento que más lo necesitaba. Siempre formaran parte especial de mi vida.

A Jilsy, Jesús, Esmailyn, Elías, Rolidy, Dilenia, Antonhy; gracias porque la distancia no fue obstáculo para que su apoyo me mostrara todo el cariño que nos une. A María Estela, por cuidar de mi hija, mientras estuve lejos. A mi hermana Elizabeth, gracias por tu preocupación constante, siempre orabas cuando estaba en exámenes y sé que te alegrabas más que yo por mis calificaciones.

A mi esposo Jeison Beriguét; si no me hubieras motivado, hoy no estuviera escribiendo estas palabras, fuiste pieza clave para atreverme a venir hasta aquí; gracias por cuidar nuestra hija y velar por mi familia en mi ausencia. A ti te debo esta meta que acabo de alcanzar. A mi madre Arcadia, por sus oraciones; tú y mi pequeña Jassiel han sido el motor principal, la mejor bendición de mi vida. A ustedes les dedico este trabajo.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	I
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	II
RESUMEN.....	III
RESUMO.....	III
SUMMARY.....	III
1. Introducción.....	1
1.1. Obesidad.....	1
1.2. Tejido adiposo.....	3
1.3. Adipogénesis.....	6
1.3.1. Factores de transcripción y regulación.....	7
1.3.2. Regulación hormonal.....	9
1.4. Metabolismo de los lípidos.....	10
1.4.1. Lipogénesis.....	10
1.4.2. Lipólisis.....	11
1.5. <i>microARNs</i>	12
1.5.1. Biogénesis y mecanismo de acción.....	12
1.5.2. Relación <i>miARNs</i> -obesidad.....	13
1.5.3. <i>miARNs</i> y adipogénesis.....	13
2. OBJETIVOS.....	15
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
3.1. Diseño experimental.....	16
3.2. Técnicas.....	17
<input type="checkbox"/> Cultivo celular de 3T3-L1.....	17
<input type="checkbox"/> Transfección.....	17
<input type="checkbox"/> Inducción de adipogénesis.....	18
<input type="checkbox"/> Tinción <i>Oil Red</i>	18
<input type="checkbox"/> Extracción de ARN total.....	19
<input type="checkbox"/> Retrotranscripción.....	19
<input type="checkbox"/> Reacción en Cadena de Polimerasa.....	20
3.3. Análisis Estadístico.....	21
4. RESULTADOS.....	22
4.1. Efectos de la sobreexpresión de <i>miR-19a</i> en la adipogénesis.....	22
4.2. Efectos de la sobreexpresión de <i>miR-19b</i> en la adipogénesis.....	26
4.3. Efecto de la sobreexpresión conjunta de <i>miR-19a</i> y <i>miR-19b</i> en la adipogénesis.....	29
5. DISCUSIÓN.....	31
6. CONCLUSIONES.....	36
6.1. CONCLUSIONS.....	36
BIBLIOGRAFÍA.....	37
ANEXOS.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa mundial de la prevalencia de la obesidad en ambos sexos para adultos mayores de 18 años en el año 2016.	2
Figura 2. Características de los tipos de adipocitos en muestras de ratón.....	4
Figura 3. Regulación y etapas de la adipogénesis.	8
Figura 4. Biosíntesis y mecanismo de acción de los <i>miARNs</i>	12
Figura 5. Línea de tiempo y protocolo seguido para diferenciar los preadipocitos de la línea celular hasta adipocitos maduros.....	18
Figura 6. Niveles de expresión de <i>miR-19a</i> en preadipocitos 3T3-L1 tratados con un control negativo (TN) o con un sobreexpresante para <i>miR-19a</i>	22
Figura 7. Fotografías de células 3T3-L1 tratadas con un sobreexpresante comercial para <i>miR-19a</i> (B, D, F) o con un control negativo (A, C, E)..	23
Figura 8. Niveles de expresión de <i>PPARγ</i> (A), <i>C/EBPα</i> (B), <i>AdipoQ</i> (C), <i>FAS</i> (D), <i>RORα</i> (E) en preadipocitos 3T3-L1 tratados con un control negativo (TN) o con un sobreexpresante para <i>miR-19a</i>	25
Figura 9. Niveles de expresión de <i>miR-19b</i> en preadipocitos 3T3-L1 tratados con un control negativo (TN) o con un sobreexpresante para <i>miR-19b</i>	26
Figura 10. Fotografías de células 3T3-L1 tratadas con un sobreexpresante comercial para <i>miR-19b</i> (B, D, F) o con un control negativo (A, C, E)..	27
Figura 11. Niveles de expresión de <i>PPARγ</i> (A), <i>C/EBPα</i> (B), <i>AdipoQ</i> (C), <i>FAS</i> (D), <i>RORα</i> (E) en preadipocitos 3T3-L1 tratados con un control negativo (TN) o con un sobreexpresante para <i>miR-19b</i>	28
Figura 12. Fotografías de células 3T3-L1 tratadas con sobreexpresantes comerciales para <i>miR-19a</i> y <i>miR-19b</i> (B, D, F) o con un control negativo (A, C, E).	29
Figura 13. Niveles de expresión de <i>PPARγ</i> (A), <i>C/EBPα</i> (B), <i>AdipoQ</i> (C), <i>FAS</i> (D), <i>RORα</i> (E) en preadipocitos 3T3-L1 tratados con un control negativo (TN) o con sobreexpresantes para <i>miR-19a</i> y <i>miR-19b</i>	30
Figura 14. Posible mecanismo de acción de <i>RORα</i> y de la familia <i>miR-19</i> en la adipogénesis.....	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de la obesidad según la OMS.	1
Tabla 2. Moduladores hormonales de la adipogénesis.	10
Tabla 3. <i>miARNs</i> relacionados con la obesidad y el síndrome metabólico.	13
Tabla 4. <i>miARNs</i> implicados en la fisiología de los adipocitos.	14
Tabla 5. Componentes de la mezcla de retrotranscripción de <i>ARNm</i>	19
Tabla 6. Programa de retrotranscripción de <i>ARNm</i>	20
Tabla 7. Componentes de la mezcla de retrotranscripción de <i>miARN</i>	20
Tabla 8. Programa de retrotranscripción de <i>miARN</i>	20
Tabla 9. Mezcla de <i>qRT-PCR</i> para análisis de <i>ARNm</i>	21
Tabla 10. Mezcla de <i>qRT-PCR</i> para análisis de <i>miARNs</i>	21
Tabla 11. Etapas de la <i>qRT-PCR</i> para <i>ARNm</i>	21
Tabla 12. Etapas de la <i>qRT-PCR</i> para <i>miARN</i>	21
Tabla 13. Secuencias de cebadores	40

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ACC	Acetil-CoA carboxilasa	miARNs	<i>microARNs</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico	MGL	Monoglicérido lipasa
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario	MSCs	Células madre mesenquimales
ADSC	Células madre derivadas del tejido adiposo	OMS	Organización Mundial de la Salud
AdipoQ	Adiponectina	PBS	Tampón fosfato
AKT	Proteína serina-treonina quinasa	P/S	Penicilina/estreptomicina
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico	PPARγ	Receptor activado por proliferadores peroxisomales γ
AP-1	Factores de transcripción activadores de proteína-1	PRDM16	Proteína 16 que contiene el dominio PR
ARN	Ácido ribonucleico	Pref-1	Factor 1 de preadipocito
ATGL	Lipasa adipocítica de triglicéridos	pre-miARNs	Precursor de <i>microARNs</i>
BMP	Proteínas morfogénicas óseas	pri-miARN	Transcrito primario de <i>microARN</i>
C/EBPs	Familia de proteínas de unión al potenciador CCAAT	qRT-PCR	Reacción en cadena de polimerasa cuantitativa en tiempo real
DIO2	Yodotironina desyodasa	RORα	Receptor huérfano relacionado con el ácido retinoico α
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2	RISC	Complejo de silenciamiento inducido por <i>ARN</i>
FAS	Ácido graso sintetasa	RT	Retrotranscripción
GH	Hormona de crecimiento	SREBP-1c	Proteína de unión al elemento regulador de esteroides-1c
GLUT-4	Transportador de glucosa 4	STAT	Transductores de señal y activadores de la transcripción
HSL	Lipasa sensible a hormonas	SG	Ratones <i>staggerer</i>
HT	Hormonas tiroideas	TAB	Tejido adiposo blanco
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina	TAM	Tejido adiposo marrón
IMC	Índice de masa corporal	TAS	Tejido adiposo subcutáneo
KLF	Factores similares a <i>Krüppel</i>	TAV	Tejido adiposo visceral
KO	Ratones <i>Knockout</i>	UCP-1	Proteína desacoplante-1
		UTR	Regiones no traducidas

RESUMEN

La obesidad es una enfermedad compleja caracterizada por el aumento de grasa corporal, cuya prevalencia mundial posee tendencia al aumento. Comorbilidades como la diabetes *mellitus* y las enfermedades cardiovasculares hacen que sea un riesgo importante para la salud. Por esto, es menester conocer los mecanismos epigenéticos implicados en la diferenciación de los adipocitos. Los *miARNs* son ácidos ribonucleicos cortos no codificantes que forman parte de la regulación epigenética en importantes procesos biológicos como la adipogénesis. El objetivo principal de este trabajo fue determinar el papel de *miR-19a* y *miR-19b* en la adipogénesis, utilizando un modelo *in vitro*, la línea celular 3T3-L1, un modelo ampliamente empleado para estudios de adipogénesis e investigaciones relacionadas con la obesidad. Para ello, se sobreexpresaron *miR-19a* y *miR-19b* con precursores comerciales, tras lo cual se analizaron diferentes marcadores de adipogénesis mediante *qRT-PCR* a distintos tiempos de diferenciación y se visualizaron los lípidos acumulados mediante tinción con *Oil Red*. Nuestros resultados muestran que la sobreexpresión de *miR-19a* y *miR-19b* en células 3T3-L1 inhibe la adipogénesis, evidenciado por la reducción del ARNm de *AdipoQ*, *PPAR γ* , *C/EBP α* y *FAS*.

RESUMO

A obesidade é unha enfermidade complexa caracterizada polo aumento de graxa corporal, cuxa prevalencia mundial posúe tendencia ao aumento. Comorbilidades como a diabetes *mellitus* e as enfermidades cardiovasculares fan que sexa un risco importante para a saúde. Por isto, é mester coñecer os mecanismos epixenéticos implicados na diferenciación dos adipocitos. Os *miARNs* son ácidos ribonucleicos curtos non codificantes que forman parte da regulación epixenética en importantes procesos biolóxicos como a adipoxénese. O obxectivo principal deste traballo foi determinar o papel de *miR-19a* e *miR-19b* na adipoxénese, utilizando un modelo *in vitro*, a liña celular 3T3-L1, un modelo amplamente empregado para estudos de adipoxénese e investigacións relacionadas coa obesidade. Para iso, sobreexpresáronse *miR-19a* e *miR-19b* con precursores comerciais, tras o cal analizáronse diferentes marcadores de adipoxénese mediante *qRT-PCR* a distintos tempos de diferenciación e visualizáronse os lípidos acumulados mediante tinción con *Oil Red*. Os nosos resultados mostran que a sobreexpresión de *miR-19a* e *miR-19b* en células 3T3-L1 inhibe a adipoxénese a tempos tardíos, evidenciado pola redución do ARNm de *AdipoQ*, *PPAR γ* , *C/EBP α* e *FAS*.

SUMMARY

Obesity is a complex disease characterized by the increase of body fat, whose worldwide prevalence has a tendency to increase. Comorbidities such as diabetes *mellitus* and cardiovascular diseases represent a significant risk to health. Therefore, it is important to know the epigenetic mechanisms involved in the differentiation of adipocytes. *miRNAs* are short non-coding ribonucleic acids which are part of epigenetic regulation in important biological processes such as adipogenesis. The main objective of this work was to determine the role of *miR-19a* and *miR-19b* in adipogenesis, using an *in vitro* model, the 3T3-L1 cell line, a model widely used for studies of adipogenesis and obesity. For this, *miR-19a* and *miR-19b* were overexpressed with commercial precursors, then several markers of adipogenesis were evaluated by *qRT-PCR* through several differentiation times and accumulated lipids were visualized by staining with *Oil Red*. Our results showed that overexpression of *miR-19a* and *miR-19b* in 3T3-L1 cells inhibits adipogenesis, as shown by the reduction of *AdipoQ*, *PPAR γ* , *C/EBP α* and *FAS* mRNAs.

1. Introducción

1.1. Obesidad

La obesidad es una patología crónica y compleja caracterizada esencialmente por el incremento de la grasa corporal a raíz de un desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético, generando así un balance calórico positivo que va asociado a un mayor riesgo para la salud (1). En las últimas décadas esta enfermedad ha avanzado de forma alarmante, hasta el punto que la Organización Mundial de la Salud (OMS) le considera una pandemia (2).

En el año 2016 existían más de 1,900 millones de adultos con sobrepeso, de éstos más de 650 millones eran obesos. Dentro de las cifras más preocupantes de la obesidad está su alta prevalencia durante la infancia y adolescencia. Por ejemplo, en el año 2016 aproximadamente 41 millones de niños menores de cinco años tenían sobrepeso o eran obesos, mientras que de 5 a 19 años existían más de 340 millones (3). Para estimar el riesgo para la salud la OMS propone una clasificación que corresponde a la relación entre el peso expresado en kilos (Kg) y de la altura expresada en metros cuadrados (m^2) (Tabla 1), denominado Índice de Masa Corporal (IMC), de tal forma que las personas cuyo cálculo sea igual o mayor a $30 \text{ Kg}/m^2$ son consideradas obesas (3).

Clasificación	IMC (Kg/m^2)
Normopeso	18,5-24,9
Sobrepeso o Preobeso	25-29,9
Obesidad Grado I o moderada	30-34,9
Obesidad Grado II o severa	35-39,9
Obesidad Grado III o mórbida	≥ 40

Tabla 1. Clasificación de la obesidad según la OMS (3).

1.1.1. Etiopatogenia y factores asociados a la obesidad

La obesidad es el resultado de la interrelación de diversos factores como son genéticos, metabólicos, endocrinos y ambientales, de este último podemos mencionar el aumento de la ingesta de alimentos con alto contenido calórico y una disminución de la actividad física causada por una conducta sedentaria progresiva (2); otro factor asociado es la microbiota intestinal, pues se considera que una alteración en su equilibrio puede conllevar a procesos de inflamación que sirven como inductores en la patogénesis de la obesidad y el síndrome metabólico (4).

Dentro de los factores asociados al desarrollo de la obesidad también se encuentran los mecanismos epigenéticos, los cuales actúan produciendo marcas químicas sobre la estructura

del ácido desoxirribonucleico (ADN) sin modificar su secuencia, de esta forma alteran la función génica ya sea activando o silenciando su expresión. Entre estos mecanismo podemos destacar los cambios de metilación y los *microARNs* (*miARNs*) (5). Ambos mecanismos están relacionados con la fisiopatología de la obesidad, por ejemplo se ha demostrado que individuos obesos y no obesos poseen patrones de metilación diferentes (6); también se han encontrado diferencias en las metilaciones del tejido adiposo visceral y subcutáneo (7). Además, estudios en roedores y humanos han comprobado como el estado nutricional durante la gestación afecta la metilación de genes implicados en los procesos de adiposidad corporal, en especial en la zona visceral correlacionados con la obesidad y la diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2). Por tanto, la susceptibilidad a desarrollar obesidad no sólo depende de la secuencia genética y la ingesta calórica, sino también de la herencia epigenética dependiente del estilo de vida durante el período prenatal y posnatal.

1.1.2. Consecuencias y comorbilidad

Estudios aprecian como un incremento del IMC y la prevalencia de la obesidad se asocia significativamente con la mortalidad de las poblaciones, la OMS resalta que la mayoría de los países desarrollados mantienen una prevalencia entre 20 y el 29,9% (Fig. 1). El mayor problema de la obesidad es que constituye un factor de riesgo importante para el desarrollo de varias enfermedades siendo su principal consecuencia la DM2 y las enfermedades cardiovasculares, afecta también al aparato locomotor debido al peso, se relaciona con ciertos tipos de tumores y, además acarrea efectos psicosociales que deterioran la calidad de vida de las personas (8). En niños se relaciona con un alto riesgo de desarrollar síndrome metabólico en la adultez, mientras que en embarazadas aumenta el riesgo de abortos espontáneos, diabetes e hipertensión gestacional (3). Actualmente los sistemas de salud se enfrentan a un gran reto, debido a los costos económicos que conllevan los tratamientos de la obesidad y de las atenciones especializadas de las comorbilidades que presenta (2).

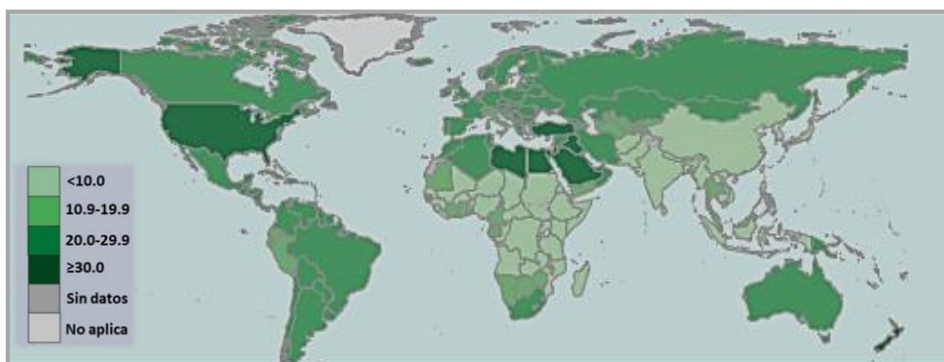


Figura 1. Mapa mundial de la prevalencia de la obesidad en ambos sexos para adultos mayores de 18 años en el año 2016. España poseía una prevalencia de 23,8% y República Dominicana del 27,6%. (9)

1.2. Tejido adiposo

Para comprender la fisiopatología de la obesidad debemos conocer el metabolismo y homeostasis del tejido adiposo del cual básicamente existen 2 tipos: el tejido adiposo blanco (TAB), el más abundante y cuya función principal es el almacenamiento de energía, y el tejido adiposo marrón (TAM), que participa de la termogénesis no temblorosa a través de la lipólisis (10). En humanos, el TAB se distribuye básicamente en tejido subcutáneo (TAS) y visceral (TAV) que está ubicado alrededor de los órganos internos especialmente en el abdomen, sin embargo en roedores se encuentran más depósitos de TAB como el gonadal y el retroperitoneal o el omental (11); por otro lado el TAM en humanos se encuentra principalmente en recién nacidos que gradualmente es reemplazado por TAB. Por esta razón hace años se pensaba que no existía en adultos, sin embargo, diversos estudios llevados a cabo con tomografía de emisión de positrones demostraron su existencia (12), pero su localización está restringida al cuello, la región supraclavicular, interescapular, la médula espinal y los depósitos perirrenales. En comparación con modelos murinos el TAM humano posee un perfil molecular similar, pero con la diferencia de que en los roedores el TAM está bien desarrollado y fácilmente visible sin distinción de la edad (13).

Las células del tejido adiposo o adipocitos, se caracterizan por el depósito de lípidos en su citoplasma, pero no todos los adipocitos son iguales, pues los adipocitos de TAM y TAB presentan características celulares propias para cada tejido (Fig. 2). Los adipocitos blancos presentan una gran vacuola lipídica que suele ocupar casi todo el citoplasma, esto provoca un desplazamiento del núcleo a la periferia y una distribución escasa de otros orgánulos como las mitocondrias y el retículo endoplásmico (14), por el contrario los adipocitos marrones presentan múltiples vacuolas lipídicas, un núcleo relativamente central y una distribución organizada de los orgánulos distinguiéndose por un gran número de mitocondrias que le brindan el color marrón característico y permiten la función termorreguladora (10). Recientemente se ha descrito un nuevo tipo celular que comparte características con los adipocitos blancos y marrones denominado adipocito *beige* o *brite* ubicado en los depósitos de tejido adiposo blanco, en humanos las que exhiben estas características están presentes en la región supraclavicular y paravertebral mientras que en los murinos abundan en la grasa inguinal y retroperitoneal (15).

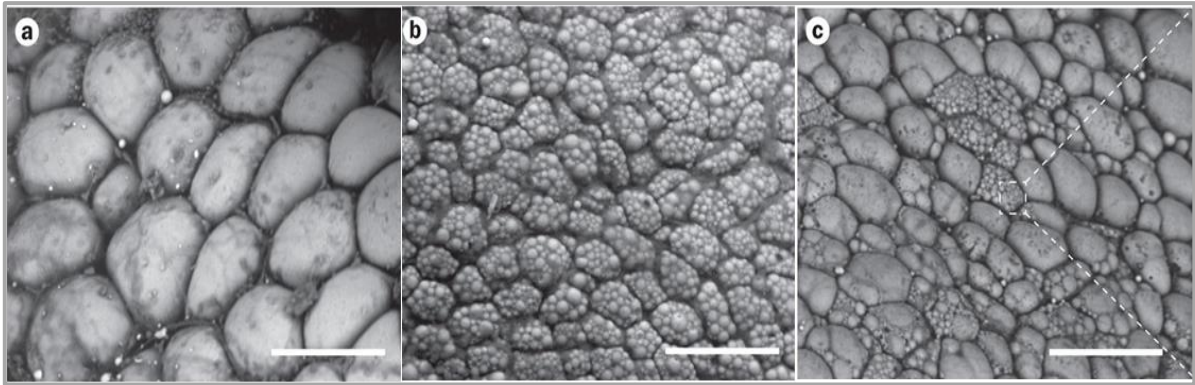


Figura 2. Características de los tipos de adipocitos en muestras de ratón. A) Adipocitos blancos con una sola gota de lípido; B) Adipocitos marrones multiloculares; C) Adipocitos *beige* tras estímulo farmacológico β -adrenérgico de TAB inguinal. Microfotografía de microscopio de barrido obtenida de (16). Barra de escala: 50 μ m.

Además de adipocitos en el tejido adiposo también existen otros tipos celulares como preadipocitos, células madre, células endoteliales, macrófagos y leucocitos (conocidas en su conjunto como células estromales) cuya proporción varía de acuerdo a la condición fisiológica y la localización del tejido (10). En la obesidad, las células del sistema inmune aumentan su infiltración dentro del tejido adiposo y aumentan la síntesis de factores que promueven la inflamación generalizada que caracteriza a la obesidad y que provoca lipotoxicidad en otros tejidos (17). Las células madre derivadas del tejido adiposo (ADSC) proporcionan la capacidad del tejido para generar adipocitos nuevos como un mecanismo importante para la homeostasis metabólica. Su capacidad de diferenciación en varios tipos celulares es actualmente un foco de interés para la medicina regenerativa (18).

1.2.1. Funciones

- **Almacenamiento de energía**

La función principal de los adipocitos es almacenar energía, siendo el TAB el principal responsable. Para responder a variaciones del estado energético y acomodarse a la cantidad de energía que debe almacenar es capaz de realizar cambios por un remodelado rápido y dinámico de su estructura, que puede ocurrir por 2 mecanismos: aumentando el número de adipocitos (hiperplasia) o aumentando su volumen (hipertrofia) (19).

La hipertrofia es típica de los adipocitos blancos y está relacionada con una mayor morbilidad debido a que los adipocitos hipertrofiados muestran características necróticas que provocan estados inflamatorios. La inflamación altera las vías de señalización y la función normal del receptor de la insulina y aumenta marcadamente la lipólisis conduciendo a una acumulación ectópica de lípidos en otros órganos que termina afectando el tráfico del transportador de glucosa 4 (GLUT-4), resultados que a la larga conducen a resistencia a la

insulina y dislipidemia (11, 19, 20). Estas características se han observado principalmente en los adipocitos del TAV, debido a que los tejidos mesentéricos y omentales están más cercanos a la vena porta y los factores proinflamatorios secretados tienen fácil acceso a la circulación, por tanto es su expansión la más relacionada al riesgo cardiometabólico. Por otro lado los adipocitos de TAS se comportan de forma distinta ya que experimentan más hiperplasia que el TAV y su tasa de lipólisis, la secreción de citoquinas y la síntesis de triglicéridos es menor (11, 21).

Aunque en la obesidad se presenta tanto la hipertrofia como la hiperplasia, esta última se relaciona con vías beneficiosas como la disminución de la liberación de ácido grasos libres y de citoquinas proinflamatorias y provoca un aumento de la sensibilidad a la insulina, esto sugiere que la adipogénesis es un posible objetivo para combatir la obesidad (12). Estos efectos demuestran que la capacidad y mecanismo de expansión del tejido adiposo es importante en relación a la patogenicidad de la obesidad, ya que de acuerdo a como ocurra la expansión se pueden producir desajustes metabólicos que se vinculan a otras patologías asociadas como la diabetes (1).

- **Función endocrina**

Hoy es bien sabido que el tejido adiposo es muy dinámico ya que también sintetiza y secreta numerosos factores denominados adipocinas las cuales intervienen en múltiples procesos metabólicos como la regulación de la ingesta, la sensibilidad a la insulina y procesos inflamatorios (10). Entre los factores secretados por el tejido adiposo se encuentran hormonas como la adiponectina, leptina y resistina por lo que podemos afirmar que se trata de un tejido endocrino (22). La adiponectina (o AdipoQ), es una hormona producida en todos los tipos de adipocitos, que posee un efecto antiobesogénico y antidiabético, ya que estimula la lipólisis y las respuestas antiinflamatorias (21). Esta proteína también promueve la funcionalidad y la supervivencia de las células β pancreáticas, encargadas de secretar insulina, y además presenta una acción a nivel central, estimulando el aumento de gasto energético y la pérdida de peso (23). Además su síntesis es proporcional a la diferenciación de los adipocitos, por lo que es usado como un marcador adipogénico (24).

La leptina es otra hormona importante, fue la primera hormona que determinó la capacidad endocrina del tejido adiposo, aunque también es producida por otros tejidos en menor cantidad. Sus valores plasmáticos son proporcionales a la cantidad de masa grasa (21). Entre sus funciones podemos diferenciar las que lleva a cabo a nivel central y a nivel

periférico. A nivel central, específicamente en el hipotálamo, tiene un fuerte poder anorexígeno reduciendo el apetito y promoviendo la saciedad, favoreciendo de este modo la pérdida de peso corporal. También interviene en el balance energético regulando la temperatura corporal y aumentando el gasto energético (25). Aunque la leptina ejerce un efecto antiobesidad, los individuos obesos presentan resistencia a esta hormona debido a mecanismos que alteran el transporte al sistema nervioso central y la eficacia de su señalización (21).

Existen además otras hormonas que antagonizan la acción de las anteriores, por ejemplo la resistina, la cual posee la capacidad de inducir resistencia a la insulina en ratones obesos, por tanto esta hormona demuestra el fuerte vínculo de la obesidad con la DM2, puesto que la resistencia a la insulina es la antesala de la diabetes. Otras hormonas como la omentina y la nesfatina se han relacionado, respectivamente, con los niveles de glucosa en sangre y la modulación del apetito de acuerdo al estado nutricional (11).

- **Termogénesis**

Tal como se ha mencionado, la gran cantidad de mitocondrias presentes en TAM permite la producción de calor por termogénesis no temblorosa, gracias a la alta expresión de la proteína desacoplante-1 (UCP-1) ubicada en la membrana mitocondrial interna (26). Esta proteína se activa tras estímulos que promueven la liberación de ácidos grasos, como es el frío y señales β -adrenérgicas. Como respuesta, la UCP-1 desacopla la fosforilación oxidativa al devolver protones a la matriz intermembranal de la mitocondria, causando así disminución de la síntesis de ATP y aumento de la actividad de la cadena respiratoria, que al final producen liberación de energía en forma de calor por combustión de los sustratos disponibles (27).

La termogénesis también favorece la pérdida de grasas almacenadas en adipocitos blancos, ya que estos al captar el déficit de ATP movilizan sus reservas energéticas. Esto fue corroborado por estudios en ratones transgénicos que expresaban genes homólogos de *UCP-1*, los cuales a pesar de dietas hipercalóricas eran resistentes a la obesidad (28). Por otra parte el tejido *beige* también contribuye a la termogénesis en ratones, en especial tras una prolongada exposición al frío que causa hiperplasia en los adipocitos *beige* y aumento en la expresión de *UCP-1* (29).

1.3. Adipogénesis

La adipogénesis es el proceso por el cual las células madres precursoras adquieren las características morfológicas y fisiológicas de un adipocito maduro y es similar en el TAB y el

TAM (30). A nivel celular se divide en 2 etapas, una de compromiso donde las células madre mesenquimales (*MSCs*) pluripotentes se convierten en preadipocitos y una etapa de diferenciación que puede ser temprana o terminal, en la cual los preadipocitos adquieren las características propias de un adipocito maduro (Fig. 3) (14, 31). Es importante destacar que la mayoría de los conocimientos que hoy se poseen de la adipogénesis, es gracias a estudios realizados con modelos celulares *in vitro*, tal como la línea de preadipocitos 3T3-L1, cuyas células poseen características fisiológicas y morfológicas muy similares a las *in situ*.

Recientemente se ha comprobado que los adipocitos blancos y marrones poseen un origen celular diferente (32); los adipocitos blancos derivan de una población de *MSCs* estromales ubicadas en el TAB (18), además se ha descubierto hace poco un nicho de células madre en la vasculatura adiposa (33); en cambio los adipocitos marrones surgen de una célula precursora común para los miocitos esqueléticos (34), proceso que es estimulado por el factor de transcripción denominado proteína 16 que contiene el dominio PR (*PRDM16*) (31). Por otro lado el origen de los adipocitos *beige* es muy debatido, algunos sugieren la posibilidad de una adipogénesis *de novo* (33) mientras otros abogan por una transdiferenciación de adipocitos blancos, fenómeno conocido como *browning* o *beiging* (35).

1.3.1. Factores de transcripción y regulación

En todo el proceso de adipogénesis existe una regulación muy compleja en la que intervienen múltiples señales extracelulares e intrínsecas que pueden promoverla o inhibirla como son: factores de transcripción, hormonas, citoquinas y *miARNs* (Fig. 3) (31). Los efectores positivos de la adipogénesis pueden ser específicos para cada adipocito, para los blancos se han identificado la familia de factores de transcripción activadores de proteína-1 (*AP-1*), los transductores de señal y activadores de la transcripción (*STAT*), el gen para la proteína de unión al elemento regulador de esteroides-1c (*SREBP-1c*) (14) factores similares a *Krüppel* (*KLF*), y la familia de proteínas morfogénicas óseas (BMP) que contribuye tanto para los adipocitos blancos (BMP2 y BMP4) como para los adipocitos marrones (BMP7) (14). Para el estímulo de la adipogénesis marrón se han caracterizado otros como *PRDM16* implicado en la inhibición del desarrollo del músculo esquelético (32).

El perfil de expresión de los factores de transcripción de la adipogénesis es muy coordinado y específico; la familia de proteínas de unión al potenciador *CCAAT* (*C/EBPs*), específicamente *C/EBPβ* y *C/EBPδ* se expresan luego de recibir el estímulo de varios factores, y son los principales reguladores en la etapa temprana de la adipogénesis (31) y para

promoverla inducen la expresión de *C/EBPα* y del receptor activado por proliferadores peroxisomales γ (*PPAR γ*) mediante un proceso de retroalimentación positiva; *PPAR γ* y *C/EBPα* se autoregulan entre sí provocando la diferenciación terminal por activación de una serie de genes relacionados con la sensibilidad a la insulina, la lipogénesis y la lipólisis, incluido el gen *GLUT-4* como se representa en la figura 3 (31, 36).

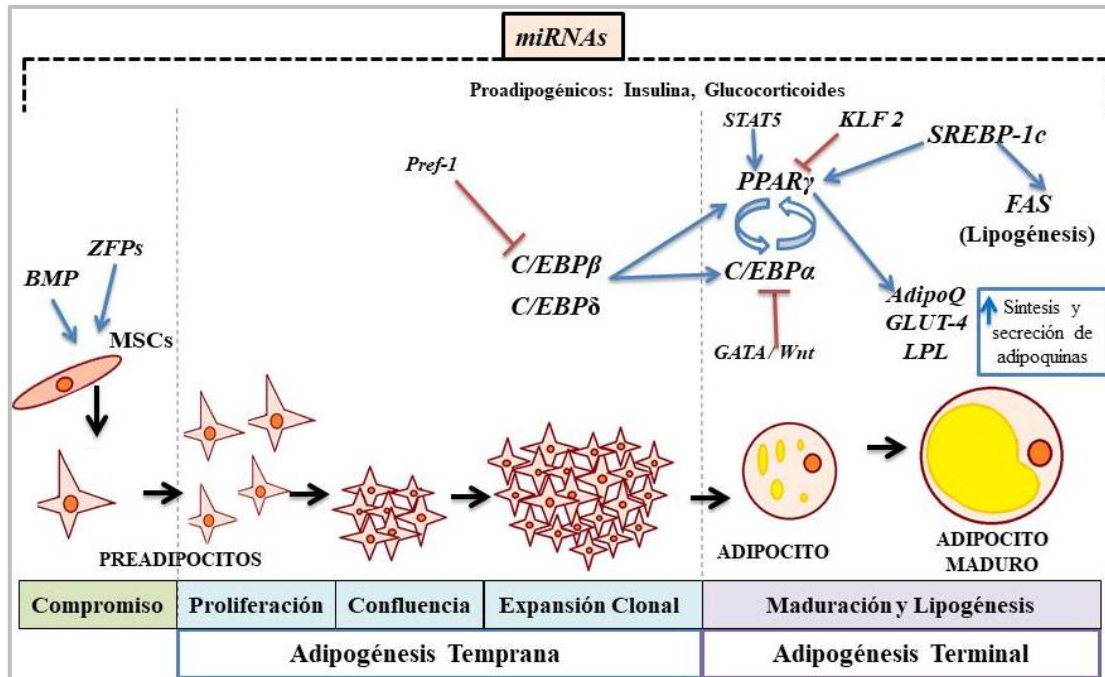


Figura 3. Regulación y etapas de la adipogénesis. En el esquema se muestran algunos factores de transcripción que inhiben (líneas rojas) o estimulan (flechas azules) el progreso de la adipogénesis. Líneas punteadas señalan etapas en las que actúan diferentes *miRNAs*. También se muestra la transición y los cambios morfológicos desde célula madre (*MSC*) hasta adipocito maduro en las distintas etapas de la adipogénesis (Flechas negras).

Aunque todos los factores mencionados poseen un papel importante, *PPAR γ* se considera el principal regulador de la adipogénesis, pues estudios han demostrado que sin él es imposible la diferenciación (31). Pertenece a una súper familia de receptores nucleares de factores de transcripción que actúan uniéndose a promotores de genes diana que participan en la proliferación celular, la inflamación y el metabolismo energético, y su expresión puede ser inducida por esteroides como la dexametasona (37). Este factor de transcripción también favorece la sensibilidad a la insulina induciendo la síntesis de adiponectina y actuando como receptor de medicamentos hipoglucemiantes del tipo tiazolidinedionas, lo que demuestra su importancia como diana terapéutica de la DM2. En estudios llevados a cabo en roedores también se ha demostrado que, induce apoptosis en adipocitos hipertróficos viscerales y subcutáneos (37). Estos efectos han permitido demostrar cómo *PPAR γ* juega un papel

importante en la fisiopatología de la obesidad y el síndrome metabólico (21), además es la diana de diferentes factores externos que pueden promover o reprimir la adipogénesis (31).

Menos estudiados son los factores antiadipogénicos o efectores negativos. Se conocen algunos como *KLF2*, el factor 1 de preadipocito (*Pref-1*) y los miembros de las familias *GATA* y *Wnt* (14). Otro factor que ha cobrado importancia recientemente y al que algunos artículos asocian un papel negativo en la adipogénesis es el receptor huérfano relacionado con el ácido retinoico α (*ROR α*), el cual forma parte de una súper familia de receptores nucleares regulados por ligando relacionados con el ácido retinoico (38). *ROR α* se expresa altamente en varios tejidos, incluyendo el hígado y el tejido adiposo, se ha relacionado con un papel importante en procesos inmunes, la regulación del ritmo circadiano y en procesos metabólicos como la homeostasis lipídica (39). Sin embargo su papel en la adipogénesis es controvertido.

Muchas investigaciones sobre cómo *ROR α* afecta la adipogénesis y la síntesis de triglicéridos se han realizado en ratones *staggerer (sg)* los cuales poseen una mutación natural para *ROR α* , que provoca que la proteína no sea funcional. Lau y cols. realizaron estudios con este modelo de ratón, y sus resultados muestran cómo los preadipocitos presentaban una diferenciación celular menos potente con menor absorción de glucosa y de ácidos grasos libres que sus contrapartes salvajes (40, 41). Mientras, en contraste, los estudios de Duez señalan una disminución de la expresión de reguladores y marcadores adipogénicos (*PPAR γ* , *C/EBP α* y *GLUT-4*) en un modelo *in vitro* de células 3T3-L1 con sobreexpresión de *ROR α* , observando un descenso en la adipogénesis (42). Estudios realizados con ratones *knockout (KO)* de *ROR α* específicos para tejido hepático, presentaban una adipogénesis más potente que los controles y un aumento en la expresión *PPAR γ* , por lo que postularon que los efectos de *ROR α* podrían ser a través de la inhibición transcripcional de *PPAR γ* (43).

1.3.2. Regulación hormonal

Además de los factores de transcripción numerosas hormonas también regulan el metabolismo y la diferenciación de los adipocitos, pero los efectos dependerán de las diferentes vías de señalización por las que actúen y el tipo de cultivo en el que se analicen. Generalmente las proadipogénicas actúan estimulando la transcripción directa de factores como *PPAR γ* y la familia *C/EBP* y de sus reguladores positivos o bien contrarrestando el efecto de vías antiadipogénicas (Tabla 2) (44).

Hormona	Efectos
Hormona de crecimiento (GH)	<i>In vitro</i> : Proadipogénica en 3T3-L1 y antiadipogénica en cultivos primarios. <i>In vivo</i> : Antiadipogénica, disminuye el TAB en humanos y modelos murinos tratados con GH.
Hormonas tiroideas (HT)	<i>In vitro</i> : -Proadipogénica para 3T3-L1 y la línea HIB-B1 (línea celular de TAM). -Promoción del <i>browning</i> adaptativo en adipocitos blancos. Efectos diversos <i>in vivo</i> : -En ratones <i>KO</i> para receptores de HT y <i>DIO2</i> no hay evidencia de alteraciones significativas en el tejido adiposo, pero sí en células aisladas de estos ratones en cultivos <i>in vitro</i> . -En ratas tratadas con triyodotironina, se promueve la lipogénesis, y además aumenta la expresión de <i>UCP-1</i> , estimulando de esta forma la lipólisis y la termogénesis.
Glucocorticoides	-<i>In vitro</i> : Proadipogénico tanto en líneas celulares (3T3-L1, 10T1/2) como en cultivos primarios de BM- <i>MSCs</i> . -<i>In vivo</i> : Proadipogénico; promueven la obesidad visceral al favorecer a los adipocitos blancos (en murinos tratados con GC disminuye el <i>browning</i> y la actividad termogénica de <i>UCP-1</i>).
Insulina	-<i>In vitro</i> : Proadipogénico en modelos 3T3-L1. Estimula la proliferación y la diferenciación de los adipocitos al bloquear reguladores negativos de <i>PPARγ</i> y al estimular a <i>SREBP-1c</i> . -<i>In vivo</i> : ratones <i>KO</i> para receptores de insulina presentan TAB reducido.
Estrógenos	-Efectos diversos en modelos <i>in vitro</i> : antiadipogénica en 3T3-L1 y proadipogénico en preadipocitos de rata. -<i>In vivo</i> : antiadipogénico, disminuye el TAV en mujeres y en modelos trágénicos. En ratones tratados con estrógenos disminuye la masa magra y el tamaño de los adipocitos.
Andrógenos	Efectos controversiales : Principalmente antiadipogénico <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> . Pero su exceso en mujeres induce obesidad abdominal.

Tabla 2. Moduladores hormonales de la adipogénesis (44).

1.4. Metabolismo de los lípidos

1.4.1. Lipogénesis

La diferenciación de los adipocitos también incluye la expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico. A pesar de que la mayor parte de los lípidos almacenados en los adipocitos provienen de la dieta, los adipocitos maduros pueden sintetizarlos por un proceso llamado lipogénesis *de novo* (21). La lipogénesis es una ruta metabólica que transforma el acetil-CoA, obtenido del metabolismo de la glucosa, para la síntesis de ácidos grasos que luego son esterificados hasta triglicéridos y almacenados en el citoplasma del adipocito

blanco (45). Esta ruta es llevada a cabo gracias a una serie de enzimas, principalmente la ácido graso sintetasa (FAS) y la acetil-CoA carboxilasa (ACC) (46).

FAS es un gran complejo formado por varios dominios que le confieren una actividad multienzimática que es necesaria para la síntesis y elongación de ácidos grasos (21). *FAS* se expresa en varios tejidos, predominando en el hígado y el tejido adiposo; utiliza acetil-CoA, NADPH y malonil-CoA como sustrato para sintetizar palmitato (16 carbonos) y está principalmente regulada a nivel hormonal por la insulina, además se relaciona con la regulación de la ingesta a nivel cerebral (Fig. 4) (47).

FAS para su función recibe el estímulo de *SREBP-1c*, un regulador importante de la lipogénesis *de novo*. El factor de transcripción *SREBP-1c* modula la actividad de otros genes lipogénicos y puede ser estimulado por diversas hormonas (48), siendo la más importante la insulina, ésta al unirse a su receptor induce actividad tirosinquinasa que aumenta la absorción de glucosa en los adipocitos por medio del reclutamiento de transportadores GLUT-4, al mismo tiempo la glucosa también influye en la lipogénesis por medio de otros factores de transcripción similares a *SREBP-1c*. Otras hormonas que afectan *SREBP-1c* son la leptina y la *GH*, las cuales ejercen un efecto negativo en la lipogénesis (49).

1.4.2. Lipólisis

La lipólisis es la vía metabólica por la cual se produce la degradación de los lípidos almacenados en estados de requerimiento energético como el ayuno, o por señales β -adrenérgicas y frío (45). Esta vía es llevada a cabo principalmente en el adipocito por la acción de 3 enzimas hidrolíticas: primero la lipasa adipocítica de triglicéridos (ATGL) o desnutrina, convierte los triacilgliceroles en diacilgliceroles, éstos luego son divididos hasta monoacilgliceroles por la lipasa sensible a hormonas (HSL); ésta enzima es activada por fosforilación como consecuencia del aumento citoplásmático de adenosín monofosfato cíclico (AMPc); por último la monoglicérido lipasa (MGL) genera glicerol y ácidos grasos libres que son captados por otros tejidos (45). La insulina es el principal inhibidor de la lipólisis, pues provoca que la proteína serina-treonina quinasa (AKT) active una fosfodiesterasa que disminuye los niveles de AMPc, para de esta forma inhibir la actividad de la HSL (45). La lipólisis puede verse influenciada por las dietas hipercalóricas, ya que como mencionamos anteriormente, éstas provocan adipocitos hipertrofiados que luego aumentan marcadamente su tasa de lipólisis, este aumento produce depósitos ectópicos de grasas en otros tejidos que luego sufren lipotoxicidad y resistencia a la insulina, por tanto la regulación de esta vía

metabólica, anudado a la lipogénesis *de novo*, juega un papel importante en la fisiopatología de la obesidad (50).

1.5. *microARNs*

1.5.1. Biogénesis y mecanismo de acción

Recientemente muchos estudios han resaltado el papel que juegan los *miARNs* en la regulación celular. Los *miARNs* son ácidos ribonucleicos (ARN) cortos no codificantes de aproximadamente 19-25 nucleótidos que forman parte de la maquinaria epigenética (51). Los *miARNs* pueden ser transcritos a partir de secuencias intrónicas de genes codificantes o de regiones intergénicas. La biosíntesis se inicia en el núcleo con transcritos primarios (*pri-miARNs*) que luego atraviesan una vía de maduración; la ribonucleasa DROSHA procesa los *pri-miARNs* hasta *pre-miARNs*, estos luego son exportados al citoplasma donde son escindidos por otra enzima llamada DICER hasta generar *miARNs* maduros de una sola cadena (Fig. 4) (52).

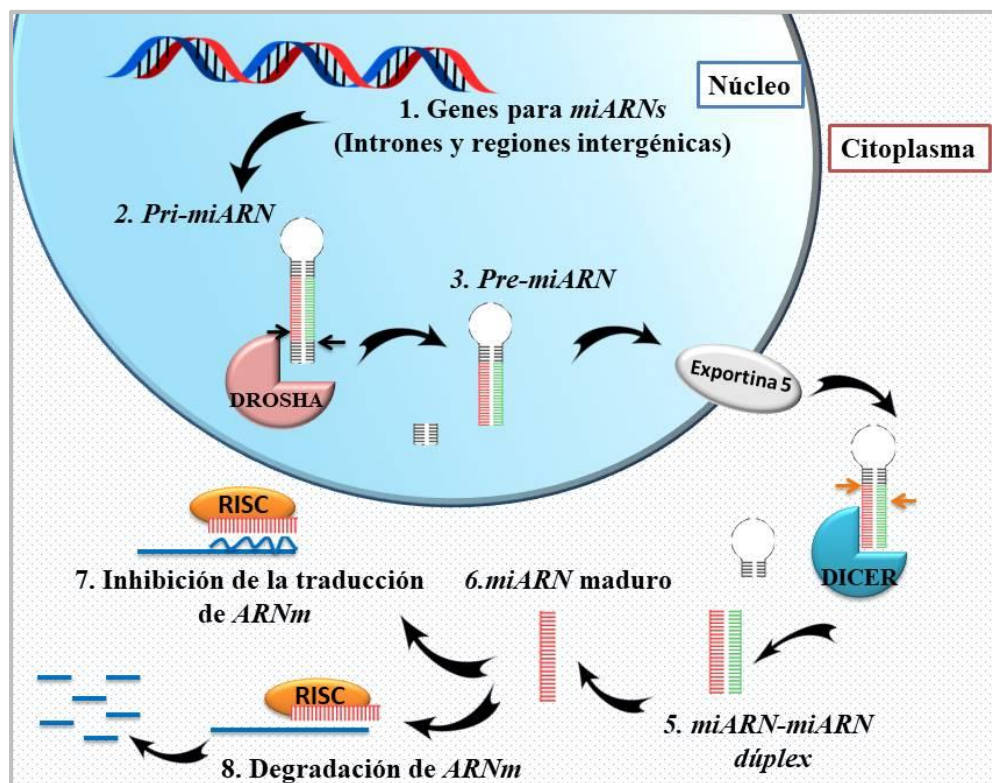


Figura 4. Biosíntesis y mecanismo de acción de los *miARNs*. Modificado de (53).

Los *miARNs* maduros regulan la expresión génica a nivel postraduccional al unirse principalmente a regiones no traducidas (*UTR*) 3' o 5' de múltiples *ARNm* diana. Herramientas informáticas especializadas han identificado más de 45,000 sitios de unión para *miARNs* que afectan al 60% de los genes (54). Al unirse dirigen el complejo de silenciamiento inducido por ARN (*RISC*) para provocar la inactivación génica, ya sea inhibiendo el inicio o

elongación de la traducción o bien induciendo la degradación parcial o total del *ARNm* diana (Fig. 4) (52). De esta forma los *miARNs* regulan múltiples procesos como proliferación celular, apoptosis, inflamación, metabolismo y diferenciación celular (55). Por otra parte sus concentraciones circulantes son elevadas y existen evidencias de cómo *miARNs* pueden regular tejidos a distancia por medio de exosomas, por lo que se estima que intervienen en la comunicación celular actuando también como entidades endocrinas y paracrinas (55).

1.5.2. Relación *miARNs*-obesidad

Debido a las implicaciones que tienen los *miARNs*, su desregulación puede ser la causa de un amplio rango de enfermedades (55). Se han determinado perfiles de *miARNs* estrechamente relacionados con enfermedades metabólicas como la obesidad y la DM2, encontrándose *miARNs* asociados al IMC, al aumento de peso corporal y la resistencia a la insulina, esto destaca su posible uso como biomarcadores (Tabla 3) (51).

Existen estudios que han mostrado el comportamiento específico que muestran varios *miARNs* (55). Por ejemplo un estudio reveló cómo *miR-140* se encontraba elevado en individuos con obesidad mórbida en contraste con aquellos sometidos a tratamiento quirúrgico tras cual disminuían los niveles. De modo que los cambios asociados a la pérdida de peso por cirugía pueden revertir la expresión de *miARNs* (51). Otros como *miR-21* y *miR-143* intervienen en el deterioro progresivo de la sensibilidad a la insulina, otro hecho que enlaza la obesidad con la DM2 (55). En un estudio en ratones alimentados con dieta alta en grasas los niveles de *miR-143* aumentaron en el TAV, asociándose a cambios en el peso corporal, los niveles de leptina plasmática y de *PPAR γ* , reflejando que la dieta también influye en la expresión de los *miARNs* (51).

Patología asociada	<i>miARN</i>
Obesidad	<i>miR-34a</i> , <i>miR-221</i> , <i>miR-222</i> , <i>miR-122</i> , <i>miR-221</i> , <i>miR-17</i> , <i>miR-132</i>
Resistencia a la insulina	<i>miR-15a/b</i> , <i>miR-21</i> , <i>miR-143</i> , <i>miR-103</i> , <i>miR-107</i> , <i>miR-125</i> , <i>miR-33b</i>
DM2	<i>miR-27a</i> , <i>miR-21</i> ,
Hipertensión	<i>miR-15a/b</i> , <i>miR-103</i> , <i>miR-122</i> , <i>miR-200a/c</i> , <i>miR-143</i>

Tabla 3. *miARNs* relacionados con la obesidad y el síndrome metabólico (51, 52, 55).

1.5.3. *miARNs* y adipogénesis

Tanto en la diferenciación del adipocito, desde el compromiso de las *MSCs* hasta su maduración, como en el metabolismo lipídico participa un amplio universo de *miARNs*, ya sea

actuando como inhibidores o promotores (Tabla 4) (55). Entre ellos podemos mencionar el *clúster miR-17-92* (56), que incluye 7 *miARNs* distintos (*miR-17-5p* y *miR-17-3p*, *miR-18a*, *miR-19a-3p*, *miR-19b-3p*, *miR-20* y *miR-92-1*) que participan activamente en procesos de apoptosis y proliferación celular, por lo que también están asociados a tumorigénesis (55). Estudios *in vitro* revelaron cómo estos *miARNs* participan en la regulación de la adipogénesis alcanzando una mayor expresión en la expansión clonal de los preadipocitos (57). Bases de datos para *miARNs* enlistan las dianas para cada miembro de esta familia, relacionándose a *RORα* como posible diana para la familia *miR-19* (tanto para *miR-19a-3p* como para *miR-19b-3p*) (58). De este grupo también se asocia a *miR-19a-3p* con la sensibilidad a la insulina a través de AKT (59). Mientras que se relaciona a *miR-19b-3p* con la inhibición de la síntesis de insulina (60) y con el *browning* de los adipocitos blancos (61). Esto implica que las acciones que ejercen éstos *miARNs* podría ser una posible vía terapéutica para la obesidad y sus comorbilidades asociadas.

Efecto		<i>miARN</i>
Adipogénesis	Proadipogénicos	<i>miR-15a/b</i> , <i>miR-103</i> , <i>miR-122</i> , <i>miR-200a/c</i> , <i>miR-143</i>
	Antiadipogénicos	<i>miR-27a/b</i> , <i>miR-26a</i> , <i>miR-155</i>
<i>Browning</i>		<i>miR-19b</i> , <i>miR-26</i> , <i>miR-30</i> , <i>miR-32</i> <i>miR-133</i> , <i>miR-155</i>
Lipogénesis		<i>miR-143-3p</i> , <i>miR-652-3p</i> , <i>miR-192</i>
Lipólisis		<i>miR-33b</i>
Captación de glucosa		<i>miR-148a</i> , <i>miR-93</i> , <i>miR-223</i>
Inflamación		<i>miR-222</i> , <i>miR-221</i> , <i>miR-132</i>
Síntesis de adiponectina		<i>miR-193b</i>

Tabla 4. *miARNs* implicados en la fisiología de los adipocitos (51, 52, 55).

2. OBJETIVOS

Ante la evidente importancia que poseen los *miARNs* en la regulación de la función metabólica y diferenciación de las células adiposas y su papel en el desarrollo de la obesidad, el objetivo general de esta investigación es:

Determinar el papel de *miR-19a-3p* y *miR-19b-3p* en la adipogénesis.

Para llevar a cabo este objetivo general nos planteamos una serie de objetivos específicos:

1. Estudiar el efecto de la sobreexpresión de *miR-19a-3p* sobre la adipogénesis en la línea celular de preadipocitos 3T3-L1.
2. Estudiar el efecto de la sobreexpresión de *miR-19b-3p* sobre la adipogénesis en la línea celular de preadipocitos 3T3-L1.
3. Conocer si los efectos de la sobreexpresión simultánea de *miR-19a-3p* y *miR-19b-3p* en la línea celular de preadipocitos 3T3-L1, sobre la adipogénesis son acumulativos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño experimental

1. Sobreexpresión de *miR-19a-3p*

Para llevar a cabo el primer objetivo las células fueron cultivadas y tras alcanzar una confluencia del 100%, se transfectaron con sobreexpresante comercial de *miR-19a-3p* (a partir de ahora lo llamaremos *miR-19a*) a una concentración de 17 nM. Tras la transfección se indujo la adipogénesis aplicando un protocolo que describiremos más adelante. La progresión de la adipogénesis fue monitoreada por la observación de los cambios morfológicos y por la visualización de la acumulación de lípidos por medio de tinción *Oil Red*. Las células fueron levantadas a los 2, 4 y 6 días después de la inducción de la adipogénesis y se extrajo ARN. Posteriormente se retrotranscribió *ARNm* y su producto fue utilizado para cuantificar, por medio de la técnica de reacción en cadena de polimerasa cuantitativa en tiempo real (*qRT-PCR*), los niveles de expresión de genes relacionados con la progresión de la adipogénesis (*PPAR γ* , *C/EBP α* , *AdipoQ* y *FAS*) así como los niveles de expresión génica de *ROR α* , una posible diana de la familia *miR-19* y que como se ha mencionado, relacionado con la adipogénesis. De forma similar también se estudiaron los niveles de expresión de *miR-19a* por *qRT-PCR* usando sondas comerciales.

2. Sobreexpresión de *miR-19b-3p*

Para llevar a cabo el segundo objetivo, células 3T3-L1 se transfectaron con un sobreexpresante comercial para *miR-19b-3p* (a partir de ahora *miR-19b*) a una concentración de 17 nM. Siguiendo el mismo procedimiento que para el primer objetivo. Las células se recogieron a iguales tiempos e igualmente se analizó la progresión de la adipogénesis por medio de las características morfológicas celulares, tinción *Oil Red* y a través de los niveles de expresión de los genes mencionados anteriormente.

3. Sobreexpresión simultánea de *miR-19a* y *miR-19b*

En el tercer ensayo experimental se transfectaron células 3T3-L1 con los sobreexpresantes *miR-19a* y *miR-19b* simultáneamente usando las mismas concentraciones que en los anteriores ensayos. El tiempo de recogida de las células, así como los parámetros estudiados fueron iguales a los ensayos 1 y 2. A continuación se desglosan los pasos realizados en cada una de las técnicas empleadas.

3.2. Técnicas

- **Cultivo celular de 3T3-L1**

Para llevar a cabo la investigación se utilizó la línea celular de preadipocitos 3T3-L1 como modelo *in vitro* de adipogénesis. Esta línea celular obtenida de tejido embrionario de ratones *Swiss* constituye actualmente el modelo más estudiado de adipogénesis, pues es capaz de diferenciarse en adipocitos morfológica, fisiológica y bioquímicamente semejantes a adipocitos de tejidos primarios bajo ciertos estímulos (14).

Las células 3T3-L1 se cultivaron en placas de 100mm con 8ml de medio de cultivo *Eagle* modificado por Dulbecco, DMEM (*Gibco*) suplementado con 10% *Calf Serum* (*HyClone*), 1% de penicilina/estreptomicina, *P/S* (*Gibco*) a 37°C y 5% de CO₂. Cuando se obtuvo el número adecuado de células, se recogieron con Tripsina-EDTA al 0.5% (10X) (*Gibco*) diluida al 2X con suero salino (*Fresenius kabi*), luego se centrifugaron a 193 xg (1.000 rpm) durante 5 minutos a temperatura ambiente, el pellet se resuspendió en 50 ml de medio y fueron sembradas nuevamente a una concentración de 80.000 células/pocillo en placas de 12 multipocillos (*Thermo Scientific*) con 1,5 ml de medio/pocillo.

- **Transfección**

Cuando las células alcanzaron el 100% de confluencia se procedió a retirar el DMEM, se lavaron con suero salino y fueron transfectadas con imitadores sintéticos comerciales de los *miARNs* correspondientes a cada ensayo o con un control negativo (TN) todos obtenidos a través de la casa comercial *Applied biosystems* empleando Endofectina (*GeneCopeia*) en medio Opti-MEM[®] (*Gibco*) como se describe a continuación.

Se prepara para cada tratamiento, TN y el sobreexpresante de *miARN* correspondiente, 2 tubos (A y B) con los siguientes componentes y concentraciones:

- Tubo A: 25µl de Opti-MEM[®] + 1,5 µl de endofectina, tras un *vortex* se incuba durante 5 min.
- Tubo B: 25,565µl de Opti-MEM[®] + 0,935 µl de *miARN* o TN según corresponda; tras un *vortex* se incuba durante 5 min.
- Se mezclan los tubos A y B; se incuban por otros 5 min sin *vortex*.

En cada pocillo por cada 540 µl de medio se emplearon 50 µl de la mezcla correspondiente a cada tratamiento, con el cual permanecieron 24 h.

- **Inducción de adipogénesis**

Para estimular la adipogénesis se siguieron los pasos descritos a continuación como se muestra en la Figura 5.

1. Tras 24 h con el cóctel de transfección se retira el medio, se lavan las células con salino y se mantienen otras 24h antes de empezar la diferenciación para permitir la “recuperación” de las células. Para ello se emplea el mismo medio en el que se expandieron los preadipocitos (DMEM, *Calf Serum* al 10% y *P/S* al 1%).
2. Pasadas 24h con el medio de recuperación, el medio de preadipocitos fue reemplazado por medio de diferenciación compuesto por DMEM/F12 (*Gibco*) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (10%), 0,25 μ M dexametasona (*Sigma*), 1 μ g/ml insulina (*Novo Nordisk*), 0,5 mM 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) y *P/S* al 1%. Este momento se considera el día 0 de diferenciación (D0).
3. Tras 48h (D2) el medio de diferenciación fue sustituido por medio de mantenimiento I (DMEM/F12 sin IBMX ni dexametasona), el cual se renovaba cada 24h tomando 1,2 ml de cada pocillo y añadiendo 1,5 ml.
4. A partir del día 4 (D4), se empleó medio de mantenimiento II (DMEM/F12 sin insulina) renovándose cada 24h de forma similar al anterior hasta el día 6 de la diferenciación.

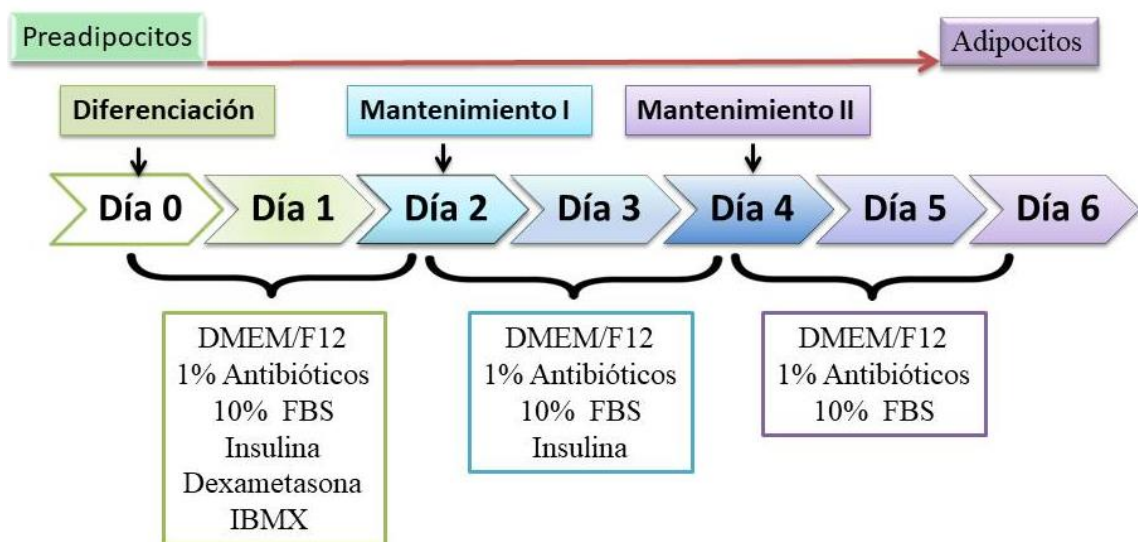


Figura 5. Línea de tiempo y protocolo seguido para diferenciar los preadipocitos de la línea celular hasta adipocitos maduros.

- **Tinción Oil Red**

El *Oil Red* es un colorante hidrófobo soluble en grasas neutras y ésteres de colesterol que se asocia con facilidad a los lípidos almacenados pero no en los lípidos de las membranas celulares, por lo que es un método preciso para detectar y cuantificar los triglicéridos

almacenados (62). Para teñir las células les fue retirado el medio y se lavaron 2 veces con tampón fosfato (PBS; pH 7,4) A continuación las células se fijaron con formalina al 10% durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras otros 2 lavados con PBS fueron lavadas durante 1 min con isopropanol (*Sigma*) al 60%, tras su retirada se añadió a las células 400 µl de *Oil Red* a una concentración de 3mg/ml durante 30 min a temperatura ambiente. Tras retirar el *Oil Red*, las células se lavaron con agua para posteriormente tomar fotografías usando un microscopio (*Nikon Eclipse TS 100*) con cámara microscópica digital *XM Full HD Camera (XM Family) Samsung BWC-1602*. El tinte fue eludido con 300 µl de isopropanol (*PanReac*) al 100% para leer su absorbancia a 450nm con un lector de microplacas *TECAN* usando como blanco isopropanol al 100%.

- **Extracción de ARN total**

Las células fueron recogidas con 800 µl de TRIzol™ (*Invitrogen*) los días 2, 4 y 6 de diferenciación para la posterior extracción de ARN siguiendo las especificaciones del fabricante. La concentración de ARN, así como la contaminación por proteínas y fenoles se determinaron mediante ratios 260/280 nm y 260/230 nm en un espectrofotómetro *NanoDrop ND 100 (Thermo Scientific)* mientras que la integridad del ARN se determinó por gel de agarosa (*Sigma*) al 1,5%.

- **Retrotranscripción**

Para analizar la expresión del *ARNm* lo primero fue transformar este ARN en ADN complementario (ADNc) mediante el proceso de retrotranscripción (RT). Para ello se preparó una mezcla con los componentes que muestra la Tabla 5. Se tomó 20 µl de la mezcla que aparece en la Tabla 5 para cada muestra y se añadieron 10 µl de ARN a una concentración de 100 ng/µl. La RT fue realizada en un termociclador *GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)* siguiendo el programa descrito en la Tabla 6. El ADNc se diluyó en 70 µl de agua estéril (*Sigma*).

Componentes de la mezcla	Volumen/pocillo (µl)
<i>Buffer 5x First Strand (Invitrogen)</i>	6
dNTPs (<i>Invitrogen</i>)	6
MgCl (<i>Ambion</i>)	1,5
<i>Random primers (Invitrogen)</i>	0,17
<i>RNaseOUT™ (Invitrogen)</i>	0,25
RM·MLV (<i>Invitrogen</i>)	1,5
H ₂ O estéril (<i>Sigma</i>)	4,58

Tabla 5. Componentes de la mezcla de retrotranscripción de ARNm.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Retrotranscripción	37	95
	42	15
Desnaturalización	95	5
Enfriamiento	4	∞

Tabla 6. Programa de retrotranscripción de *ARNm*.

Para analizar los niveles de expresión de los *miARNs* se utilizó una técnica muy similar a la anterior, con la particularidad de que en este caso para llevar a cabo la RT se usaron cebadores comerciales específicos para cada *miARN* a estudiar. Además para cada RT se emplearon 5 µl de ARN a una concentración de 10 ng, y 10 µl de la mezcla señalada en la Tabla 7. La RT fue realizada según el programa descrito en la Tabla 8 en el termociclador mencionado anteriormente. El producto de la RT fue diluido en 150 µl de agua estéril.

Componentes de la mezcla	Volumen/pocillo (µl)
Tampón de Transcripción inversa (<i>Applied biosystems</i>)	1,5
dNTPs (<i>Applied biosystems</i>)	0,15
Cebadores (<i>Applied biosystems</i>)	2
<i>RNaseOUT</i> TM (<i>Applied biosystems</i>)	0,19
RTasa (<i>Applied biosystems</i>)	1
H ₂ O estéril (<i>Sigma</i>)	5,16

Tabla 7. Componentes de la mezcla de retrotranscripción de *miARN*.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Retrotranscripción	10	45
	42	45
Desnaturalización	85	5
Enfriamiento	4	∞

Tabla 8. Programa de retrotranscripción de *miARN*.

- **Reacción en Cadena de Polimerasa**

Para analizar la expresión de los genes objeto de estudio se usó la técnica *qRT-PCR*. Para ello se preparó una mezcla con cebadores diseñados por el grupo tal como se detalla en la Tabla 9. Se tomaron 15 µl de dicha mezcla y 2 µl de ADNc para cada muestra a analizar y se colocaron en una placa de 96 pocillos (*Roche*). Para analizar los niveles de expresión de *miRNAs* objeto de estudio, se emplearon sondas *TaqMan* comerciales más los componentes descritos en la tabla 10, tomándose 2µl ADNc y 10 µl de la mezcla para cada muestra. Las *PCRs* se realizaron en un termociclador *LightCycler*[®] 480 II (*Roche*) como describe la tabla 11.

Componentes de la mezcla	Volumen/pocillo (µl)
<i>PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems)</i>	8,5
Cebador Sentido (<i>Invitrogen</i>)	0,068
Cebador Antisentido (<i>Invitrogen</i>)	0,068
H ₂ O estéril (<i>Sigma</i>)	6,4

Tabla 9. Mezcla de *qRT-PCR* para análisis de *ARNm*.

Componentes de la mezcla	Volumen/pocillo (µl)
<i>TaqMan Universal Master Mix (Applied biosystems)</i>	8,75
Cebadores (<i>Applied biosystems</i>)	0,875
H ₂ O estéril (<i>Sigma</i>)	5,375

Tabla 10. Mezcla de *qRT-PCR* para análisis de *miARNs*.

Etapas	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
Incubación	1	95	10 min
Amplificación	40	95	10 min
		60	45s
		72	4s
Enfriamiento		40	10s

Tabla 11. Etapas de la *qRT-PCR* para *ARNm*.

Etapas	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
Incubación	1	50	2 min
Activación	1	95	10 min
Amplificación	40	95	15s
		60	1min
Enfriamiento		40	10s

Tabla 12. Etapas de la *qRT-PCR* para *miARN*.

3.3. Análisis Estadístico

Se calcularon las medias y el error estándar (ES) de cada grupo. Se consideraron significativas las diferencias con un p-valor < 0,05, determinadas por el test de *Bonferroni* y con análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías. Las gráficas y los análisis estadísticos se realizaron con el programa *SigmaPlot V.11.0*.

4. RESULTADOS

4.1. Efectos de la sobreexpresión de *miR-19a* en la adipogénesis.

Para explorar los efectos de *miR-19a* en la adipogénesis se transfectaron células 3T3-L1 con un sobreexpresante comercial para este *miARN* tal como se describió en el apartado anterior. Luego de transfectar las células se procedió a estimularlas con un cóctel proadipogénico para inducir la transformación a adipocitos maduros tal y como se explicó más arriba. Las células se observaron a los 2, 4 y 6 días tras la inducción de la diferenciación. Lo primero que llevamos a cabo fue analizar sus cambios morfológicos.

Teniendo en cuenta que el tipo de sobreexpresión usada en este estudio es transitoria, lo primero que hicimos fue comprobar que la transfección había tenido éxito y que además los valores de *miR-19a* se mantienen más elevados en las células tratadas que en el control durante todo el tiempo que duró el experimento (seis días). Para realizar esta comprobación se analizó por *qRT-PCR* el nivel de expresión *miR-19a*. En la Figura 6 se puede ver que la transfección funcionó perfectamente llegando a aumentar los valores de *miR-19a* hasta en 60 veces. Algo que también se observa en la Figura 6, es que la diferenciación disminuye los niveles de expresión de *miR-19a* en las células control, si bien las diferencias no son estadísticamente significativas, aunque hay que tener en cuenta que el N no es excesivamente elevado y habría que hacer más réplicas para confirmar si existe un descenso real en la expresión de este *miARN* con la diferenciación adipogénica.

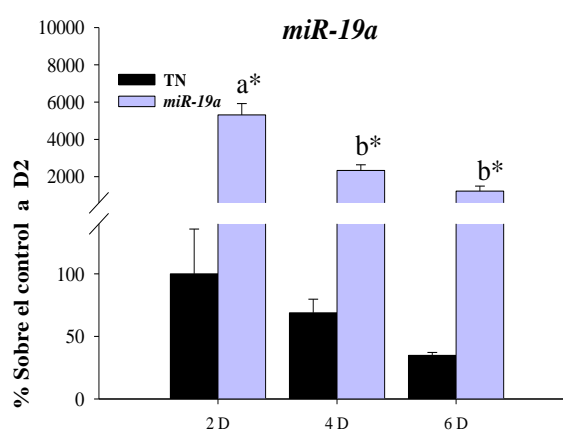


Figura 6. Niveles de expresión de *miR-19a* en preadipocitos 3T3-L1 tratados con un control negativo (TN) o con un sobreexpresante para *miR-19a*. Los análisis se llevaron a cabo 2, 4 y 6 días (2D, 4D, 6D) después de que las células fueron estimuladas para diferenciarse a adipocitos maduros. Datos normalizados por la expresión del gen *U6*. Los valores se expresan en unidades arbitrarias como la media \pm el error estándar, donde a las células 3T3-L1 transfectadas negativo a día 2 se les asignó el valor 100%. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los distintos tiempos de diferenciación dentro de cada tratamiento y * indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) por la transfección respecto al control (TN), (ANOVA de 2 vías, test *post hoc* Bonferroni). N= 4 para todos los grupos.

Tal y como puede verse en la Figura 7A a día 2 las células de ambos tratamientos comenzaron a cambiar su morfología de fibroblastos, tornándose ligeramente más redondeadas, si bien a este tiempo aún no es perceptible una cantidad importante de lípidos (Fig. 7A, 7B). A día 4 se puede observar que las células con el sobreexpresante para *miR-19a* poseen vacuolas de lípidos más grandes, aunque no parece haber diferencias en la cantidad de células diferenciadas entre ambos tratamientos (Fig. 7C, 7D). Sin embargo a día 6 las diferencias son opuestas, puesto que se aprecia como las gotas de lípidos son más pequeñas en las células sobreexpresadas con *miR-19a* comparadas con las células control (Fig. 7E, 7F).

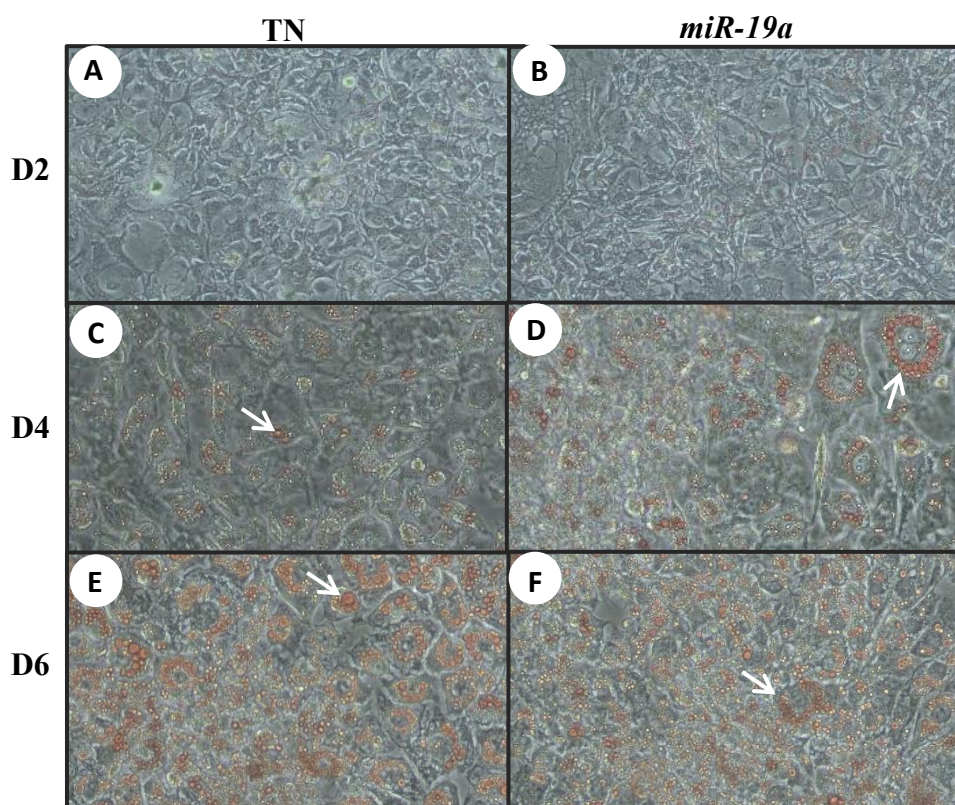


Figura 7. Fotografías de células 3T3-L1 tratadas con un sobreexpresante comercial para *miR-19a* (B, D, F) o con un control negativo (A, C, E). Las células se tiñeron con *Oil Red*, para visualizar los lípidos intracelulares (flechas); las fotografías se tomaron respectivamente a los 2, 4 y 6 días después de la inducción de la diferenciación, con un microscopio *Nikon Eclipse TS 100* con cámara microscópica digital *XM Full HD Camera (XM Family) Samsung BWC-1602* (20x).

Para establecer la relación entre la sobreexpresión de *miR-19a* y la adipogénesis se analizó la expresión de factores de transcripción que estimulan la adipogénesis como *PPAR γ* y *C/EBP α* por *qRT-PCR*, así como de marcadores típicos de adipocitos maduros como *FAS*, gen implicado en la síntesis *de novo* de los lípidos, y *AdipoQ* relacionado con el metabolismo de la glucosa y la síntesis de adiponectina. También incluimos el gen *ROR α* , debido a que varios algoritmos bioinformáticos predicen que podría ser una diana de la familia *miR19*.

Tal y como se esperaba, la inducción de la adipogénesis provocó un aumento muy importante en los niveles de expresión de *PPAR γ* y *C/EBP α* , tanto en las transfectadas negativo como en las sobreexpresadas para *miR-19a*, datos que coinciden con los marcadores analizados *FAS* y *AdipoQ* (Fig.8 A-D). A pesar de que los niveles de expresión de *PPAR γ* y *C/EBP α* no presentan variaciones significativas por la transfección (Fig.8A, 8B), podemos ver que la sobreexpresión de *miR-19a* provocó un descenso en la adipogénesis a períodos tardíos, tal y como se puede observar en los niveles de *AdipoQ* y *FAS* (Fig. 8C, 8D). Por otra parte, en *ROR α* se observa como sus niveles de expresión aumentan a medida que transcurre la diferenciación de preadipocito a adipocito maduro, aunque sin variaciones de expresión estadísticamente significativas por la transfección (Fig.8E).

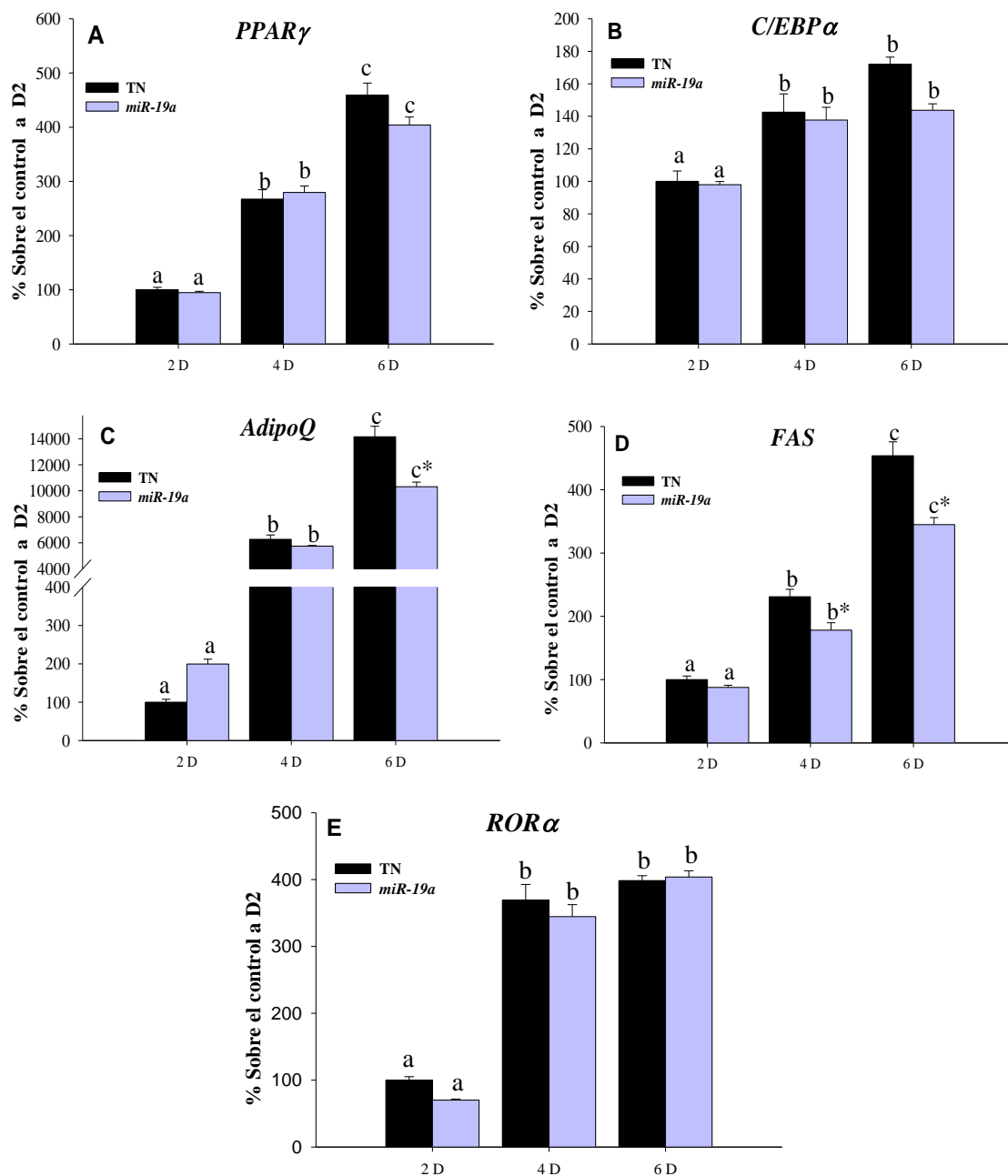


Figura 8. Niveles de expresión de *PPAR γ* (A), *C/EBP α* (B), *AdipoQ* (C), *FAS* (D), *ROR α* (E) en preadipocitos 3T3-L1 tratados con un control negativo (TN) o con un sobreexpresante para *miR-19a*. Los análisis se llevaron a cabo 2, 4 y 6 días (2D, 4D, 6D) después de que las células fueron estimuladas para diferenciarse a adipocitos maduros. Datos normalizados por la expresión del gen *SII*. Los valores se expresan en unidades arbitrarias como la media \pm el error estándar, donde a las células 3T3-L1 transfectadas negativo a día 2 se les asignó el valor 100%. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los distintos tiempos de diferenciación dentro de cada tratamiento y * indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) por la transfección respecto al control (TN), (ANOVA de 2 vías, test *post hoc Bonferroni*). N= 4 para todos los grupos.

4.2. Efectos de la sobreexpresión de *miR-19b* en la adipogénesis.

Debido a que los miembros de una misma familia de *miARNs* comparten muchas características y pueden tener funciones similares, decidimos analizar si los efectos de *miR-19b* eran similares a los del anterior ensayo, aplicando las mismas técnicas.

Al igual que en el primer ensayo, la eficiencia de la transfección con el sobreexpresante de *miR-19b* fue verificada por medio de *qRT-PCR*. En la figura 9 se comprueba que la transfección fue efectiva pues los niveles de expresión de *miR-19b* son estadísticamente más altos que en los controles, durante todo el tiempo de estudio. En este caso no se observa ningún cambio en los niveles de expresión de este *miARN* por la diferenciación.

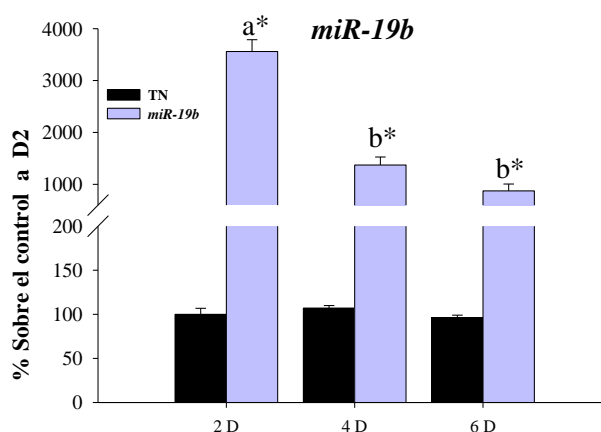


Figura 9. Niveles de expresión de *miR-19b* en preadipocitos 3T3-L1 tratados con un control negativo (TN) o con un sobreexpresante para *miR-19b*. Los análisis se llevaron a cabo 2, 4 y 6 días (2D, 4D, 6D) después de que las células fueron estimuladas para diferenciarse a adipocitos maduros. Datos normalizados por la expresión del gen *U6*. Los valores se expresan en unidades arbitrarias como la media \pm el error estándar, donde a las células 3T3-L1 transfectadas negativo a día 2 se les asignó el valor 100%. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los distintos tiempos de diferenciación dentro de cada tratamiento y * indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) por la transfección respecto al control (TN), (ANOVA de 2 vías, test *post hoc* Bonferroni). N= 4 para todos los grupos.

En la evaluación microscópica, a día 2 es notable cómo las células del control ya habían iniciado a cambiar su morfología, perdiendo el aspecto fibroblástico tan característico de los preadipocitos, mientras las tratadas con *miR-19b* aún presentaban muchas características de esta morfología (Fig.10A, 10B). Los cambios se van acentuando a medida que van transcurriendo los días desde la inducción de la diferenciación. A día 6, los cambios son mucho más marcados, tal como se puede apreciar en las Figuras 10E-10F, donde podemos observar un menor porcentaje de células diferenciadas en aquellas tratadas con el sobreexpresante *miR-19b*, que presentaron una adipogénesis más lenta con menos lípidos que los controles.

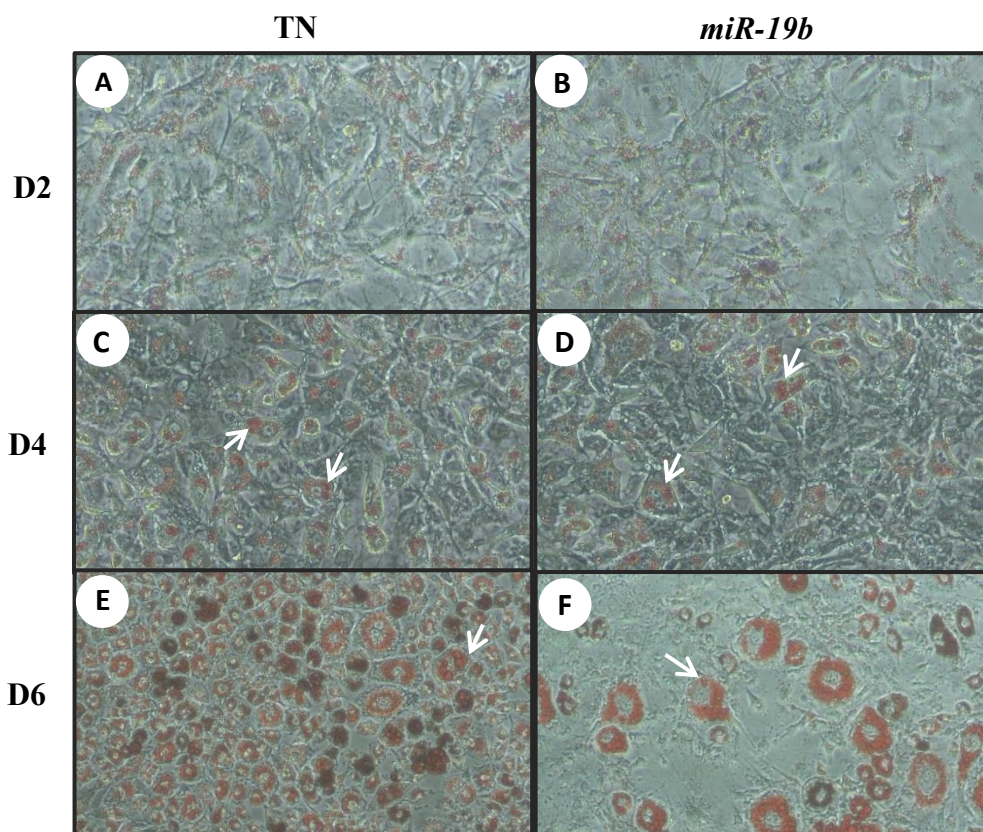


Figura 10. Fotografías de células 3T3-L1 tratadas con un sobreexpresante comercial para *miR-19b* (B, D, F) o con un control negativo (A, C, E). Las células se tiñeron con *Oil Red*, para visualizar los lípidos intracelulares (flechas); las fotografías se tomaron respectivamente a los 2, 4 y 6 días después de la inducción de la diferenciación, con un microscopio *Nikon Eclipse TS 100* con cámara microscópica digital *XM Full HD Camera (XM Family) Samsung BWC-1602* (20x).

Los resultados de las *qRT-PCRs* coinciden con los observados en las fotografías de microscopía, demostrando que el tratamiento con el sobreexpresante de *miR-19b*, en contraste con el control, provocó un descenso significativo en los factores de transcripción *PPAR γ* y *C/EBP α* (Fig. 11A,11B), así como del marcador de adipocitos maduros *AdipQ* (Fig. 11C). En contraste con estos resultados la expresión génica de *FAS* no presenta ninguna variación estadísticamente significativa por el tratamiento con el sobreexpresante (Fig.11D). Sin embargo, la expresión de *ROR α* sí experimenta cambios estadísticamente significativos, pues sus niveles no solo aumentan de forma proporcional a la diferenciación en ambos tratamientos, sino que también se observa como estos descienden significativamente por efecto de la sobreexpresión de *miR-19b* a partir del cuarto día tras la inducción de la diferenciación, tal como muestra la Figura 11E.

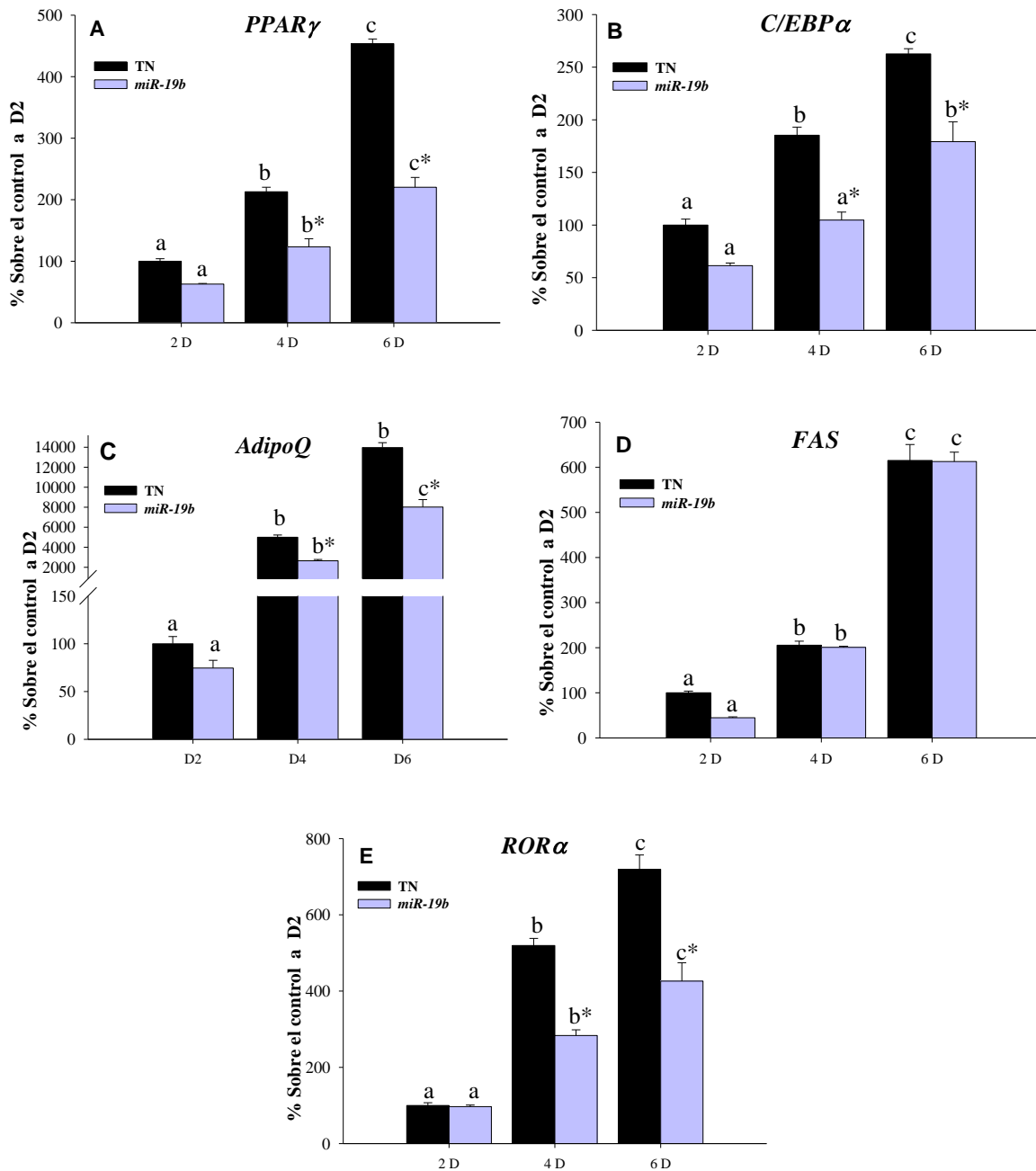


Figura 11. Niveles de expresión de *PPAR γ* (A), *C/EBP α* (B), *AdipoQ* (C), *FAS* (D), *ROR α* (E) en preadipocitos 3T3-L1 tratados con un control negativo (TN) o con un sobreexpresante para *miR-19b*. Los análisis se llevaron a cabo 2, 4 y 6 días (2D, 4D, 6D) después de que las células fueron estimuladas para diferenciarse a adipocitos maduros. Datos normalizados por la expresión del gen *S11*. Los valores se expresan en unidades arbitrarias como la media \pm el error estándar, donde a las células 3T3-L1 transfectadas negativo a día 2 se les asignó el valor 100%. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los distintos tiempos de diferenciación dentro de cada tratamiento y * indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) por la transfección respecto al control (TN), (ANOVA de 2 vías, test *post hoc* Bonferroni). N= 4 para todos los grupos.

4.3. Efecto de la sobreexpresión conjunta de *miR-19a* y *miR-19b* en la adipogénesis.

En vista de los resultados anteriores, se planteó la posibilidad de que los efectos de ambos *miARNs* pudieran ser sinérgicos debido a su relación génica familiar. Por tanto se realizó otro ensayo experimental donde se transfectaron conjuntamente ambos *mirARNs*. Efectivamente a nivel morfológico, tras 4 días de diferenciación, las diferencias ya son muy marcadas entre los controles y las células tratadas con los sobreexpresantes, confirmando que los efectos son aún más potentes que en los anteriores experimentos (Fig.12 C-F).

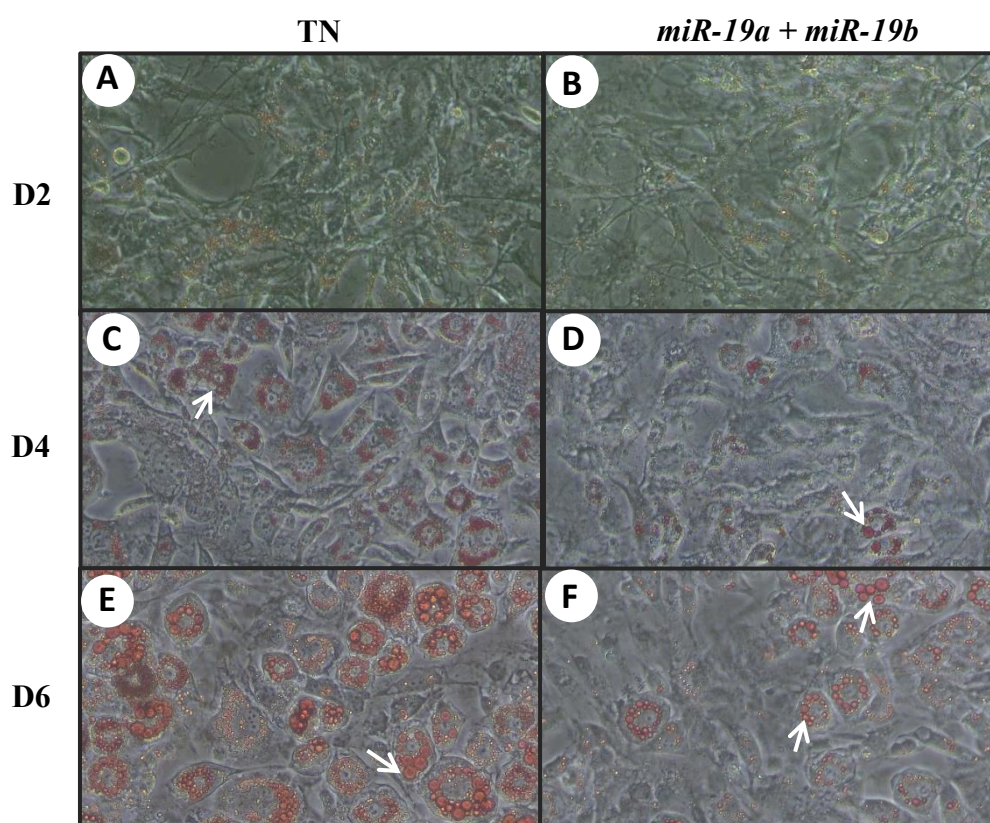


Figura 12. Fotografías de células 3T3-L1 tratadas con sobreexpresantes comerciales para *miR-19a* y *miR-19b* (B, D, F) o con un control negativo (A, C, E). Las células se tiñeron con *Oil Red*, para visualizar los lípidos intracelulares (flechas); las fotografías se tomaron respectivamente a los 2, 4 y 6 días después de la inducción de la diferenciación, con un microscopio *Nikon Eclipse TS 100* con cámara microscópica digital *XM Full HD Camera (XM Family) Samsung BWC-1602* (20x).

Transcurridos 4 días de diferenciación, destaca el efecto de la sobreexpresión de *miR-19a+miR-19b* sobre la expresión génica de la mayoría de los genes estudiados. *C/EBP α* , *AdipoQ*, *FAS* y *ROR α* , presentaron un descenso significativo en relación a los controles (Fig. 13 A-E), descenso superior al observado cuando se sobreexpresó por separado cada *miARN*. Los resultados para *miR-19a+miR-19b* en comparación a los de *miR-19b* son similares en cuanto a *PPAR γ* , pero con un efecto muy superior a los de *miR-19a*. Sin embargo en los

marcadores *AdipoQ*, *FAS* y el factor *C/EBPα* se observa a los días 4 y 6 un efecto sumatorio en *miR-19a+miR-19b*.

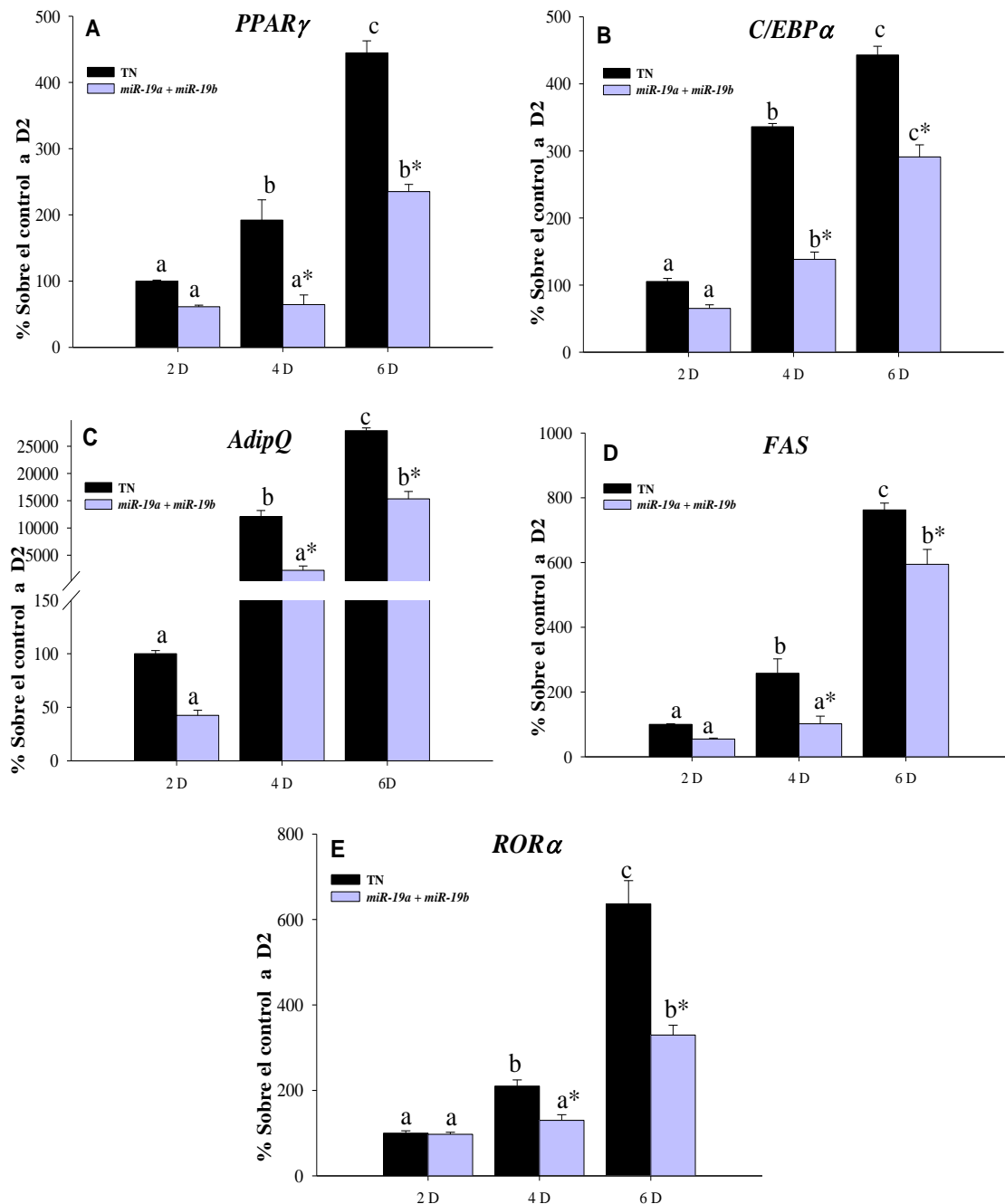


Figura 13. Niveles de expresión de *PPARγ* (A), *C/EBPα* (B), *AdipoQ* (C), *FAS* (D), *RORα* (E) en preadipocitos 3T3-L1 tratados con un control negativo (TN) o con sobreexpresantes para *miR-19a* y *miR-19b*. Los análisis se llevaron a cabo 2, 4 y 6 días (2D, 4D, 6D) después de que las células fueron estimuladas para diferenciarse a adipocitos maduros. Datos normalizados por la expresión del gen *S11*. Los valores se expresan en unidades arbitrarias como la media \pm el error estándar, donde a las células 3T3-L1 transfectadas negativo a día 2 se les asignó el valor 100%. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los distintos tiempos de diferenciación dentro de cada tratamiento y * indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) por la transfección respecto al control (TN), (ANOVA de 2 vías, test *post hoc* Bonferroni). N= 4 para todos los grupos. El experimento se repitió 2 veces para los grupos 2D y 4D; N= 4 para todos los grupos en cada experimento.

5. DISCUSIÓN

La obesidad es una enfermedad compleja y multifactorial que constituye un problema importante de salud pública a nivel mundial (1-3). Debido a esto, es de vital importancia conocer los factores que están implicados en su desarrollo. Para lograrlo, es imprescindible estudiar las características biológicas del tejido adiposo, especialmente aquellas relacionadas con su diferenciación celular y el paso de preadipocito a adipocito maduro (adipogénesis), pues de este modo se podrían determinar los procesos que promueven la obesidad, y por lo tanto se podría comenzar a trabajar en mecanismos para contrarrestarla.

Para el estudio de la diferenciación se suelen utilizar modelos *in vitro* con diferentes líneas celulares, como la línea 3T3-L1, utilizada en este estudio. Esta es una línea celular bien establecida, que ha permitido importantes avances en el conocimiento de los mecanismos de regulación de diferentes genes implicados en la adipogénesis, como el realizado por Chawla y cols., donde fue descubierto *PPAR γ* , como el principal regulador de la adipogénesis (63). El uso de estas células supone ventajas económicas y fisiológicas, a destacar: se obtiene una respuesta homogénea a los tratamientos experimentales (64) y son células similares tanto en función como en morfología a los adipocitos obtenidos *in situ* (14), razones por las que no se requiere un alto número de réplicas en los experimentos, de ahí su frecuente uso en investigaciones como la presentada en este trabajo.

En el estudio de la adipogénesis, al igual que en muchos procesos metabólicos, intervienen tanto factores genéticos como epigenéticos. Entre los moduladores epigenéticos destacan los *miARNs*, que se han relacionado con un amplio grupo de procesos biológicos. Su importancia radica en el hecho de que pueden inducir cambios en la expresión génica/proteica que podrían explicar los diferentes fenotipos y la gran variedad de patrones de expresión que tienen diferentes tipos celulares en determinados procesos patológicos (5, 6).

Nuestra investigación se ha centrado en determinar el papel de los *miARNs* *miR-19a* y *miR-19b* (miembros de la familia *miR-19*) en la adipogénesis, el cual sigue siendo desconocido. Estudios previos han relacionado estos *miARNs* con procesos tumorales o inflamatorios (55). *miR-19a* también se ha relacionado con la proliferación celular y la sensibilidad a la insulina a través de AKT (59), cuyo descenso contribuye a la diabetes y a la resistencia a la insulina (65). Por su parte *miR-19b* fue estudiado por Puthanveetil y cols., como inhibidor de la síntesis de insulina (60), mientras Yi-fan y cols. determinaron que su sobreexpresión inhibía el fenómeno de *browning* del TAM (61). Además, los estudios de

Hsieh y cols. en ratones C57BL/6 obesos demostraron que los niveles de expresión de *miR-19b* en plasma disminuían tras una dieta alta en grasa (66). Con los resultados de estos investigadores es posible establecer una relación entre la familia *miR-19* y diferentes rutas metabólicas importantes, como es la vía insulina-AKT, por tanto la desregulación de estos *miARNs* en el tejido adiposo podría contribuir a la patogénesis de la resistencia a la insulina presente en la obesidad.

Este estudio sugiere que la familia *miR-19*, en general, posee un efecto antiadipogénico, puesto que tras su sobreexpresión, tal como puede verse en la tinción *Oil red*, se observó una menor acumulación de lípidos y un menor porcentaje de células diferenciadas. Efecto que también es visible a nivel molecular como puede comprobarse por el descenso en la expresión de *ARNm* de los factores de transcripción *PPAR γ* y *C/EBP α* , así como de los genes marcadores de adipogénesis *AdipoQ* y *FAS*. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Wang y cols., quienes tras sobreexpresar el *clúster 17-92*, al cual pertenece la familia *miR-19*, sugirieron una función proadipogénica debido al aumento en el nivel de expresión de *PPAR γ* , atribuyendo sus efectos a la regulación negativa del gen *Rb* (Proteína del Retinoblastoma), un gen supresor tumoral importante en la regulación del ciclo celular (57). Sin embargo, a diferencia de este trabajo, su estudio abarcó etapas muy tempranas de la diferenciación (de solo horas incluso), que están caracterizadas por una síntesis proteica muy activa que podrían explicar el aumento en los genes analizados. En nuestro estudio, en las células sobreexpresadas con *miR-19a* y 48 h después del cóctel de diferenciación, también observamos un ligero aumento en la tinción *Oil Red*, pero este aumento no fue confirmado a nivel molecular y los resultados de la tinción deben ser confirmados repitiendo experimentos e incrementando el número de réplicas. En el experimento llevado a cabo por Wang y cols., también hay que destacar que algunas de las discrepancias pueden deberse al hecho de que realizaron un análisis grupal atribuyendo un mismo efecto a todos los *miARNs* del *clúster*, pero es necesario recordar que los miembros de un *clúster*, a pesar de compartir características, no tienen por qué tener funciones idénticas debido a que pueden poseer diferentes *ARNm* dianas que les confieran diferentes funciones (54). Además, este *clúster* está formado por *miARNs* de familias diferentes, que pueden tener funciones distintas a la familia *miR-19*. Esto resalta la importancia de caracterizar individualmente cada *miARN* de acuerdo a la diana sobre la que actúen o tomando en cuenta la homología de sus secuencias, como hemos realizado en nuestro estudio, pues *miR-19a* y

miR-19b comparten un mismo origen génico y homología de secuencia, ya que pertenecen a la misma familia (58).

En nuestras células control hemos observado que la expresión de *miR-19a* disminuye a medida que avanza la adipogénesis, lo que podría significar que su descenso es necesario para que se complete la maduración de los adipocitos, y que por lo tanto al sobreexpresar este *miARN* se provoca un retraso o represión en la diferenciación, tal y como muestran los resultados con el descenso de *FAS* y *AdipoQ* en etapas tardías de la adipogénesis, algo que también es perceptible en la tinción *Oil Red*, ya que las células poseen lípidos más pequeños.

Por otra parte, a pesar de que los niveles de expresión *miR-19b* en los controles no disminuyen con la adipogénesis, los análisis por *qRT-PCR* señalan una disminución importante en la expresión génica de *PPAR γ* , *C/EBP α* y *AdipoQ*, cuando *miR-19b* está sobreexpresado. Resultados que concuerdan con la tinción *Oil Red*, ya que muestran células mucho menos diferenciadas y con menor cantidad de lípidos. Teniendo en cuenta estos resultados, podemos decir que *miR-19b* es un regulador negativo de la adipogénesis más potente que *miR-19a*. También demostramos que la sobreexpresión simultánea de *miR-19a* y *miR-19b*, produce un efecto muy similar a la sobreexpresión de *miR-19b*, pero más potente, específicamente en la expresión el factor de transcripción *C/EBP α* así como de los genes marcadores de adipogénesis, *FAS* y *AdipoQ*. Demostrando que los miembros de la familia *miR-19* pueden actuar sinérgicamente para regular de forma negativa la adipogénesis.

Sin embargo, no sabemos si la disminución de los factores *PPAR γ* y *C/EBP α* son por unión directa de *miR-19a* y/o *miR-19b* a éstos factores, o de forma indirecta a través de otros genes tales como *ROR α* , un gen relacionado con el metabolismo de los lípidos y el desarrollo del cerebelo (67), y que según distintos algoritmos bioinformáticos *ROR α* es una posible diana tanto para *miR-19a* como *miR-19b* (58). Los resultados obtenidos en los niveles de expresión de *ARNm* de este gen, que disminuyen con la sobreexpresión de *mir-19* apoyaría esta hipótesis, si bien sería necesario analizar los niveles proteicos de *ROR α* , puesto que muchos de los efectos de los *miARNs* se producen a nivel postranscripcional. Hay muchos estudios relacionando *ROR α* con la adipogénesis, aunque los resultados son discrepantes. Por ejemplo, Duez y cols., usando ratones *sg*, que portan una mutación natural para *ROR α* y en un modelo *in vitro* de 3T3-L1 con sobreexpresión de este gen, concluyeron sus efectos como antiadipogénicos (42). Resultados similares fueron obtenidos por Kim y cols., quienes emplearon ratones *KO* para *ROR α* en hígado y también determinaron un efecto

antiadipogénico mediado por *PPAR* γ (43). Sin embargo, Lau y cols., obtuvieron resultados contrapuestos a los anteriores, reflejados por la resistencia a la obesidad inducida por la dieta en ratones *sg* y niveles reducidos de genes como *SREBP-1c* y *FAS* (40, 41).

Nuestro trabajo muestra una disminución de los niveles de *ARNm* de *ROR* α directamente proporcionales al descenso de la adipogénesis tras el uso de sobreexpresantes, pero no está claro si esto es causa o consecuencia del descenso de la adipogénesis, puesto que hemos visto (tanto en las células controles como en aquellas tratadas con los sobreexpresantes) que los niveles de *ROR* α aumentan a medida que va avanzando la adipogénesis en el tiempo. Sin embargo, resultados obtenidos por nuestro grupo empleando agonistas de *ROR* α demostraron un aumento en la adipogénesis en preadipocitos 3T3-L1 (datos no publicados), lo que apoyaría que el descenso de *ROR* α es el responsable, al menos parcialmente, del descenso en la diferenciación observado en los preadipocitos tratados con los sobreexpresantes de la familia *mir-19*.

Los resultados presentados en este estudio podrían explicarse por una posible interacción entre *ROR* α y *PPAR* γ -*C/EBP* α , bien sea de modo directo o indirecto. En la Figura 14 se puede ver el modelo que proponemos en base a nuestros resultados. *miR-19* se une a *ROR* α disminuyendo su expresión, lo que a su vez provoca un descenso en *PPAR* γ y *C/EBP* α (bien sea de modo directo o indirecto). Al inhibirse estos factores de transcripción también se inhibe la adipogénesis y por tanto los marcadores de la misma y la acumulación de lípidos. A mayores, también podría existir un circuito de retroalimentación entre los factores de transcripción proadipogénicos y *ROR* α , pero para demostrarlo es necesario realizar más experimentos, que debido al tiempo limitado para este trabajo no fue posible.

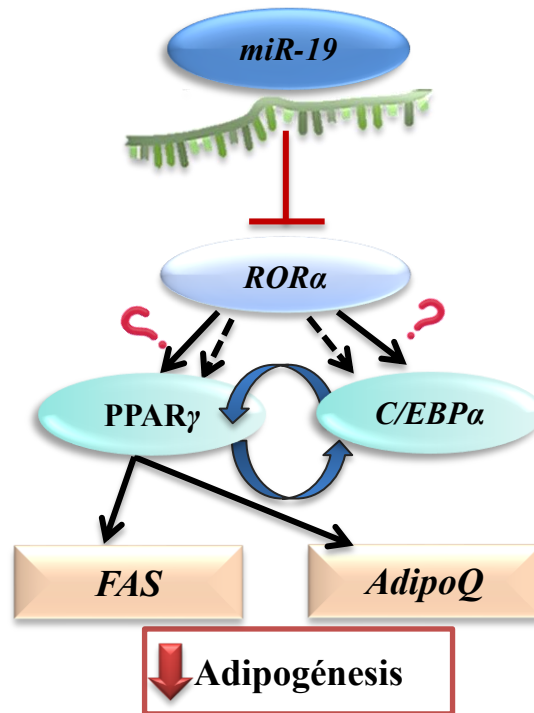


Figura 14. Posible mecanismo de acción de *RORα* y de la familia *miR-19* en la adipogénesis. Un aumento de *miR-19* provoca un descenso de *RORα*, que a su vez promueve la adipogénesis estimulando los factores *PPARγ* y *C/EBPα*, de forma directa (flechas sólidas) o indirecta (flechas punteadas). A mayores podría existir un circuito de retroalimentación entre los factores de transcripción que estimulan la adipogénesis y *RORα*.

En conclusión, este estudio demuestra por primera vez que altos niveles de expresión en la familia *miR-19*, especialmente *miR-19b*, comprometen el correcto desarrollo de adipocitos maduros a partir de preadipocitos, inhibición que parece estar mediada, bien sea de forma directa o indirecta vía *RORα*, por los factores de transcripción *PPARγ* y *C/EBPα*.

6. CONCLUSIONES

1. La sobreexpresión de *miR-19a* inhibe moderadamente la adipogénesis en células 3T3-L1 en etapas avanzadas de adipogénesis, como indican los niveles de expresión de marcadores adipogénicos.
2. *miR-19b* actúa regulando negativamente la adipogénesis en células 3T3-L1, de modo más efectivo que *miR-19a* y desde etapas más tempranas, disminuyendo, ya sea directa o indirectamente, los factores de transcripción *PPAR γ* y *C/EBP α* .
3. La sobreexpresión simultánea de *miR-19a* y *miR-19b* se asocia a una inhibición más fuerte de la adipogénesis en células 3T3-L1.

6.1.CONCLUSIONS

1. *miR-19a* overexpression moderately inhibits adipogenesis in 3T3-L1 cells in advanced stages of adipogenesis, as indicated by adipogenic markers expression levels.
2. *miR-19b* acts by negatively regulating adipogenesis in 3T3-L1 cells, more effectively than *miR-19a* and from earlier stages, decreasing either directly or indirectly, the transcription factors *PPAR γ* and *C/EBP α* .
3. The simultaneous overexpression of *miR-19a* and *miR-19b* is associated with a stronger inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pradhan RN, Zachara M, Deplancke B. A systems perspective on brown adipogenesis and metabolic activation. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2017;18 Suppl 1:65-81.
2. Pearen MA, Muscat GE. Orphan nuclear receptors and the regulation of nutrient metabolism: understanding obesity. *Physiology*. 2012;27(3):156-66.
3. (OMS) OMdIS. *Obesidad y Sobrepeso*. 2017 [cited 2018 1 de Mayo]. Página Web Oficial OMS]. Available from: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
4. He M, Shi B. Gut microbiota as a potential target of metabolic syndrome: the role of probiotics and prebiotics. *Cell & bioscience*. 2017;7:54.
5. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. 2004;429(6990):457-63.
6. Lomba A, Martinez JA, Garcia-Diaz DF, Paternain L, Marti A, Campion J, et al. Weight gain induced by an isocaloric pair-fed high fat diet: a nutriepigenetic study on FASN and NDUFB6 gene promoters. *Molecular genetics and metabolism*. 2010;101(2-3):273-8.
7. Bouchard L, Rabasa-Lhoret R, Faraj M, Lavoie ME, Mill J, Perusse L, et al. Differential epigenomic and transcriptomic responses in subcutaneous adipose tissue between low and high responders to caloric restriction. *The American journal of clinical nutrition*. 2010;91(2):309-20.
8. González-Muniesa P, Martínez-González M-A, Hu FB, Després J-P, Matsuzawa Y, Loos RJF, et al. *Obesity*. *Nature Reviews Disease Primers*. 2017;3:17034.
9. (OMS) OMdIS. Mapa Interactivo. Prevalencia de Obesidad en adultos mayores de 18 años. 2016 2017 [cited 2018]. Estimación estandarizada por edad de la prevalencia de la obesidad.]. Available from: http://gamapserv.who.int/gho/interactive_charts/ncd/risk_factors/obesity/atlas.html.
10. Esteve Ràfols M. Tejido adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional. *Endocrinología y Nutrición*. 2014;61(2):100-12.
11. Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, Kim JI, Kim JB. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Frontiers in endocrinology*. 2016;7:30.
12. Scheele C, Nielsen S. Metabolic regulation and the anti-obesity perspectives of human brown fat. *Redox biology*. 2017;12:770-5.
13. Lidell ME, Betz MJ, Dahlqvist Leinhard O, Heglind M, Elander L, Slawik M, et al. Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nature medicine*. 2013;19(5):631-4.
14. Sarjeant K, Stephens JM. Adipogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2012;4(9):a008417.
15. Shinoda K, Luijten IH, Hasegawa Y, Hong H, Sonne SB, Kim M, et al. Genetic and functional characterization of clonally derived adult human brown adipocytes. *Nature medicine*. 2015;21(4):389-94.
16. Bartelt A, Heeren J. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nature Reviews Endocrinology*. 2013;10:24.
17. Mathieu P, Poirier P, Pibarot P, Lemieux I, Despres JP. Visceral obesity: the link among inflammation, hypertension, and cardiovascular disease. *Hypertension*. 2009;53(4):577-84.
18. De Francesco F, Ricci G, D'Andrea F, Nicoletti GF, Ferraro GA. Human Adipose Stem Cells: From Bench to Bedside. *Tissue engineering Part B, Reviews*. 2015;21(6):572-84.
19. Moreno-Indias I, Tinahones FJ, #xe9. Impaired Adipose Tissue Expandability and Lipogenic Capacities as Ones of the Main Causes of Metabolic Disorders. *Journal of Diabetes Research*. 2015;2015:12.
20. Karpe F, Pinnick KE. Biology of upper-body and lower-body adipose tissue--link to whole-body phenotypes. *Nature reviews Endocrinology*. 2015;11(2):90-100.
21. Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell*. 2014;156(1-2):20-44.
22. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological reviews*. 2004;84(1):277-359.
23. Bluher M. Clinical relevance of adipokines. *Diabetes & metabolism journal*. 2012;36(5):317-27.
24. Fasshauer M, Klein J, Kralisch S, Klier M, Lössner U, Blüher M, et al. Growth hormone is a positive regulator of adiponectin receptor 2 in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS letters*. 2004;558(1-3):27-32.
25. Yu JH, Kim MS. Molecular mechanisms of appetite regulation. *Diabetes & metabolism journal*. 2012;36(6):391-8.
26. Kalinovich AV, de Jong JM, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 in adipose tissues: two steps to full browning. *Biochimie*. 2017;134:127-37.
27. Ricquier D. Respiration uncoupling and metabolism in the control of energy expenditure. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2007;64(1):47-52.
28. Dalgaard LT, Pedersen O. Uncoupling proteins: functional characteristics and role in the pathogenesis of obesity and Type II diabetes. *Diabetologia*. 2001;44(8):946-65.

29. Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nature medicine*. 2013;19(10):1252-63.
30. Ali AT, Hochfeld WE, Myburgh R, Pepper MS. Adipocyte and adipogenesis. *European journal of cell biology*. 2013;92(6-7):229-36.
31. Lowe CE, O'Rahilly S, Rochford JJ. Adipogenesis at a glance. *Journal of cell science*. 2011;124(Pt 16):2681-6.
32. Lin JC. Impacts of Alternative Splicing Events on the Differentiation of Adipocytes. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(9):22169-89.
33. Vishvanath L, MacPherson KA, Hepler C, Wang QA, Shao M, Spurgin SB, et al. Pdgfrbeta+ Mural Preadipocytes Contribute to Adipocyte Hyperplasia Induced by High-Fat-Diet Feeding and Prolonged Cold Exposure in Adult Mice. *Cell metabolism*. 2016;23(2):350-9.
34. Lau AM, Tseng YH, Schulz TJ. Adipogenic fate commitment of muscle-derived progenitor cells: isolation, culture, and differentiation. *Methods in molecular biology*. 2014;1213:229-43.
35. Berry DC, Jiang Y, Graff JM. Mouse strains to study cold-inducible beige progenitors and beige adipocyte formation and function. *Nature communications*. 2016;7:10184.
36. Luo H, Zhou Y, Hu X, Peng X, Wei H, Peng J, et al. Activation of PPARgamma2 by PPARgamma1 through a functional PPRE in transdifferentiation of myoblasts to adipocytes induced by EPA. *Cell cycle*. 2015;14(12):1830-41.
37. Lagana AS, Vitale SG, Nigro A, Sofo V, Salmeri FM, Rossetti P, et al. Pleiotropic Actions of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) in Dysregulated Metabolic Homeostasis, Inflammation and Cancer: Current Evidence and Future Perspectives. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(7).
38. Kimmel AR. An orphan nuclear receptor finds a home. *Molecular cell*. 2010;37(2):155-7.
39. Solt LA, Kojetin DJ, Burris TP. The REV-ERBs and RORs: molecular links between circadian rhythms and lipid homeostasis. *Future medicinal chemistry*. 2011;3(5):623-38.
40. Lau P, Fitzsimmons RL, Raichur S, Wang SC, Lechtken A, Muscat GE. The orphan nuclear receptor, RORalpha, regulates gene expression that controls lipid metabolism: staggerer (SG/SG) mice are resistant to diet-induced obesity. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(26):18411-21.
41. Lau P, Tuong ZK, Wang SC, Fitzsimmons RL, Goode JM, Thomas GP, et al. Roralpha deficiency and decreased adiposity are associated with induction of thermogenic gene expression in subcutaneous white adipose and brown adipose tissue. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2015;308(2):E159-71.
42. Duez H, Duhem C, Laitinen S, Patole PS, Abdelkarim M, Bois-Joyeux B, et al. Inhibition of adipocyte differentiation by RORalpha. *FEBS letters*. 2009;583(12):2031-6.
43. Kim K, Boo K, Yu YS, Oh SK, Kim H, Jeon Y, et al. RORalpha controls hepatic lipid homeostasis via negative regulation of PPARgamma transcriptional network. *Nature communications*. 2017;8(1):162.
44. Lee MJ. Hormonal Regulation of Adipogenesis. *Comprehensive Physiology*. 2017;7(4):1151-95.
45. David L, Nelson MMC. Lehninger. *Principios de Bioquímica* W.H. Freeman and Company Book; 2013.
46. Lapid K, Graff JM. Form(ulation) of adipocytes by lipids. *Adipocyte*. 2017;6(3):176-86.
47. Duncan RE, Ahmadian M, Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Sul HS. Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annual review of nutrition*. 2007;27:79-101.
48. Seo JB, Moon HM, Kim WS, Lee YS, Jeong HW, Yoo EJ, et al. Activated liver X receptors stimulate adipocyte differentiation through induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression. *Molecular and cellular biology*. 2004;24(8):3430-44.
49. Kersten S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO reports*. 2001;2(4):282-6.
50. Hepler C, Vishvanath L, Gupta RK. Sorting out adipocyte precursors and their role in physiology and disease. *Genes & Development*. 2017;31(2):127-40.
51. Engin AB. MicroRNA and Adipogenesis. *Advances in experimental medicine and biology*. 2017;960:489-509.
52. Deiluiis JA. MicroRNAs as regulators of metabolic disease: pathophysiologic significance and emerging role as biomarkers and therapeutics. *International journal of obesity*. 2016;40(1):88-101.
53. Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Nature-signal transduction and targeted therapy*. 2016;1:15004.
54. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research*. 2009;19(1):92-105.
55. Zaiou M, El Amri H, Bakillah A. The clinical potential of adipogenesis and obesity-related microRNAs. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*. 2018;28(2):91-111.
56. Shi C, Huang F, Gu X, Zhang M, Wen J, Wang X, et al. Adipogenic miRNA and meta-signature miRNAs involved in human adipocyte differentiation and obesity. *Oncotarget*. 2016;7(26):40830-45.

57. Wang Q, Li YC, Wang J, Kong J, Qi Y, Quigg RJ, et al. miR-17-92 cluster accelerates adipocyte differentiation by negatively regulating tumor-suppressor Rb2/p130. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(8):2889-94.
58. Wong N, Wang X. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic acids research*. 2015;43(Database issue):D146-52.
59. Arner P, Kulyté A. MicroRNA regulatory networks in human adipose tissue and obesity. *Nature Reviews Endocrinology*. 2015;11:276.
60. Puthanveetil P, Thomas Anu A, Chakrabarti S. MicroRNAs in diabetes - are they perpetrators in disguise or just epiphenomena? *Non-coding RNAs in Endocrinology 2014*.
61. Lv Y-F, Yu J, Sheng Y-L, Huang M, Kong X-C, Di W-J, et al. Glucocorticoids Suppress the Browning of Adipose Tissue via miR-19b in Male Mice. *Endocrinology*. 2018;159(1):310-22.
62. Mehlem A, Hagberg CE, Muhl L, Eriksson U, Falkevall A. Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. *Nature protocols*. 2013;8(6):1149-54.
63. Chawla A, Lazar MA. Peroxisome proliferator and retinoid signaling pathways co-regulate preadipocyte phenotype and survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(5):1786-90.
64. Ruiz-Ojeda FJ, Ruperez AI, Gomez-Llorente C, Gil A, Aguilera CM. Cell Models and Their Application for Studying Adipogenic Differentiation in Relation to Obesity: A Review. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(7).
65. Mackenzie RWA, 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.
66. Hsieh CH, Rau CS, Wu SC, Yang JC, Wu YC, Lu TH, et al. Weight-reduction through a low-fat diet causes differential expression of circulating microRNAs in obese C57BL/6 mice. *BMC genomics*. 2015;16:699.
67. Duez H, Staels B. The nuclear receptors Rev-erbs and RORs integrate circadian rhythms and metabolism. *Diabetes & vascular disease research*. 2008;5(2):82-8.

ANEXOS

Gen (de ratón)	Secuencia sentido (5'-----3')	Secuencia antisentido (3'----5')	No. de Acceso
<i>FAS</i>	GCCACCTCAGTCCTGCTATC	GGTATAGACGACGGGCACAG	NM_007988.3
<i>PPARγ</i>	GGTGTGATCTTAACTGCCGGA	ACCTGATGGCATTGTGAGACA	NM_001127330.2
<i>C/EBPα</i>	ACTCGCTCCTTTTCCTACCG	CCCCAACACCTAAGTCCCTC	NM_001287514.1
<i>AdipoQ</i>	TCCCAATGTACCCATTCGCT	AACGGCCTTGTCCTTCTTGA	NM_009605.4
<i>RORα</i>	AGCGAACATATTCCCACAG	GTCTCCCTCCCTCTTCATCC	NM_013646.2
<i>S11</i>	CATTGACGAGCGTGCTTAC	TGCATCTTCATCTTCGTCAC	
<i>U6</i>	Cebador comercial (<i>Applied biosystems</i>)		

Tabla 13. Secuencias de cebadores.