

# Avances en la regulación de la obesidad: microARNs, genes y proteínas.

Autor/a: Bárbara María Varela Rodríguez

---

Tesis doctoral UDC / 2018

Director/a: Susana Sangiao Alvarellos y Fernando Cordido Carballido

Tutor/a: Susana Sangiao Alvarellos

Programa de doctorado en Ciencias de la Salud según *Real Decreto 99/2011*



La Dra. Susana Sangiao Alvarellos, profesora contratada Doctora del Área de Fisiología del Departamento de Fisioterapia, Medicina y Ciencias Biomédicas de la Universidad de A Coruña y el Dr. Fernando Cordido Carballido, Catedrático de Universidad del Área de Fisiología del Departamento de Fisioterapia, Medicina y Ciencias Biomédicas de la Universidad de A Coruña y Facultativo Especialista del Área de Endocrinología y Nutrición del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña.

CERTIFICAN

Que Dña. Bárbara María Varela Rodríguez, Licenciada en Biología por la Universidad de A Coruña, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo que lleva por título “*Avances en la regulación de la obesidad: microARNs, genes y proteínas*”. Se estima que dicho trabajo se encuentra concluido y en condiciones de ser presentando públicamente para optar al grado de doctor con internacional.

Y para que así conste, firman en A Coruña, a 16 de Noviembre 2018,

Dra. Susana Sangiao Alvarellos

Dr. Fernando Cordido Carballido

Bárbara M<sup>a</sup> Varela Rodríguez  
(Doctoranda)



Parte de los estudios que se presentan en esta tesis han sido Financiados por:

- Proxectos Emerxentes, 2013. Financiado por la Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria (Xunta de Galicia). Número de expediente EM2013/011.
- Proyecto FIS del Instituto de Salud Carlos III (cofinanciado por el programa FEDER de la Unión Europea), Madrid. Número de expediente PI16/00884.
- Beca para estancias predoctorales Albert Renold, concedida por el programa EFSD.



## Agradecimientos

---

Y cuando parecía que nunca llegaba el día y que este apartado sería el más fácil y corto de la tesis... Me veo pensando que si tuviera que agradecer una por una a todas las personas que han hecho posible la realización de esta tesis doctoral, seguramente escribiría más de lo “estipulado”.

En primer lugar, agradecer a la Dra. Susana Sangiao Alvarellos y al Dr. Fernando Cordido por darme la oportunidad de realizar esta tesis bajo su dirección. En especial a Susana, por las eternas horas en el laboratorio y sus interminables correcciones hasta el último momento.

En segundo lugar, agradecer a la Dra. Marián Freire, por iniciarme en el mundo de la investigación hace ya unos cuantos años atrás.

A la Dra. Eugènia Carvalho por acogerme durante 4 meses en su laboratorio así como a los compañeros/as por su acogida, en especial a Ana, Ermelindo y a las personas con quien no solo compartí laboratorio Anja, Patricia y Tatiana y a las alumnas de Máster Manuela y Ana Rita. Sin olvidarme también de los compañeros/as virtuales.

Y al personal de los servicios de Endocrino y Cirugía del CHUAC, la Dra. Outeiriño, la Dra. Brao, el Dr. Mena y el Dr. Sotelo entre otros, a las enfermeras Eva, Rocio, Sonia y M<sup>a</sup> Eugenia, así como a los equipos de celadores/as (en especial a Chelo) y a la secretaria Deli por su colaboración para la obtención de las muestras.

Quisiera dar las gracias a Mariajo por sus sabios consejos en el “mundo de los cultivos”, en el de las rutas de senderismo y la cocina.

Recién aterrizada en el INIBIC agradezco a Dolo y Fani por su ayuda con los pedidos generales y las tareas de “reprografía”. Y por supuesto a la mujer multitareas y multioficios del laboratorio, María Moreno, por estar dispuesta siempre a prestar su ayuda y sobretodo por ser tan resolutiva.

A las compañeras del servicio de histomorfología, tanto por su trabajo como por endulzar las mañanas microscópicas con succulentas dosis de repostería.

En especial también a mis primos, el radio andante de cultivos, Adrián Varela (co-inventor del Walkie-fotómetro) y Marta Varela por su omnipresencia hasta altas horas de la noche y fines de semana, ya que siempre se agradece no estar sola.

A Ramón, el cocinero de Ribeira, y su whatasapp más repetido: Tengo tubo, evitando así enviarnos la invitación a la paella.

Y como no, a mis compañeras de endocrino, Lara Pena, por sus ánimos y visitas mañaneras pero sobretudo a Paula y todos sus gadgets que nos han facilitado la existencia. Gracias por tus consejos, por tu trabajo hasta avanzadas horas de la noche y la madrugada, por tu sacrificio y por tu esfuerzo, por todos los favores que me has concedido y por aquellos que para los que te has ofrecido sin pedir, por las visitas a los bares de matogrande y por hacerme reír con tus lapsus telefónico-temporales, ¡gracias por todo!. Y a Bea, Laurita y Yocastia, con quien tuve un vínculo particular, una gran afinidad y a quien le estaré agradecida siempre por sus consejos y enseñanzas.

Y al resto de compañeros/as no mencionados de los grupos de Terapia, Cardio, Onco Proteo, CellCOM, Inflamación, Micro y Genómica.

Para ir finalizando a todas aquellas personas con quien me fui cruzando por la vida, en especial a aquellos que entendieron y apoyaron mi aventura y a todos aquellos que todavía no la entendieron: a la supercompi y todoterreno Tania, Suevia, José, Julito, Vero, Pablo, Marco, Miguel, Sara, Vanesa, Bibi, Rubén, Elena... Y a todos aquellos que en algún momento desaparecieron.

Y por último, y no menos importante, al mayor soporte desde hace ya casi 3 décadas, mis padres.



## Resumen

---

La obesidad y el sobrepeso están definidos por la Organización Mundial de la Salud como una acumulación anormal o excesiva de grasa corporal. Desde los años 80 la prevalencia de la obesidad se duplicó y casi triplicó en más de 70 países, principalmente en países desarrollados y en vías de desarrollo, y continúa aumentando año tras año. Las comorbilidades asociadas a esta patología hacen que sea un riesgo importante para la salud aumentando la tasa de mortalidad de las personas que la padecen. Dada la naturaleza etiogénica de esta enfermedad, en esta tesis de doctorado decidimos investigar sobre las bases moleculares de esta enfermedad desde varias aproximaciones:

- 1.- Estudiamos diversos mecanismos epigenéticos, concretamente diversos microARNs que pudiesen estar implicados en la diferenciación de los adipocitos y en la regulación de la obesidad. Para eso empleamos un modelo *in vitro* (la línea celular de preadipocitos 3T3-L1) con el fin de determinar el papel de las familias *MIR-19* y *MIR-200* en la adipogénesis, usamos modelos animales (ratas tratadas con distintas dietas) y por último usamos muestras de tejido adiposo subcutáneo humano de voluntarios con IMC normal y con obesidad.
- 2.- Estudio del perfil proteómico del tejido adiposo subcutáneo de pacientes obesos y los mismos candidatos tras la pérdida de peso inducida por la cirugía bariátrica empleando espectrometría de masas y confirmación de varios de los resultados obtenidos mediante *Western blot* y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.
- 3.- Y estudio de los niveles circulantes de irisina (hormona relacionada recientemente con el ejercicio y el *browning*) y los niveles de expresión génica de su precursor, *FNDC5*, bajo diferentes estadios de estrés metabólico.

Con estos estudios, fuimos capaces de demostrar:

- La implicación de *miR-19a*, *miR-19b* e *miR-200c* en el proceso de la adipogénesis, así como la desregulación de *miR-19b* e *miR-200c* durante la obesidad mórbida en humanos, mientras que en modelos animales observamos un mayor efecto de la dieta en la expresión de los microARNs del tejido adiposo visceral frente al resto de tejidos estudiados.
- La existencia de diferencias en el perfil proteómico del tejido adiposo subcutáneo de pacientes obesos mórbidos y los mismos tras la pérdida de peso observándose mejoría tras la pérdida de peso en procesos metabólicos, inflamatorios, etc.
- Diferencias en el control central y periférico de la expresión génica de *FNDC5* e irisina circulante bajo distintos estadios metabólicos.



## Resumo

---

A obesidade e o sobrepeso están definidos pola Organización Mundial da Saúde como unha acumulación anormal ou excesiva de graxa corporal. Dende os anos 80 a prevalenza da obesidade duplicouse e case triplicouse en máis de 70 países, principalmente en países desenvolvidos e en vías de desenvolvemento, e continúa medrando ano tras ano. As comorbilidades asociadas a esta patoloxía fan que sexa un risco importante para a saúde aumentando a taxa de mortalidade das persoas que a padecen. Dada a natureza etioxénica desta enfermidade, nesta tese de doutoramento decidimos investigar sobre as bases moleculares desta doenza dende varias aproximacións:

- 1.- Estudamos diversos mecanismos epixenéticos, concretamente diversos microARNs que puidesen estar implicados na diferenciación dos adipocitos e na regulación da obesidade. Para iso empregamos un modelo *in vitro* (a liña celular de preadipocitos 3T3-L1) co fin de determinar o papel das familias *MIR-19* e *MIR-200* na adipoxénese, usamos modelos animais (ratas tratadas con distintas dietas) e por último usamos mostras de tecido adiposo subcutáneo humano de voluntarios con IMC normal e con obesidade.
- 2.- Estudo do perfil proteómico do tecido adiposo subcutáneo de doentes obesos e os mesmos candidatos tras a perda de peso inducida pola cirurxía bariátrica empregando espectrometría de masas e confirmación de varios dos resultados obtidos mediante *Western blot* e reacción en cadea da polimerasa en tempo real.
- 3.- E estudo dos niveis circulantes de irisina (hormona relacionada recentemente co exercicio e o *browning*) e os niveis de expresión xénica do seu precursor, *FNDC5*, baixo diferentes estadios de estrés metabólico.

Con estes estudos, fomos capaces de demostrar:

- A implicación de *miR-19a*, *miR-19b* e *miR-200c* no proceso da adipoxénese, así como a desregulación de *miR-19b* e *miR-200c* durante a obesidade mórbida en humanos, mentres que en modelos animais observamos un maior efecto da dieta na alteración da expresión dos microARNs do tecido adiposo visceral fronte ó resto de tecidos estudados.
- A existencia de diferenzas no perfil proteómico do tecido adiposo subcutáneo de doentes obesos mórbidos e os mesmos tras a perda de peso observándose melloría tras a perda de peso en procesos metabólicos, inflamatorios, etc.
- Diferenzas no control central e periférico da expresión xénica de *FNDC5* e irisina circulante baixo distintos estadios metabólicos.



## Abstract

---

Overweight and obesity are defined by the World Health Organization as an abnormal or excessive fat that accumulate and present a risk to health. Since the 1980s, the prevalence of obesity has doubled and almost tripled in more than 70 countries, mainly in developed and developing countries, and continues to increase year after year. The comorbidities associated with this pathology make it an important risk to health by increasing the mortality rate of people who suffer it. Given the etiogenic nature of this disease, in this thesis we decided to investigate the molecular basis of this disease from several approaches:

- 1.- We studied several epigenetic mechanism, specifically different microRNAs that could be involved in the differentiation of the adipocytes and in the regulation of obesity. For that, we used an in vitro model (the cell line of preadipocytes 3T3-L1) in order to determine the role of MIR-19 and MIR-200 families in adipogénesis, we used animal models (rats reared with different diets) and finally, we used human subcutaneous adipose tissue samples from volunteers with normal BMI and with obesity.
- 2.- Study of the proteomic profile of the subcutaneous adipose tissue of obese patients and the same candidates after the weight loss induced by bariatric surgery using mass spectrometry and confirmation of several obtained results by western blot and real-time polymerase chain reaction.
- 3.- And the study of the circulating levels of irisin (hormone recently related to exercise and browning) and the expression levels of its precursor, FNDC5, under different stages of metabolic stress.

With this studies, we were able to demonstrate:

- The implication of miR-19a, miR-19b and miR-200c in the adipogenesis process, as well as the deregulation of miR-19b and miR-200c during morbid obesity in humans, while in animal models we observed a greater effect of the diet on the visceral adipose tissue microRNAs expression compared to the other studied tissues.
- The existence of differences in the proteomic profile of the subcutaneous adipose tissue of morbid obese patients and the same patients after weight loss, with improvement in metabolic and inflammatory processes after weight loss.
- Differences in the central and peripheral control of FNDC5 gene expression and circulating irisin levels under different metabolic stages.



## Abreviaturas

---

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AKT ó PKB: Proteína quinasa B

*AMPc*: Adenosín monofosfato cíclico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

*ATP*: Adenosín trifosfato

*BAT*: Tejido adiposo marrón

*BDNF*: factor neurotrófico derivado del cerebro

*BSA*: Seroalbúmina bovina

CCL2: Ligando de quimiocinas 2

C/EBP: Proteínas de unión al activador CCAAT

CHOP: Proteína homóloga de *C/EBP*

CHUAC: Complejo hospitalario universitario de A Coruña

ChREBP: Proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos

CREB: Proteína de unión al elemento de respuesta a AMP cíclico

DAG: Diacilglicerol

*DDA*: Adquisición dependiente de datos

*DGCR8*: *Microprocessor complex subunit DGCR8*

*DIA*: Adquisición independiente de datos

DN: Dieta normal

*dNTP*: Desoxirribonucleótido trifosfato

dsARN: ARN de cadena doble

EGR-1: Proteína de respuesta de crecimiento temprano 1

ERK: Quinasas reguladoras de señales extracelulares

ETS-1: Proteína C-ets-1

*FDR*: Tasa de descubrimientos falsos

*FGDR2*: Receptor 2 del factor de crecimiento fibroblástico

*FNDC5*: Fibronectina tipo III con 5 dominios

*G-CSF*: Factor estimulador de la colonia de granulocitos

*GLUT4*: Transportador de glucosa tipo 4

*GMPc*: Guanosín monofosfato cíclico

*HFD*: Dieta alta en grasa

*IDF*: Federación internacional de la diabetes

*IDIS*: Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela

*IGF-II*: Factor de crecimiento insulínico tipo 2

*IL-6*: Interleuquina 6

*IL-8*: Interleuquina 8

*IMC*: Índice de masa corporal

*INIBIC*: Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña

*INS*: gen codificador de la insulina

*INSR*: Receptor de insulina

*IP*: Intraperitoneal

*IP3*: Inositol 1,4,5-trifosfato

*IRS*: Sustrato del receptor de la insulina

*JAK*: Janus quinasa

*JAK2*: Janus quinasa 2

*KLF4*: Factor 4 tipo Kruppel

*LC-MS/MS*: Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem

*LIF*: Factor inhibidor de la leucemia

*LXR $\alpha$* : Receptor hepático  $\alpha$



MAP: Proteínas asociadas a microtúbulos

MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógeno

*MIF*: Factor inhibidor de la migración de macrófagos

*miR*: MicroARN

mTOR: Diana de rapamicina en células de mamífero

*MS/MS*: Espectrometría de masas en tándem

NF- $\kappa$ B: Factor de transcripción nuclear kappa B

Ngn3: Neurogenina 3

*NIH*: Instituto nacional de salud de Estados Unidos de América

ObR: Receptor de la leptina

*OD*: Densidad óptica

OMS: Organización mundial de la salud

PGC1: Co-activador 1 alfa del receptor activado por el proliferador de peroxisomas tipo gamma

PH: Dominios con homología a Pleckstrina

PI3K: Fosfatidil inositol 3-quinasa

PIP3: Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato

PKC $\epsilon$ : Proteína quinasa C tipo épsilon

PKD: Quinasa dependiente de PIP3

PPAR $\gamma$ : receptor activado por el proliferador de peroxisomas tipo gamma

PTEN: fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa

PTP1B: Proteína tirosina fosfatasa 1B

RC: Restricción calórica

RE: Retículo endoplasmático

RISC: Complejo de silenciamiento inducido por ARN

*RORα*: Receptor huérfano alfa relacionado con el ácido retinoico

*SCD1*: Esteroil-CoA desaturasa 1

SEEDO: Sociedad española para el estudio de la obesidad

SNC: Sistema nervioso central

SOCS: Proteínas supresoras de la señalización por citoquinas

SOCS3: Proteína supresora de la señalización por citoquinas 3

SREBF1: Factor de transcripción de unión del elemento regulador del esterol 1

SREBF2: Factor de transcripción de unión del elemento regulador del esterol 2

STAT: Transductor de señal y activador de la transcripción

STAT1: Transductor de señal y activador de la transcripción 1

STAT3: Transductor de señal y activador de la transcripción 3

STAT5: Transductor de señal y activador de la transcripción 5

SsARN: ARN de cadena sencilla

TAE: Tris-Acetato-EDTA

*T1DM*: Diabetes *mellitus* tipo 1

*T2DM*: Diabetes *mellitus* tipo 2

TARP2: Receptor gamma de región de cadena constante de las células T

TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa

UCP1: Proteína desacopladora 1

*3'-UTR*: Región 3' no traducida

VNM: Núcleo ventro-medial hipotalámico

WAT: Tejido adiposo blanco

# Índice General

---

<b>1. Introducción</b>	37
1.1 Obesidad	37
1.1.1 Homeostasis del peso corporal	38
1.1.2 Valoración clínica de la obesidad y tratamiento	38
1.1.3 Tejidos implicados en la obesidad	43
1.1.4 Síndrome metabólico	54
1.1.5 Obesidad e inflamación	55
1.1.6 Hormonas relacionadas con la obesidad	57
1.2 microARNs	73
1.2.1 Biogénesis de los <i>miRs</i>	74
1.2.2 Funciones biológicas en las que están implicados los <i>miRs</i>	77
1.2.3 <i>MiRs</i> como biomarcadores	77
1.2.4 <i>MiRs</i> y síndrome metabólico	77
<b>2. Justificación</b>	89
<b>3. Objetivos</b>	93
<b>4. Material y métodos</b>	97
4.1 Obtención de muestras biológicas	97
4.1.1 Línea celular 3T3-L1	97
4.1.2 Animales de experimentación	97
4.1.3 Pacientes	98
4.2 Diseños experimentales	99
a. <i>MiRs</i> relacionados con la obesidad y la adipogénesis	99
b. Estudio del perfil proteómico del tejido adiposo subcutáneo durante la obesidad mórbida y tras la pérdida de peso	102
c. Estudio de la alteración de la expresión de <i>FNDC5</i> e irisina bajo diferentes estados metabólicos	102
4.3 Técnicas experimentales empleadas	104
4.3.1 Cultivos celulares	104
4.3.2 Extracción de ácidos nucleicos	107
4.3.3 Transfección transitoria de la línea celular 3T3-L1	109
4.3.4 Transfección de la línea celular 293-TN y producción lentiviral	109
4.3.5 Transducción de la línea celular 3T3-L1 y 293-TN	110
4.3.6 Técnicas histoquímicas	111
4.3.7 Reacciones en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa ( <i>RT-PCRs</i> )	111
4.3.8 <i>qPCRs</i>	114

4.3.9 Obtención de extractos proteicos para <i>Western blot</i> .....	116
4.3.10 Análisis proteómicos.....	118
4.3.11 Herramientas Informáticas .....	121
<b>5. Resultados y Discusión</b> .....	127
5.1 <i>MiRs</i> relacionados con la obesidad y la adipogénesis.....	127
5.1.1 Análisis de <i>miRs</i> mediante algoritmos bioinformáticos .....	127
5.1.2 Regulación de la adipogénesis por <i>miRs</i> .....	130
5.1.3 <i>miRs</i> que se ven alterados a nivel circulante y en tejidos en ratas sometidas a distintas dietas a largo plazo.....	165
5.2 Diferencias en el proteoma de grasa subcutánea humana durante los estadios de obesidad mórbida y tras la pérdida de peso.....	183
5.2.1 Perfil proteómico del tejido adiposo subcutáneo durante la obesidad mórbida y tras la pérdida de peso: Diferencias cualitativas.....	186
5.2.2 Perfil proteómico del tejido adiposo subcutáneo durante la obesidad mórbida y tras la pérdida de peso: Diferencias cuantitativas.....	192
5.2.3 Análisis de la expresión proteica mediante <i>Western blot</i> .....	203
5.2.4 Análisis de la expresión génica mediante <i>qPCR</i> .....	209
5.3 Alteración de la expresión de <i>FNDC5</i> e irisina bajo diferentes estados metabólicos.....	215
5.3.1 Alteración de la expresión de <i>FNDC5</i> y los niveles circulantes de irisina en ratas sometidas a distintas dietas – Experimento a largo plazo .....	217
5.3.2 Alteración de la expresión de <i>FNDC5</i> y los niveles circulantes de irisina en ratas sometidas a ayuno – Experimento a corto plazo.....	222
5.3.3 Efectos de la leptina sobre la expresión génica de <i>FNDC5</i> y los niveles circulantes de irisina en ratas alimentadas y sometidas a ayuno.....	226
5.3.4 Efectos de la insulina y metformina sobre la expresión génica de <i>FNDC5</i> y los niveles circulantes de irisina en ratas .....	231
5.3.5 Efectos de la irisina sobre los niveles circulantes de insulina y glucosa en ratas con alimentación normal.....	234
5.3.6 Efectos de la diabetes sobre los niveles de expresión génica de <i>FNDC5</i> y los niveles circulantes de irisina en ratas alimentadas y sometidas a ayuno. ....	236
<b>6. Conclusiones</b> .....	245
6.1. <i>MiRs</i> relacionados con la obesidad y la adipogénesis.....	0
6.2. Estudio del perfil proteómico del tejido adiposo subcutáneo durante la obesidad mórbida y tras la pérdida de peso.....	0
6.3. Estudio de la alteración de la expresión de <i>FNDC5</i> e irisina bajo diferentes estados metabólicos.....	0
<b>7. Bibliografía</b> .....	249

<b>8. Anexos .....</b>	<b>283</b>
<b>9. Publicaciones .....</b>	<b>345</b>
<b>10. <i>Currículum vitae</i>.....</b>	<b>362</b>



## Índice de Tablas

---

<b>Tabla 1.</b> Clasificación del estado ponderal según la OMS y la SEEDO .....	39
<b>Tabla 2.</b> Riesgo de padecer <i>T2DM</i> , hipertensión y enfermedades cardiovasculares según el <i>NIH</i> . .....	40
<b>Tabla 3.</b> Señales que regulan el hambre y la saciedad a corto y largo plazo. ....	53
<b>Tabla 4.</b> Factores que definen el síndrome metabólico según la <i>IDF</i> . ....	54
<b>Tabla 5.</b> Funciones, a nivel central y periférico, en las que la leptina presenta un papel importante.....	61
<b>Tabla 6.</b> <i>miRs</i> circulantes alterados en enfermedades metabólicas.....	78
<b>Tabla 7.</b> <i>MiRs</i> que promueven la adipogénesis. ....	79
<b>Tabla 8.</b> <i>MiRs</i> que inhiben la adipogénesis. ....	80
<b>Tabla 9.</b> Suplementos del medio <i>DMEM/F-12</i> para preparar medio de diferenciación. ....	105
<b>Tabla 10.</b> Suplementos del medio <i>DMEM/F-12</i> para inducir el <i>browning</i> . ....	106
<b>Tabla 11.</b> Plásmidos empleados a lo largo de esta tesis. ....	107
<b>Tabla 12.</b> Imitadores comerciales <i>mirVana<sup>TM</sup></i> empleados. ....	109
<b>Tabla 13.</b> Reactivos para preparar el cóctel de transfección. ....	110
<b>Tabla 14.</b> Mix de <i>RT-PCR</i> para síntesis de ADNc a partir de ARN.....	112
<b>Tabla 15.</b> Programa de <i>RT-PCR</i> para síntesis de ADNc a partir de ARN. ....	112
<b>Tabla 16.</b> Mix y programa de <i>RT-PCR</i> para síntesis de ADNc a partir de ARN de muestras humanas.....	113
<b>Tabla 17.</b> Mix para <i>RT-PCR</i> de <i>miRs</i> .....	113
<b>Tabla 18.</b> Programa de <i>RT-PCR</i> de <i>miRs</i> . ....	114
<b>Tabla 19.</b> Mix de <i>qPCR</i> ( <i>SYBR Green</i> ).....	114
<b>Tabla 20.</b> Programa de <i>qPCR</i> ( <i>SYBR Green</i> ). ....	115
<b>Tabla 21.</b> Mix de <i>qPCR</i> de <i>miRs</i> ( <i>Taqman</i> ). ....	115
<b>Tabla 22.</b> Programa de <i>qPCR</i> ( <i>Taqman</i> ). ....	116
<b>Tabla 23.</b> Herramientas bioinformáticas para la predicción de dianas de los <i>miRs</i> .....	122
<b>Tabla 24.</b> Potenciales <i>miRs</i> reguladores de <i>SOCS3</i> . ....	127
<b>Tabla 25.</b> Caracterización de los pacientes.....	154
<b>Tabla 26.</b> Medicación de los pacientes. ....	155
<b>Tabla 27.</b> Caracterización de los pacientes.....	156
<b>Tabla 28.</b> Medicación de los pacientes. ....	156
<b>Tabla 29.</b> Características clínicas de los pacientes.....	185
<b>Tabla 30.</b> Procesos biológicos con una menor <i>FDR</i> en los que están implicadas las proteínas que se expresan de forma exclusiva en el estadio de obesidad y tras la pérdida de peso. ....	189

<b>Tabla 31.</b> Componentes celulares con una menor <i>FDR</i> en los que se expresan las proteínas de forma exclusiva en el estadio de obesidad y de forma exclusiva tras la pérdida de peso.....	190
<b>Tabla 32.</b> Funciones moleculares con una menor <i>FDR</i> en las que están implicadas las proteínas que se expresan de forma exclusiva en el estadio de obesidad y de forma exclusiva tras la pérdida de peso.....	191
<b>Tabla 33.</b> Procesos biológicos con una menor <i>FDR</i> en los que están implicadas las proteínas cuya expresión desciende con la pérdida de peso.....	192
<b>Tabla 34.</b> Componentes celulares con una menor <i>FDR</i> en los que se expresan las proteínas cuyos niveles de expresión descienden tras la pérdida de peso. ....	193
<b>Tabla 35.</b> Funciones con una menor <i>FDR</i> en las que están implicadas las proteínas cuyos niveles de expresión descienden tras la pérdida de peso.....	195
<b>Tabla 36.</b> Procesos biológicos con una menor <i>FDR</i> en los que están implicadas las proteínas cuya expresión aumenta con la pérdida de peso.....	198
<b>Tabla 37.</b> Componentes celulares con una menor <i>FDR</i> en los que se expresan las proteínas cuyos niveles de expresión aumentan tras la pérdida de peso.....	199
<b>Tabla 38.</b> Funciones con una menor <i>FDR</i> en las que están implicadas las proteínas cuyos niveles de expresión aumentan tras la pérdida de peso. ....	200
<b>Tabla 39.</b> Caracterización de los pacientes.....	209
<b>Tabla 40.</b> Medicación de los pacientes. ....	210
<b>Tabla 41.</b> Efecto de la <i>HFD</i> y <i>RC</i> durante 3 meses sobre el % de grasa corporal (A), % de masa magra (B) y peso corporal (C). ....	218
<b>Tabla 42.</b> Efecto de la <i>HFD</i> y <i>RC</i> durante 3 meses sobre los niveles circulantes de glucosa, insulina, leptina y triglicéridos.....	218
<b>Tabla 43.</b> Efectos del ayuno durante 48 h sobre la ganancia de peso corporal e índices somáticos. ....	223
<b>Tabla 44.</b> Efectos del ayuno durante 48 h sobre los niveles de glucosa en plasma, triglicéridos e insulina.....	223
<b>Tabla 45.</b> Efectos del tratamiento con salino e insulina <i>IP</i> durante 14 días y metformina subcutánea sobre los niveles plasmáticos de glucosa, triglicéridos e insulina.....	231
<b>Tabla 46.</b> Efectos del tratamiento con salino e insulina <i>IP</i> durante 14 días y metformina subcutánea sobre la ganancia de peso corporal e índices somáticos.....	232
<b>Tabla 47.</b> Cebadores empleados. ....	305
<b>Tabla 48.</b> Cebadores comerciales empleados en la línea celular 3T3-L1 y humanos.....	306
<b>Tabla 49.</b> Anticuerpos empleados.....	307
<b>Tabla 50.</b> Proteínas identificadas en ambos estadios.....	309
<b>Tabla 51.</b> Proteínas identificadas únicamente en el estadio de obesidad.....	313
<b>Tabla 52.</b> Proteínas identificadas únicamente tras la pérdida de peso.....	318



<b>Tabla 53.</b> Proteínas cuyos niveles de expresión aumentaron de forma estadísticamente significativa tras la pérdida de peso. ....	331
<b>Tabla 54.</b> Proteínas cuyos niveles de expresión disminuyeron de forma estadísticamente significativa tras la pérdida de peso. ....	337



## Índice de Figuras

---

<b>Figura 1.</b> Relación entre la ingesta y el gasto energético.....	37
<b>Figura 2.</b> Homeostasis del peso corporal.....	38
<b>Figura 3.</b> Esquema de los principales procesos quirúrgicos de cirugía bariátrica y/o metabólica. ....	42
<b>Figura 4.</b> Procesos de cambio constante en el tejido adiposo: hipertrofia e hiperplasia.....	44
<b>Figura 5.</b> Distribución corporal del <i>BAT</i> y <i>WAT</i> en humanos adultos y recién nacidos.....	45
<b>Figura 6.</b> Fotografías al microscopio óptico.....	45
<b>Figura 7.</b> Diferencias tejido adiposo individuos delgados e individuos obesos.....	46
<b>Figura 8.</b> Proceso de diferenciación de preadipocitos a adipocitos maduros.....	48
<b>Figura 9.</b> Diferencias y similitudes entre adipocito marrón, beis y blanco.....	50
<b>Figura 10.</b> Rango de daños en el hígado.....	51
<b>Figura 11.</b> Ubicación del hipotálamo, el centro de saciedad y el centro del hambre.....	52
<b>Figura 12.</b> Citoquinas proinflamatorias y adipoquinas producidas por el tejido adiposo.....	56
<b>Figura 13.</b> Biosíntesis y procesamiento de la insulina.....	57
<b>Figura 14.</b> Secreción de la insulina.....	58
<b>Figura 15.</b> Estructura del receptor de insulina.....	59
<b>Figura 16.</b> Vías de señalización de la insulina y la leptina.....	60
<b>Figura 17.</b> Control y balance energético.....	62
<b>Figura 18.</b> Estructura de los receptores de la leptina.....	63
<b>Figura 19.</b> Estructura de SOCS3.....	64
<b>Figura 20.</b> Esquema de la inhibición de la señalización de la insulina y la leptina por SOCS3.....	65
<b>Figura 21.</b> Alteraciones sistémicas durante la resistencia a insulina.....	68
<b>Figura 22.</b> Resistencia a leptina.....	69
<b>Figura 23.</b> Esquema de la proteína FNDC5 e irisina.....	70
<b>Figura 24.</b> Efecto de la irisina en el tejido adiposo blanco.....	73
<b>Figura 25.</b> Estructura de un pri-miARN.....	75
<b>Figura 26.</b> Biogénesis de los <i>miRs</i> .....	76
<b>Figura 27.</b> Línea del tiempo del proceso de diferenciación de la línea celular 3T3-L1.....	106
<b>Figura 28.</b> Esquema en el que se representa la interacción entre los <i>miRs</i> y sus potenciales diana de las vías de señalización de la insulina, leptina y adiponectina.....	129
<b>Figura 29.</b> Niveles de expresión de <i>miR-19a</i> .....	131

<b>Figura 30.</b> Niveles de expresión de <i>miR-19b</i> .....	131
<b>Figura 31.</b> Fotografías de la tinción <i>Oil Red O</i> y cuantificación de la deposición de lípidos en las células 3T3-L1 a distintos tiempos de diferenciación.....	132
<b>Figura 32.</b> Niveles de expresión del ARNm de <i>PPAR<math>\gamma</math></i> (a), <i>C/EBP<math>\alpha</math></i> (b), <i>ADIPOQ</i> (c) y <i>FAS</i> (d)....	134
<b>Figura 33.</b> Resumen de los sitios de unión de <i>miR-19a</i> y <i>miR-19b</i> a <i>ROR<math>\alpha</math></i> según <i>TargetScan</i> ...	136
<b>Figura 34.</b> Niveles de expresión del ARNm de <i>ROR<math>\alpha</math></i> .....	137
<b>Figura 35.</b> Fotografías de la tinción <i>Oil Red O</i> y cuantificación de la deposición de lípidos en las células 3T3-L1 a distintos tiempos de diferenciación.....	138
<b>Figura 36.</b> Niveles de expresión del ARNm de <i>PPAR<math>\gamma</math></i> (a), <i>C/EBP<math>\alpha</math></i> (b), <i>ADIPOQ</i> (c) y <i>FAS</i> (d)....	139
<b>Figura 37.</b> Niveles de expresión del ARNm de <i>ROR<math>\alpha</math></i> .....	140
<b>Figura 38.</b> Fotografías de la tinción <i>Oil Red O</i> y cuantificación de la deposición de lípidos en las células 3T3-L1 a distintos tiempos de diferenciación.....	141
<b>Figura 39.</b> Niveles de expresión del ARNm de <i>PPAR<math>\gamma</math></i> (a), <i>C/EBP<math>\alpha</math></i> (b), <i>ADIPOQ</i> (c) y <i>FAS</i> (d)....	143
<b>Figura 40.</b> Niveles de expresión del ARNm de <i>ROR<math>\alpha</math></i> .....	144
<b>Figura 41.</b> Niveles de expresión del ARNm de <i>UCP1</i> .....	145
<b>Figura 42.</b> Fotografías de la tinción <i>Oil Red O</i> y cuantificación de la deposición de lípidos en las células 3T3-L1 a distintos tiempos de diferenciación.....	146
<b>Figura 43.</b> Niveles de expresión del ARNm de <i>PPAR<math>\gamma</math></i> (a), <i>C/EBP<math>\alpha</math></i> (b), <i>ADIPOQ</i> (c) y <i>FAS</i> (d)....	149
<b>Figura 44.</b> Niveles de expresión del ARNm de <i>ROR<math>\alpha</math></i> .....	150
<b>Figura 45.</b> Niveles de expresión del ARNm de <i>ABCA1</i> .....	151
<b>Figura 46.</b> Niveles de expresión del ARNm de <i>SCD1</i> .....	152
<b>Figura 47.</b> Niveles de expresión del ARNm de <i>MIF</i> .....	153
<b>Figura 48.</b> Niveles de expresión de <i>miR-19a</i> (a) y <i>miR-19b</i> (b) en grasa subcutánea humana..	155
<b>Figura 49.</b> Niveles de expresión de <i>miR-19a</i> (a) y <i>miR-19b</i> (b) en grasasubcutánea humana..	157
<b>Figura 50.</b> Fotografías al microscopio de fluorescencia de la línea celular 3T3-L1.....	159
<b>Figura 51.</b> Niveles de expresión de <i>miR-200c</i> 7 días después de inducir la diferenciación. ....	160
<b>Figura 52.</b> Fotografías de microscopía.....	161
<b>Figura 53.</b> Niveles de expresión del ARNm de <i>PPAR<math>\gamma</math></i> (a) y <i>ADIPOQ</i> (b).....	162
<b>Figura 54.</b> Niveles de expresión de <i>miR-200c</i> en grasa subcutánea humana.....	163
<b>Figura 55.</b> Niveles de expresión de <i>miR-200c</i> en grasa subcutánea humana.....	164
<b>Figura 56.</b> Perfil de expresión de los <i>miRs</i> analizados en suero.....	166
<b>Figura 57.</b> Perfil de expresión de los <i>miRs</i> analizados en tejidos.....	167
<b>Figura 58.</b> Efecto de la <i>HFD</i> y <i>RC</i> durante 3 meses sobre los niveles de expresión de <i>miR-16</i> en suero (a), hígado (b), grasa visceral (c) y grasa epididimal (d).....	168

<b>Figura 59.</b> Efecto de la <i>HFD</i> y RC durante 3 meses sobre los niveles de expresión de <i>miR-24</i> en suero (a), hígado (b), grasa visceral (c) y grasa epididimal (d)..	170
<b>Figura 60.</b> Efecto de la <i>HFD</i> y RC durante 3 meses sobre los niveles de expresión de <i>miR-30a</i> (a), <i>miR-30b</i> (b) y <i>miR-30d</i> (c) en suero.....	171
<b>Figura 61.</b> Efecto de la <i>HFD</i> y RC durante 3 meses sobre los niveles de expresión de <i>miR-30a</i> (a), <i>miR-30b</i> (b) y <i>miR-30d</i> (c) en hígado..	172
<b>Figura 62.</b> Efecto de la <i>HFD</i> y RC durante 3 meses sobre los niveles de expresión de <i>miR-30a</i> (a), <i>miR-30b</i> (b) y <i>miR-30d</i> (c) en grasa visceral mesentérica.....	173
<b>Figura 63.</b> Efecto de la <i>HFD</i> y RC durante 3 meses sobre los niveles de expresión de <i>miR-30a</i> (a), <i>miR-30b</i> (b) y <i>miR-30d</i> (c) en grasa epididimal.....	174
<b>Figura 64.</b> Efecto de la <i>HFD</i> y RC durante 3 meses sobre los niveles de expresión de <i>miR-34a</i> en suero (a), hígado (b), grasa visceral (c) y grasa epididimal (d). .....	175
<b>Figura 65.</b> Efecto de la <i>HFD</i> y RC durante 3 meses sobre los niveles de expresión de <i>miR-122</i> en suero (a), hígado (b), grasa visceral (c) y grasa epididimal (d).....	177
<b>Figura 66.</b> Efecto de la <i>HFD</i> y RC durante 3 meses sobre los niveles de expresión de <i>miR-146a</i> en suero (a), hígado (b), grasa visceral (c) y grasa epididimal (d).....	179
<b>Figura 67.</b> Efecto de la <i>HFD</i> y RC durante 3 meses sobre los niveles de expresión de <i>miR-191</i> en suero (a), hígado (b), grasa visceral (c) y grasa epididimal (d).....	180
<b>Figura 68.</b> Efecto de la <i>HFD</i> y RC durante 3 meses sobre los niveles de expresión de <i>miR-218</i> en suero (a), hígado (b), grasa visceral (c) y grasa epididimal (d).....	181
<b>Figura 69.</b> Efecto de la <i>HFD</i> y RC durante 3 meses sobre los niveles de expresión de <i>miR-221</i> en suero (a), hígado (b), grasa visceral (c) y grasa epididimal (d). .....	182
<b>Figura 70.</b> Diagramas de Venn del análisis cualitativo proteómico del tejido adiposo subcutáneo antes y después de la cirugía bariátrica. ....	187
<b>Figura 71.</b> Diagrama de Venn del análisis cualitativo proteómico del tejido adiposo subcutáneo antes y después de la cirugía bariátrica.....	188
<b>Figura 72.</b> <i>Western blot</i> de muestras de tejido adiposo subcutáneo humano.....	204
<b>Figura 73.</b> Niveles de expresión proteica relativa de FAS en pacientes control, obesos y obesos tras la normalización del peso. ....	205
<b>Figura 74.</b> Niveles de expresión proteica de ACC, pACC y el ratio entre ambas en pacientes control, obesos y obesos tras la normalización del peso. ....	206
<b>Figura 75.</b> Niveles de expresión proteica relativa de AMPK, pAMPK y el ratio entre ambas en pacientes control, obesos y obesos tras la normalización del peso. ....	207
<b>Figura 76.</b> Niveles de expresión proteica relativa de AKT, pAKT y el ratio entre ambas en pacientes control, obesos y obesos tras la normalización del peso. ....	208

<b>Figura 77.</b> Niveles de expresión del ARNm de <i>FAS</i> (a), <i>GLUT1</i> (b), <i>GLUT4</i> (c) y <i>ADH1B</i> (d) en <i>WAT</i> subcutáneo abdominal.....	211
<b>Figura 78.</b> Niveles de expresión del ARNm de <i>FAS</i> (a), <i>GLUT1</i> (b), <i>GLUT4</i> (c) y <i>ADH1B</i> (d) en <i>WAT</i> subcutáneo abdominal.....	212
<b>Figura 79.</b> Perfil de expresión del ARNm de <i>FNDC5</i> en un panel de tejidos de ratas <i>Wistar</i> adultas.....	216
<b>Figura 80.</b> Efecto de la <i>HFD</i> y RC durante 3 meses sobre los niveles circulantes irisina.....	219
<b>Figura 81.</b> Efecto de la <i>HFD</i> y RC durante 3 meses sobre los niveles de expresión del ARNm de <i>FNDC5</i> en hipotálamo (a), músculo gastrocnemio (b), <i>WAT</i> visceral (c), <i>WAT</i> subcutáneo (d) y <i>WAT</i> epididimal (e).....	220
<b>Figura 82.</b> Efecto de la <i>HFD</i> y RC durante 3 meses sobre los niveles de expresión del ARNm de <i>FNDC5</i> (a) y <i>UCP1</i> (b) en <i>BAT</i> .....	221
<b>Figura 83.</b> Efectos del ayuno durante 48 h sobre los niveles de irisina en plasma.....	224
<b>Figura 84.</b> Efecto del ayuno durante 48 h sobre los niveles de expresión del ARNm de <i>FNDC5</i> en hipotálamo (a), músculo gastrocnemio (b), <i>WAT</i> visceral (c), <i>WAT</i> subcutáneo (d) y <i>WAT</i> epididimal (e).....	225
<b>Figura 85.</b> Efecto del ayuno durante 48 h sobre los niveles de expresión del ARNm de <i>FNDC5</i> (a) y <i>UCP1</i> (b) en <i>BAT</i> .....	226
<b>Figura 86.</b> Efecto de dos inyecciones IP de leptina (1 cada 24 h) sobre los niveles circulantes de irisina.....	227
<b>Figura 87.</b> Efecto de dos inyecciones IP de leptina (1 cada 24 h) sobre los niveles de expresión del ARNm de <i>SOCS3</i> y <i>FNDC5</i> en hipotálamo (a y b, respectivamente) y <i>FNDC5</i> en músculo gastrocnemio (c), <i>WAT</i> visceral (d), <i>WAT</i> subcutáneo (e) y <i>WAT</i> epididimal (f).....	228
<b>Figura 88.</b> Efecto de dos inyecciones IP de leptina (1 cada 24 h) sobre los niveles de expresión del ARNm de <i>FNDC5</i> y <i>UCP1</i> en <i>BAT</i> (a y b, respectivamente).....	229
<b>Figura 89</b> Efecto de dos inyecciones IP de leptina (1 cada 24 h) en animales alimentados y sometidos a ayuno durante 48 h sobre los niveles expresión de expresión génica de <i>SOCS3</i> en hipotálamo (a), <i>FNDC5</i> en hipotálamo (b), músculo gastrocnemio (c) y <i>WAT</i> epididimal (d).....	230
<b>Figura 90.</b> Efecto de dos inyecciones IP de leptina (1 cada 24 h) en animales alimentados y sometidos a ayuno durante 48 h sobre los niveles plasmáticos de irisina.....	231
<b>Figura 91.</b> Efectos del tratamiento con salino (control) e insulina IP durante 14 días y metformina subcutánea sobre los niveles plasmáticos de irisina. ....	232
<b>Figura 92.</b> Efectos del tratamiento con metformina e insulina subcutánea durante 14 días sobre los niveles de expresión del ARNm de <i>FNDC5</i> en el hipotálamo (a) músculo gastrocnemio (b), <i>WAT</i> visceral (c) y <i>WAT</i> epididimal (d).....	233

<b>Figura 93.</b> Efecto de la irisina IP durante 2 días sobre los niveles circulantes de irisina (a), glucosa (b) e insulina (c) en ratas macho alimentadas. ....	235
<b>Figura 94.</b> Efectos de la diabetes inducida por una inyección de alloxan en ratas alimentadas y sometidas a ayuno durante 48 h sobre los niveles de glucosa (a), insulina (b) e irisina (c) en plasma. ....	237
<b>Figura 95.</b> Efectos de la diabetes inducida por una inyección de alloxan en ratas alimentadas y sometidas a ayuno durante 48 h sobre los niveles de expresión del ARNm de <i>FNDC5</i> en hipotálamo (a), músculo gastrocnemio (b) y <i>WAT</i> epididimal (c). ....	238
<b>Figura 96.</b> Efecto del tratamiento de ratas macho diabéticas usando insulina <i>NPH</i> (9,5 UI/día) durante 8 días sobre los niveles plasmáticos de glucosa (a) e irisina (b).. ....	239
<b>Figura 97.</b> Efecto del tratamiento de ratas macho diabéticas usando insulina <i>NPH</i> (9,5 UI/día) durante 8 días sobre los niveles de expresión del ARNm de <i>SOCS3</i> y <i>FNDC5</i> en hipotálamo (a y b respectivamente), <i>FNDC5</i> en músculo gastrocnemio (c), <i>WAT</i> visceral (d), <i>WAT</i> subcutáneo (e) y <i>WAT</i> epididimal (f). ....	240
<b>Figura 98.</b> Efecto del tratamiento de ratas macho diabéticas usando insulina <i>NPH</i> (9,5 UI/día) durante 8 días sobre los niveles de expresión de <i>FNDC5</i> y <i>UCP1</i> (a y b respectivamente) en <i>BAT</i> . ....	241
<b>Figura 99.</b> Mapa de restricción del plásmido <i>pCMV-VSV-G</i> . ....	301
<b>Figura 100.</b> Mapa de restricción del plásmido <i>pRSV-Rev</i> . ....	302
<b>Figura 101.</b> Mapa de restricción del plásmido <i>pMDLg/pRRE</i> . ....	303
<b>Figura 102.</b> Mapa del plásmido empleado como control negativo. ....	304
<b>Figura 103.</b> Mapa general de los vectores lentivirales de expresión de pre-miARNs de ratón. ....	304
<b>Figura 104.</b> Mapa de componentes: Tras la pérdida de peso. ....	327
<b>Figura 105.</b> Mapa de componentes: Estadio de obesidad. ....	328
<b>Figura 106.</b> Mapa de funciones: Tras la pérdida de peso. ....	329
<b>Figura 107.</b> Mapa de funciones: Estadio de obesidad. ....	330





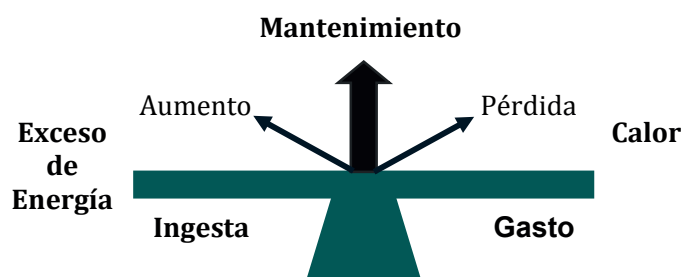
# **1. Introducción**



# 1. Introducción

## 1.1 Obesidad

La obesidad es un problema de salud crónico definido como la acumulación excesiva de grasa corporal; resultado de un desequilibrio entre la ingesta y el gasto de energía (*Figura 1*), lo cual a menudo, desencadena enfermedades metabólicas (1). La ingesta excesiva de ácidos grasos saturados puede exacerbar la ganancia de peso y por tanto la obesidad, así como incrementar el riesgo de resistencia a insulina (2).



**Figura 1. Relación entre la ingesta y el gasto energético.** Si la ingesta y el gasto energético son iguales, se mantiene el equilibrio y por tanto el peso corporal.

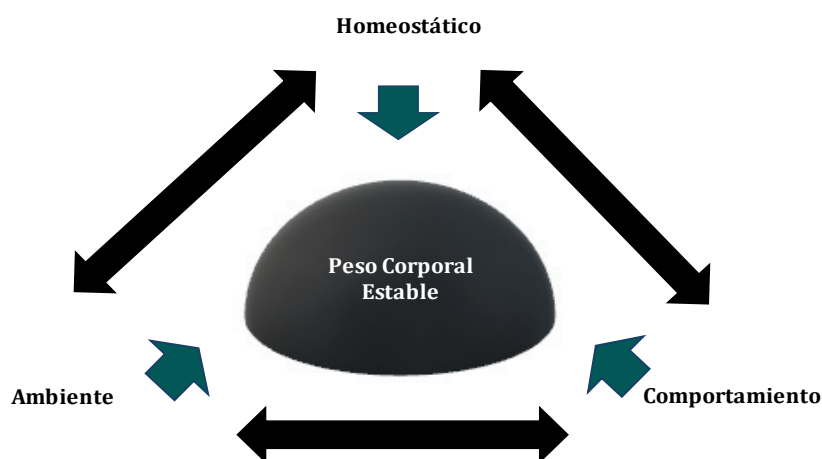
Existen evidencias que indican que la patogénesis de la obesidad es mucho más compleja que la acumulación pasiva de grasa por un exceso de calorías (3). Un ejemplo de ello es la evolucionada fisiología de los humanos, la cual está predispuesta a acumular la masa grasa como factor de supervivencia, sin embargo, en la actualidad disponemos de acceso a calorías ilimitadas, lo que ha creado que una parte de la población humana esté predispuesta biológicamente a una ganancia excesiva de peso (3).

La prevalencia de la obesidad, continúa en aumento sobre todo en los países desarrollados y subdesarrollados, afectando a más del 15% de la población mundial (4), lo que se traduce en aproximadamente 33 millones de personas afectadas en 2015 (5) y es, además, la segunda causa de mortalidad previsible (6). Presenta un gran impacto en el estado funcional y calidad de vida y aumenta el riesgo de una gran variedad de enfermedades como la diabetes *Mellitus* tipo II (*T2DM*), hiperlipemias, enfermedades cardiovasculares, apnea e incluso algunos tipos de cáncer (7). Esta tendencia actual, es un desafío importante para la salud pública tanto por la reducción de la calidad de vida como por el importante gasto sanitario que conlleva (8). Estudios recientes sobre la prevalencia de la obesidad, siguen aportando datos poco esperanzadores sobre su evolución, estimándose que en el año 2030 el 90% de los adultos padecerán sobrepeso y la mitad de ellos serán obesos (8), lo que supondrá más del 16% del gasto sanitario (9, 10).

Para comprender la patogénesis de la obesidad, es necesario comprender e integrar los factores moleculares, genéticos, de desarrollo y ambientales en lo que están implicadas disciplinas como la neurociencia, la psicología, la genética, la epigenética, etc. (3).

### 1.1.1 Homeostasis del peso corporal

Hoy en día, existen muchas evidencias que defienden las ideas de que el peso corporal y la energía almacenada en forma de grasa corporal están regulados (3, 11). En la mayoría de los seres humanos y animales adultos, tanto el peso corporal como la adiposidad permanecen constantes durante períodos largos de tiempo (*Figura 2*), aunque haya fluctuaciones en la ingesta de alimento a corto plazo; si bien es cierto, se pueden inducir cambios pronunciados en el aumento y descenso del peso corporal mediante sobrealimentación o restricción energética forzada respectivamente, sin embargo, el peso corporal recupera valores próximos a los iniciales cuando se reanuda una alimentación normal tanto en individuos obesos como delgados (3, 11). La capacidad de ajustar la ingesta de alimentos en función de las necesidades energéticas es esencial para la supervivencia y a este respecto, existen varias publicaciones que han proporcionado una visión de los mecanismos moleculares, celulares y de comportamiento que intentan explicar los cambios en la acumulación de grasa corporal relacionados con la conducta alimentaria (12). Sin embargo, este mecanismo de homeostasis a nivel fisiológico se ve alterado en alguno o varios de sus componentes clave durante la obesidad severa (12).



**Figura 2. Homeostasis del peso corporal.** La homeostasis del peso corporal o tendencia a mantener el peso corporal estable, viene fijado por una serie de factores entre los que se incluyen los genéticos, epigenéticos, el ambiente así como el comportamiento. Modificado de (13).

### 1.1.2 Valoración clínica de la obesidad y tratamiento

Para medir el estado nutricional y definir la obesidad se emplea de forma rutinaria el Índice de Masa Corporal (IMC) que se calcula siguiendo la fórmula  $IMC = \text{peso (kg)} / \text{altura}^2$

(m) (14). Teniendo esto en cuenta, tanto la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO) clasifican el estado ponderal de la persona tal y como se detalla a continuación (*Tabla 1*):

	OMS	SEEDO
Peso Insuficiente	<18.5	<18.5
Normopeso	18.5-24.9	18.5-24.9
Sobrepeso grado I	≥25.0	25-26.9
Sobrepeso grado II (pre-obesidad)	25-29.9	27-29.9
Obesidad de tipo I	30-34.9	30-34.9
Obesidad de tipo II	35-39.9	35-39.9
Obesidad de tipo III (mórbida)	40-49.9	40-49.9
Obesidad de tipo IV (extrema)	>50	>50

**Tabla 1.** Clasificación del estado ponderal según la OMS (15) y la SEEDO (16).

Aceptándose en ambos casos, la definición de sobrepeso como un IMC igual o superior a 25 kg/m<sup>2</sup> y la obesidad como un IMC igual o superior a 30 kg/m<sup>2</sup> (15, 16).

Si además del peso corporal, también tenemos en cuenta la distribución adiposa (mediante la medida de la circunferencia de la cintura), obtenemos una nueva clasificación que da idea del riesgo relativo de presentar comorbilidades mayores como la *T2DM*, hipertensión y enfermedades cardiovasculares. Según el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos de América (*NIH*) (*Tabla 2*):

	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Clase de Obesidad	Riesgo de enfermedad	
			Hombres (≤102 cm) Mujeres (≤88 cm)	Hombres (≥102 cm) Mujeres (≥88 cm)
Peso insuficiente	<18.5	-	-	-
Normal	18.5-24.9	-	-	-
Sobrepeso	25.0-29.9	-	Aumentado	Alto
Obesidad	30.0-34.9	I	Alto	Muy alto
Obesidad	35.0-39.9	II	Muy alto	Muy alto
Obesidad Extrema	+40.0	III	Extremadamente alto	Extremadamente alto

**Tabla 2.** Riesgo de padecer *T2DM*, hipertensión y enfermedades cardiovasculares según el *NIH*.

La distribución de la grasa corporal es un factor de riesgo importante de padecer enfermedades relacionadas con la obesidad y especialmente enfermedades cardiometabólicas cuando se presenta un exceso de grasa abdominal (17). Existen técnicas radiológicas para medir la grasa abdominal como la imagen por resonancia magnética o la tomografía computarizada pero son muy costosas, por lo que se emplea muy a menudo la medición de la circunferencia de la cintura (17).

La circunferencia de la cintura, por tanto, es un parámetro que proporciona una estimación de la circunferencia del cuerpo a nivel del abdomen (17). Existen diferentes puntos anatómicos de referencia para realizar la medición que se emplean en diferentes estudios clínicos entre los que podemos destacar el punto medio entre la costilla inferior y la cresta ilíaca, el ombligo o justo por encima de la cresta ilíaca (17).

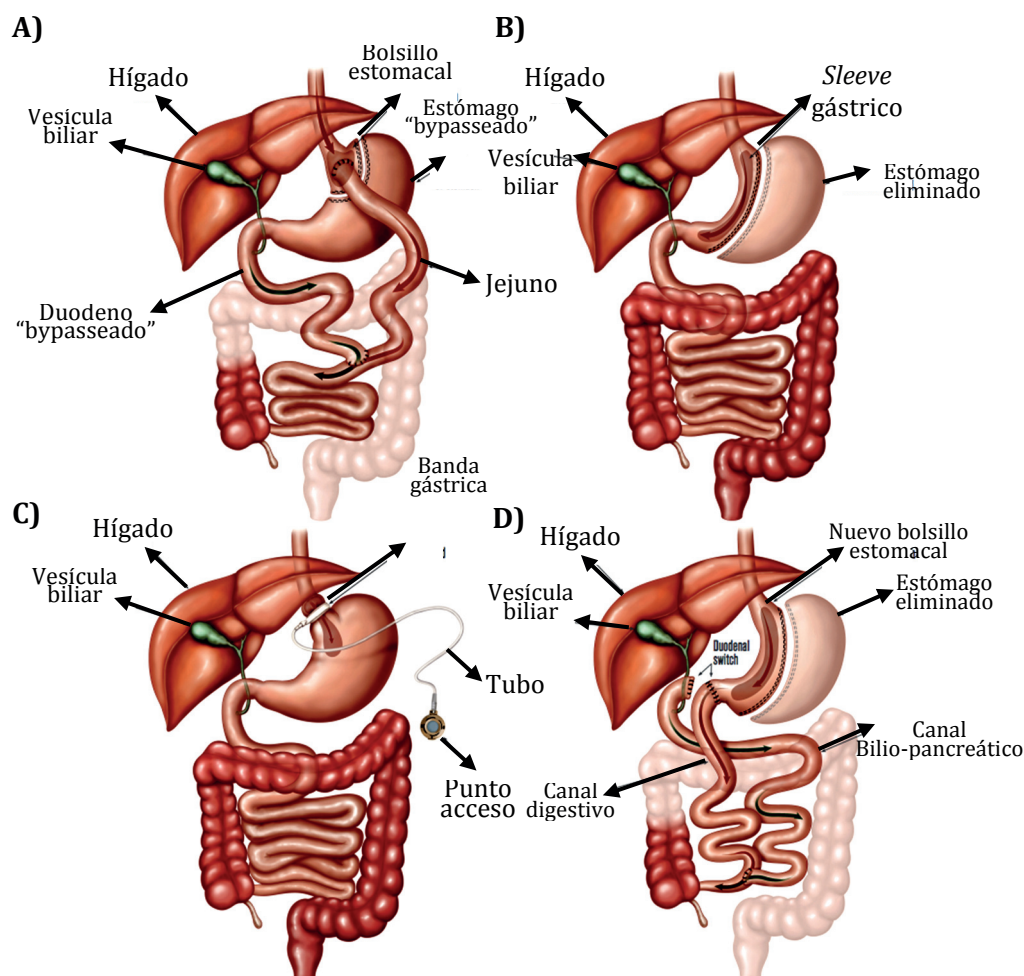
Los mecanismos responsables de la relación entre el exceso de grasa abdominal y las enfermedades cardiometabólicas no se conocen; una de las hipótesis propuestas defiende que la activación del sistema nervioso central por el estrés ambiental causa el depósito de tejido adiposo de forma preferente en el tronco y de las enfermedades cardiovasculares y metabólicas relacionadas con esta deposición, más recientemente se ha propuesto que el exceso de energía química resulta en la acumulación excesiva de grasa en zonas ectópicas, hígado y músculo esquelético, causando disfunción metabólica en ellos como dislipidemia y resistencia a insulina (17).

Muchas de las enfermedades endocrinas tienen establecidos tratamientos efectivos, sin embargo, en el caso de la obesidad no es así (3). El tratamiento de la obesidad, se centra en la intervención a distintos niveles (3): a) modificaciones en el estilo de vida, las cuales pueden incluir el asesoramiento a pacientes y familiares; intervención a nivel dietético, fomentándose la eliminación de bebidas azucaradas y la reducción del consumo de “comida rápida” y estimulando el consumo de frutas, verduras y aumento de la fibra en la dieta, entre otros; b) práctica de actividad física; c) terapias farmacológicas y cirugía bariátrica, esta última únicamente recomendada cuando el IMC es  $>40\text{kg/m}^2$  o  $>30\text{kg/m}^2$  si existen otras comorbilidades (18).

- **Cirugía bariátrica**

La cirugía bariátrica es el término con el que se hace referencia a la cirugía gastrointestinal para controlar el peso corporal (*baros*=peso), es decir la cirugía que tiene como principal objetivo prevenir la morbimortalidad ligada a la obesidad, reduciendo la comorbilidad asociada y mejorando la calidad de vida a través de una pérdida de peso suficiente y prolongada con un mínimo de complicaciones, mientras que el término de cirugía metabólica hace referencia el uso principal de la cirugía con el propósito de tratar la *T2DM* y/o el síndrome metabólico (19). Con el tiempo, ambos procedimientos han ido ganando popularidad como elección para el tratamiento de la obesidad mórbida y la *T2DM* ya que se alcanzan mejores resultados que con otros tratamientos estándar (19).

Existen distintos procedimientos quirúrgicos, que se clasifican en restrictivos, malabsortivos o una combinación de ambos (20). De todos ellos, los más empleados son el *bypass* gástrico en Y de Roux, la gastrectomía vertical en manga o *sleeve*, la banda gástrica ajustable y la derivación biliopancreática con o sin cruce duodenal, pudiendo realizarse todos ellos mediante laparoscopia en la mayoría de los casos (20) (*Figura 3*). Mediante el empleo de técnicas laparoscópicas, este tipo de cirugías se han hecho cada vez más seguras, siendo la tasa de mortalidad del 0,1% (inferior a la de la colicestomía que es del 0,7%) (21).



**Figura 3.** Esquema de los principales procesos quirúrgicos de cirugía bariátrica y/o metabólica. Modificado de (22).

### • *Bypass gástrico en Y de Roux*

Combina procedimientos restrictivos, por la creación de un pequeño bolsillo o bolsa estomacal de 15-30 ml, y malabsortivos ya que se conecta esta bolsa estomacal con el intestino delgado, de forma que los nutrientes evitan la mayor parte del estómago y la primera sección del intestino delgado, resultando en una reducción de la absorción de alimentos y nutrientes (23). Anatómicamente, el asa no alimentaria o biliopancreática abarca desde el ligamento de Treitz hasta la jejunostomía, el asa alimentaria es el segmento entre la bolsa gástrica y la jejunostomía y el intestino delgado remanente desde la jejunostomía hasta la válvula ileocecal se conoce como canal común (*Figura 3a*) (23). De esta forma, con el *bypass* gástrico se desvían las secreciones gástricas y la bilis al segmento medio jejunal resultando en alteraciones neuro-hormonales, del ácido biliar y del microbioma que afectan al hambre, saciedad, sensibilidad a la insulina e incluso a la homeostasis de la glucosa (23, 24).



- **Gastrectomía vertical en manga o *sleeve***

Con esta intervención se reduce el volumen gástrico aproximadamente un 80% mediante la resección de la mayor parte de la curvatura del estómago con conservación del píloro, así el estómago tiene finalmente forma de manga o tubo (*Figura 3b*) (25, 26). Inicialmente se pensó como una cirugía puramente restrictiva, sin embargo, en la actualidad se sabe que la eliminación de células endocrinas con la resección del segmento gástrico causa una reducción del hambre y mejora el metabolismo de la glucosa (25, 26). Si la comparamos con la anterior, con la gastrectomía vertical en manga se evita la obstrucción intestinal o las úlceras marginales que pueden aparecer tras el *bypass* gástrico, sin embargo, no es tan efectiva para el tratamiento del reflujo gastroesofágico y la *T2DM*. En ocasiones, tras esta cirugía puede realizarse un *bypass* gástrico o una técnica malabsortiva tras perder una cantidad significativa de peso, siendo la primera una cirugía de pérdida de peso para hacer la segunda cirugía menos arriesgada y más sencilla técnicamente (25, 26).

- **Banda gástrica ajustable**

Es un procedimiento puramente restrictivo, con el que se produce un estrechamiento de la porción proximal del estómago con una banda ajustable que reduce la capacidad del flujo de los contenidos gástricos (*Figura 3c*) (27, 28). Los primeros estudios demostraron su efectividad en la pérdida de peso y mejora de comorbilidades, sin embargo en la actualidad se sabe que es relativamente ineficaz a largo plazo y que conlleva complicaciones frecuentes como el prolapso gástrico, reflujo, disfagia, deslizamiento de la banda o dismotilidad esofágica (27, 28), por lo que en la actualidad su realización está en declive (29).

- **Derivación biliopancreática con o sin cruce duodenal**

Este tipo de intervención es poco frecuente comparado con el *sleeve* o con el *bypass* gástrico. Con ella se dirigen las secreciones pancreáticas y biliares al intestino delgado distal (más distal que con el *bypass* gástrico) (*Figura 3d*). Este procedimiento, comparado con otras cirugías bariátricas y metabólicas, está asociado con una mayor resolución de la *T2DM* (30).

### 1.1.3 Tejidos implicados en la obesidad

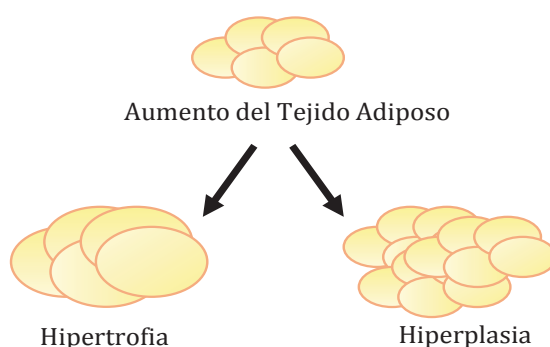
La obesidad modifica el metabolismo del tejido adiposo e incrementa la liberación de hormonas y moléculas proinflamatorias, sin embargo, en la homeostasis del peso corporal, también están implicados otros tejidos como el hígado, músculo, páncreas, intestino, estómago y cerebro (31). De los cuales nos centraremos en:

## • Tejido Adiposo

El tejido adiposo constituye entre un 20-28% de la masa corporal de individuos delgados, con diferencias entre sexos y edades; en individuos obesos puede alcanzar el 80% del peso corporal (32). Presenta variedad de funciones dependiendo tanto del tipo como de la localización anatómica del depósito graso, variedad de fenotipos y diferente composición celular (33).

Inicialmente fue considerado como un depósito de triacilglicerol, sin embargo, en la actualidad también es considerado como un órgano dinámico que secreta numerosos factores con funciones tanto autocrinas, como paracrinas y endocrinas (33, 34).

Cabe destacar la diferencia entre la hiperplasia de los adipocitos o adipogénesis (aumento del número de adipocitos) y la hipertrofia (aumento del tamaño de los adipocitos) (Figura 4) (35). La expansión de la masa grasa requiere tanto del aumento del tamaño de los adipocitos como del aumento del número de estos (35). Por un lado, existen mecanismos que permiten la hipertrofia mediante el aumento de la toma de nutrientes, mientras que el mecanismo de la hiperplasia está basado en precursores que hacen que el tejido adiposo se diferencie en adipocitos blancos maduros bajo condiciones que estimulan la activación del receptor activado por el proliferador de peroxisomas tipo gamma (*PPAR $\gamma$* ) (35). Y además debemos tener en cuenta que en adultos, la adipogénesis o tasa de conversión a adipocitos maduros es baja (35).



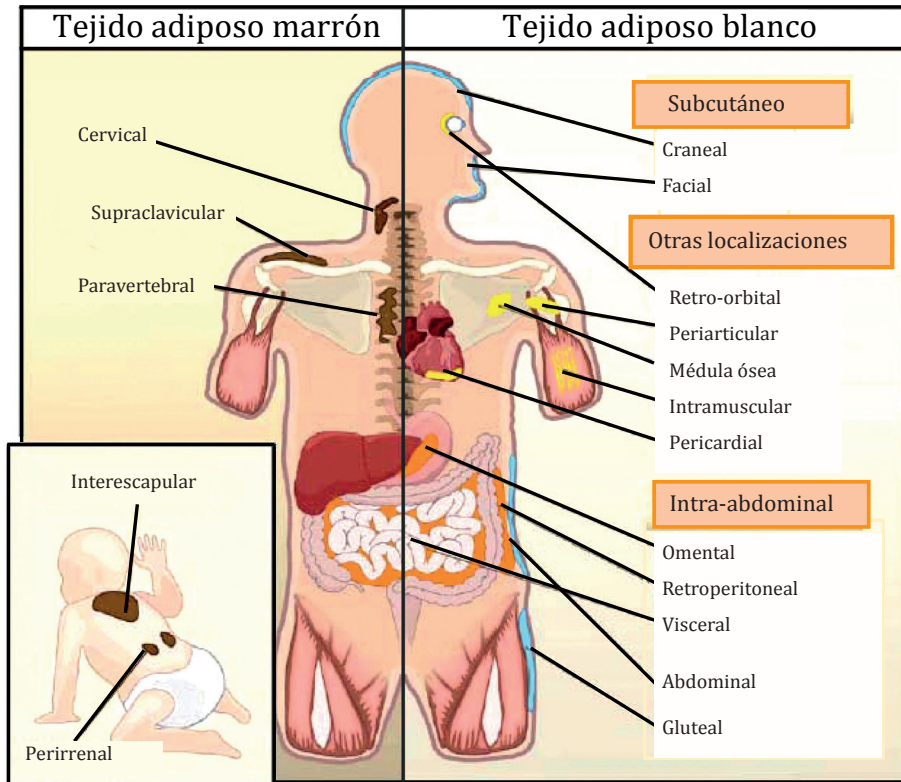
**Figura 4.** Procesos de cambio constante en el tejido adiposo: hipertrofia e hiperplasia.

Existen 3 tipos diferentes de tejido adiposo: el tejido adiposo blanco (*WAT*), el tejido adiposo marrón (*BAT*) y el tejido adiposo beis (36):

### - *WAT*

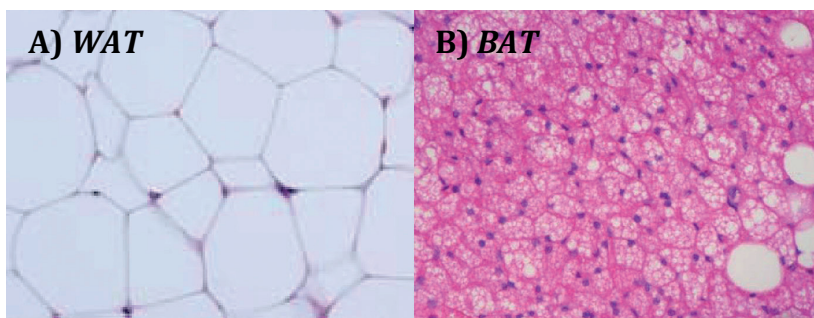
Funciona como el principal almacén de energía del organismo y como aislante y protector mecánico de muchos órganos (33). Se encuentra ampliamente distribuido por el cuerpo

(Figura 5), abarcando casi la totalidad de la región subcutánea y alberga las vísceras en la cavidad abdominal, pero también tiene un papel importante en el mantenimiento de la temperatura corporal (33, 36) y regulación de otras funciones biológicas (coagulación, inmunidad, angiogénesis, etc.) (33). Es su capacidad para acumular y proporcionar energía, las que hacen que sea un sistema implicado en el balance energético (33).



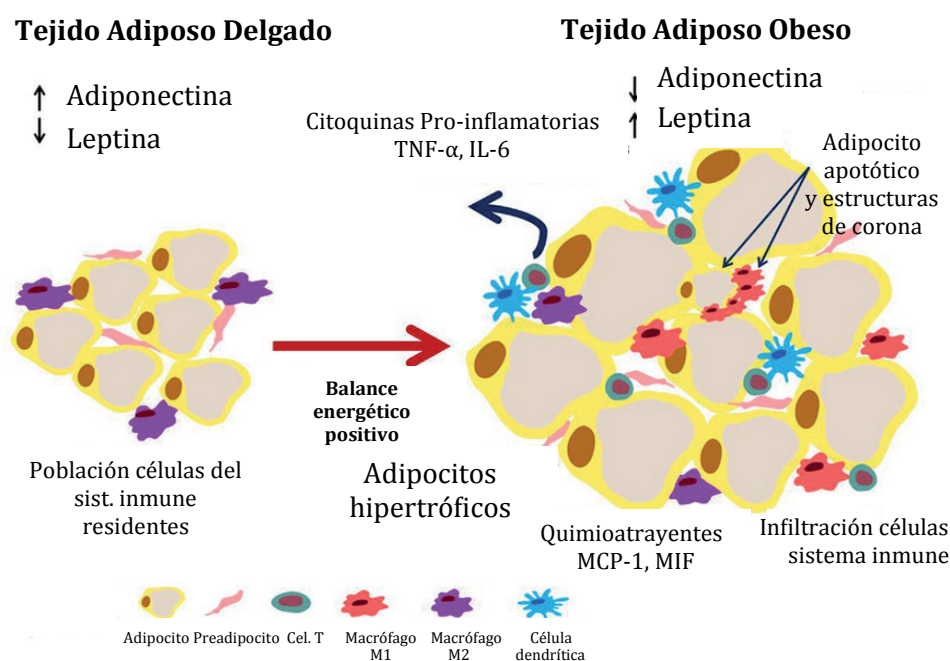
**Figura 5.** Distribución corporal del BAT y WAT en humanos adultos y recién nacidos. Modificado de (34).

El WAT está constituido por adipocitos, los cuales presentan una gran vacuola de grasa que abarca todo el citoplasma y células del estroma vascular (Figura 6) (34):



**Figura 6.** Fotografías al microscopio óptico. Se puede observar el WAT (A) y BAT (B) en las que se pueden apreciar diferencias morfológicas entre ambos tejidos. Modificado de (34).

Aunque los adipocitos ocupan casi toda el área del tejido adiposo, cabe destacar que entre el 60 y el 80% de las células de este tejido, se corresponden con células del estroma vascular, la mayoría de las cuales son preadipocitos, macrófagos, células madre, células endoteliales e incluso neutrófilos y linfocitos (37). Las proporciones entre los distintos tipos celulares varían según la situación fisiológica y la localización del tejido; la abundancia de macrófagos parece estar relacionada con el tamaño del *WAT*, por tanto en el *WAT* de individuos obesos, el número de macrófagos es mayor que en individuos con peso normal (Figura 7), y además, son los responsables de la secreción de citoquinas proinflamatorias, mientras que las células madre que podemos encontrar en este tejido, tienen características similares a las células mesenquimales de la médula ósea, cuya presencia en este tejido, pone en evidencia la capacidad para generar nuevos adipocitos (34).

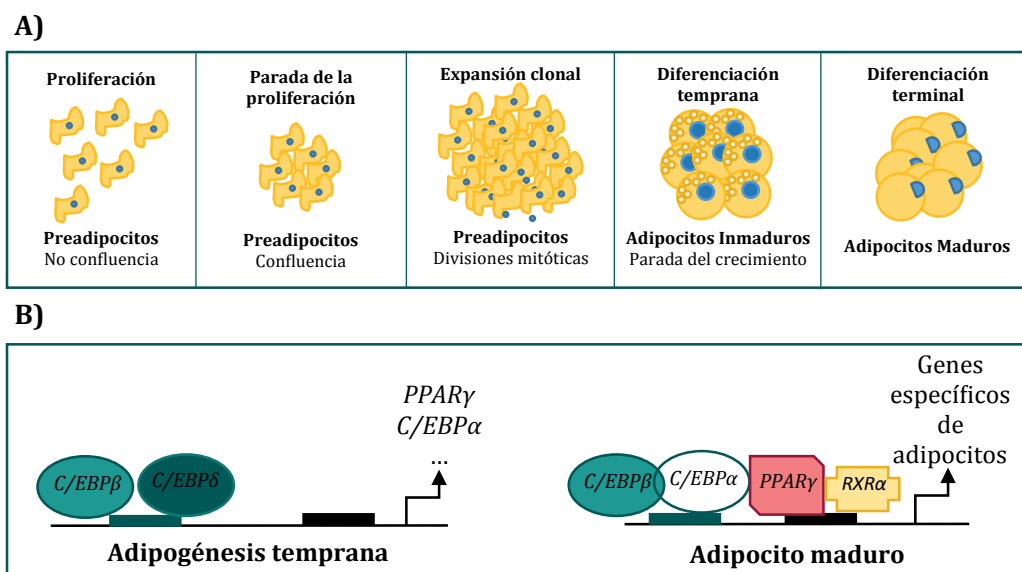


**Figura 7. Diferencias tejido adiposo individuos delgados e individuos obesos.** La expansión del tejido adiposo da lugar a inflamación y desregulación metabólica. Se produce la secreción de mediadores pro-inflamatorios como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e interleuquina 6 (IL-6) y la infiltración de células del sistema inmune y macrófagos. Modificado de (37).

En humanos, de forma clásica se diferencian varios tipos de depósitos de tejido adiposo blanco, el visceral u omental y subcutáneo (38). El tejido adiposo visceral, abarca el tejido adiposo contenido en la cavidad intraabdominal y rodeando al omento, estómago y riñones (38). El tejido adiposo subcutáneo se localiza bajo la piel, está ampliamente distribuido y puede encontrarse en altas concentraciones en el abdomen y piernas (región femoral-glútea) (38). Existen diferencias en la biología de estos dos depósitos, por ejemplo, difieren en la secreción de adipoquinas y perfiles de secreción, además de diferir en su actividad metabólica,

respuesta a hormonas, capacidad proliferativa, tasa de apoptosis y tamaño de los adipocitos (38). En el tejido adiposo visceral la adipocina proinflamatoria más expresada y secretada es la resistina, mientras que el tejido adiposo subcutáneo secreta principalmente grandes cantidades de adiponectina, la cual juega papeles importantes en la sensibilidad a la insulina e inflamación (39). Además, centrándonos en la obesidad, el tejido adiposo visceral libera más citoquinas inflamatorias y contiene más cantidad de macrófagos, células T y células “*natural killer*” que el tejido adiposo subcutáneo, lo que ha llevado a establecerse una fuerte asociación entre la acumulación de tejido adiposo visceral y la resistencia a insulina (40). Además, los efectos adversos de la acumulación de tejido adiposo visceral, también están relacionados con el impacto sobre el metabolismo hepático, debido a que las adipocinas, citoquinas y ácidos grasos libres de este tejido son capaces de liberarse a la vena portal (41, 42). Por otro lado, el exceso de grasa visceral se ha asociado con el incremento de padecer enfermedades relacionadas con la obesidad y la mortalidad, mientras que para el tejido adiposo subcutáneo se ha descrito un papel protector (41, 42).

Los preadipocitos, son células sin diferenciar que son estimuladas para formar adipocitos, tienen pequeño tamaño y morfología similar a un fibroblasto, tras cuya estimulación pueden derivar a adipocitos maduros (34). Su capacidad para proliferar y diferenciarse así como la susceptibilidad para sufrir apoptosis difiere por la localización del tejido (34). Existen diferentes modelos celulares en los que se ha estudiado el proceso de diferenciación de preadipocitos a adipocitos como las líneas celulares 3T3-L1 y 3T3-F442A (34). Este proceso de diferenciación de preadipocitos a adipocitos maduros se lleva a cabo en 4 etapas (*Figura 8*): la primera, es una parada de la proliferación, que es inducida por la inhibición por contacto (llegada a la confluencia), momento a partir del cual el preadipocito está comprometido a diferenciarse a adipocito, la segunda etapa es una expansión clonal, que consiste en divisiones mitóticas con la finalidad de sincronizar el ciclo celular, a continuación se produce una diferenciación temprana, durante la cual se detiene la diferenciación celular, comienzan a expresarse genes característicos de adipocitos y comienza la acumulación de lípidos y por último, se produce la diferenciación terminal, durante la cual los adipocitos adquieren su morfología típica redondeada y se expresan genes de adipocitos maduros (34).



**Figura 8. Proceso de diferenciación de preadipocitos a adipocitos maduros.** En la figura se esquematiza como la diferenciación de preadipocitos a adipocitos implica cambios en la morfología celular así como una red de factores de transcripción responsables de la expresión de proteínas clave en la inducción de la formación de adipocitos maduros, entre ellos, destacan *PPAR $\gamma$*  y las proteínas de unión al activador CCAAT (*C/EBP*) por ser reguladores clave de este proceso. Modificado de (34).

Todo el proceso descrito con anterioridad, se encuentra regulado bajo una cascada de factores transcripcionales, entre los que juega un papel fundamental *PPAR $\gamma$* , el cuál es necesario tanto para la diferenciación de los adipocitos como para el mantenimiento de la diferenciación y otros como *C/EBP* que incluye 5 miembros (*C/EBP $\alpha$* , *C/EBP $\beta$* , *C/EBP $\delta$* , *C/EBP $\gamma$*  y el gen que codifica para la proteína homóloga de *C/EBP* denominado *CHOP*, cuya expresión es secuencial durante la diferenciación de los adipocitos): la expresión de *C/EBP $\beta$*  es fundamental en los primeros estadios de diferenciación, el cual junto con *C/EBP $\delta$*  van a promover la expresión de *C/EBP $\alpha$*  y *C/EBP $\gamma$* , necesarios para la diferenciación total de los adipocitos. Aunque *C/EBP $\alpha$*  es necesario para la diferenciación junto con *PPAR $\gamma$* , es éste último el que parecer ser el dominante en el proceso (34). Pero además, este proceso también se ve regulado por microARNs (miRs) (43).

### - *BAT*

Inicialmente fue descrito como un tejido poco activo, pero en la actualidad se sabe que es dinámico y que secreta numerosos factores lipídicos y proteicos (33, 34). Está especializado en la producción de calor (termogénesis) mediante el metabolismo de los ácidos grasos, a través de la proteína desacopladora 1 (UCP1), mediante el bloqueo del acoplamiento de la cadena respiratoria a la Adenosín Trifosfato (ATP) sintetasa sintetasa (33, 34). Solo se

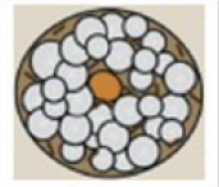
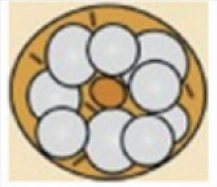
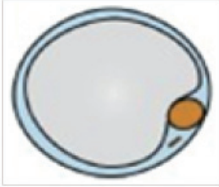
encuentra en mamíferos, en humanos adultos se localiza principalmente en la región supraclavicular, pero también en pequeños depósitos alrededor de los riñones y corazón mientras que es más abundante en el feto y recién nacidos, disminuyendo progresiva y rápidamente tras el nacimiento (*Figura 5*) (33, 34, 36). En roedores es abundante en el período perinatal, y su depósito más abundante es el interescapular (33, 34, 36).

Los adipocitos del *BAT*, tienen un tamaño inferior a los del *WAT*, tienen un mayor número de gotas lipídicas citoplasmáticas de diferentes tamaños y citoplasma relativamente abundante, núcleo esférico y ligeramente excéntrico, además de numerosas mitocondrias que liberan calor mediante la oxidación de los ácidos grasos (*Figura 6*) (33). Su color deriva de su gran vascularización (está atravesado por más vasos sanguíneos que el *WAT*) y la abundancia de mitocondrias (33).

### - Tejido adiposo beis:

El tejido adiposo beis fue identificado en ciertos tejidos adiposos como el inguinal en ratones, siendo considerado como el tercer tipo de tejido adiposo (36). Sin embargo, se ha sugerido que estos adipocitos beis podrían tener un origen distinto, derivando de un linaje diferente no compartido con los adipocitos marrones o blancos, aparecer a partir de los adipocitos blancos preexistentes o una combinación de ambas hipótesis (36). Muchos autores no distinguen entre adipocitos marrones y beis, especialmente en humanos, mientras que en ratones se distinguen con mayor claridad (36). Los adipocitos beis, son por tanto, depósitos heterogéneos, con un fenotipo similar a los adipocitos blancos, expresando bajos niveles de *UCP1*, pero cuando son estimulados, adquieren un fenotipo similar a los adipocitos marrones (*browning*), desencadenando incluso un aumento de la termogénesis y por tanto de los niveles de *UCP1* (aunque no alcanzan los valores del *BAT*) (44), este proceso de *browning* aparece en respuesta al frío, pero también se asocia con caquexia en cáncer y quemaduras severas (45).

Los adipocitos beis, como se mencionó anteriormente, son distintos de los adipocitos marrones clásicos, sin embargo, parece que su principal función también es generar calor para mantener la temperatura corporal, incluso existen varios estudios que indican que estos adipocitos afectan a la regulación de la glucosa y podrían tener un papel importante en el tratamiento de la *T2DM* (46). Existen hipótesis alternativas, que defienden que el fenómeno de *browning* podría responder a cambios en el ambiente metabólico intracelular, por ejemplo asociado con estadios en los que se incrementa de forma sistémica la demanda energética (ejercicio físico, estrés por frío, etc.) (46). En resumen, las diferencias entre los adipocitos marrones, blancos y beige atienden entre otros, a la morfología y expresión de genes (*Figura 9*) (45):

Adipocito Marrón	Adipocito Beis	Adipocito Blanco
		
<p><i>UCP1</i>: Positivas</p> <p>Alta densidad mitocondrias</p> <p>Numerosas gotas lipídicas</p> <p>Funciones: termogénesis y endocrinas</p>	<p><i>UCP1</i>: Positivas</p> <p>Densidad mitocondrias media</p> <p>Pocas a muchas gotas lipídicas</p> <p>Funciones: ¿termogénesis? ¿endocrinas?</p>	<p><i>UCP1</i>: Negativas</p> <p>Baja densidad mitocondrias</p> <p>Una gran gota lipídica</p> <p>Funciones: Almacén de energía / endocrinas</p>

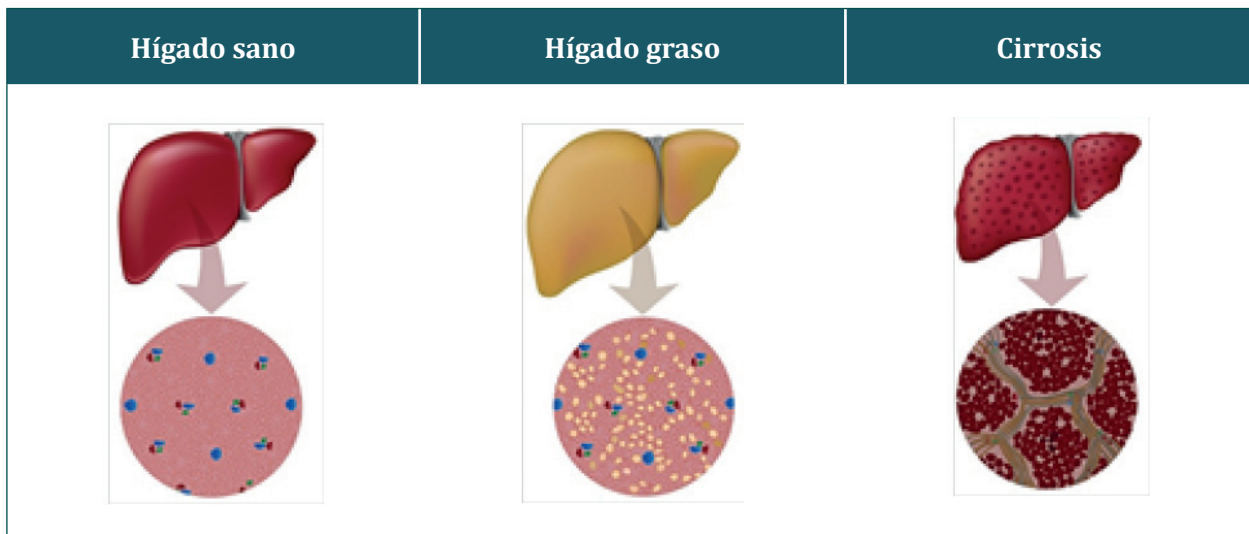
**Figura 9. Diferencias y similitudes entre adipocito marrón, beis y blanco.** Modificado de (45).

### • Hígado

El hígado es considerado uno de los órganos más importantes para la homeostasis metabólica y la acumulación de vesículas lipídicas en él, puede causar una desregulación metabólica en diferentes grados, así como una enfermedad progresiva, denominada hígado graso no alcohólico, relacionada con la reducción de la sensibilidad a la insulina (1).

El hígado graso no alcohólico se caracteriza por la presencia de una acumulación excesiva de grasa dentro del hígado de individuos cuyo consumo del alcohol es nulo o casi nulo. Abarca un amplio rango de daños en el hígado, desde esteatosis simple, fibrosis avanzada hasta la progresión a cirrosis (*Figura 10*), aunque esta última ocurre con poca frecuencia, e incluso cáncer, para cuyos diagnósticos definitivos se requiere una biopsia del hígado (47-49). La esteatosis se determina estimando la proporción de hepatocitos que contienen gotas lipídicas. Su prevalencia alcanza el 30% de los adultos y casi el 5% en niños y se ha descrito que aumenta la tasa de mortalidad de las personas que lo padecen respecto a personas sanas de la misma edad y sexo (47-49).





**Figura 10. Rango de daños en el hígado.** Modificado de <http://notes.medicosnotes.com>.

En función de la patogénesis subyacente, el hígado graso no alcohólico puede clasificarse como primario o secundario (47). El primario está asociado con la resistencia a insulina y síndrome metabólico mientras que el secundario está relacionado con otros factores como pueden ser la nutrición parenteral total, cirugía abdominal, uso de algunos medicamentos, exposición a algunos disolventes orgánicos, pero también se asocia con algunas enfermedades como la hepatitis C, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, algunos trastornos metabólicos como el hipopituitarismo o la obesidad hipotalámica, entre otros (47).

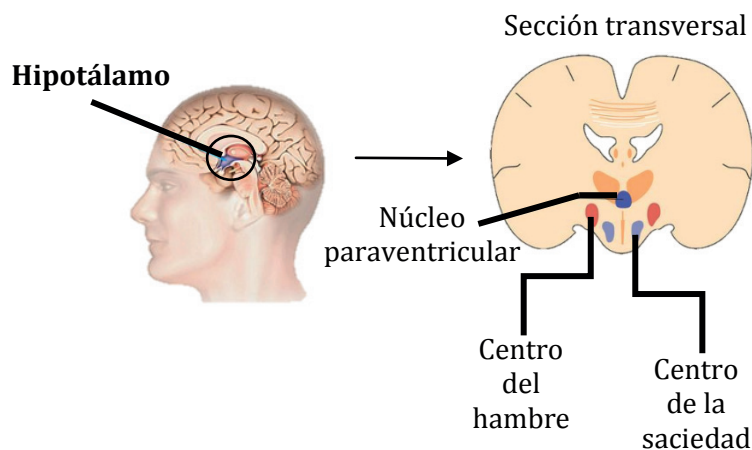
El hígado graso no alcohólico se relaciona estrechamente con la obesidad, sin embargo, lo que parece desempeñar un papel importante, es la distribución de la grasa corporal, en concreto, el exceso de grasa intraabdominal, parece ser clave en la patogénesis de esta alteración, debido posiblemente a su fuerte asociación con la resistencia a la insulina y posiblemente como fuente de ácidos grasos libres (47, 48). En concreto, existen estudios publicados en los que encontraron que entre 30-70% de los pacientes estudiados con *T2DM*, padecían también esta patología, mientras que su prevalencia varía entre el 10-56% en los pacientes obesos no diabéticos (50).

A nivel molecular, la acumulación de grasa hepática, es resultado de una desregulación en el equilibrio entre el suministro, consumo y oxidación o eliminación hepática de los triglicéridos (47, 50). Los lípidos que contribuyen al desarrollo del hígado graso no alcohólico tienen diferentes fuentes de procedencia, incluyéndose los ácidos grasos no esterificados en plasma a partir del tejido adiposo (en concreto el 60-80% del triacilglicerol hepático deriva de los ácidos grasos libres circulantes), los ácidos grasos sintetizados de *novo* en el hígado a través de la lipogénesis (aproximadamente el 25% del triacilglicerol hepático deriva de la li-

pogénesis de *novo*) y los ácidos grasos procedentes de la dieta, que aportan aproximadamente el 15% de los ácidos grasos libres (47, 50). Cabe destacar, que modelos animales sugieren que la acumulación de triglicéridos en el hígado podría tener una acción hepatoprotectora y no hepatotóxica como cabría pensar, ya que disminuye la acumulación de ácidos grasos libres en los hepatocitos, su peroxidación así como el estrés oxidativo (47).

## • Cerebro

A nivel central, el hipotálamo es la estructura del cerebro más importante que controla la ingesta de alimentos, por tanto es la región donde se integra una red compleja de vías neuronales que regulan el hambre y la saciedad, presentando dos áreas que juegan un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis energética corporal (*Figura 11*) (51). El núcleo ventro-medial hipotalámico (*VNM*), es la parte conocida como “centro de la saciedad” y su estimulación causa la interrupción de la ingesta de alimentos, mientras que una lesión en el *VMN* induce hiperfagia y obesidad (51). El área hipotalámica lateral, es conocida como el “centro del hambre” y su estimulación o lesión produce una respuesta opuesta a la anteriormente descrita (51).



**Figura 11.** Ubicación del hipotálamo, el centro de saciedad y el centro del hambre. Modificado de (51).

El sistema nervioso central (SNC) recibe información del estado del organismo (*Tabla 3*) y envía señales hacia los diversos órganos y sistemas periféricos para conseguir el balance energético a corto y a largo plazo (52). Todas estas señales se pueden agrupar en función de dónde se originan (en el SNC o en órganos y tejidos periféricos), en función de su duración (a corto plazo y a largo plazo) y en función de sus efectos (orexigénicos que activan las vías anabólicas o anorexigénicos que activan las vías catabólicas) (52). Mediante las vías anabólicas se produce el mantenimiento o ganancia de peso corporal mientras que mediante

las vías catabólicas se encargan del mantenimiento o pérdida del peso corporal; ambas vías funcionan mediante una red de comunicación nerviosa (sináptica) y/o química (endocrina, paracrina y autocrina) (52).

Regulación a Corto Plazo	Regulación a Largo Plazo
<p><b>Sistema Anabólico</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Factores neurosensoriales (ej. Receptores externos, visión, olfato, gusto...)</li> <li>• Factores gastrointestinales (ej. Contracción rítmica gástrica...)</li> <li>• Factores metabólicos (ej. Niveles de glucemia, índice metabólico...)</li> <li>• Señales moleculares periféricas (ej. Ghrelina, hormonas tiroideas, glucocorticoides...)</li> <li>• Señales moleculares centrales (ej. Neurotransmisores, serotonina, noradrenalina...)</li> </ul>	<p><b>Sistema Anabólico</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Neuropéptidos orexigénicos (ej. Neuropéptido Y, proteína Agouti, orexinas A y B, ghrelina, hormona concentradora de melanina...)</li> </ul>
<p><b>Sistema Catabólico</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Factores gastrointestinales. (ej. Receptores mecánicos, receptores químicos...)</li> <li>• Factores metabólicos (ej. Índice metabólico, concentración de metabolitos...)</li> <li>• Señales moleculares periféricas (ej. Colecistocinina, enterostatina, péptidos similares al glucagón, amilina, péptido liberador de gastrina...)</li> </ul>	<p><b>Sistema Catabólico</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hormonas (ej. Leptina, insulina, péptido YY...)</li> <li>• Neuropéptidos anorexigénicos (ej. Sistema de melanocortinas, péptido liberador de prolactina, citosinas...)</li> </ul>

**Tabla 3. Señales que regulan el hambre y la saciedad a corto y largo plazo.**

### 1.1.4 Síndrome metabólico

Históricamente, el síndrome metabólico comenzó como un concepto y no como un diagnóstico; en los años 20 fue descrito al demostrarse la asociación entre la hipertensión, hiperglicemia y la gota; más tarde, en el año 1947 se demostró que la obesidad central estaba relacionada con los desórdenes metabólicos encontrados en enfermedades cardiovasculares y *T2DM* (53). Llegando a definirse en la actualidad como el conjunto de factores fisiológicos, bioquímicos, clínicos y metabólicos que incrementan de forma directa el riesgo de padecer arterioesclerosis, *T2DM* y mortalidad por cualquier causa (53).

Debido a la cantidad de definiciones existentes, la Federación Internacional de la Diabetes (*IDF*) y la OMS han llegado a un consenso para definir el síndrome metabólico como uno de los grupos de factores de riesgo más peligroso de padecer un infarto al corazón; este grupo incluye factores como la diabetes y prediabetes, obesidad abdominal, dislipemias y presión arterial elevada. Por tanto, de acuerdo con la definición de la *IDF*, para considerar que una persona adulta tiene síndrome metabólico deberá padecer al menos tres de los factores detallados a continuación (*Tabla 4*) (53). Sin embargo, no existe un consenso en los criterios de diagnóstico para la población infantil (53).

Factor	Valor del factor
Circunferencia de la cintura	Hombres ( $\geq 94$ cm) Mujeres ( $\geq 80$ cm) Salvo para IMC mayores a $30 \text{ kg/m}^2$ que ya se asume obesidad central
Niveles elevados de triglicéridos	$\geq 150 \text{ mg/dl}$ ( $1,7 \text{ mmol/l}$ ) o tratamiento específico para esta anomalía
Niveles de colesterol HDL bajos	$< 40 \text{ mg/dl}$ ( $1,03 \text{ mmol/l}$ ) en hombres $< 50 \text{ mg/dl}$ ( $1,29 \text{ mmol/l}$ ) en mujeres o tratamiento específico para esta anomalía
Presión sanguínea elevada	Presión sanguínea sistólica $\geq 130$ o diastólica $\geq 85 \text{ mm Hg}$ o con tratamiento para la hipertensión previamente diagnosticada
Niveles de glucosa en plasma elevados en ayuno	$\geq 100 \text{ mg/dl}$ ( $5,6 \text{ mmol/l}$ ) o <i>T2DM</i> previamente diagnosticada

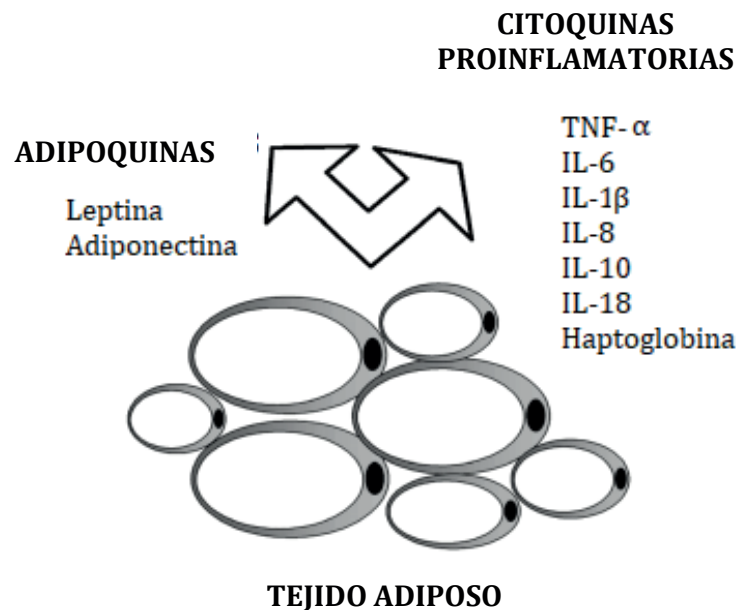
**Tabla 4.** Factores que definen el síndrome metabólico según la *IDF*.

Se estima que en la actualidad el 20-35% de la población adulta presenta síndrome metabólico, presentando el doble de probabilidades de morir y el triple de padecer un infarto al corazón o accidente cerebro-vascular que las personas que no presentan síndrome metabólico; y como se mencionó anteriormente, presentan mayor riesgo de desarrollar *T2DM* (54, 55).

Esta misma federación destacó otra serie de parámetros que parecen estar relacionados con el síndrome metabólico y que deben incluirse en estudios de investigación: distribución anormal de la grasa corporal, dislipidemia aterogénica, disglucemia, resistencia a insulina, desregulación vascular, estado proinflamatorio, estado protrombótico y factores hormonales (53). El uso de estos factores adicionales en investigación, permite modificar la definición de síndrome metabólico si es necesario y la validación de nuevas definiciones clínicas entre los diferentes grupos étnicos (53).

### 1.1.5 Obesidad e inflamación

La inflamación ocurre con frecuencia en respuesta a infecciones, alergias, respuestas autoinmunes o traumatismos tisulares y se caracteriza por signos como el enrojecimiento, hinchazón, dolor e incluso la pérdida de la función como consecuencia de la producción de mediadores proinflamatorios como los lipídicos, citocinas, quimiocinas y liberación de restos celulares (56). A diferencia de esta respuesta inflamatoria clásica, la respuesta inflamatoria en la obesidad, se inicia con otro tipo de señales, en este caso intrínsecas, como pueden ser la detección de nutrientes o el estrés del retículo endoplasmático (56). Estas señales, promueven la respuesta inflamatoria a través de la activación de la vía de señalización del factor de transcripción nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), la producción de citoquinas proinflamatorias (*Figura 12*), la generación de especies reactivas de oxígeno y la síntesis de adipoquinas proinflamatorias por los adipocitos y las células inmunes del tejido adiposo, como los leucocitos (56). Estos leucocitos, a su vez elaboran mediadores proinflamatorios que además de contribuir a la inflamación local lo hacen también extendiéndolos a la circulación (nivel sistémico) lo que causa un estado de bajo grado de inflamación crónica (56). Pero también es importante destacar la existencia de citoquinas inflamatorias que no son producidas únicamente por el tejido adiposo, sino también por otros tejidos u órganos (57).



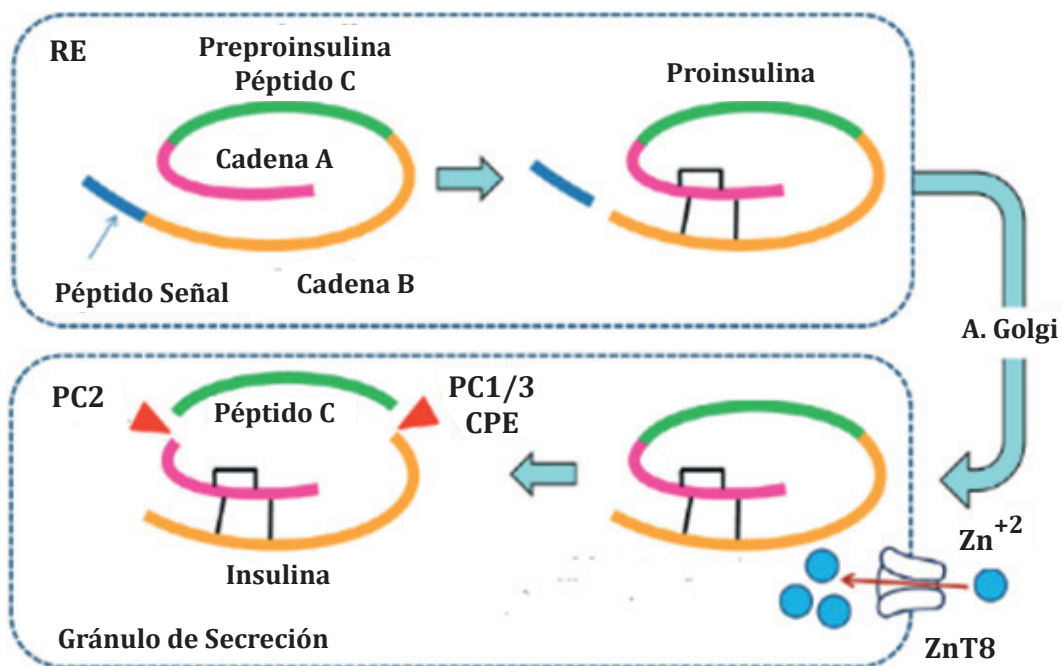
**Figura 12.** Citoquinas proinflamatorias y adipoquinas producidas por el tejido adiposo. Modificado de (57).

Como ya se ha mencionado, la inflamación del tejido adiposo con frecuencia se vincula con la obesidad y con la *T2DM*, sin embargo, además de las adipoquinas proinflamatorias existen otras moléculas que se han estudiado mucho menos (58). Un ejemplo son los factores nucleares, entre ellos el receptor huérfano  $\alpha$  relacionado con el ácido retinoico (*ROR $\alpha$* ) (58). *ROR $\alpha$*  se expresa en hígado, músculo esquelético, piel, pulmones, tejido adiposo, riñones, timo y cerebro (59), está relacionado con la regulación de la respuesta inflamatoria en varios tejidos, sin embargo su papel en el tejido adiposo es poco conocido y los resultados actuales son controvertidos (58). Los ratones staggerer (*ROR $\alpha^{sg/sg}$* ) son ratones mutantes que carecen de un *ROR $\alpha$*  funcional (59), estos animales presentan unos niveles de colesterol en plasma inferiores respecto a los silvestres y además son resistentes a la ganancia de peso corporal y a desarrollar esteatosis hepática cuando son sometidos a dieta alta en grasa (59, 60). Los ratones *ROR $\alpha^{-/-}$*  tienen niveles de colesterol y triglicéridos normales pero niveles de glucosa inferiores respecto a los silvestres (59). Curiosamente, estudios in vitro demuestran que los niveles de expresión de *ROR $\alpha$*  en la línea celular 3T3-L1 aumentan con la adipogénesis mientras que la sobreexpresión de *ROR $\alpha$*  en esta línea celular causa un descenso de la adipogénesis evidenciado por un descenso en la expresión de marcadores de adipogénesis y acumulación de lípidos, al contrario de esto, los fibroblastos embrionarios de ratones *staggerer* se diferencian a adipocitos de una forma más eficiente, lo que no es consistente con su reducida adiposidad (61). En ratones *ob/ob* se observa sin embargo que *ROR $\alpha$*  estimula la respuesta inflamatoria en el tejido adiposo causando estrés del retículo (58).

### 1.1.6 Hormonas relacionadas con la obesidad

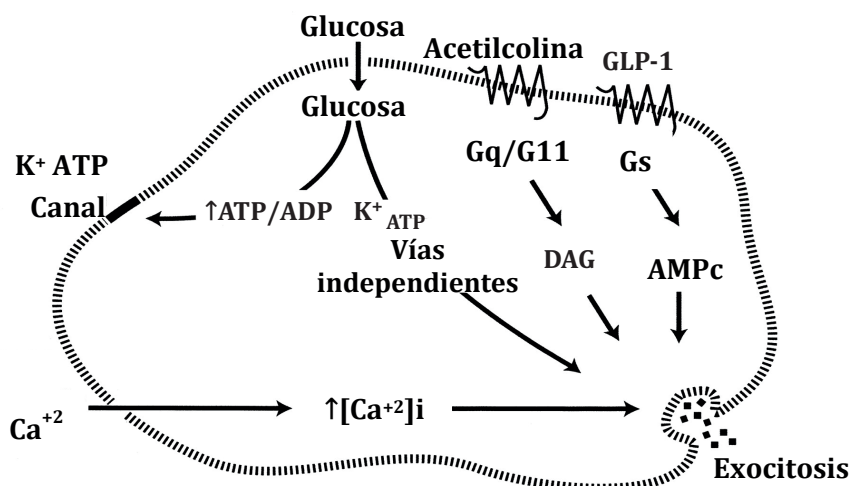
#### • Insulina

Esta hormona fue aislada por primera vez en 1921 del tejido pancreático de perros (62). Es producida en las células  $\beta$  del páncreas y es un regulador crítico del metabolismo intermedio de 51 aminoácidos y con un peso molecular de 5,8 kDa (63,64). Es sintetizada como preproinsulina (110 aminoácidos), que es codificada por el gen de la insulina (*INS*), y se transforma en proinsulina mediante la separación del péptido señal por una peptidasa en el retículo endoplasmático (RE), la preproinsulina es almacenada en gránulos de secreción inmaduros revestidos por clatrina en el aparato de Golgi, y en éste, la preproinsulina se convierte en insulina y péptido C tras la alineación de los puentes disulfuro entre las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  y se almacena en gránulos de secreción hasta ser liberada bajo demanda (Figura 13), estos gránulos de secreción maduran por la pérdida de la clatrina y la acidificación progresiva, pasos simultáneos a la biosíntesis de la insulina (63,64).



**Figura 13. Biosíntesis y procesamiento de la insulina.** La preproinsulina (no funcional) es procesada en el RE, donde pierde parte de los aminoácidos del extremo C-terminal y se transforma en proinsulina, la cual consta de 3 cadenas (B, C y A). La proinsulina pasa al aparato de Golgi y se empaqueta en vesículas recubiertas de clatrina que presentan en su membrana bombas de protones que introducen  $H^+$ , produciéndose una bajada de pH que origina la escisión del péptido C mediante la acción de las enzimas proteolíticas convertasas PC1/3 y PC2 y carboxipeptidasa E, transformando la proinsulina en insulina madura que se vierte al torrente sanguíneo mediante exocitosis. Modificado de (64).

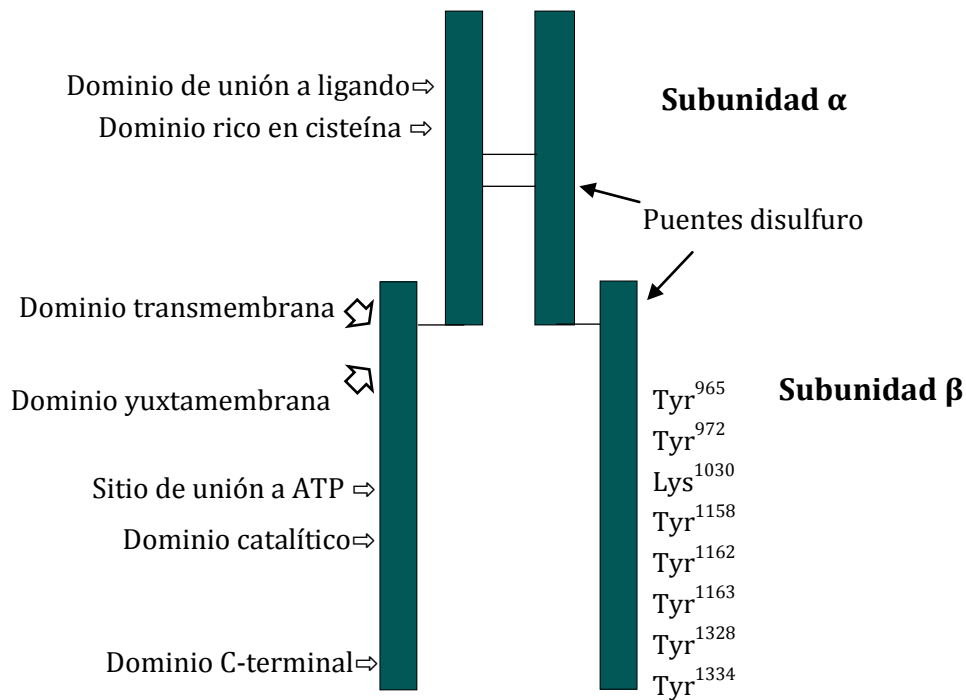
Actualmente es ampliamente conocido el papel de la insulina regulando los niveles de glucosa en sangre a través de la estimulación de la captación de glucosa periférica de tejidos como la grasa, el hígado o el músculo esquelético (63). En condiciones normales, las células  $\beta$  del páncreas detectan cambios en la concentración de glucosa en plasma y responden liberando las cantidades correspondientes de insulina (63). La insulina es secretada por inducción por la glucosa tanto mediante efectos de activación (cierre de los canales de  $K^+$  dependientes de *ATP*, *KATP*) como mediante efectos de amplificación (cierre de los canales de *KATP*); aunque la primera señal intracelular es el aumento de  $Ca^{+2}$ , la cual desencadena la exocitosis de la insulina por la glucosa (Figura 14) (63). Pero existen además, otras señales celulares activadas por la glucosa que también juegan papeles importantes en este proceso como adenosín monofosfato cíclico (*AMPc*), guanósín monofosfato cíclico (*GMPc*), inositol 1,4,5-trifosfato (*IP3*) y el diacilglicerol (*DAG*) (63).



**Figura 14. Secreción de la insulina.** La primera señal que regula la secreción de insulina es el aumento de  $Ca^{+2}$  intracelular, pero el *AMPc*, *GMPc*, *IP3* y el *DAG* también presentan papeles importantes, así como el cierre de los canales de  $K^+$  dependientes de *ATP*. Modificado de (65).

El receptor de la insulina (INSR), es necesario para mediar la acción de la insulina, es una proteína heterotetramérica de membrana compuesta de dos subunidades  $\alpha$  y dos  $\beta$ , unidas por puentes disulfuro (Figura 15) (66).



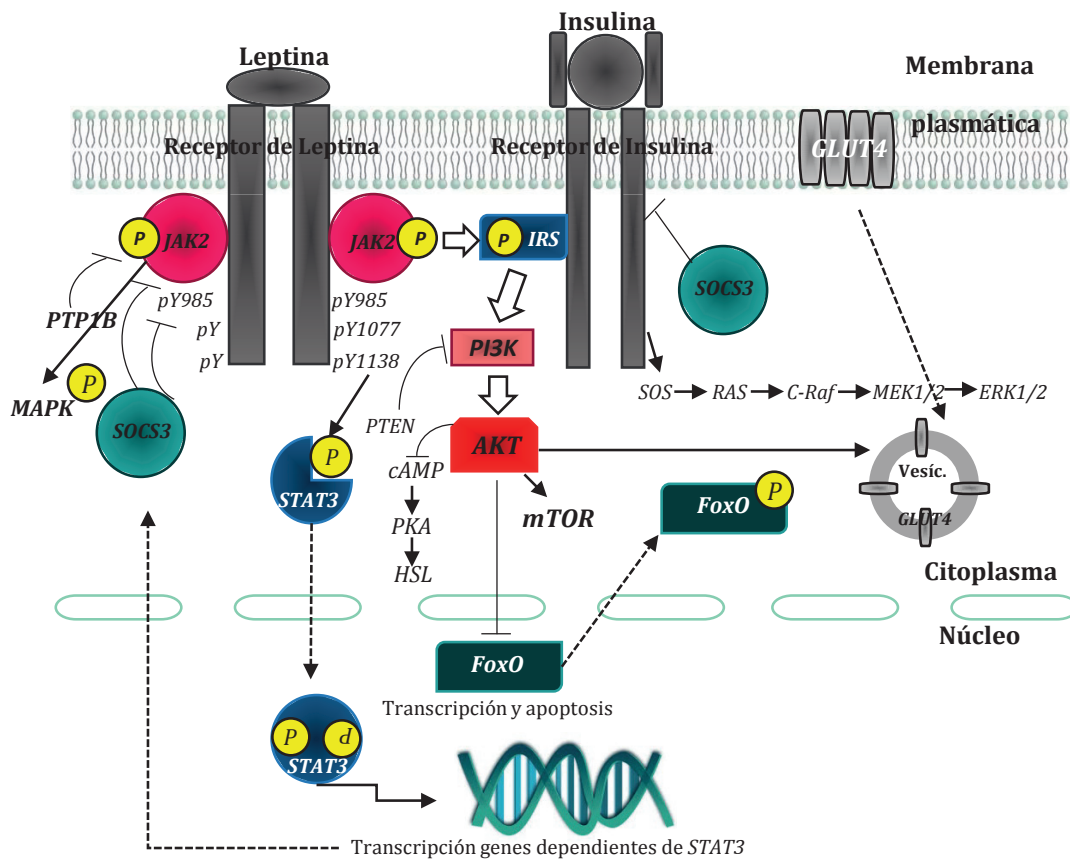


**Figura 15 Estructura del receptor de insulina.** El receptor de la insulina consta de dos subunidades, la subunidad  $\alpha$ , en cuya región N-terminal se localiza el dominio de unión a la insulina y la subunidad intracelular  $\beta$ , la cual contiene dominios tirosina y lisina fosforilados. Modificado de (66).

El receptor de la insulina tiene dos isoformas, generadas por *splicing* alternativo del gen *INSR* (67). La isoforma B (INSR-B) incluye al exón 11 y está asociada con la unión fuerte a la insulina, mientras que la isoforma A (INSR-A), que no incluye al exón 11, se une tanto a la insulina como al factor de crecimiento insulínico tipo 2 (IGF-II) (67). Ambas isoformas también difieren en la capacidad de activar vías de señalización *downstream* (67). El *splicing* alternativo es célula-específico y las proporciones relativas de las diferentes isoformas varían durante el desarrollo, envejecimiento y los diferentes tejidos (67). En la vida adulta, INSR-A se expresa de forma ubicua, mientras que INSR-B predomina en las células  $\beta$  del páncreas, hígado, músculo, tejido adiposo y riñón, los cuales son órganos diana de los efectos metabólicos de la insulina (67). En la vida prenatal, se expresa predominantemente INSR-A, el cual juega un papel importante en el desarrollo fetal y quizás en ciertos cánceres (67).

La unión de la insulina a su receptor, inicia una serie de respuestas consistentes en la activación de varias vías de transducción (Figura 16) (68). En primer lugar, cuando la insulina se une a su receptor, se produce una autofosforilación del mismo que crea un sitio de unión para el sustrato del receptor de insulina (IRS), a continuación se activa la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K), la cual consta de una subunidad p85 y una subunidad p110; por tanto, cuando una subunidad p85 se une a un residuo fosforilado de IRS, se activa PI3K (68). La PI3K fosforila fosfolípidos de membrana, siendo uno de sus productos principales el fosfatidi-

linositol-3,4,5-trifosfato (*PIP3*) (68). *PIP3* se une a los dominios con homología a Pleckstrina (*PH*) de la quinasa dependiente de *PIP3* (*PDK*) activándola (68). *PDK* fosforila y activa a la proteína quinasa B (*AKT* o también conocida como *PKB*). Cabe destacar que *AKT* es una proteína quinasa que regula múltiples procesos biológicos como por ejemplo el metabolismo de la glucosa, apoptosis, expresión de genes y proliferación celular (68). La estimulación de la cascada de señalización de *AKT* activa una serie de dianas anabólicas como la diana de rapamicina en células de mamífero (*mTOR*) (68).



**Figura 16. Vías de señalización de la insulina y la leptina.** La insulina al unirse a su receptor causa la fosforilación del mismo, provocando la unión del IRS, activando éste a PI3K. IRS también es sustrato de JAK2 por lo que la leptina y la insulina comparten parte de sus rutas de señalización.

• **Leptina**

La leptina se descubrió en 1994 y desde entonces, ha crecido su interés en el ámbito de la obesidad por ser secretada por el tejido adiposo en proporción a la cantidad de grasa almacenada (69), sin embargo, también puede ser secretada por otros tejidos como los ovarios, músculo esquelético, estómago y tejido adiposo marrón y además, existe un dimorfismo sexual claro, presentando las mujeres niveles de leptina circulantes mayores que los hom-

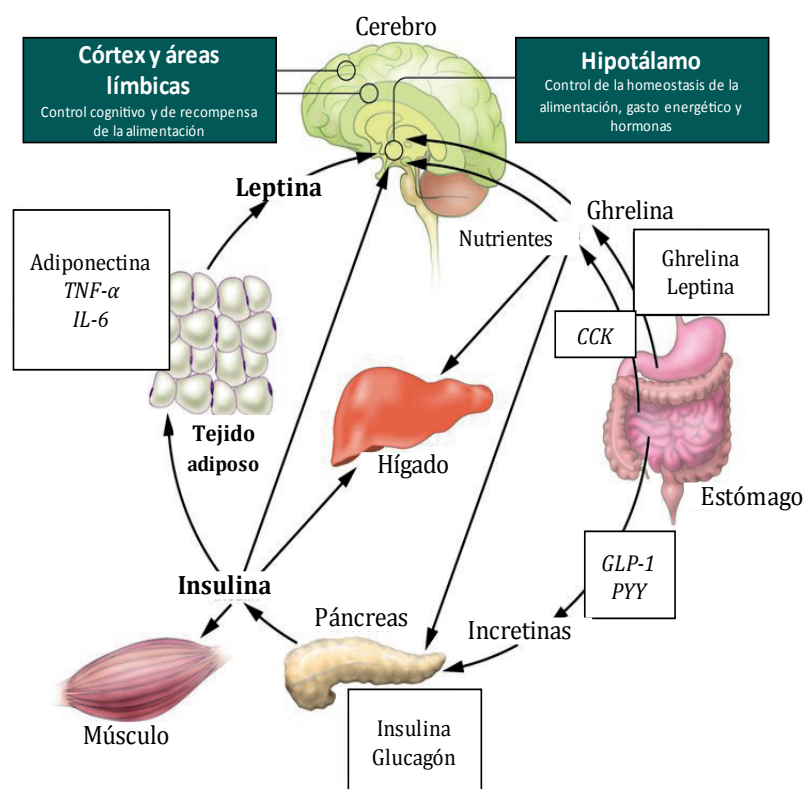
bres (70). Actúa tanto a nivel central como periférico, a nivel central su principal diana es el hipotálamo, regulando la ingesta a largo como corto plazo, siendo capaz de modular una red compleja de distintos neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos para reducir la ingesta de alimentos y aumentar el gasto energético, sin embargo, el hipotálamo no es el único objetivo de la leptina, sino que ésta también modula las neuronas hipotalámicas de forma indirecta como por ejemplo a través del sistema de melanocortina (69), mientras que a nivel periférico diversos estudios han revelado que ejerce tanto efectos directos y efectos a través de otras hormonas como puede ser la insulina (70). Estos efectos, que se resumen en la *Tabla 5* han sido descritos en tejidos y órganos como el hígado, corazón, riñones, pulmones, intestino delgado, células hipofisarias, testículos, ovarios, páncreas y tejido adiposo entre otros (71):

Papeles de la leptina	
Sistema nervioso central	Periférico
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hipotálamo</li> <li>• Función neuroendocrina</li> <li>• Ingesta de alimento y gasto de energía</li> <li>• Metabolismo</li> <li>• Neuropéptido Y, hormona del crecimiento, etc.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Hígado:</b> acción de la insulina</li> <li>• <b>Riñón:</b> excreción y reabsorción</li> <li>• <b>Páncreas:</b> secreción de insulina, <i>UCP2</i>, etc.</li> <li>• <b>Útero:</b> crecimiento fetal y metabolismo</li> <li>• <b>Intestino:</b> Absorción de azúcares</li> <li>• <b>Reproducción:</b> pubertad y ovulación</li> <li>• <b>Sangre:</b> homeostasis de la glucosa, lipogénesis y oxidación lipídica</li> <li>• <b>Tejido adiposo marrón:</b> <i>UCP1</i> y termogénesis</li> <li>• <b>Adipocitos:</b> acción de la insulina, <i>UCP2</i>, etc.</li> <li>• <b>Músculo esquelético:</b> síntesis de glucógeno, transporte de la glucosa, etc.</li> </ul>

**Tabla 5. Funciones, a nivel central y periférico, en las que la leptina presenta un papel importante.** Modificado de (71).

Inicialmente se describió que la leptina podía inducir la pérdida de peso a través de la inhibición del apetito y de la estimulación de la actividad metabólica, sin embargo, este afán inicial relacionado con su posible potencial terapéutico cayó en decadencia al observarse que la mayoría de los pacientes obesos presentaban niveles elevados de leptina circulantes, actualmente se sabe que la obesidad no es causada por la deficiencia de leptina sino que existe hiperleptinemia y ausencia de sensibilidad a la acción de esta hormona (72).

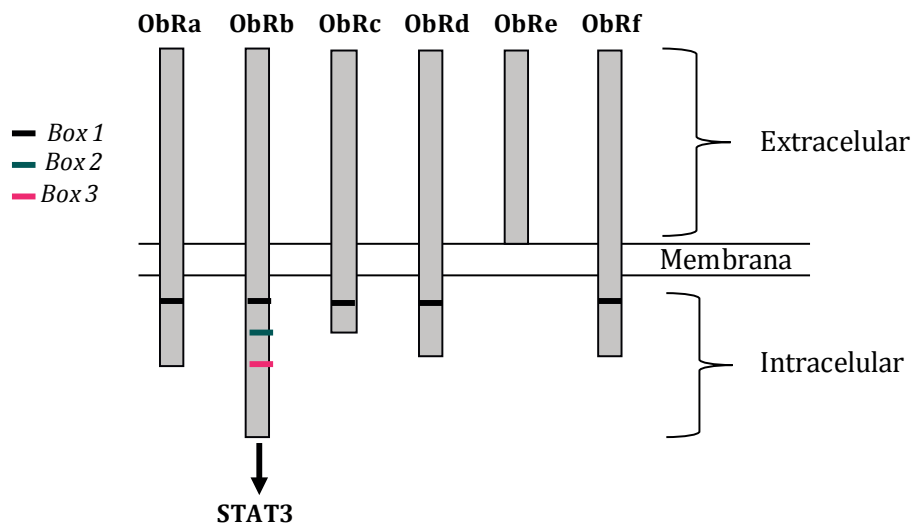
Cuando la masa grasa desciende, los niveles de leptina en plasma disminuyen, activando las respuestas orexigénicas y reprimiendo la anorexigénicas, de manera que aumenta la ingesta de alimentos y se inhibe el gasto energético hasta que se restaura la masa grasa (69, 73). Cuando la masa grasa aumenta, los niveles de leptina aumentan, lo que conduce a una inhibición de la ingesta de alimentos y al incremento del gasto energético a través de acciones conectadas con los circuitos neuronales hipotalámicos sin embargo, durante la obesidad esta respuesta desaparece debido al desarrollo de leptina (69, 73). En general, el peso corporal se mantiene en equilibrio gracias al sistema de señalización de ésta y otras hormonas, como se esquematiza en la *Figura 17* (69, 73).



**Figura 17. Control y balance energético.** Los niveles de leptina disminuyen durante la pérdida de peso, el hipotálamo envía señales para estimular la alimentación, reducir el gasto de energía y promover la recuperación de peso corporal. La ghrelina producida en el estómago estimula el apetito en el cerebro y aumenta la absorción de nutrientes por el músculo, hígado y tejido adiposo. La insulina actúa en el cerebro para reprimir la ingesta, mientras que los péptidos como el *GLP-1* derivados del estómago, aumentan la liberación de insulina desde el páncreas. Modificado de (74).

El receptor de la leptina (*ObR*) está codificado por el gen *OB* (75). Existen seis isoformas de los receptores de la leptina, clasificados como cortos (*ObRa*, *ObRc*, *ObRd* y *ObRf*), largos (*ObRb*) y secretados (*ObRe*) (75). En ratones se expresan las isoformas *ObRa*, *ObRb*, *ObRc* y *ObRd*, en ratas *ObRa*, *ObRb*, *ObRc*, *ObRf* y *ObRe*, mientras que en humanos se ha descrito la expresión de *ObRa*, *ObRb*, *ObRc* y *ObRe* (75). En cuanto a su estructura (*Figura 18*), la iso-

forma ObRe es la única que carece de un dominio transmembrana, mientras que las demás presentan un dominio transmembrana con una caja (“Box 1”) de unión al motivo JAK2 (75, 76). ObRb se considera el principal receptor funcional de la leptina, ya que es la única isoforma que presenta un dominio intracelular de longitud completa (cajas Box 2 y 3 adicionales) que interacciona con otras proteínas que funcionan como transductores de señales intracelulares (75, 76). Sin embargo, el papel de las otras isoformas no está claramente descrito en la actualidad (75, 76).

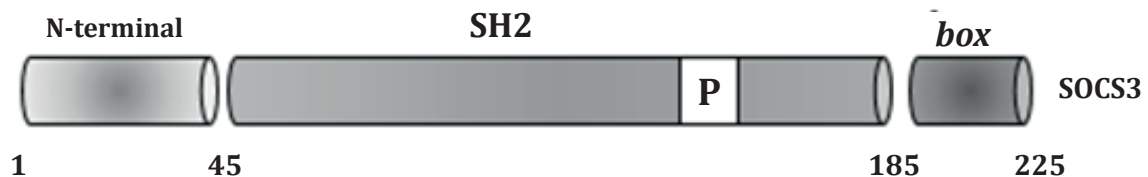


**Figura 18. Estructura de los receptores de la leptina.** Se representan el dominio extracelular e intracelular de cada receptor así como las cajas Box 1, 2 y 3. Modificado de (71).

La señalización de la leptina inicia al unirse ésta a su receptor, el cual está asociado con el sistema JAK-STAT, activándose múltiples cascadas de señalización (Figura 16) (75, 76). Principalmente se activa la tirosina quinasa JAK2, induciéndose la autofosforilación del complejo leptina-ObRb-JAK2 e iniciándose una cascada de fosforilaciones en numerosos residuos de tirosina en otras proteínas (75, 76). Esta autofosforilación del ObRb fundamentalmente en la tirosina 1138, proporciona sitios de unión para las proteínas transductor de señal y activador de la transcripción (STAT), en concreto, en estudios *in vitro* se ha demostrado que la leptina es capaz de activar las isoformas STAT1, STAT3 y STAT5 aunque *in vivo* únicamente se ha podido demostrar la activación de STAT3; la fosforilación de STAT motiva su disociación del receptor y su translocación al núcleo para regular la expresión de genes diana como por ejemplo el gen que codifica para la proteína supresora de la señalización por citoquinas 3 (SOCS3) (75, 76). Pero también se ven activadas por la leptina otras cascadas de señalización como la cascada de señalización de las proteína quinasa activadas por mitógenos (MAPK) y la vía de señalización de IRS; la leptina es capaz de inducir la activación de quinasa reguladas por señales extracelulares (ERK) a través de su fosforilación bien por la activación de JAK2 o bien

directamente a través del receptor, ERK una vez activada, se transloca al núcleo y modula la expresión de genes diana de la acción de la insulina como son *C-FOS* y la proteína de respuesta de crecimiento temprano 1 (*EGR-1*); por otro lado, la leptina es capaz de actuar sobre algunas proteínas de la cascada de la señalización de la insulina, como IRS y PI3K a través del receptor *ObR*; PI3K es activado a través de JAK2, quien una vez activa es capaz de fosforilar al IRS, permitiendo la activación de PI3K (75, 76).

Otra proteína importante en la vía de señalización de la leptina es la mencionada SOCS3, quien es un miembro de la familia de proteínas SOCS, que contiene un dominio *SH2* central (específico de unión a residuos de tirosina fosforilados), un dominio N-terminal y un dominio C-terminal (*Figura 19*) (77, 78). Es un potente inhibidor de la señalización de la leptina a nivel de la vía JAK-STAT3, es decir, es un mediador molecular de la resistencia a leptina (78, 79). Sin embargo, la región *SH2* central, no es suficiente por sí sola para inhibir la señal de JAK-STAT, sino que la región amino-terminal también es necesaria para lograr este efecto y aparentemente sólo funciona si la leptina se encuentra presente (77, 78).

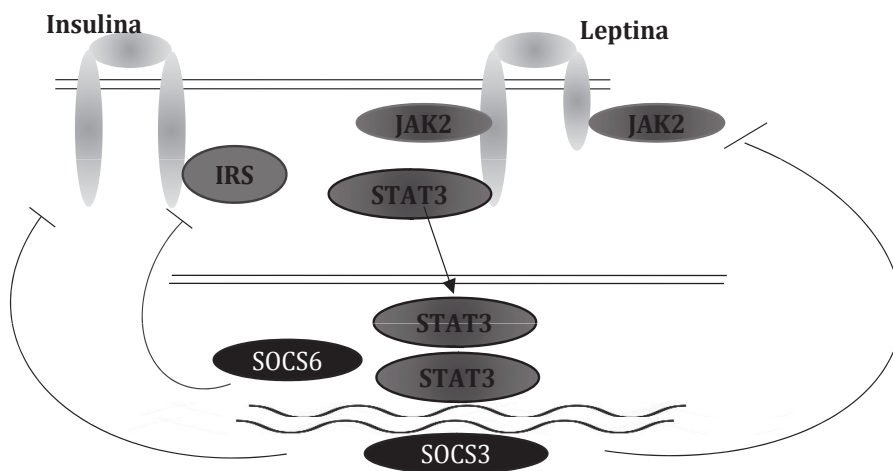


**Figura 19. Estructura de SOCS3.** Se representan los dominios N-terminal, C-terminal así como la región central. Modificado de (77).

Los niveles de expresión de SOCS3 están elevados en el tejido adiposo, hígado y músculo de animales con resistencia a insulina. Varios estudios demuestran que SOCS3 juega un papel importante en la regulación de la señalización de la insulina, en concreto, la regula negativamente a través de diferentes mecanismos: mediante su unión a la tirosina 960 fosforilada del receptor de insulina, mediante la inhibición de la fosforilación del IRS1 e IRS2, mediante degradación proteasomal mediada por la ubiquitina de proteínas asociadas a SOCS y mediante la inhibición de JAK (80).

Su expresión se ve aumentada por las citoquinas proinflamatorias como la IL-6 y el TNF $\alpha$  a través de la activación de STAT y el factor nuclear NF- $\kappa$ B. Respecto a esto último existen estudios que demuestran que la expresión de SOCS3 está aumentada en ratones obesos resistentes a la insulina y que en el hígado, la sobreexpresión de SOCS3 induce resistencia a insulina *in vivo* (81, 82). Además, la sobreexpresión de SOCS3, también pueden inhibir la transcripción del gen de la preproinsulina en células  $\beta$ -pancreáticas y reducir la secreción de insulina (82). Estudios *in vivo*, también demuestran que la sobreexpresión de SOCS3 en el tejido adiposo, causa resistencia a insulina local pero no sistémica (83).

Otros autores han establecido que SOCS3 funciona como un regulador negativo de la señalización de la leptina, aunque SOCS3 es inducido por la leptina, ésta a su vez, inhibe la señalización de la misma, por tanto, presenta un papel importante en la regulación de la sensibilidad de la leptina y no solo de la insulina (*Figura 20*). El hecho de que SOCS3 intervenga en la mediación de la señalización tanto de la insulina como de la leptina, le hace ser un mediador único interesante de la obesidad y del síndrome metabólico (84). Otros estudios demuestran que SOCS3 además de inhibir la señalización de la insulina en el tejido adiposo e hígado, lo hace también a nivel hipotalámico (85).



**Figura 20. Esquema de la inhibición de la señalización de la insulina y la leptina por SOCS3.** SOCS3 se puede unir al receptor de la leptina y regular negativamente la activación de JAK2-STAT3 mediada por el receptor. Además, SOCS3, también se puede unir al receptor de insulina (INSR) resultando en la inhibición de la autofosforilación del mismo y aumentando la degradación del IRS1/2. Modificado de (86).

Todas estas evidencias, indican que SOCS3 determina la señalización basal de la insulina, es un mediador de la resistencia a insulina inducida por citoquinas y un mediador de la resistencia a insulina en el tejido adiposo en la obesidad (83).

### • Mecanismos de resistencia a insulina

La resistencia a insulina es una característica distintiva de la *T2DM* asociada a la obesidad, siendo un fenómeno mediante el cual órganos o tejidos como el hígado, músculo esquelético, tejido adiposo e incluso cerebro presentan una reducida la respuesta a la insulina, aun existiendo concentraciones normales de la misma (87). Las personas con resistencia a la insulina, presentan por tanto, un metabolismo de la glucosa alterado evidenciado por respuestas anormales a pruebas de glucosa o niveles elevados de glucosa en ayunas entre otros. (88).

La expansión de algunos depósitos grasos, como el visceral, se asocia con un mayor riesgo de padecer resistencia a insulina, mientras que la expansión de otros, como el subcutáneo, se asocia con una disminución de ese riesgo. Por tanto, la relación existente entre la acumulación de tejido adiposo graso y la resistencia a insulina todavía no es del todo clara; existen estudios que demuestran que la adiposidad visceral está correlacionada con el exceso de grasa en el hígado y por tanto con el deterioro autónomo de las células implicadas en la señalización de la insulina; el tejido adiposo visceral es además, propenso a la inflamación y la producción de citoquinas inflamatorias que contribuyen al deterioro de la señalización de la insulina; mientras que la masa de tejido adiposo subcutáneo, disminuye las probabilidades de presentar resistencia a insulina (89).

Se han propuesto diferentes mecanismos para explicar la resistencia a insulina y leptina, incluyendo la alteración del transporte de la insulina y la leptina a través de la barrera hematoencefálica, alteraciones de la transducción de señal intracelular y otras anomalías (75).

### **- Resistencia a la insulina a nivel periférico**

En el músculo esquelético de pacientes obesos que desarrollan resistencia a insulina se ha observado, una reducción de la expresión del transportador de glucosa 4 (GLUT4) y una disminución del metabolismo no oxidativo de la glucosa y síntesis de glucógeno; mientras que en personas jóvenes y delgadas, la resistencia a insulina muscular hace que la glucosa ingerida no sea absorbida por el músculo y se desvíe al hígado, actuando como sustrato de la lipogénesis hepática de *novo*, aumentando la síntesis de triglicéridos hepáticos, los niveles de triglicéridos plasmáticos y reduciendo las concentraciones de lipoproteínas de alta densidad (colesterol *HDL*) en plasma (90). Mientras que en modelos de ratones modificados genéticamente, se ha observado que la resistencia a la insulina a nivel muscular se puede generar por deleciones de *GLUT4* haciendo que estos animales sean más propensos a desarrollar esteatosis hepática y un aumento de la adiposidad (90).

A nivel hepático, el hígado graso no alcohólico está estrechamente relacionado con la resistencia a la insulina hepática; aunque se han propuesto varios modelos para explicarla, parece que cobran fuerza el papel de la acumulación de diacilglicerol y la activación de proteína quinasa C tipo épsilon (PKC $\epsilon$ ) (90). En ratas y ratones, las dietas altas en grasa a corto plazo conducen al desarrollo de esteatosis hepática y resistencia a insulina hepática sin acumulación de lípidos musculares ni resistencia a insulina periférica, por tanto, los lípidos ectópicos del hígado están asociados con la resistencia a insulina hepática y esta parece no estar asociada con la obesidad y adiposidad visceral (90). Mientras que en humanos, se ha demostrado que la activación de PKC $\epsilon$  y el contenido de diacilglicerol hepático son buenos

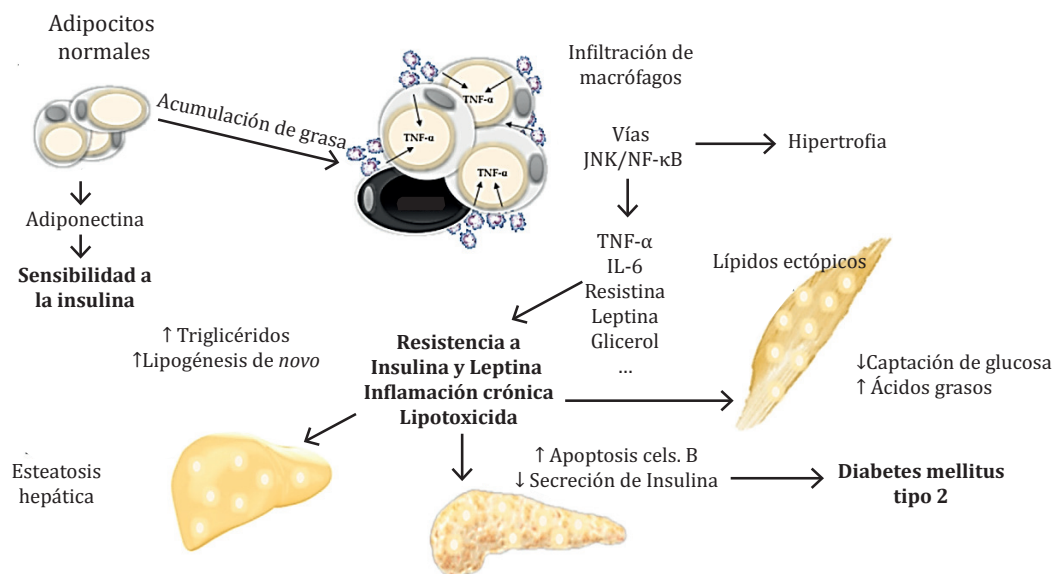


predictores de la sensibilidad a la insulina. Sin embargo, no se observó una asociación entre la sensibilidad a la insulina y factores previamente implicados en la resistencia a insulina hepática tales como la activación de JNK1 y el contenido de ceramida (90).

En el tejido adiposo, la resistencia a la insulina se traduce en la incapacidad de la insulina para activar el transporte de la glucosa en este tejido, promover la absorción de lípidos y suprimir la lipólisis (90). La disminución de la captación de glucosa en el tejido adiposo se ha demostrado tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*, sin embargo no está claro el mecanismo e impacto metabólico de la captación de glucosa mediada por la insulina (90). Cabe destacar que el metabolismo de la glucosa del tejido adiposo estimulado por la insulina, es cuantitativamente menor si lo comparamos con el metabolismo de la glucosa estimulado por la insulina a nivel global, sin embargo, los efectos en el primero, influyen a nivel extra-adiposo (90). Por ejemplo, la pérdida de la función de GLUT4 en ratones, no altera la adiposidad ni peso corporal, sino que conduce a resistencia a la insulina en el hígado y músculo esquelético (90). En humanos, la expresión de la proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (ChREBP) en el tejido adiposo, está directamente relacionada con la sensibilidad a la insulina y está implicada en la síntesis de ésteres de ácidos grasos y de ácidos grasos hidroxilados que mejoran la tolerancia a la glucosa (90). Por otro lado, las adipocitoquinas como la leptina, resistina y adiponectina también influyen sobre la sensibilidad a la insulina sistémica, asociándose con la resistencia a insulina el incremento de leptina y resistina, mientras que la adiponectina se asocia con el incremento de la sensibilidad a la insulina (90).

A nivel pancreático, se sabe que la *T2DM* se desarrolla cuando las células  $\beta$  del páncreas no secretan cantidad suficiente de insulina para satisfacer la demanda metabólica; habitualmente un aumento de la demanda metabólica precede al desarrollo de hiperglucemia debido a la resistencia a insulina en varios tejidos; es decir, existe un período en el cual la glucemia presenta valores normales o próximos a la normalidad durante el cual, las células  $\beta$  del páncreas compensan la resistencia a insulina mediante la hipersecreción de insulina, sin embargo, este período es seguido por un fallo de las células  $\beta$  pancreáticas y éste órgano deja de segregar suficiente insulina produciéndose entonces diabetes (91).

En cuanto al desarrollo de la resistencia a la insulina sistémica, estudios previos revelan que existe comunicación entre tejidos (*Figura 21*). Esta comunicación está mediada por las hormonas clásicas y el sistema nervioso, pero también por la producción y secreción de biomoléculas por varios tipos celulares (91).



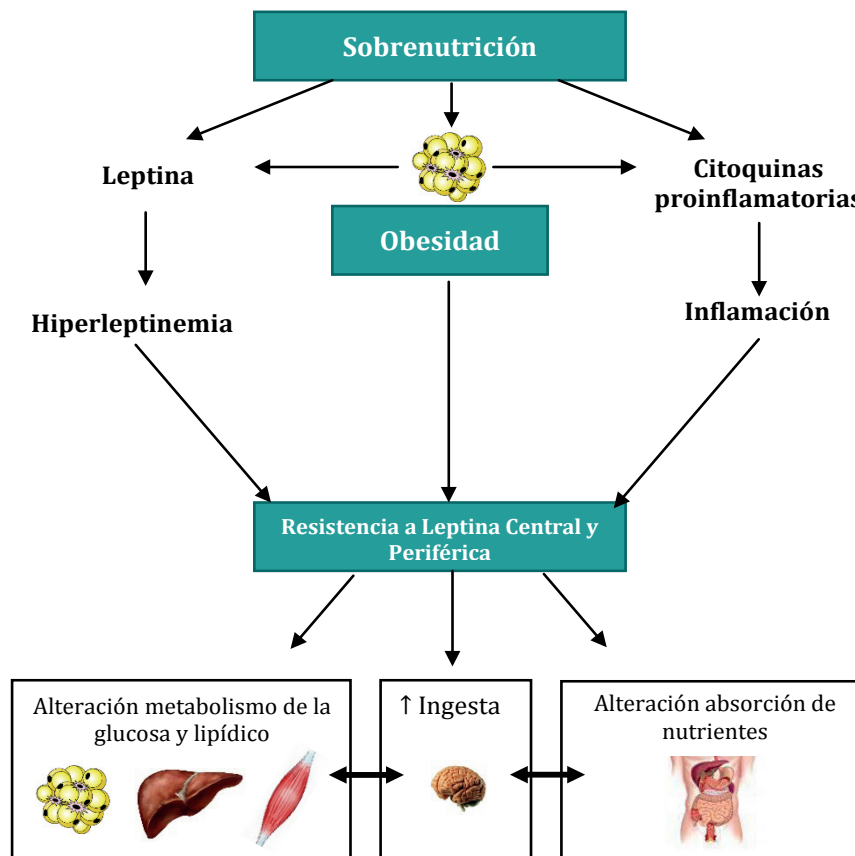
**Figura 21. Alteraciones sistémicas durante la resistencia a insulina.** La hipertrofia de los adipocitos da lugar a inflamación crónica, resistencia a insulina y lipotoxicidad. El incremento del flujo de ácidos grasos libres hacia tejidos no adiposos, produce acumulación lipídica, lipoapoptosis y disfunción orgánica. Modificado de (92).

### - Resistencia a la insulina a nivel central

A nivel central, el cerebro es el principal órgano que utiliza la glucosa, sin embargo, no siempre fue considerado como un órgano sensible a la insulina (87). Hoy en día, se sabe que la acción central de la insulina, en concreto la señalización de la insulina en el hipotálamo, es requerida para el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa y que la resistencia central a hormonas metabólicas puede ser consecuencia de un sistema de transporte incorrecto entre la sangre circulante y el cerebro (87); existiendo ya estudios en roedores, en los que se ha asociado la pérdida de la sensibilidad central a la insulina con la progresión de la obesidad tras ser alimentados con dietas altas en grasa (87). En otros estudios también se demuestra la importancia de la señalización de insulina en el cerebro, ya que la delección de IRS2 en el hipotálamo de ratones desencadena hiperglucemia y obesidad (93).

### • Mecanismos de resistencia a leptina

La resistencia a leptina (Figura 22), se describe en general como una reducción de la sensibilidad a la misma con respecto a la respuesta anorexigénica de leptina administrada de forma exógena, aunque no es una definición aceptada por todos los expertos, por lo tanto, la presencia de hiperleptinemia *per se* no puede ser considerada como una evidencia de la existencia de resistencia a leptina (70).



**Figura 22. Resistencia a leptina.** La obesidad se asocia con inflamación local y sistémica así como con niveles circulantes elevados de leptina. Se sugiere que la resistencia a leptina durante la obesidad puede ser iniciada por la señalización inflamatoria ya que varios mediadores inflamatorios como la IL-6 o TNF $\alpha$  están elevados durante la obesidad sugiriendo además, que estas moléculas podrían estar involucradas en el desarrollo de hiperleptinemia y también de la resistencia a leptina.

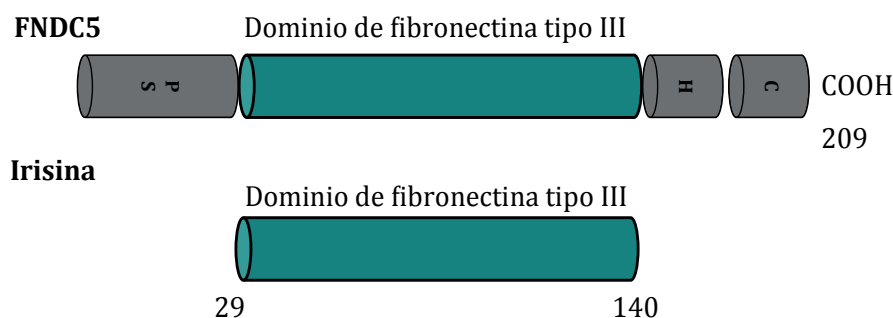
Aunque los mecanismos de resistencia a leptina todavía no están claros, se han postulado tres posibilidades: 1) un fallo de la leptina circulante para alcanzar sus dianas en el cerebro, 2) un descenso en la expresión del receptor ObR y/o 3) una inhibición de los eventos de señalización en neuronas específicas en regiones específicas del cerebro (70). Sin embargo, estudios más recientes también han sugerido que el estrés del RE también podría estar involucrado en el desarrollo de resistencia a leptina tal y como se observó en modelos de ratón obesos (94).

Datos recientes, sugieren que la respuesta celular a la leptina a través de la activación de STAT3, está conservada en obesos y roedores hiperleptinémicos (3) y que en los casos más comunes de resistencia a leptina, también ocurre resistencia a insulina (95).

- **Irisina**

En la actualidad, sabemos que el músculo esquelético es capaz de liberar varias hormonas (mioquinas) que son capaces de repercutir sobre el metabolismo y la producción de citoquinas por otros tejidos y órganos (96).

En el año 2012, Böstrom y colaboradores identificaron un nuevo péptido desconocido que se secretaba en el músculo y se denominó irisina (97). Inicialmente se describió como una mioquina, procesaba proteolíticamente del producto del gen de la fibronectina tipo III con 5 dominios (*FNDC5*) antes de su liberación a la circulación (97) aunque en la actualidad se conoce también como una adipoquina (98). La proteína *FNDC5* está formada por 212 aminoácidos en humanos y 209 en ratas y ratones (99) e incluye un péptido señal, el dominio de fibronectina tipo III, un dominio transmembrana hidrofóbico y un dominio carboxilo-terminal (C-terminal) que se localiza en el citoplasma (100) (*Figura 23*); tras un corte proteolítico, la glucosilación y probablemente la dimerización de *FNDC5* se libera la irisina, la cual está constituida por 112 aminoácidos y cuya secuencia es idéntica en humanos y ratones (100).



**Figura 23. Esquema de la proteína FNDC5 e irisina.** PS (péptido señal), H (dominio hidrofóbico), C (dominio carboxi-terminal).

En humanos, sus niveles de expresión son elevados tanto en el músculo esquelético como cardíaco, pero también se expresa en otros órganos como la lengua y el recto a niveles relativamente altos, mientras que sus niveles de expresión son bajos en el páncreas e hígado (101). Otra fuente importante de irisina es el tejido adiposo, si bien los niveles de expresión de *FNDC5* son unas 100-200 veces inferiores en este tejido que en el músculo esquelético (101, 102). Se ha observado que en ratas, la irisina del tejido adiposo proviene de los adipocitos maduros del tejido adiposo blanco subcutáneo y en menor medida del tejido adiposo visceral, mientras que el tejido adiposo marrón casi no expresa *FNDC5* ni secreta irisina (103). En ratones, varios estudios concluyeron que aproximadamente el 72% de la *FNDC5*/irisina circulante provenía del músculo y que posiblemente el 28% restante sería la secretada por el tejido adiposo (103), aunque también se ha detectado la expresión de *FNDC5* en el cerebro,

la piel y en pequeñas cantidades en el hígado, páncreas, estómago y testículos de ratas (104). A nivel circulante, los niveles de irisina difieren mucho, incluso dentro de la misma especie, describiéndose unas concentraciones que varían desde 0,01 ng/ml hasta 2000 ng/ml en suero y plasma humanos, lo que ha dado lugar a un gran debate sobre la validez de los distintos métodos para detectar la irisina e incluso sobre la existencia de la misma en humanos (105).

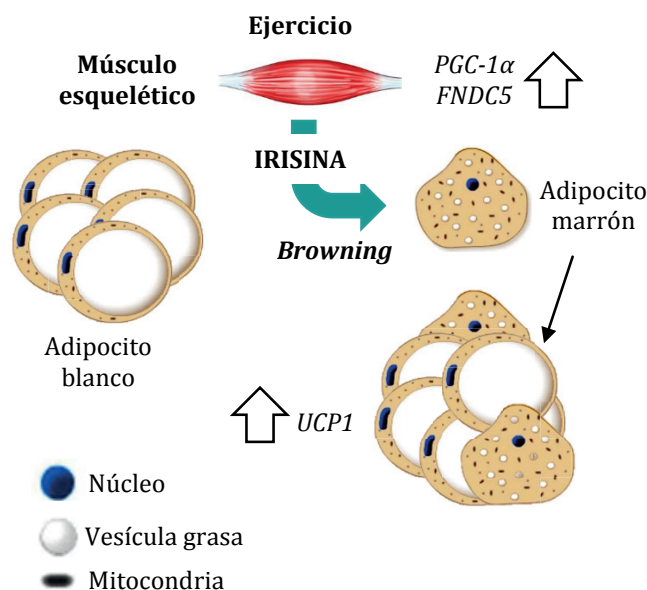
Esta controversia relacionada con la detección de la irisina, comenzó cuando se publicó el primer artículo en el que empleaban un anticuerpo diseñado para detectar la irisina, este anticuerpo se unía a la región hidrofóbica y al dominio C-terminal de FNDC5, los cuales permanecen intracelulares y no son secretados, por lo que las bandas detectadas como irisina podrían ser la forma completa secretada de FNDC5 o incluso proteínas no específicas que se unían al anticuerpo (106). Posteriormente, varios investigadores comunicaron que habían detectado inmunoreactividad de este anticuerpo con irisina recombinante (105). Finalmente este anticuerpo se retiró del mercado y se han comenzado a comercializar otros que se emplean para detectar irisina circulante en *kits* comerciales de ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y que al ser empleados en *western blots* dan bandas de pesos moleculares de entre 12 KDa (masa molecular estimada para la irisina) y 35 KDa (105). Para dar luz a estas discrepancias, algunos autores publicaron que la proteína de 32 KDa detectada por uno de los anticuerpos, se podía reducir a 24 KDa por desglucosilación, masa molecular que se corresponde con un dímero de irisina; otro estudio identificó una proteína de unos 20 KDa que fue identificada como irisina glucosilada, sin embargo, esta banda no pudo ser detectada empleando ensayos comerciales y varios autores cuestionaron los resultados (107). Posteriormente, otro estudio en humanos identificó que la irisina humana tenía un codón de inicio diferente (ATA en vez de ATG) respecto a la irisina de ratas y ratones y que estaría asociado con una mejor eficiencia de la traducción del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) (106). Mediante espectrometría de masas, la banda de la proteína detectada se corresponde con una masa molecular de 12 KDa, coincidiendo con la masa molecular estimada para la irisina desglucosilada (108). En resumen, para poder definir valores de referencia y métodos para la detección de la irisina, es necesario el desarrollo de ensayos con anticuerpos monoclonales específicos que sean capaces de detectar las formas glucosiladas y no glucosiladas de la irisina, ya que la presencia de diferentes fragmentos proteicos, las glucosilaciones, la presencia de proteínas libres o complejos proteicos en el suero y plasma y la reacción de otras proteínas con los anticuerpos puede alterar los resultados de los ensayos, hechos que ya ocurrieron en estudios similares en el pasado con otras hormonas (105).

En estudios *in vitro* se demostró que al añadir esta hormona a cultivos primarios de adipocitos blancos subcutáneos durante las primeras etapas, éstos se transformaban en adipocitos beis e incrementaba su capacidad termogénica (96).

Todos estos resultados y avances en el estudio de la hormona irisina, hicieron que fuera postulada como una posible candidata para el tratamiento del sobrepeso, obesidad, diabetes e incluso otras patologías relacionadas con el síndrome metabólico (109).

La irisina es regulada por el co-activador 1 alfa del receptor activado por el proliferador de peroxisomas tipo gamma (*PGC1- $\alpha$* ), el cual se encuentra elevado en el músculo tras el ejercicio y es capaz de estimular la expresión de *FNDC5* (97, 103). Varios estudios han investigado los efectos del ejercicio sobre la secreción de irisina y los resultados son contradictorios, algunos estudios no encuentran asociación entre los niveles de *PGC1- $\alpha$* , *FNDC5*, irisina y ejercicio, mientras que otros autores dependiendo del protocolo de ejercicio empleado (incluyendo la duración y el tipo de ejercicio) encuentran una asociación entre los niveles de irisina, *PGC1- $\alpha$*  y ejercicio (105); es importante mencionar que además de la controversia relacionada con la detección de la irisina que se describió con anterioridad, existe también una gran heterogeneidad entre los diseños experimentales que se han realizado, lo cual dificulta extraer una conclusión general (105); muchos estudios pueden no estar empleando un modelo experimental adecuado para estudiar la relación entre la irisina y el ejercicio y en ocasiones, los estudios en humanos constan de un número bajo de participantes (105).

En lo que la mayoría de estudios están de acuerdo es en que la irisina derivada del músculo, es capaz de inducir el *browning* de los adipocitos subcutáneos y la termogénesis por el aumento de los niveles de la proteína UCP1 en el *BAT* a través de *PPAR $\gamma$*  (97, 103) (Figura 24) y también interviene en el control de la biogénesis mitocondrial, metabolismo oxidativo en varios tipos celulares y puede causar la pérdida de peso a través del incremento del gasto energético (103). Los niveles circulantes de irisina se ven modulados por diferentes factores como la dieta, la obesidad, el ejercicio, fármacos, hormonas e incluso diferentes condiciones patológicas (105). También existen varias publicaciones en las que describen una correlación entre los niveles de irisina y los niveles de factores inflamatorios, sugiriendo que ésta presenta propiedades antiinflamatorias (105). Otros autores, muestran datos en los que los niveles de irisina en plasma podrían emplearse como un factor predictivo de *T2DM*, riesgo cardiometabólico, cáncer de mama, síndrome de ovarios poliquísticos e incluso la correlación de sus niveles con la edad de los pacientes podría predecir la longitud de los telómeros (105).



**Figura 24. Efecto de la irisina en el tejido adiposo blanco.**  $PGC1-\alpha$  estimula la liberación de  $FNDC5$ , precursor de la hormona irisina, la cual es capaz de inducir el *browning* de los adipocitos blancos. Modificada de (110).

Centrándonos en enfermedades metabólicas, varios estudios concluyen que los niveles de irisina circulante son inferiores en pacientes con *T2DM*, sin embargo, en personas obesas, esta relación negativa entre la *T2DM* y los niveles de irisina no existe; observándose, en cambio, un patrón similar al de la leptina (102, 111). Durante la obesidad, los niveles circulantes de irisina y sus niveles de expresión en tejidos aumentan, lo que sugiere una posible resistencia a la irisina (112). Sin embargo, en la actualidad, existen pocos datos que corroboren la existencia de la resistencia a la irisina.

## 1.2 MiRs

Los *miRs*, son una clase de pequeños ácidos ribonucleicos (ARNs) monocatenarios endógenos de 19 a 22 nucleótidos, no codificantes, que regulan post-transcripcionalmente la expresión de genes a través de la inhibición de la traducción, la degradación del ARNm, o por ambos mecanismos (113, 114). Se encuentran muy conservados a lo largo de la escala evolutiva y ejercen su acción reguladora mediante su unión a nivel de las regiones 3' no traducidas (*3'-UTR*) de los ARNm diana (113,114). Esta unión del *miR* al ARNm puede ser más o menos estable y en función de su complementariedad se pueden clasificar en (115, 116):

a) Sitios canónicos: Por orden de complementariedad, 8mer, del nucleótido 2 al 8 de la región semilla son complementarios con la secuencia diana seguida de una adenina, 7mer-m8, del nucleótido 2 al 8 de la región semilla son complementarios con la secuencia

diana y 7mer-A1, del nucleótido 2 al 7 de la región semilla son complementarios con la secuencia diana seguida de una adenina (115).

b) Sitios marginales: 6mer, del nucleótido 2 al 7 de la región semilla son complementarios con la secuencia diana y 6mer *offset*, del nucleótido 3 al 8 son complementarios con la secuencia diana, estando el nucleótido 8 fuera de la región semilla del *miR* (115).

c) Sitios atípicos: 3' suplementario, cuando a un sitio canónico o marginal se le suma un sitio en la región 3'-*UTR* para la unión de varios nucleótidos del 13 al 16 en la región 3' del *miR* y 3' compensatorio, cuando a un sitio sin mucha complementariedad se le suma un sitio de unión compensatorio para los nucleótidos del 13 al 16 del *miR* (115).

Su origen se encuentra en genes independientes que han sido transcritos por la ARN polimerasa II o III o en intrones de genes que codifican proteínas; la transcripción de dichos genes o intrones es lo que da lugar a un transcrito primario denominado *pri-miR*, el cual, tras una serie de procesos, da lugar al *miR* maduro y activo, proceso que se describirá con más detalle más adelante (115, 117).

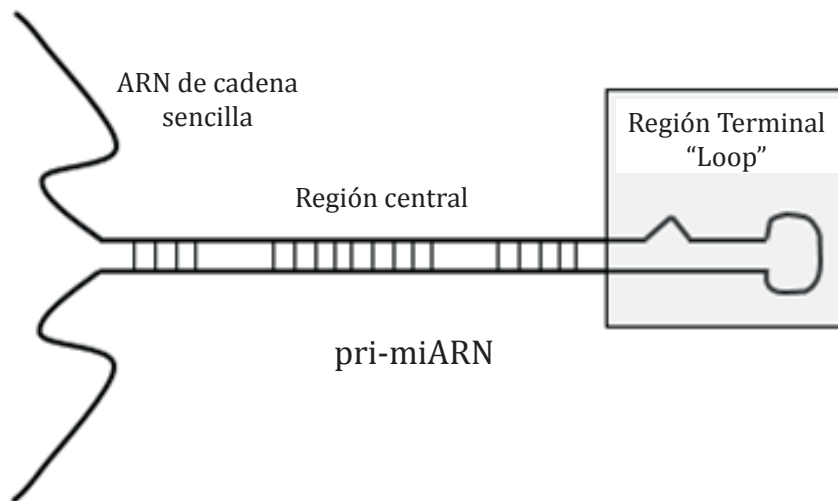
*Lin4* fue uno de los primeros *miRs* identificados y estudiados en la especie *Caenorhabditis elegans*, el cual inhibe la traducción de LIN14 (118). Por ello, inicialmente se consideraron como una peculiaridad de los nematodos, hasta que años después, se observó que uno de los *miRs* de *C. elegans* (*let-7*) estaba presente en un gran número de especies, incluido en vertebrados (119).

Actualmente se conocen más de 15.000 precursores de *miRs* de más de 150 especies distintas, que dan lugar a más de 17.000 *miRs* maduros (*miRbase* 22, <http://mirbase.org>). Mientras que alrededor de 1000 se expresan de forma única en humanos (120).

### 1.2.1 Biogénesis de los *miRs*

Los *miRs* están codificados dentro de regiones intergénicas, intrónicas o en agrupaciones policistrónicas (121, 122). La biogénesis de la mayoría de ellos, se realiza en dos pasos, comenzando con la transcripción inicial de un transcrito primario (*pri-miR*), que depende de la ARN polimerasa II; la longitud de estos *pri-miR* puede variar entre unas pocas kilobases y cientos de ellas; suelen presentar una caperuza ("*cap*") en la región 5' y una cola de adeninas en la región 3' (121, 122). Además, contienen habitualmente una región central (*stem*) de ARN de doble cadena (*dsARN*), de 30-40 nucleótidos, un lazo y horquilla terminal (*loop*) y dos regiones de ARN de cadena sencilla (*ssARN*) en los extremos opuestos de la región central (*Figura 25*) (114).





**Figura 25. Estructura de un pri-miR.** Se esquematiza la región central, la región terminal y la cadena sencilla de ARN.

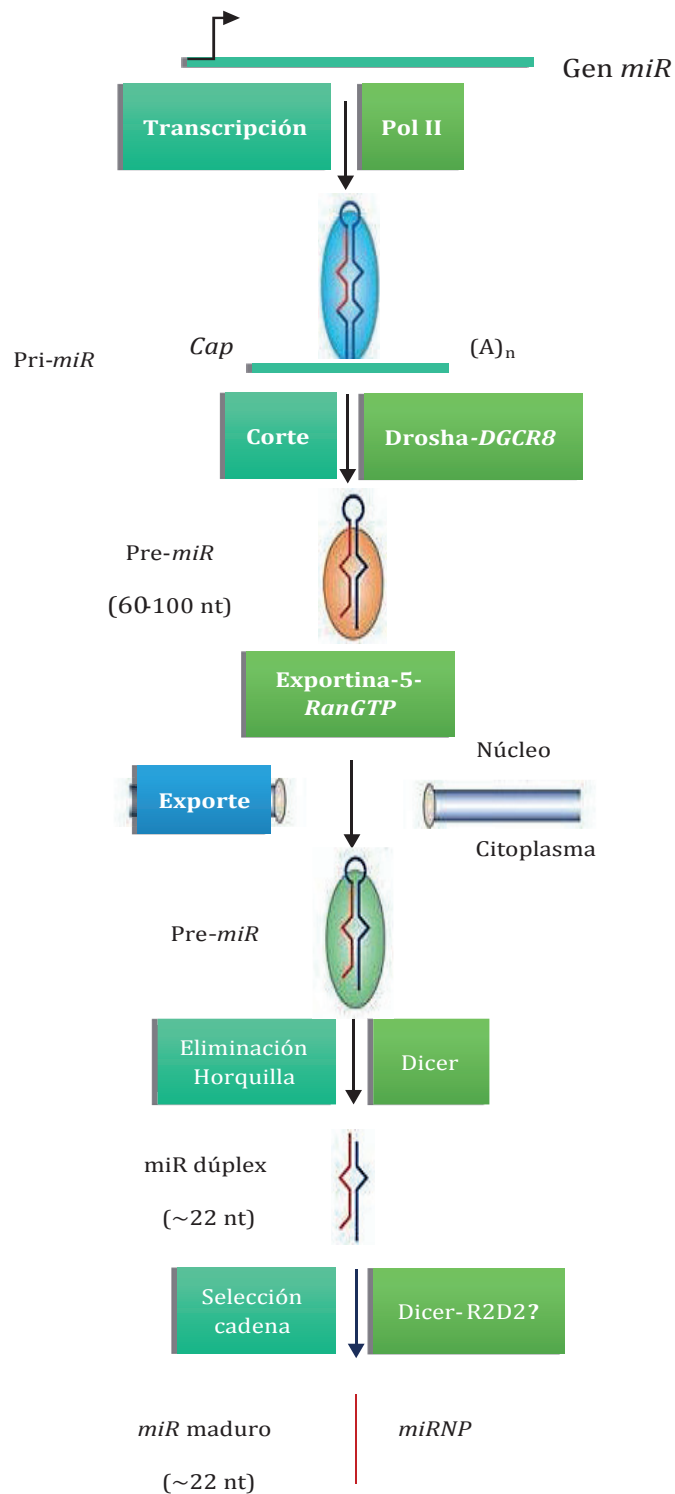
Posteriormente su maduración es llevada a cabo por un complejo nuclear microprocesador (la ribonucleasa III Drosha y su pareja de unión al dsARN, que es la proteína de la región crítica del gen 8 del síndrome DiGeorge (*DGCR8*) en humanos) liberándose un pre-miR. Este pre-miR mantiene la estructura de dsARN y la horquilla terminal y tiene un tamaño de aproximadamente 70 nucleótidos, por lo que es de menor tamaño que los precursores primarios a partir del cual se originó (114, 123).

El segundo paso de maduración se lleva a cabo dentro del complejo de silenciamiento inducido por ARN (*RISC*), para lo que el pre-miR es exportado al citoplasma por la exportina-5, donde la ARNsa III Dicer 1 junto con TARP2 elimina la horquilla en lazo del pre-miR y genera un miR dúplex de miR maduro (hebra guía) y una hebra complementaria (hebra antigua, pasajera o miR\*) (114, 123). La elección de una cadena o la otra del dúplex, no se sabe cómo se produce, sin embargo, diversos estudios sugieren que se debe a motivos termodinámicos que se relacionan con la inestabilidad del apareamiento de bases en la región 5' de cada una de las cadenas que conforman el dúplex (124, 125).

Cabe destacar, que la cadena no elegida, puede ser degradada si existe alto grado de complementariedad dentro de la molécula del miR dúplex o bien puede dar lugar a un miR maduro funcional (126, 127).

Este proceso de biogénesis de miRNAs (*Figura 26*) está regulado a tres niveles (127):

- a) durante la transcripción
- b) mediante el fenómeno de la edición de moléculas de dsARN y
- c) durante los procesamientos por el complejo Drosha/*Dgcr8* y por Dicer.



**Figura 26. Biogénesis de los miRNAs.** La biogénesis de los *miR* en células eucariotas comienza en el núcleo y posteriormente el procesamiento y maduración tiene lugar en el citoplasma. Los *miR* son transcritos por la ARN polimerasa II como un transcrito primario (*pri-miR*) que es cortado por la enzima *Drosha* en moléculas más pequeñas (*pre-miRs*), éstos son exportados al citoplasma por una exportina y procesados por una ARNasa. La cadena correspondiente al *miR* maduro se incorpora al complejo proteico *RISC* e interactúa con las regiones 3'-UTR de los ARNm diana. Modificado de (129).

### 1.2.2 Funciones biológicas en las que están implicados los *miRs*

Se han identificado más de 2000 *miRs* en humanos y se estima que un 60% de los genes en esta especie están regulados por *miRs* (114) por tanto, están implicados en numerosos y diversos procesos celulares (130). Actúan dentro de una red reguladora muy compleja, en la cual un *miR* específico puede controlar la expresión de muchos ARNm y a la inversa, un ARNm puede ser diana de varios *miRs* (114).

Actualmente, se sabe que muchos *miRs* desempeñan papeles clave en casi todos los procesos biológicos vitales, como la división y muerte celular, metabolismo, señalización celular, etc. (123). También se ha demostrado que ciertos patrones de expresión de los *miRs* son tejido-específicos y de la misma forma, otros son específicos de procesos patológicos (123). Según esto, la desregulación de los *miRs* podría conllevar graves problemas en la célula, induciendo fenotipos patológicos e incluso cancerosos, de hecho, los perfiles de expresión están modificados en un gran número de tipos de cáncer y la sobreexpresión forzada de algunos *miRs* podría provocar el desarrollo de tumores (131).

### 1.2.3 *MiRs* como biomarcadores

Los *miRs* también están presentes en los fluidos humanos como el plasma, suero, orina y saliva entre otros, lo que hace que resulten de gran interés como biomarcadores de numerosas enfermedades (132). Con el desarrollo adecuado, presentan el potencial de identificar problemas metabólicos ya durante la fase preclínica, permiten evaluar la severidad de la enfermedad, identificar la predisposición de los pacientes a determinada enfermedad metabólica (evaluar el riesgo) e incluso confirmar un diagnóstico (132). Entre todos los *miR*, los *miRs* plasmáticos son los que tienen un mayor potencial como biomarcadores, gracias a su gran estabilidad a temperatura ambiente y a múltiples ciclos de congelación-descongelación, posiblemente debido a su asociación con lipoproteínas y a su presencia en vesículas circulantes (132).

### 1.2.4 *MiRs* y síndrome metabólico

Tras el descubrimiento de que los *miRs* juegan un papel importante en la regulación metabólica, se ha sugerido que son importantes reguladores del metabolismo de la glucosa y los lípidos, los cuales están íntimamente relacionados con el desarrollo de resistencia a la insulina, *T2DM* y obesidad y por tanto predisponen al individuo a padecerlas (1, 133). Durante la obesidad, muchos *miRs* presentan un papel tanto compensatorio como fisiopatológico en los distintos tejidos implicados pero también juegan un gran papel los *miRs* circulantes, ya que pueden inducir cambios distales en los *miRs* tisulares (132).

- **miRs circulantes**

Varios estudios han revelado la presencia de *miRs* en el suero y plasma, muchos de ellos presentan modificaciones en su expresión bajo diferentes condiciones patológicas y generalmente se encuentran empaquetados en vesículas, como los exosomas, que los protegen de la degradación (132). En la *Tabla 6*, se resumen algunos de los *miR* circulantes conocidos alterados en diferentes enfermedades metabólicas:

<i>miR</i>	Enfermedad metabólica	Referencias
↓ <i>miR-126</i> , ↓ <i>miR-29</i> , ↓ <i>miR-24</i> , ↓ <i>miR-191</i> , ↓ <i>miR-320</i> , ↓ <i>miR-30d</i>	T2DM	(134-137)
↑ <i>miR-1</i> , ↑ <i>miR-21</i> , ↑ <i>miR-133a</i> , ↑ <i>miR-208</i>	Infarto de miocardio	(137)
↑ <i>miR-122</i>	Daño hepático y esteatosis	(139)
↑ <i>let-7e</i>	Hipertensión	(140)
↑ <i>miR-130a</i> , ↑ <i>miR-195</i>	Presión sanguínea	(141)
↑ <i>let-7b</i> , ↑ <i>miR-221</i>	Síndrome metabólico (específico de ☐)	(142)
↑ <i>let-7b</i> , ↑ <i>miR-143</i> , ↑ <i>miR-221</i>	Diferenciación adipogénica-Obesidad	(143)
↓ <i>miR-17-5p</i> , ↓ <i>miR-132</i>	Obesidad	(144)
↓ <i>miR-122</i> , ↓ <i>miR-324-3p</i> , ↓ <i>miR-375</i> , ↓ <i>miR-652</i> , ↑ <i>miR-625</i>	Obesidad pregestacional y gestacional	(144)
↑ <i>miR-140-5p</i> , ↑ <i>miR-142-3p</i> , ↑ <i>miR-222</i> , ↓ <i>miR-532-5p</i> , ↓ <i>miR-125b</i> , ↓ <i>miR-130b</i> , ↓ <i>miR-221</i> , ↓ <i>miR-15a</i> , ↓ <i>miR-423-5p</i> , ↓ <i>miR-520c-3p</i>	Obesidad mórbida	(145)
↓ <i>miR-17-5p</i>	Enfermedad arterial coronaria	(146)
↑ <i>miR-33</i>	Hipercolesterolemia familiar y desórdenes cardiometabólicos	(147)
↑ <i>miR-122</i>	Hígado graso no alcohólico, resistencia a insulina, obesidad, síndrome metabólico, T2DM	(148, 149)
↑ <i>miR-122</i> , ↑ <i>miR-199a</i>	Obesidad infantil	(150)
↓ <i>miR-375</i>	Diabetes mellitus tipo 1 (T1DM) temprana	(151)

**Tabla 6.** *miRs* circulantes alterados en enfermedades metabólicas. ↑: se encuentran sobreexpresados y ↓: su expresión se encuentra disminuida en la enfermedad descrita.

- **miRs en tejidos**

Diferentes autores han demostrado que en la mayoría de los tejidos implicados en la obesidad y el desarrollo del síndrome metabólico, la expresión de los *miR* está desregulada (152, 153). La comprensión del papel que desempeñan estos *miR* en el metabolismo y la homeostasis energética, es primordial para el diseño de futuras estrategias terapéuticas (152, 153). De los múltiples *miRs* asociados con la obesidad y el síndrome metabólico en humanos, al menos 155 están presentes en el tejido adiposo blanco (154), considerándolo a su vez, la mayor fuente de *miRs* circulantes, sin embargo, con la edad, la cantidad de *miRs* en el tejido adiposo blanco descende, debido a una disminución de la enzima de procesamiento de *miRs*, Dicer (130). De estos 155, destacan *miR-221*, *miR-201*, *miR-222* y *miR-16*, por presentar niveles de expresión muy elevados en grasa (130). Sin embargo, otros estudios van más allá y revelan que el tejido adiposo constituye una fuente importante de *miR* circulantes exosomales, que pueden regular la expresión génica en tejidos distantes y por tanto, funcionaría como una forma de adipoquina (130). Aunque existe gran controversia en este momento, ya existen varios estudios que comparan el perfil de *miRs* en el tejido adiposo de humanos obesos con el perfil de *miRs* en el mismo tejido en humanos sin obesidad o incluso su correlación con el IMC (155).

La primera evidencia de que los *miRs* desempeñaban algún papel en la regulación de los adipocitos fue en *Drosophila*, observándose posteriormente que un amplio rango de *miRs* estaban involucrados en la regulación del metabolismo de la glucosa y lipídico, en la *Tabla 7* y en la *Tabla 8* se resume un listado de *miRs* y su posible implicación en la diferenciación de los adipocitos:

<i>miRs</i>	Proceso en el que están implicados o diana	Referencias
<i>miR-17</i>	Rb2/p130	(156)
<i>miR-21</i>	Vía de señalización de TGF- $\beta$	(156-158)
<i>miR-26b</i>	PTEN	(159-161)
<i>miR-30a/d</i>	RUNX2	(162)
<i>miR-103</i>	MEF2D y PANK1	(163)
<i>miR-143</i>	Vía de señalización MAPK (MAPK7)	(156, 164)
<i>miR-146b</i>	SIRT1	(165)

<i>miRs</i>	Proceso en el que están implicados o diana	Referencias
<i>miR-148a</i> y <i>miR-210</i>	Vía de señalización de Wnt	(166)
<i>miR-181</i>	TNF $\alpha$	(167)
<i>miR-199a</i>	Smad1	(171)
<i>miR-204</i>	Runx2	(169)
<i>miR-320</i>	RUNX2	(170)
<i>miR-371</i>	Modificaciones epigenéticas Diferenciación adipogénica	(171)
<i>miR-375</i>	Vía de señalización ERK1/2	(172)
<i>miR-378</i>	Diferenciación y desarrollo de los adipocitos	(173)
<i>miR-637</i>	Sp7	(174)

**Tabla 7. MiRs que promueven la adipogénesis.**

<i>miRs</i>	Proceso/diana	Referencias
<i>let-7</i>	Vía de señalización de FABP4 y PPAR $\gamma$	(173)
<i>miR-15a</i>	DLK1	(175)
<i>miR-22</i>	HDAC6	
<i>miR-27a/b</i>	Vía de señalización MAPK/ERK y señalización de PHB, C/EBP $\beta$ , PPAR $\gamma$ y Ap2	(176, 177)
<i>miR-31</i>	Señalización de C/EBP $\beta$	(178)
<i>miR-33b</i>	Señalización de C/EBP $\beta$ y PPAR $\gamma$	(114)
<i>miR-93</i>	Sirt7 y Tbx3	(179)
<i>miR-125a</i>	ERR $\alpha$	(180)
<i>miR-130</i>	Inhibición de PPAR $\gamma$	(43)
<i>miR-138</i>	EID-1	(181)

<i>miRs</i>	Proceso/diana	Referencias
<i>miR-145</i>	IRS1	(132)
<i>miR-155</i>	Vía C/EBP $\beta$	(182)
<i>miR-193a/b</i>	Producción de adiponectina por el tejido adiposo	(183)
<i>miR-194</i>	Inhibición de la adipogénesis	(184)
<i>miR-221</i>	Señalización de la adiponectina	(182)
<i>miR-222</i>	Metabolismo de la glucosa	(182)
<i>miR-224</i>	EGR2	(185)
<i>miR-344</i>	GSK3 $\beta$	(186)
<i>miR-363</i>	Inhibición de la diferenciación de los adipocitos	(187)
<i>miR-365</i>	Diferenciación de grasa marrón	(188)
<i>miR-369</i>	FABP4	(171)
<i>miR-448</i>	KLF5	(189)
<i>miR-709</i>	GSK3 $\beta$	(190)

**Tabla 8. *MiRs* que inhiben la adipogénesis.**

De los anteriores, cabe destacar que *miR-143* y *miR-130* son de los *miR* más estudiados relacionados con la adipogénesis y con frecuencia, se estudian juntos. Por otro lado, la sobreexpresión de *miR-27a* y *miR-130a* inhibe la diferenciación de los adipocitos a través de *PPAR $\gamma$*  y se ha demostrado que los niveles de expresión de éstos son bajos en el tejido adiposo subcutáneo abdominal de mujeres obesas comparado con mujeres delgadas (1). *miR-365*, *miR-133* y *miR-455* están implicados en la conversión de *WAT* a *BAT* y también en la diferenciación (2).

Se ha descrito que la obesidad está asociada con el descenso de los niveles de *miR-17* en el tejido adiposo subcutáneo y omental de humanos obesos (191). Por otro lado, los *miRs* que regulan el metabolismo lipídico y lipoproteico mejor caracterizados son *miR-33a/b*. El primero, *miR-33a*, es un miembro de la familia *MIR-33* que se encuentra evolutivamente conservado entre especies de animales, mientras que el segundo, *miR-33b* se conserva solo en ciertos mamíferos. En humanos, cuando los niveles de colesterol intracelular son bajos,

*MIR33A* se cotranscribe con el factor de transcripción de unión del elemento regulador del estero 2 (SREBF2) e incrementa la biosíntesis y captación de colesterol así como reduce la excreción de colesterol, mientras que *MIR33B*, se cotranscribe con el factor de transcripción de unión del elemento regulador del estero 1 (SREBF1) y promueve la síntesis de ácidos grasos, reprime la oxidación de los ácidos grasos e incrementa los niveles intracelulares de colesterol (192). También se ha descrito que en el tejido adiposo inflamado, *miR-132* controla la expresión de interleuquina 8 (IL-8) y el ligando de quimiocinas 2 (*CCL2*), *miR-193* influye sobre la secreción de *CCL2* en adipocitos humanos mientras que *miR-145* incrementa la expresión de *TNF $\alpha$*  por los adipocitos; y además, *miR-155* es inducido por la inflamación y participa en la amplificación del fenotipo inflamatorio (193). *MiR-206* también juega un papel importante en la regulación del metabolismo lipídico y la homeostasis de la glucosa, habiéndose identificado ya varias dianas de este *miR*, entre ellas el receptor hepático  $\alpha$  (*LXR $\alpha$* ) (194). En ratones se ha descrito que *miR-34a* regula el desarrollo de obesidad inducida por la dieta, presentando un complejo papel en el metabolismo y que varía dependiendo de los distintos tipos celulares (195) y que los niveles de expresión de *miR-21* se correlacionan con el número de adipocitos en el *WAT* de ratones con obesidad inducida por dieta alta en grasa (196). Además, estudios previos han revelado niveles de expresión elevados de *miR-342-3p* en el tejido adiposo de ratones obesos, y que además, su expresión también aumenta durante la diferenciación adipogénica tanto en células madre mesenquimales de humanos y como en células 3T3-L1, mientras que la adipogénesis se ve bloqueada por la inhibición de *miR-342-3p* (197). Otros autores han identificado a *miR-335* como un *miR* relacionado con la adipogénesis, implicado tanto en el metabolismo de los ácidos grasos como de la lipogénesis. Durante la diferenciación de adipocitos humanos, *miR-335* aumenta con el tratamiento con leptina, resistina, *TNF $\alpha$*  e IL-6 y su expresión aumenta además, durante el proceso de diferenciación de los adipocitos (198). Respecto a *miR-210*, ya relacionado a nivel circulante con la diabetes, se ha descrito que en el tejido adiposo subcutáneo de pacientes obesos se encuentra regulado negativamente (199). También en pacientes obesos, han estudiado al *miR-192*, en concreto análisis en el tejido adiposo visceral de pacientes obesos revelan que *miR-192* es un regulador de la diferenciación de los adipocitos y la homeostasis lipídica (200). Otros estudios relacionados con la contribución de las células b a las funciones del tejido adiposo durante la obesidad, muestran que *miR-150*, un *miR* regulador de las células B, juega un papel importante en la modulación de la inflamación del tejido adiposo relacionada con la obesidad y la resistencia a insulina (201). Estudios recientes en humanos, señalan por otro lado, que *miR-146a* reduce la respuesta inflamatoria en adipocitos humanos, pudiendo contribuir mediante retroalimentación negativa a la regulación de los procesos inflamatorios en el tejido adiposo blanco (202), evitando una respuesta inflamatoria y estudios paralelos *in vitro* en adipocitos porcinos, demostraron que *miR-146a* podía inhibir la adipogénesis inducida por *TNF $\alpha$*  a través de la inhibición del INSR (203). Otros autores demostraron que los niveles de



*miR-30d*, *miR-24* y *miR-146* (algunos ya descritos con anterioridad) permanecen elevados en el tejido adiposo abdominal de personas obesas y diabéticas (204). Atendiendo a *miR-125a*, se realizaron estudios en roedores, que posteriormente fueron confirmados en humanos, detectándose que la expresión de *miR-125a* está reducida de forma considerable en la grasa subcutánea y visceral de pacientes obesos, independientemente de si padecían diabetes o no (205, 206). En ratón se han detectado niveles de expresión elevados de *miR-93* en varios tejidos, incluyendo grasa visceral y subcutánea, estando disminuidos en tejido adiposo visceral de ratones *ob/ob*, sugiriendo que *miR-93* está implicado en la adipogénesis visceral (179). Estos resultados, se vieron apoyados cuando observaron que la inhibición de *miR-93 in vitro*, promovía la diferenciación de los adipocitos (179). En otros estudios, diferentes autores han comprobado que los niveles de expresión de *miR-30c* incrementan en las células humanas multipotentes derivadas del tejido adiposo durante la adipogénesis, la inducción de genes marcadores de adipocitos tras la sobreexpresión de *miR-30c*, así como la acumulación de triglicéridos (207).

En cuanto al *BAT*, se ha descrito la importancia de varios *miR* en su formación; el ejemplo más destacado es el clúster *miR-193b-365*, implicado en la regulación de la diferenciación de grasa marrón, sin embargo en la actualidad no está clara su función ya que estudios *in vivo* en ausencia de *miR-193* muestran una función normal del *BAT* (152, 208). *MiR-182* y *miR-230* han sido identificados como reguladores positivos del desarrollo de los adipocitos marrones mientras que el clúster *miR-106b-93* como un regulador negativo (208). Si hacemos referencia a la regulación del desarrollo de los adipocitos beige *miR-196a* y *miR-26* son reguladores positivos del proceso de *browning*. Pero también han sido identificados otros *miR* como reguladores del desarrollo tanto de adipocitos marrones como beis, entre ellos destaca la familia de *miR-30* (en concreto *miR-30b* y *miR30c*), *miR-455*, *miR-378*, *miR-133*, *miR-155*, *miR-27* y *miR-34a* (152).

A nivel pancreático, los islotes de Langerhans son clave para mantener los niveles de glucosa, por un lado la secreción de insulina por las células  $\beta$  del páncreas es necesaria para la captación de glucosa y por otro, las células  $\alpha$  secretan glucagón, necesario para la producción de glucosa hepática (152). En el páncreas, las familias de *miR-200* y *miR-29* están implicadas en el mantenimiento del balance entre la proliferación y diferenciación; *miR-7*, *miR-375* y *miR-335* en la exocitosis de insulina (153). De los citados anteriormente, el *miR-375* es el más abundante en el páncreas, constituyendo aproximadamente el 10% de los *miR* de las células  $\beta$ -pancreáticas, éste regula la secreción de insulina independientemente de los niveles de glucosa en plasma pero también está implicado en la regulación de la expresión de genes que controlan la proliferación y crecimiento celular (153). Por otro lado, *miR-33a* y *miR-33b* están implicados en el metabolismo del colesterol y lipídico, mientras que *miR-103* y *miR-*

107 regulan la sensibilidad hepática a la insulina. Otros como *miR-124a*, además de guardar relación con el desarrollo endocrino del páncreas, es considerado un regulador negativo de la secreción de insulina y se encuentra sobreexpresado en este órgano en pacientes T2DM (209, 210).

En modelos de ratón, también se ha descrito que curiosamente, el factor de transcripción de neurogenina 3 (*Ngn3*), el cual es un marcador temprano de las células de los islotes pancreáticos con un papel importante en el desarrollo de los linajes endocrinos de estos animales, es diana de *miRs* como *miR-375*, *miR-15a*, *miR-15b*, *miR-16* y *miR-195* (153).

En los hepatocitos, *miR-122* es el *miR* más abundante, con aproximadamente 135000 copias, representando aproximadamente el 75% de la expresión total de los *miR* en hepatocitos humanos y está implicado en numerosas funciones del hígado como el metabolismo del colesterol, respuestas a estrés, infecciones virales, cáncer de hígado, etc. (133) También está implicado en el síndrome metabólico y otras enfermedades del hígado como el hígado graso no alcohólico o cirrosis. Sin embargo, existen otros *miR* como *miR-27b*, *miR-33-p3*, *miR-34a*, *miR-103*, *miR-104*, *miR-223* y *miR-370*, que también controlan el metabolismo de los ácidos grasos y la biosíntesis de colesterol en el hígado. Con respecto a *miR-33-3p*, se ha descrito además que su inhibición en ratones tiene efectos adversos sobre el metabolismo lipídico y de la insulina (210).

Varios estudios describen que *miR-21*, también se encuentra sobreexpresado en el hígado de ratones y pacientes con hígado graso no alcohólico, pero no en pacientes con esteatosis leve. *PPAR $\gamma$* , es una de las dianas de *miR-21* que se sabe que está implicada en el desarrollo del hígado graso no alcohólico, cuya expresión desciende en el hígado de ratones con esta enfermedad y se restaura tras la inhibición de *miR-21*, lo que a su vez desciende el daño en el hígado, la inflamación y la fibrosis (212).

El músculo esquelético constituye más del 40% del peso corporal de una persona normal sana, y es por tanto, el mayor órgano corporal. Varios autores han descrito que los *miR* son necesarios para un desarrollo muscular apropiado y control de las fibras musculares (152). También desempeñan papeles importantes en el metabolismo de la glucosa, aunque no se han llevado a cabo muchos estudios (132). Un ejemplo es *miR-29a*, cuyos niveles de expresión incrementan en los miocitos de roedores sometidos a dieta alta en grasa (213-215). Relacionado con el metabolismo de la glucosa, en concreto con su captación, también se ha descrito que otros *miRs* regulan de forma directa o indirecta la expresión de GLUT4, algunos ejemplos son *miR-21a-5p*, *miR-29a-3p*, *miR-29c-3p*, *miR-93-5p*, *miR-106b-5p*, *miR-133a-3p*, *miR-133b-3p*, *miR-222-3p* y *miR-223-3p*, cuyos niveles de expresión están además alterados durante la diabetes (215).

Como ya hemos explicado anteriormente tanto el cerebro, como el sistema nervioso central y periférico están implicados en la regulación del apetito, de la masa grasa corporal y del metabolismo de la glucosa (216). En el cerebro también se ha observado que hay *miRs* que se expresan de forma diferencial durante la obesidad y síndrome metabólico, y que además están relacionados con la regulación de factores neurales específicos de la obesidad, en concreto con la regulación del apetito y la señalización neural de órganos y tejidos como el hígado, músculo, páncreas y tracto intestinal a distintos niveles, influyendo en el metabolismo (216). Entre estos *miRs*, destaca *miR-132*, por poseer una alta expresión en el tejido cerebral y distintos tipos celulares de neuronas, respecto a este *miR*, existen evidencias de su implicación en la regulación de la proteína de unión al *elemento* de respuesta a AMP cíclico (CREB), la cual está involucrada en la homeostasis de la glucosa (216).

Además del *miR* descrito anteriormente, resultados ya publicados en nuestro grupo, muestran que los patrones de expresión de *miR-218* se encuentran alterados en el hipotálamo de ratones sometidos a restricción calórica y/o dieta alta en grasa (217), además este *miR* ha sido relacionado con la inhibición de la fosforilación de AKT (218) al igual que *miR-132*, cuyos niveles de expresión también aumentan con la restricción calórica y con la dieta alta en grasa. Otro *miR* interesante, es *miR-200a*, miembro de la familia de *miR-200*, cuya inhibición puede revertir la obesidad aumentando los niveles del receptor de leptina e insulina en el hipotálamo (219), también se ha descrito que los niveles de expresión de *miR-200a* así como *miR-200b* y *miR-200c* se encuentran regulados negativamente en el hipotálamo de roedores tras ser sometidos a restricción calórica (217).



## **2. Justificación**



## 2. Justificación

La obesidad es la enfermedad metabólica más frecuente en la actualidad. Su alta prevalencia y sus predicciones futuras poco esperanzadoras, hacen que sean necesarios más estudios para comprender sus mecanismos moleculares. Es una enfermedad regulada por múltiples factores como los epigenéticos, genéticos, hormonales y ambientales entre otros. Ante el evidente vínculo de los *miRs* con las enfermedades, incluyendo el papel crucial que juegan en el mantenimiento y alteración de los procesos fisiológicos, entre ellos el equilibrio energético y la homeostasis metabólica así como la conocida expresión alterada durante la obesidad en animales y humanos, se hace necesario avanzar en este campo. Además, en la actualidad los estudios proteómicos disponibles tras las diferentes estrategias aplicadas para la pérdida de peso son limitados y los datos referentes a hormonas no clásicas, sino de descubrimiento más reciente, son escasos y contradictorios. Por todo ello, nos hemos planteado los objetivos descritos en el siguiente apartado.





## **3. Objetivos**



### 3. Objetivos

Teniendo en cuenta todo lo anterior, nos hemos planteado 3 objetivos principales y varios objetivos secundarios:

1. Identificar posibles *miRs* desregulados durante la obesidad y/o síndrome metabólico y su posible papel en la adipogénesis.
  - 1.1 Identificar mediante algoritmos informáticos aquellos *miRs* de interés que presenten potenciales diana implicadas en vías de señalización desreguladas durante la obesidad.
  - 1.2 Comprobar de forma individual la implicación en la adipogénesis de *miRs* seleccionados a partir del objetivo 1.1 mediante técnicas que aumenten su expresión.
  - 1.3 Estudiar el perfil de expresión tanto circulante como tisular en *miRs* de interés en ratas *Wistar* sometidas a distintas dietas.
2. Estudiar y comparar el perfil proteómico humano de grasa subcutánea durante el estado de obesidad mórbida y tras la pérdida de peso inducida por la cirugía bariátrica.
  - 2.1 Comparar mediante espectrometría de masas de forma cualitativa y cuantitativa el perfil proteómico de grasa subcutánea en pacientes con obesidad mórbida y los mismos pacientes tras la pérdida de peso inducida por la cirugía bariátrica.
  - 2.2 Validar mediante *Western blot* algunas de las proteínas que presenten diferencias estadísticamente significativas a nivel cuantitativo en el objetivo 2.1.
  - 2.3 Estudiar mediante *PCR* en tiempo real los niveles de expresión génica de proteínas que mostraron diferencias estadísticamente significativas a nivel cuantitativo en el objetivo 2.1.
3. Estudiar la alteración de los niveles de expresión de *FNDC5* e irisina bajo diferentes estados de estrés metabólico y tratamientos hormonales en ratas macho de la cepa *Wistar*. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos secundarios:
  - 3.1 Realizar un perfil de expresión de *FNDC5* en diferentes tejidos de ratas *Wistar*.
  - 3.2 Evaluar los efectos de diferentes dietas a largo plazo sobre los niveles de expresión de *FNDC5* a nivel central y periférico.
  - 3.3 Determinar los efectos de la leptina, la insulina y la diabetes sobre los niveles de expresión génica de *FNDC5* e irisina en ratas *Wistar* a nivel central y periférico.
  - 3.4 Conocer los efectos de la irisina exógena sobre los niveles circulantes de insulina y glucosa.



## **4. Material y métodos**



## 4. Material y métodos

### 4.1 Obtención de muestras biológicas

#### 4.1.1 Línea celular 3T3-L1

Los experimentos *in vitro* se han llevado a cabo empleando la línea celular 3T3-L1 (*Zen-Bio*) en pases inferiores al 17, estas células se cultivaron en placas de cultivo de 100 mm de diámetro para su expansión y placas multipocillo de 12 pocillos para la realización de los experimentos. Se emplearon para la extracción de ARN y posterior análisis de genes y *miRs* así como para la realización de tinciones histoquímicas como el *Oil Red O*. Los modelos experimentales y técnicas empleadas se describen en los apartados 4.2 y 4.3 de este manuscrito.

#### 4.1.2 Animales de experimentación

Para llevar a cabo los modelos animales que se describen en el apartado 4.2, se emplearon ratas de la cepa *Wistar* de diferentes edades, que fueron alojadas bajo temperatura controlada y ciclos de 12 h de luz y oscuridad (fase luminosa de 08:00 a 20:00 h) y sacrificadas mediante dislocación cervical. Estos modelos se llevaron a cabo tras la revisión y aprobación por el comité de ética de la Universidad de A Coruña y el CHUAC de acuerdo con la legislación vigente en la Unión Europea. Únicamente se emplearon ratas hembra para obtener ovarios y placenta, mientras que el resto de experimentos fueron realizados empleando ratas macho para evitar posibles interferencias hormonales del ciclo estral o reproductivo.

Los niveles de glucosa se midieron *in vivo* empleando un glucométero y una gota de sangre de la vena de la cola.

Tras el sacrificio de los animales se recogió la sangre troncal en tubos *Vacurette*® que presentan gel y activador coagulante de sílice para obtener suero y tubos *Vacurette*® con EDTA 3K para obtener plasma. A continuación se centrifugaron a 4.000 r. p. m. durante 15 minutos a 4 °C y se recogió el sobrenadante (suero y plasma respectivamente), por último se conservaron a -80 °C hasta su uso; estas muestras se emplearon para medir los niveles de irisina e insulina mediante el empleo de *kits* comerciales de *ELISA* (*Adipogen* y *DRG* respectivamente) siguiendo las especificaciones del fabricante y los niveles de expresión de *miRs*.

Las muestras de tejidos se tomaron inmediatamente después del sacrificio, se pesaron y se congelaron lo más rápido posible en hielo seco y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. El pesado de órganos y tejidos se empleó para calcular los índices somáticos mediante el siguiente ratio:

$$[\text{peso del tejido (u órgano)} / \text{peso corporal del animal}] \times 100$$

### 4.1.3 Pacientes

Para los estudios de expresión de *miRs*, se emplearon muestras de grasa subcutánea abdominal de 38 pacientes obesos mórbidos el día que se sometieron a cirugía bariátrica (grupo obesidad/obesos), muestras de grasa subcutánea abdominal de 22 pacientes sanos, no obesos, como control y muestras de grasa subcutánea abdominal de 6 de los pacientes que ya se habían sometido a cirugía bariátrica para disminuir su porcentaje de masa grasa y por tanto peso corporal (grupo post-obesos). Para los estudios de expresión del ARNm se empleó un mayor número de pacientes: 32 pacientes control, 148 pacientes obesos mórbidos y 6 de estos últimos una vez que disminuyó su porcentaje de masa grasa y por tanto peso corporal.

Para llevar a cabo los estudios de proteómica también se tomaron muestras de grasa subcutánea de la región abdominal de 4 pacientes obesos mórbidos (IMC superior 38,8 kg/m<sup>2</sup>) el día que se sometieron a cirugía bariátrica (grupo obesidad/obesos) y una vez que disminuyó de forma significativa el porcentaje de masa grasa (y por tanto peso corporal).

En todos los casos las muestras de los pacientes obesos mórbidos se obtuvieron el día en el que se sometieron a cirugía bariátrica; las muestras del grupo post-obesos cuando éstos disminuyeron su peso corporal y consiguieron la estabilización del mismo, abandonando el estadio de obesidad y fueron sometidos a cirugía plástica reconstructiva abdominal (abdominoplastia) para la eliminación de los colgajos de piel. Entre ambas cirugías (la cirugía bariátrica y la abdominoplastia) trascurrieron un total 2-3 años (dependiendo del paciente). Mientras que la obtención de las muestras de los pacientes del grupo control, se realizó en el momento en que fueron sometidos a cirugías generales programadas concretamente colecistectomía o hernia.

Todos los pacientes del grupo obesidad y del grupo post-obesos se reclutaron de la consulta externa de obesidad del servicio de endocrinología del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), mientras que los pacientes del grupo control del servicio de cirugía general del mismo complejo hospitalario.

En todos los casos, las muestras de grasa subcutánea fueron tomadas por el equipo de cirugía durante la intervención quirúrgica bajo anestesia general y toda la noche de ayuno, e introducidas en hielo seco de forma inmediata para su congelación sin lavados ni tratamientos previos.

Todos los pacientes recibieron y firmaron el consentimiento informado en el que se indicaban las características del estudio así como las muestras que se iban a tomar (*Anexo 1*). El estudio está realizado de acuerdo a los principios establecidos por la VII declaración de Helsinki de la asociación médica mundial (2002) así como a los criterios establecidos por el



convenio de Oviedo (1997-2000) y la legislación española vigente, Ley 14/2007 de investigación biomédica. Y además, ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia.

## 4.2 Diseños experimentales

### a. *MiRs* relacionados con la obesidad y la adipogénesis

#### i. Análisis de *miRs* mediante algoritmos bioinformáticos

Se sabe que un gran porcentaje del ARN, está regulado por *miRs* y a su vez un mismo *miR* puede regular distintos ARNm. Ante la imposibilidad de estudiar todos los *miRs* conocidos para saber cuáles están relacionados con la obesidad/adipogénesis empleamos distintos algoritmos informáticos como *TargetScan*, *miRanda* y *miRWalk*, lo que nos permitió realizar una lista de *miRs* que tienen como posibles dianas genes implicados en las rutas metabólicas alteradas en la obesidad, como la resistencia a la insulina, la resistencia a la leptina, etc., tales como los receptores de la leptina, insulina y adiponectina, proteína tirosina fosfatasa 1B (*PTP1B*), *ROR $\alpha$*  y *SOCS3*. Y posteriormente se realizaron estudios a la inversa, es decir, buscamos mediante algoritmos informáticos posibles dianas de los *miRs* seleccionados con anterioridad.

La elección de los *miRs* individuales a estudiar, se llevó a cabo en función de sus dianas y su implicación e importancia en la obesidad y comorbilidades asociadas, principalmente el síndrome metabólico, la resistencia a insulina, la resistencia a leptina y adipogénesis, teniendo en cuenta además, los niveles de expresión de cada *miR*.

#### ii. Regulación de la adipogénesis por *miRs*

##### • Regulación de la adipogénesis por miembros de la familia *MIR-19*

Para investigar si *miR-19a-3p* y *miR-19b-3p* (en adelante *miR-19a* y *miR-19b*) estaban implicados en la regulación de la adipogénesis, se llevaron a cabo varios modelos en la línea celular 3T3-L1. En el primero de ellos, preadipocitos sin diferenciar se transfectaron con un sobreexpresante comercial para *miR-19a* cuando alcanzaron la confluencia 100%, tras 24 h en recuperación, se indujo la diferenciación y se analizaron diferentes marcadores y factores transcripcionales de la adipogénesis mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (*qPCR*), así como su capacidad para almacenar lípidos mediante *Oil Red O* a diferentes tiempos de diferenciación (2, 4 y 6 días); de la misma forma, se realizó el mismo estudio

empleando un sobreexpresante comercial para *miR-19b*. También se llevó a cabo un tercer modelo del mismo modo, pero empleando al mismo tiempo el sobreexpresante comercial de *miR-19a* y el de *miR-19b*, con la finalidad de comprobar si los efectos observados por separado, podrían ser acumulativos por tratarse de dos miembros de la misma familia. En este mismo modelo, también analizamos los niveles de expresión del ARNm del transportador 1 en casete de unión a ATP (*ABCA1*), de la enzima que codifica para la esteroil-CoA desaturasa 1 (*SCD1*) y del factor inhibidor de la migración de macrófagos (*MIF*).

Para comprobar si la familia *MIR-19* regula el proceso de *browning* en los adipocitos *in vitro*, preadipocitos sin diferenciar se transfectaron de la misma forma con los sobreexpresantes comerciales de *miR-19a* y *miR-19b*, posteriormente se indujo la diferenciación e inducción del *browning*, y tras 8 días se llevó a cabo un estímulo con forskolina 10  $\mu$ M durante 4 h tanto en el grupo control como en el grupo sobreexpresado y se analizaron los niveles de ARNm de *UCP1* mediante *qPCR*.

Para comprobar si el efecto de estos *miRs* sobre la adipogénesis podría ser ejercicio a través de la inhibición de *ROR $\alpha$* , se realizó el mismo estudio que en el que empleamos de forma individual el sobreexpresante comercial para *miR-19b* añadiendo además, un agonista de *ROR $\alpha$*  (SR1078, *Sigma-Aldrich*) desde el día de la diferenciación a una concentración final de 25  $\mu$ M.

Para analizar los niveles de expresión de los miembros de la familia *MIR-19* en humanos y su relación con la obesidad, se emplearon 38 muestras de grasa subcutánea de pacientes obesos el día que se sometieron a cirugía bariátrica (grupo obesidad/obesos) y 6 de ellos tras la disminución de su peso corporal y abandono del estadio de obesidad y estabilización del mismo (grupo post-obesos) para estudiar el efecto de la cirugía bariátrica y por tanto la pérdida de peso sobre los niveles de expresión de estos *miRs*, así como 22 muestras de grasa subcutánea de pacientes sanos, no obesos, como control. Posteriormente se realizó la extracción del ARN total, se retrotranscribió y se analizó la expresión de los *miRs* mediante *qPCR*, empleando sondas comerciales, como se describe en el apartado de técnicas experimentales.

### • Regulación de la adipogénesis por miembros de la familia *MIR-200*

Para investigar si la familia *MIR-200* estaba implicada en la regulación de la adipogénesis se llevó a cabo un modelo experimental en la línea celular 3T3-L1. En primer lugar, se llevó a cabo la transducción de preadipocitos sin diferenciar con partículas lentivirales para sobreexpresar *miR-149* y *miR-200c* (miembros de la familia mencionada) y crear una línea celular estable con ambos *miRs* sobreexpresados, así como con un vector lentiviral sin secuencias

diana para ningún pre-*miR* (control negativo), posteriormente se indujo la diferenciación y se analizaron diferentes marcadores y factores transcripcionales de la adipogénesis mediante *qPCR*. No se llevó a cabo el silenciamiento de estos miRs, ya que sus niveles de expresión en adipocitos de esta línea celular son muy bajos y prácticamente indetectables mediante *qPCR*.

Para estudiar los niveles de expresión de *miR-200c* (miembro de la familia *MIR-200*) en humanos y su relación con la obesidad mediante *qPCR*, así como el efecto de la pérdida de peso inducida por la cirugía bariátrica, se emplearon las mismas muestras y técnicas que las mencionadas en el apartado anterior en el que analizamos los niveles de expresión de varios miembros de la familia *MIR-19*.

### iii. Estudio de los *miRs* circulantes y en tejidos en ratas *Wistar*

Para poder investigar si la lista de *miRs* elegidos gracias a los algoritmos bioinformáticos estaba realmente relacionada con el porcentaje de masa corporal, estudiamos los niveles de expresión de estos *miRs* tanto de modo circulante como en distintos depósitos de tejido adiposo y en el hígado. Para ellos se emplearon tres grupos de ratas macho de la cepa *Wistar*: ratas obesas, ratas con peso normal y ratas con infrapeso. Para obtener estos tres grupos experimentales, cuando los animales alcanzaron 23 días de vida, se destetaron y dividieron en tres grupos que se sometieron a distintas alteraciones en la dieta:

- El primero de los grupos, el grupo control, estuvo constituido por 10 animales sometidos a dieta normal (DN) (3,85 kcal/g; 10% kcal % grasa; *Research Diets, Inc.*)
- El segundo de los grupos, estuvo constituido por 10 animales obesos, que se sometieron a *HFD* (4,73 kcal/g; 45% kcal % grasa; *Research Diets, Inc.*)
- Y el tercero de los grupos, grupo infrapeso, estuvo sometido a DN pero restringida al 65 % de lo que ingirieron los animales del grupo control.

Los animales de todos los grupos, se mantuvieron bajo estos regímenes de alimentación, acceso libre a agua y 12 h de luz y 12 h de oscuridad durante 6 meses. Después se sacrificaron mediante dislocación cervical, tomándose muestras de sangre y de los diferentes tejidos a estudiar tales como hígado, grasa epididimal y grasa visceral.

Para el posterior estudio de los *miRs* individuales, se realizó la extracción del ARN total, posteriormente la retrotranscripción del mismo y por último se analizó su expresión mediante *qPCR* empleando sondas comerciales tal y como se describe en el apartado de técnicas experimentales.

## **b. Estudio del perfil proteómico del tejido adiposo subcutáneo durante la obesidad mórbida y tras la pérdida de peso**

Para estudiar el efecto de la cirugía bariátrica y por tanto la pérdida de peso sobre el proteoma de grasa subcutánea en humanos, se analizaron muestras de este tejido mediante espectrometría de masas, de 4 pacientes distintos, recogidas en el estadio de obesidad mórbida y tras alcanzar un IMC inferior a 30 kg/m<sup>2</sup>. De esta forma se comprobó la existencia de proteínas que se expresan durante ambos estadios o solo en uno de ellos, así como la expresión diferencial entre un estadio y otro. Posteriormente, se validaron de forma individual algunas de ellas mediante *Western blot*, empleando muestras de los mismos pacientes y a mayores muestras de 5 pacientes sanos (no obesos) como grupo control, para poder comprobar si las alteraciones producidas por la obesidad se revertían total o parcialmente tras la pérdida de peso. Por último, se comprobaron si existían además alteraciones a nivel génico aumentando el tamaño muestral.

## **c. Estudio de la alteración de la expresión de *FNDC5* e irisina bajo diferentes estados metabólicos.**

Previo a la realización del estudio, se llevó a cabo un perfil de expresión del ARNm de *FNDC5* mediante *qPCR*, en un amplio panel de tejidos de ratas macho adultas de la cepa *Wistar* y hembras de más de 75 días de edad.

### **i. Estudio de la alteración de los niveles de expresión de *FNDC5* e irisina con el porcentaje de masa corporal modificado por la dieta.**

- **Experimentos a largo plazo**

Para analizar el perfil de expresión del ARNm de *FNDC5* en hipotálamo, músculo esquelético, *WAT* y *BAT* así como los niveles de irisina en suero y su posible variación con el peso corporal, masa grasa, sensibilidad a la insulina y otros factores relacionados con la obesidad, se empleó el mismo modelo animal descrito en el punto a. iii.

- **Experimentos a corto plazo**

Para evaluar el impacto de la RC a corto plazo. Se empleó un modelo animal de ratas *Wistar* adultas de 11 semanas de edad constituido por dos grupos de 6-7 animales cada uno; un grupo control que se sometió a DN y un grupo de ayuno que se alimentó con DN y posterior ayuno prolongado durante 48 h.

## ii. Estudio de la alteración de los niveles de expresión de *FNDC5* e irisina bajo diferentes condiciones hormonales.

Para realizar el estudio de la alteración de los niveles de expresión de *FNDC5* e irisina bajo diferentes condiciones hormonales se emplearon 5 modelos animales:

- En el primer modelo, se estudiaron los efectos de la leptina en la expresión génica de *FNDC5* empleándose un modelo animal de ratas *Wistar* adultas alimentadas con DN *ad libitum* y que recibieron dos inyecciones intraperitoneales (IP) de salino (formaron el grupo control) y ratas *Wistar* adultas alimentadas *ad libitum* que recibieron dos inyecciones IP de leptina (*Prospec*, 1 mg/kg disuelta en 200 µl de salino) 24 h y 2 h antes del sacrificio de los animales, el cual se llevó a cabo en la fase luminosa. También se estudió si la leptina regula la expresión del ARNm, hipotalámico y periférico de *FNDC5* así como los niveles de expresión de irisina en plasma de una forma dependiente del estado nutricional, para lo que se empleó un grupo de ratas de la cepa *Wistar* adultas alimentadas *ad libitum* y otro grupo de ratas adultas también alimentadas *ad libitum*, y sometidas posteriormente a ayuno prolongado durante 48 h. Ambos grupos, recibieron dos inyecciones IP de leptina (*Prospec*, 1 mg/kg disuelta en 200 µl de salino) 24 h y 2 h antes del sacrificio de los animales, que se llevó a cabo también en la fase luminosa.

- Se estudiaron los efectos de la insulina y metformina en la expresión génica de *FNDC5* así como los niveles circulantes de irisina. Se empleó un modelo animal de ratas *Wistar* macho adultas, un grupo se sometió a DN *ad libitum* y se trató con insulina (*Novo Nordisk Pharma*, 1 UI/kg, disuelta en 200 µl de salino y administrada IP) y otro grupo se trató con metformina (*Sandoz*, 300 mg/kg, disuelta en 200 µl de salino y administrada subcutáneamente), mientras que el grupo control se trató con salino, durante dos semanas.

- Para evaluar los cambios en los niveles circulantes de insulina y glucosa bajo condiciones de niveles de irisina alterados, se emplearon ratas adultas, alimentadas *ad libitum* que recibieron dos inyecciones IP de irisina (*Phoenix*, 20 µg/rata disuelta en 200 µl de salino) o salino en el caso de los animales que formaban el grupo control. Las inyecciones se aplicaron 24 h y 2 h antes del sacrificio de los animales.

- Para estudiar el efecto de la diabetes sobre la expresión génica de *FNDC5* y los niveles de irisina en ratas alimentadas y sometidas a ayuno, se empleó un grupo control que fue sometido a DN *ad libitum* y otro grupo, que fue sometido al mismo régimen alimentario, al que se le provocó diabetes mediante una inyección de alloxan (*Sigma-Aldrich*, 130 mg/kg disuelto en 200 µl de salino y administrado IP), tras 6 días, se subdividió a este grupo en dos, uno de los cuales se mantuvo alimentado y el otro se sometió a ayuno durante 48 h para reducir los niveles de glucosa.

- Por último, se empleó un grupo control de ratas *Wistar* macho adultas, que se sometió a DN *ad libitum* y otro grupo, que se sometió al mismo régimen alimentario, al que se le provocó diabetes mediante una inyección de alloxan (*Sigma-Aldrich*, 130 mg/kg disuelto en 200 µl de salino y administrado IP), a su vez, 9 días tras la inyección de alloxan, este grupo de animales diabéticos se subdividió en dos, la mitad de los animales se trataron con inyecciones subcutáneas de insulina humana *NPH* para normalizar glucemia y la otra mitad recibió salino. Los valores de glucosa se analizaron cada 12 h (a primera hora de la mañana y final de la tarde) con un glucómetro en sangre obtenida de la vena de la cola y se sacrificaron 8 días después del comienzo del tratamiento con insulina.

### 4.3 Técnicas experimentales empleadas

#### 4.3.1 Cultivos celulares

##### 4.3.1.1 Expansión y mantenimiento de las líneas celulares 3T3-L1 y 293-TN

La línea celular de pre-adipocitos 3T3-L1 empleada, se estableció a partir de la expansión clonal de células de un ratón albino de Suiza (*Mus musculus*) en 1974. Tiene una morfología de fibroblasto y es muy similar a la línea celular 3T3 de la cual deriva; además presenta un gran potencial para diferenciarse de fibroblastos a adipocitos por lo que se ha empleado en numerosos estudios de adipogénesis y bioquímica de los adipocitos (154).

Las células HEK-293, son una línea celular que fue cultivada originariamente de células de riñón de un embrión humano (220). Estas células se asemejan más a neuronas inmaduras que a células típicas de riñón, y por tanto, no son un buen modelo de células de riñón o de la función renal (220). El origen exacto de la línea celular es desconocido y es complicado caracterizar las células debido a que tienen una morfología y expresión alteradas, además, las células embrionarias de riñón son un *mix* heterogéneo de casi todos los tipos celulares presentes en el cuerpo, aunque se piensa que pueden tener un origen neuronal, debido a la presencia de ARNm y productos génicos que se encuentran de forma típica en neuronas (220). Estas células, tienen 64 cromosomas y un cariotipo complejo, con dos o más copias de cada cromosoma, incluyendo 3 copias del cromosoma X (220). La línea celular productora 293-TN (*SBI*) empleada en esta tesis para la producción lentiviral, deriva de la anterior, y su única diferencia es que expresa el antígeno T SV40 grande, el cual es necesario para la secreción de partículas lentivirales al sobrenadante del cultivo celular (220).

El mantenimiento de estas líneas celulares se realizó incubando las células en medio de expansión Eagle Modificado de Dulbecco (*DMEM*) (*Gibco*), suplementado con un 10 % de

suero de cría de ternera (*Calf Serum, HyClone*) para la línea 3T3-L1 y 10 % de suero bovino fetal (*FBS, Gibco*) para la línea 293-TN, suplementados todos ellos con un 1 % de penicilina/estreptomicina (*Gibco*) bajo condiciones controladas de temperatura (37° C), CO<sub>2</sub> (5 %) y humedad, renovando el medio días alternos.

Cuando los cultivos alcanzaron una confluencia del 80 % se expandieron, para ello se les retiró el medio, se lavaron con suero fisiológico salino 0,9 % para perfusión (*Fresenius Kabi*) y se tripsinizaron con una solución de tripsina-EDTA al 0,5 % (*Gibco*) a una concentración final de 2X durante aproximadamente 5 minutos a 37 °C. Posteriormente, se inactivó la tripsina añadiendo la misma cantidad de medio *DMEM* suplementado con un 10 % de *Calf Serum* para la línea celular 3T3-L1 o *FBS* para la línea celular 293-TN, a continuación se centrifugaron durante 5 minutos a 800 r. p. m. y temperatura ambiente. Por último se resuspendió el *pellet* de células en el volumen de medio necesario. Las células que no fueron empleadas para cultivo inmediato se criopreservaron en nitrógeno líquido, para ello, se suplementó el medio con un 50 % de *Calf Serum* o *FBS* dependiendo de la línea celular y dimetil sulfóxido (*DMSO, Sigma-Aldrich*) al 11 % (v/v).

Para sembrar un número de células determinado por placa o pocillo de placa se hizo uso en todos los casos de la cámara Neubauer, con la que se contaron las células.

#### 4.3.1.2 Diferenciación de la línea celular 3T3-L1 a adipocitos

Para diferenciar la línea celular de fibroblastos 3T3-L1 a adipocitos se sembraron 80.000 células por pocillo en placas de 12 pocillos y se dejaron crecer en medio de expansión hasta alcanzar la confluencia, renovando el medio días alternos. Tras alcanzar la confluencia, se esperaron 48 h para iniciar la diferenciación; después de este período se cultivaron las células con medio *DMEM/F-12* (*Gibco*) suplementado tal y como se detalla a continuación para inducir la diferenciación durante 2 días (*Tabla 9*):

Componente	Concentración Final
<b>Suero Bovino Fetal</b> ( <i>FBS</i> )	10 %
<b>Penicilina/estreptomicina</b> ( <i>P/S</i> )	1 %
<b>Insulina</b> ( <i>Actrapid</i> )	1 µg/ml
<b>Dexametasona</b> ( <i>Sigma-Aldrich</i> )	0,25 mM
<b>3-Isobutil-1-Metil xantina</b> ( <i>IBMX</i> ) ( <i>Sigma-Aldrich</i> )	0,5 mM

**Tabla 9.** Suplementos del medio *DMEM/F-12* para preparar medio de diferenciación.

Por último, el medio de diferenciación se reemplazó por medio de mantenimiento I (*DMEM/F-12* suplementado con un 10 % de *FBS*, 1 % *P/S* e insulina a las mismas concentraciones que el medio de diferenciación) durante 2 días y finalmente este último se reemplaza por medio de mantenimiento II (*DMEM/F-12* suplementado con un 10 % de *FBS* y un 1 % de *P/S*) hasta el inicio del experimento (Figura 27):

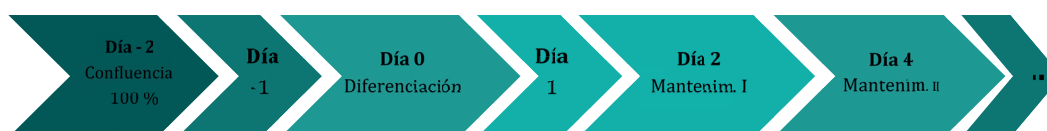


Figura 27. Línea del tiempo del proceso de diferenciación de la línea celular 3T3-L1.

#### 4.3.1.3 Inducción del *browning* en adipocitos blancos

Para inducir el *browning* en la línea celular de fibroblastos 3T3-L1, se indujo en primer lugar su diferenciación a adipocitos blancos, siguiendo el protocolo descrito en el punto 4.3.1.2 hasta el día 2. Tras retirar el medio de diferenciación a adipocitos blancos, se llevó a cabo la inducción del *browning* empleando medio *DMEM/F-12* suplementado con un 10 % *FBS* y un 1 % *P/S* además de los componentes que se detallan a continuación (Tabla 10):

Componente	Concentración Final
Triyodotironina (T3)	50 nM
Rosiglitazona	2 $\mu$ M
<i>IBMX</i>	0,5 mM
Insulina	1 $\mu$ g/ $\mu$ l
Forskolina ( <i>Santa Cruz Biotechnology</i> )	10 $\mu$ M

Tabla 10. Suplementos del medio *DMEM/F-12* para inducir el *browning*.

#### 4.3.1.4 Cultivo de plásmidos en *Escherichia coli*

Los plásmidos son pequeñas moléculas circulares, con una molécula de ADN de doble cadena. A lo largo de esta tesis se han empleado para producir lentivirus con análogos de nuestros *miRs* de interés con la finalidad de crear líneas celulares estables con una expresión endógena de esos *miRs* de interés sobreexpresada.

En la Tabla 11 se detallan los plásmidos empaquetadores y de la envuelta que se emplearon para la producción de lentivirus, así como los plásmidos (vectores) con el inserto



de interés, es decir precursores de *miRs* (pre-miARNs) que se procesan en *miRs* maduros. Además, en el *Anexo 2* se detallan los mapas de restricción de los mismos.

Vector/Plásmido	Referencia	Casa comercial
<i>pCMV-VSV-G</i> (envuelta)	#8454	Addgene
<i>pRSV-Rev</i> (empaquetado)	#12253	Addgene
<i>pMDLg/PRRE</i> (empaquetado)	#12251	Addgene
<i>pre-microRNA Expression Construct miR-200c+141</i>	MMIR-200c+141-PA-CL	SBI
<i>Mouse precursor Scramble negative control construct</i> (control negativo)	MMIR-000-PA-1	SBI

**Tabla 11. Plásmidos empleados a lo largo de esta tesis.** Se indica referencia y casa comercial.

Los plásmidos comerciales *stock* adquiridos se sembraron en placas con medio Luria-Bertani Broth (*Miller*) con agar de *Sigma-Aldrich*, suplementado con ampicilina (*Sigma-Aldrich*) a una concentración final de 50 µg/ml e incubados toda la noche a 37 °C para obtener colonias individuales. Posteriormente se inoculó un pequeño volumen (4-5 ml) de medio líquido Luria-Bertani Broth (*Miller*) también de *Sigma-Aldrich* suplementado con la misma concentración de ampicilina para obtener cultivos puros de bacterias idénticas, con éstos se realizaron glicerolados (conservación a largo plazo de los plásmidos a -80 °C en una concentración final de glicerol estéril del 25 %) y se obtuvieron extractos celulares para extracción de ADN y posterior secuenciación por el servicio de genómica del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC). Tras confirmar mediante secuenciación que eran los plásmidos deseados, se realizaron cultivos en medio líquido (200 ml de volumen) a partir de los *stocks* glicerolados realizados previamente, permitiendo a las bacterias crecer durante toda la noche a 37 °C. Posteriormente se llevó a cabo la centrifugación de los cultivos durante 30 minutos, a 4500 r. p. m. y 4 °C para obtener extractos celulares para extraer el ADN que fue empleado para la transfección de la línea celular 293-TN tal y como se describe en el apartado 4.3.9.

### 4.3.2 Extracción de ácidos nucleicos

#### 4.3.2.1 Extracción de ARN de células y tejidos

El ARN total se extrajo utilizando TRIzol® (*Invitrogen*), siguiendo las especificaciones del fabricante con ligeras modificaciones. Para llevar a cabo la homogeneización de las célu-

las y los tejidos (50-100 mg) se emplearon 0,8 ml y 1 ml de Trizol® respectivamente, posteriormente se les añadió una bola de zirconio a las muestras de células y dos a las de tejidos y se colocaron en un homogeneizador (*Qiagen Tissue Lyser*) durante 5-20 minutos hasta su completa homogeneización con una frecuencia de agitación de 25 (1/seg). A continuación, las muestras de grasa se centrifugaron durante 5 minutos a 12000 x g y 4 °C, eliminándose la fase superior grasa y el *pellet* con restos celular para recogerse la fase intermedia que contenía el ARN en un tubo *eppendorf*® limpio (etapa que se omitió para el resto de muestras). La fase de separación se realizó añadiendo a las muestras 0,23 ml de cloroformo por cada 1 ml de Trizol® empleado inicialmente, se agitó con el *vórtex* durante 30-60 segundos, se incubó a temperatura ambiente hasta que comenzaron a separarse las fases y se centrifugaron las muestras a 12000 x g durante 15 minutos a 4 °C. Se transfirió la fase acuosa (superior) que contiene el ARN a un tubo limpio y se precipitó el mismo añadiendo 0,5 ml de isopropanol (*Sigma-Aldrich*) por cada 1 ml de Trizol® empleado en la fase de homogeneización, se mezcló por inversión y se incubó durante 1 h a -20 °C, a continuación se centrifugó a 12000 x g durante 10 minutos a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se lavó el *pellet* con 1 ml de etanol (*Millipore*) frío al 75 % agitando con el *vórtex* y nuevamente se centrifugó a 8000 x g durante 5 minutos a 4 °C. Por último se eliminó el exceso de etanol y se resuspendió el *pellet* de ARN en un volumen final de 15-40 µL de H<sub>2</sub>O libre de ARNasas (*Becton Dickinson and Company Sparks*) agitando en *vórtex*. Para disolver el *pellet* de ARN se incubó la solución durante 2-3 minutos a 50 °C. El ARN se conservó a -80 °C hasta su uso.

Para comprobar su integridad, y la del resto de ácidos nucleicos, se realizaron geles de agarosa (*Sigma-Aldrich*) a una concentración del 1 % en tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X (a partir del TAE 50X comercial, *Thermo Fisher*), mientras que para llevar a cabo su cuantificación se empleó un espectrofotómetro NanoDrop-200 (*Thermo Scientific*) a 260 nm; además para conocer la contaminación por proteínas se calculó el ratio 260/280 y la contaminación por fenoles mediante el ratio 260/230.

#### 4.3.2.2 Extracción de ARN de muestras de suero

Para la extracción de ARN de muestras de suero se empleó el *kit miRNeasy* de *Qiagen* y un ensayo *miScript Primer* (*Qiagen*) como control de normalización siguiendo las especificaciones del fabricante. El ARN purificado se diluyó en H<sub>2</sub>O libre de ADNasas y ARNasas y se conservó a -80° C hasta su uso.

#### 4.3.2.3 Extracción de ADN plasmídico

El aislamiento de ADN plasmídico, se llevó a cabo empleando el kit *PureLink Expi Endotoxin-Free Maxi Plasmid Purification* de *ThermoFischer* siguiendo las especificaciones del fabricante; el ADN purificado se diluyó en H<sub>2</sub>O libre de ADNasas y ARNasas y se conservó a -80° C hasta su uso.

#### 4.3.3 Transfección transitoria de la línea celular 3T3-L1

Se llevó a cabo la transfección de la línea celular 3T3-L1 con los imitadores comerciales de *miRs* descritos en la *Tabla 12* a una concentración final de 17 nM, en presencia del reactivo de transfección *Endofectin Max (Genecopoeia)* y medio *OPTI-MEM (Gibco)* durante 24 h siguiendo las especificaciones del fabricante con ligeras modificaciones: para cada pocillo de una placa multipocillo de 12 pocillos, se preparó un tubo en el que se añadieron 1,5 µl de endofectina y 25 µL de medio *OPTI-MEM*, se mezcló con un *vórtex* y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos, en otro tubo se añadió el imitador sintético comercial a una concentración de 17 nM y se diluyó en 26,5 µl de *OPTI-MEM* y también se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se juntaron y mezclaron sin emplear *vórtex* y se incubaron otros 5 minutos a temperatura ambiente, por último, se añadieron en cada pocillo 450 µl de medio *OPTI-MEM* y 50 µl de la mezcla anterior.

Imitador sintético	Referencia
<i>miRNA mimic mmu-mir-19b-3p</i>	MC10629
<i>miRNA mimic mmu-miR-19a-3p</i>	MC10649
Control negativo	4464058

**Tabla 12.** Imitadores comerciales *mirVana*<sup>™</sup> empleados.

#### 4.3.4 Transfección de la línea celular 293-TN y producción lentiviral

En esta tesis se han creado lentivirus, los cuales son virus de ARN de cadena positiva que integran de manera estable sus genomas en los cromosomas de las células huésped o diadna, que son capaces de entrar en las células de los mamíferos (221). Los lentivirus, frente a otros sistemas, tienen las ventajas de que son capaces de transducir de forma eficiente tanto células en división como en no división, permiten la realización de estudios a largo plazo ya

que la modulación de la expresión es estable, la transducción de las poblaciones celulares es reproducible y se pueden llevar a cabo modulaciones génicas tanto inducibles como constitutivas (221).

Para llevar a cabo la transfección de la línea celular 293-TN para la producción lentiviral, fue necesario que las células presentasen una confluencia del 70-80 %. Se llevó a cabo incubando las células bajo condiciones controladas de temperatura (37 °C), CO<sub>2</sub> (5 %) y humedad con 5 ml de medio *OPTI-MEM* reducido en suero, en ausencia de antibióticos y 740 µl de cóctel de transfección durante 12 h. Para preparar el cóctel de transfección, se mezclaron con vórtex los reactivos que se describen en la *Tabla 13*, se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente los tubos A y B por separado y por último se mezcló con pipeta y sin vórtex el contenido de ambos tubos, añadiendo siempre el contenido del tubo B sobre el A. Tras 12 h se eliminó el medio con el cóctel de transfección, se lavó con suero fisiológico salino atemperado a 37° C para eliminar restos del cóctel y se añadieron 10 ml de medio de producción de lentivirus (medio *DMEM* + 10 % *FBS* inactivado por calor a 56 °C durante 45 minutos) y se recogieron los sobrenadante lentivirales tras 36 y 72 h.

Tubo A	Tubo B
ADN del Vector (4 µg)	Polietilenimina lineal de peso molecular 25000 KDa (31,49 µg)
ADN del plásmido <i>pCMV-VSV-G</i> (2µg)	
ADN del plásmido <i>pRSV-REV</i> (2µg)	
ADN del plásmido <i>pMDLg/PRRE</i> (2µg)	
Ajustamos con <i>PBS</i> libre de Ca <sup>+2</sup> y Mg <sup>+2</sup> a un volumen final de 380 µl	Ajustamos con <i>PBS</i> libre de Ca <sup>+2</sup> y Mg <sup>+2</sup> a un volumen final de 380 µl

**Tabla 13.** Reactivos para preparar el cóctel de transfección.

#### 4.3.5 Transducción de la línea celular 3T3-L1

La transducción se llevó a cabo incubando las células durante 48 h con 3 ml de sobrenadante lentiviral, al que se le añadieron 4 ml de medio fresco sin antibióticos en presencia de polibreno a una concentración final de 8 µg/µl. Tras este período, se retiró el sobrenadante lentiviral y se mantuvieron las células durante 24 h en recuperación (con el medio de expansión descrito, sin antibióticos) y por último se seleccionaron las células transducidas con puromicina a una concentración de 2 µg/ml durante 48 h, tras las cuales se mantuvieron 24 h en recuperación nuevamente, empleándose su medio de expansión correspondiente.

### 4.3.6 Técnicas histoquímicas

#### 4.3.6.1 Tinción *Oil Red O* y cuantificación

Se realizó la tinción *Oil Red O* en las células 3T3-L1 adheridas a las placas de cultivo de 12 pocillos para demostrar la presencia de lípidos. Para llevar a cabo esta tinción se preparó una solución *stock* de *Oil red O* (*Sigma-Aldrich*) en isopropanol (*Panreac*) a una concentración de 5 mg/ml, a partir de la cual se preparó la solución de trabajo con agua a una concentración de 3 mg/ml y se filtró previamente a su uso con un filtro de tamaño de poro 0,2 de  $\mu\text{m}$ . Primero se retiró completamente el medio de cultivo de cada uno de los pocillos y se fijaron las células con 1 ml de formalina al 10 % durante 1 h a temperatura ambiente, posteriormente se retiró la formalina y se lavaron los pocillos con 1ml de isopropanol al 60 %, se retiró el mismo y se dejaron secar los pocillos completamente. Se añadieron 400  $\mu\text{l}$  de la solución de trabajo de *Oil Red O* y se mantuvo durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se retiró la solución de *Oil Red O* y se lavaron los pocillos con agua bajo el grifo. Se tomaron las fotografías haciendo uso de un microscopio *Nikon Eclipse TS 100* con la cámara para microscopía digital *XM Full HD Camera (XM Family, Samsung BWC-1602)*. Por último, se eliminó el agua por completo, se dejó secar y se eluyó el *oil red* durante 10 minutos con 300  $\mu\text{l}$  de isopropanol 100 % y se cuantificó midiendo la densidad óptica (*OD*) a 450 nm en un lector de microplacas *Sunrise™ (TECAN)*, empleándose una recta de concentraciones conocidas de *Oil Red O* y como blanco isopropanol 100 %.

### 4.3.7 Reacciones en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCRs)

#### 4.3.7.1. Generación de ADNc

La generación de ADNc a partir de ARN, se llevó a cabo en un termociclador (*GeneAmp 9700*) mediante *RT-PCR*, empleando la enzima transcriptasa reversa *M-MLV (Invitrogen)*, el tampón de la transcriptasa reversa *M-MLV (M-MLV RT buffer, Invitrogen)*,  $\text{MgCl}_2$  (50 mM, *Invitrogen*), *Random Primers (Invitrogen)*, desoxirribonucleótidos trifosfato (*dNTPs*) (10 mM *dNTP Mix, Invitrogen*) así como la enzima inhibidora de ARNasas, *Rnase out™ (Invitrogen)* para muestras de células de experimentos *in vitro* y muestras de modelos animales. El volumen de reactivos empleado para cada reacción fue el siguiente (*Tabla 14*):

ARN (1 µg/µl)	10 µl
<i>M-MLV 5X RT buffer</i>	6 µl
<i>dNTPs (10 mM)</i>	6 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5 µl
<i>Random Primers (3 µg/µl)</i>	0,17 µl
RNase out™	0,25 µl
<i>M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/µL)</i>	1,5 µl
H <sub>2</sub> O libre de ARNasas	4,58 µl
<b>VOLUMEN FINAL</b>	<b>30 µl</b>

**Tabla 14.** Mix de *RT-PCR* para síntesis de ADNc a partir de ARN.

Además se realizó un control negativo de retrotranscripción (RT-), que contenía la mezcla anterior a excepción del volumen de ARN que se sustituyó por agua libre de ARNasas. Un control de ADN genómico negativo (G-), que contenía la mezcla anterior a excepción de las enzimas y el volumen de ARN se sustituyó por una mezcla de ARNs de todas las muestras de ese experimento. El programa empleado en el termociclador para la *RT-PCR* se describe a continuación (Tabla 15):

37° C	95 minutos
42° C	15 minutos
95° C	5 minutos
4° C	∞

**Tabla 15.** Programa de *RT-PCR* para síntesis de ADNc a partir de ARN.

Una vez finalizado el programa se diluyó el ADNc en un volumen de 60-70 µl de H<sub>2</sub>O libre de ARNasas.

La generación de ADNc a partir de ARN de muestras de tejido subcutáneo humano, se llevó a cabo en un termociclador (*GeneAmp 9700*) mediante *RT-PCR*, empleando la enzima *SuperScript IV (Invitrogen)*, el tampón de la enzima *SuperScript IV (5X SSIV buffer, Invitrogen)*, *Random Hexamers (Invitrogen)*, desoxirribonucleótidos trifosfato (*dNTPs*) (10 mM *dNTP Mix, Invitrogen*), *DTT* (100 mM), así como la enzima inhibidora de ARNasas *Rnase out™*

(Invitrogen). El volumen de reactivos empleado para cada reacción y el programa de reacción en cada etapa fue el siguiente (Tabla 16):

ARN (1 µg/µl)	8 µl	65 °C – 5 minutos + 1 minuto en hielo
dNTPs (10 mM)	1 µl	
Random Hexamers (50 µM)	1 µl	
H <sub>2</sub> O libre de ARNasas	2 µl	
5X SSIV buffer	6 µl	23 °C – 10 minutos  55 °C – 20 minutos  80 °C- 10 minutos
RNase out <sup>TM</sup> (40U/µL)	1 µl	
DTT (100 mM)	1 µl	
SuperScript® IV Reverse Transcriptase (200 U/µL)	1 µl	
<b>VOLUMEN FINAL</b>	<b>20 µl</b>	

Tabla 16. Mix y programa de RT-PCR para síntesis de ADNc a partir de ARN de muestras humanas.

Se realizaron los mismos controles que en el caso anterior: RT- y G-. Y una vez finalizado el programa se diluyó el ADNc en un volumen de 60 µl de H<sub>2</sub>O libre de ARNasas.

#### 4.3.7.2. Retrotranscripción de miRs

La retrotranscripción de miRs a partir de ARN, se llevó a cabo en un termociclador (GeneAmp 9700) mediante RT-PCR, empleando el Kit TaqMan MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). La mezcla para cada reacción fue la siguiente (Tabla 17):

ARN (5 ng/µL)	5 µl
dNTPs mix (100 M Total)	0,15 µl
10X RT Buffer	1,5 µl
Cebadores	2 µl
MultiScribe RT enzyme (50 U/µl)	1 µl
RNase inhibitor (20 U/µl)	0,19 µl
H <sub>2</sub> O libre de ARNasas	3,16 µl
<b>VOLUMEN FINAL</b>	<b>15 µl</b>

Tabla 17. Mix para RT-PCR de miRs.

Además se realizó un control negativo de retrotranscripción (RT-), que contenía la mezcla anterior a excepción del volumen de ARN que se sustituyó por agua libre de ARNasas. El programa empleado en el termociclador para la *RT-PCR* de *miRs* se describe a continuación (Tabla 18):

16 °C	45 minutos
42 °C	45 minutos
85 °C	5 minutos
4 °C	∞

**Tabla 18.** Programa de *RT-PCR* de *miRs*

Una vez finalizado el programa se diluyó el ADNc en un volumen de 120-150  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  libre de ARNasas.

### 4.3.8 qPCRs

#### 4.3.8.1 SYBR GREEN (para muestras de tejidos y células)

La cuantificación de la expresión génica se llevó a cabo en un termociclador (*Light Cycler 480 Roche*). Para la mezcla de reacción se empleó *PowerUp SYBR Green Master Mix (Life Technologies)*, en presencia del ADNc y los cebadores (el listado de los cebadores se detalla en el Anexo 3). Para cada reacción se describe la mezcla a continuación (Tabla 19):

ADNc	2 $\mu\text{l}$
<i>PowerUp SYBR Green Master Mix</i>	8,5 $\mu\text{l}$
Cebador hacia delante (100 nM)	0,068 $\mu\text{l}$
Cebador reverso (100 nM)	0,068 $\mu\text{l}$
$\text{H}_2\text{O}$ libre de ARNasas	6,4 $\mu\text{l}$
<b>VOLUMEN FINAL</b>	<b>17 <math>\mu\text{l}</math></b>

**Tabla 19.** Mix de *qPCR* (*SYBR Green*).



Además de las muestras a estudiar, se incluyó un control RT- y un control G-. El programa empleado se describe a continuación (*Tabla 20*):

<b>Incubación</b>	95 °C	10 min
<b>Amplificación 40 ciclos</b>	95 °C	10 seg
	60 °C	45 seg
	72 °C	4 seg
<b>Melting</b>	95 °C	5 seg
	65 °C	1 min
<b>Enfriamiento</b>	40 °C	10 seg

**Tabla 20.** Programa de *qPCR* (*SYBR Green*).

#### 4.3.8.2 Sondas *Taqman* (para *miRs*)

La cuantificación de la expresión de los *miRs* se llevó a cabo en un termociclador (*Light Cycler 480 Roche*). Para la mezcla de reacción se empleó *Taqman Universal Master Mix II, no UNG* (*Life technologies*), en presencia del ADNc y los cebadores (el listado de los cebadores se detalla en el *Anexo 3*). Para cada reacción (*Tabla 21*):

ADNc	2,5 µl
<i>Taqman Universal Master Mix II, no UNG</i>	8,75 µl
Cebadores	0,875 µl
H <sub>2</sub> O libre de ARNasas	5,375 µl
<b>VOLUMEN FINAL</b>	<b>17,5 µl</b>

**Tabla 21.** Mix de *qPCR* de *miRs* (*Taqman*).

Además de las muestras a estudiar, se incluyó un control RT- y un control G-. El programa empleado se describe a continuación (*Tabla 22*):

<b>Incubación</b>	50 °C	2 min
<b>Activación</b>	95 °C	10 min
<b>Amplificación</b>	95 °C 60 °C	15 seg 1 min
<b>Enfriamiento</b>	40 °C	10 seg

**Tabla 22.** Programa de *qPCR* (*Taqman*).

### 4.3.9 Obtención de extractos proteicos para *Western blot*

#### 4.3.9.1 Obtención de extractos proteicos

Para la obtención de extractos proteicos para *Western Blot* se llevó a cabo la homogeneización previa del tejido en tampón de lisis empleando un homogeneizador de tejidos. Una vez homogeneizado el tejido, se centrifugó a 12000 r. p. m., 4 °C durante 15 minutos para posteriormente recoger el sobrenadante que contiene las proteínas en un tubo limpio.

Tampón de lisis pH 7,5: Tris 100 mM, sacarosa 250 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, NaF 100 mM y 2 pastillas de cóctel inhibidor de proteasas (*cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail*, Roche) por cada 50 ml de tampón justo antes de su uso.

#### 4.3.9.2 Cálculo de la concentración total de proteínas

El cálculo de la concentración total de proteínas se realizó mediante el método *Bradford*. Dicha cuantificación se realizó por duplicado en una placa de 96 pocillos, empleando 10 µl de proteína y 300 µl de azul de *Comassie G-250* (*Bio-Rad*) diluido 1:4 (Azul de *Comassie G-250*:agua destilada) por pocillo y una curva estándar realizada con una proteína patrón de concentración conocida (Seroalbúmina bovina, *BSA*, *Sigma-Aldrich*). Posteriormente, se realizó la medida de la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un lector de microplacas *Sunrise™*, *TECAN*. Y por último, se diluyeron las proteínas a la concentración deseada y se conservaron a -80 °C en caso de no ser utilizadas de forma inmediata.

#### 4.3.9.3 *Western blot*

Para analizar la expresión relativa de una proteína de interés, se empleó la técnica de *Western blot* tal y como se describe a continuación:

Mediante electroforesis en geles *SDS-PAGE* de acrilamida, se realizó la separación de las proteínas por peso. Para ello, se realizó un gel concentrador o *stacking* gel para la fase superior y un gel separador o *running* gel para la fase inferior. En función del peso de la proteína objeto de estudio, los geles se usaron a diferentes concentraciones de acrilamida (8-12 %).

Gel concentrador al 4 %: 1,785 ml de H<sub>2</sub>O destilada, 2,5 ml de tampón B, 0,66 ml de acrilamida/bisacrilamida 40 % (*Bio-Rad*), 12,5 µl de TEMED (*Sigma-Aldrich*) y 25 µl de APS (*Sigma-Aldrich*) al 10%.

Gel separador al 12 % (para las demás concentraciones se añadió el volumen correspondiente de acrilamida y se restó la diferencia al agua): 0,6 ml de H<sub>2</sub>O destilada, 5,06 ml de tampón A, 4,05 ml de acrilamida/bisacrilamida 40 %, 28,5 µl de TEMED y 56,5 µl de APS al 10 %.

Tampón A pH 8,8: Tris-HCl (*Sigma-Aldrich*) 0,75 M y SDS (*Sigma-Aldrich*) al 0.2 % para un volumen final de 1 litro en H<sub>2</sub>O destilada.

Tampón B pH 6,8: Tris-HCl 0,75 M y SDS al 0,2 % para un volumen final de 1 litro en H<sub>2</sub>O destilada.

Antes de cargar las muestras en el gel de acrilamida, se procedió a la desnaturalización de las proteínas a 95 °C durante 5 minutos en presencia de tampón de carga 1X.

Tampón de carga 6X: Tris-HCl 0,0625 M, SDS al 5 %, glicerol (*Millipore*) al 10 %, 2-β-mercaptoetanol (*Sigma-Aldrich*) al 5 % y azul de bromofenol (*Sigma-Aldrich*) al 0,0025 %.

La cantidad de proteínas que se cargó por pocillo, dependió de la expresión de la proteína de interés y de la sensibilidad del anticuerpo primario.

Por último, la electroforesis se llevó a cabo durante 60-90 minutos a un voltaje fijo de 130 V en tampón de electroforesis 1X.

Tampón de electroforesis 5X: glicina (*Sigma-Aldrich*) 0,96 M, Tris base (*Sigma-Aldrich*) 0,12 M y SDS 0,017 M para un volumen final de 1 litro en H<sub>2</sub>O destilada.

La transferencia de las proteínas a la membrana se realizó con un sistema en semiseco (*Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad*), empleando membranas de polifluoruro de vinilideno (*Millipore*), las cuales fueron activadas previamente durante 2 minutos en metanol (*GPR Rectapur*), lavadas 5 minutos en H<sub>2</sub>O y 10 minutos en tampón de transferencia. La transferencia se llevó a cabo durante 1 h 40 minutos a un amperaje constante de 180 mA en tampón de transferencia 1X (40 ml tampón de transferencia 25X, 200 ml de metanol y 760 ml de H<sub>2</sub>O destilada).

Tampón de transferencia 25X: glicina 7,2 M, Tris-base 0,6 M y SDS 0,015 M para un volumen final de 1 litro en H<sub>2</sub>O destilada.

Tras finalizar la transferencia se bloqueó la membrana durante 1 h con BSA (*Sigma-Aldrich*) al 3 % en TBS-T 0,1 % a temperatura ambiente.

A continuación se llevó a cabo la hibridación de los anticuerpos específicos que reconocen un epítopo de las proteínas de estudio. Para lo que se dejó incubando la membrana toda la noche con el anticuerpo primario a 4° C. La concentración del anticuerpo varió en función de la proteína a estudiar y se siguieron las especificaciones del fabricante. En el *Anexo 4* se detallan los anticuerpos empleados. Al día siguiente se realizaron 5 lavados de 10 minutos con solución de lavado y se incubó la membrana durante 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario.

Solución de lavado TBS-T 0,1 %: 100 mL de TBS 10 X, 1 ml de *Tween (Sigma-Aldrich)* para un volumen final de 1 litro en H<sub>2</sub>O.

TBS 10X pH 7,6: Tris-base 0,2 M y NaCl (*Thermo Fisher*) 1,36 M para un volumen final de 1 litro en H<sub>2</sub>O.

Y por último, la detección de las proteínas se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia, utilizando el sustrato de inmunotransferencia de *ECL Thermo Scientific Pierce* y la cámara *Amersham Imager 600* (GE Healthcare, Life Sciences) para posteriormente realizarse la cuantificación con el *software ImageJ*.

#### 4.3.10 Análisis proteómicos

Los análisis proteómicos se realizaron en colaboración con la plataforma de proteómica del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS) tal y como se describen a continuación.

##### 4.3.10.1 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)

Para realizar una identificación de proteínas global, se cargaron 100 µg de proteína total de cada muestra en un gel de electroforesis en poliacrilamida al 10 % en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato sódico (*SDS-PAGE*). Se detuvo la electroforesis cuando el frente penetró 3 mm en el gel separador. La banda de proteínas se visualizó mediante tinción fluorescente *Sypro-Ruby (Lonza)*, posteriormente se cortó y se sometió a digestión tróptica

manual siguiendo el protocolo descrito por Shevchenko *et al.* (222) con ligeras modificaciones tal y como se detalla a continuación: se redujeron los fragmentos del gel con ditiotreitól 10 mM (*Sigma-Aldrich*) en bicarbonato de amonio 50 mM (*Sigma-Aldrich*) y se alquilaron con yodoacetamida 55 mM (*Sigma-Aldrich*) en bicarbonato de amonio 50 mM. Posteriormente los fragmentos del gel se lavaron con bicarbonato de amonio 50 mM en metanol de grado HPLC al 50 % (*Scharlau*), se deshidrataron mediante la adición de acetonitrilo de grado HPLC (*Scharlau*) y se secaron en un evaporador a vacío *SpeedVac* (*Thermo Fisher*). A continuación se añadieron 6 µl de tripsina porcina modificada (*Promega*) a los fragmentos del gel secos a una concentración final de 20 ng/µl en bicarbonato de amonio 20 mM y se incubó a 37 °C durante 16 h. Los péptidos se extrajeron por triplicado mediante incubaciones de 20 minutos en una solución de acetonitrilo al 60 % y HCOOH al 0,5 %. Los extractos peptídicos resultantes se combinaron y concentraron en un evaporador a vacío *SpeedVac* para ser almacenados a -20 °C hasta su uso.

#### 4.3.10.2 Creación de la librería espectral

Para construir las librerías espectrales de *MS/MS*, las mezclas peptídicas se analizaron mediante un método de adquisición dependiente de datos (*DDA*) empleado un micro *LC-MS/MS*. Para obtener una buena representación de los péptidos y proteínas presentes en todas las muestras, se realizaron “pools” de cada grupo realizando mezclas iguales a partir de las muestras originales. Se separaron 4 µl de cada “pool” en un sistema micro *LC Ekspert nLC425* (*Eksigen*) empleando una columna *YCM-Triart* (75 µm x 25 cm, 3 µm, 100 Å) (*YMC CO*) a un flujo de 5 µl/minuto. La bomba de carga suministró una solución de ácido fórmico al 0,1 % en agua como fase móvil A y ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo como base móvil B. Los péptidos se separaron empleando un gradiente de 40 minutos que consistió en un incremento del 5 al 95 % de solvente B durante 30 minutos, 5 minutos en solvente B al 90 % y finalmente 5 minutos en el solvente B al 5 % para equilibrar la columna.

Tras la elución de los péptidos, para la adquisición de los datos, éstos se inyectaron en un espectrómetro de masas híbrido cuádruple-*TOF*, *Triple TOF* (6600, *Sciex*) operado con un sistema de adquisición dependiente de datos en modo dependiente de iones positivo. Una microfuelle (*Sciex*) fue usada por la interfaz entre el micro LC y el *MS*, con un voltaje de amplificación de 2600 V. El modo de adquisición consistió en 250 ms de escaneo exploratorio *MS* de 400 a 1250 m/z seguido de un escaneo *MS/MS* de 100 a 1500 m/z (tiempo de adquisición 25 ms) de los 65 iones precursores superiores del escaneo exploratorio, durante un tiempo total por ciclo de 2,8 segundos. Los precursores fragmentados se agregaron a una

lista de exclusión dinámica durante 15 segundos y se excluyó del análisis *MS/MS* los iones con carga única.

La identificación de péptidos y proteínas se realizó empleando el *software Protein Pilot* versión 5.0.1 (*Sciex*) contra una base de datos específica para humanos (*Uniprot*), especificando la carbamidometilación como modificación fija y la oxidación de las metioninas como variables. El máximo permitido de falsos positivos (*FDR*) se fijó en el 1 % tanto para péptidos como proteínas. Todos los espectro *MS/MS* correspondientes a los péptidos, identificados con una confianza mayor del 99 %, se emplearon en la construcción de la librería. A partir de estos *MS/MS* se realiza la extracción de los picos de adquisición secuencial para generar las ventanas teóricas del método *SWATH* usando la aplicación *Acquisition MS/MS<sup>ALL</sup> SWATH MicroAPP* versión 2.0 (*Sciex*) presente en el *software PeakView* versión 2.2 (*Sciex*). En este caso se generaron 65 ventanas para realizar la adquisición en modo *SWATH*.

#### 4.3.10.3 Cuantificación relativa mediante *SWATH*

Se analizaron 8 muestras empleando un método de adquisición independiente (*DIA*). Se analizaron 4  $\mu$ l de cada muestra en un equipo de *LC-MS/MS* empleando el gradiente descrito anteriormente para construir la librería espectral pero empleando el método de adquisición *SWATH-MS*. El método consistió en un ciclo de repetición con 65 ventanas para la adquisición de los *MS/MS* (con un rango de masas de 400 a 1500 m/z, en modo de alta sensibilidad y tiempo de adquisición 50 ms) usando un modo de escaneo previo para identificar las masas de los iones a fragmentar (*TOF MS*) de 400 a 1250 m/x durante un tiempo de adquisición de 50 ms para cada ciclo. El tiempo total del ciclo fue de 6,3 segundos.

#### 4.3.10.4 Análisis de datos

La extracción de datos obtenidos de los fragmentos de iones a lo largo de todo el cromatograma empleado en el método *SWATH* se realizó empleando nuevamente la herramienta *SWATH Acquisition MicroAPP* versión 2.0 del programa *PeakView* versión 2.2. Esta aplicación procesó los datos empleando la librería espectral creada. Se seleccionaron hasta 10 péptidos por proteína y 7 fragmentos por péptido basándonos en la intensidad de la señal; se excluyeron del procesamiento los péptidos compartidos o modificados. Se emplearon ventanas de 5 minutos y 30 ppm de ancho para extraer los cromatogramas iónicos. La cuantificación del *SWATH* se realizó para todas las proteínas identificadas en la librería de iones con un *FDR* inferior al 1 % mediante el *software ProteinPilot* versión 5.0.1 (*Sciex*). Los tiempos de retención de los péptidos que se seleccionaron para cada proteína se ajustaron realizando una recta de calibrado con péptidos pertenecientes a varias proteínas de todas las muestras. Los cromatogramas de iones extraídos se generaron después para cada fragmento de iones

seleccionado; las áreas de los péptidos se obtuvieron sumando las áreas de los picos a partir de los fragmentos correspondientes de iones. El programa *PeakView* calculó una *FDR* y una puntuación para cada péptido asignado de acuerdo a los componentes cromatográficos y espectrales; únicamente se emplearon péptidos con una *FDR* por debajo del 5 % para la cuantificación de proteínas. La alineación de los datos antes de exportar mediante la realización de una recta de calibrado con el mayor número posible de péptidos de varias proteínas en todas las muestras, compensa las pequeñas variaciones en los valores de tiempo de retención y de masa, asegurando que los compuestos idénticos en las diferentes muestras se comparan entre sí con precisión.

El conjunto de las áreas de los picos se exportó directamente al *software Marker View 1.3.1 (Sciex)* para la realización de los análisis cuantitativos. Este proceso generó 3 archivos que contienen la información cuantitativa de los iones individuales, la intensidad sumada de los diferentes iones para un péptido particular y la intensidad sumada de los péptidos distintos para una proteína particular. El *software Marker View* emplea algoritmos de procesamiento que encuentran con exactitud los picos cromatográficos y los picos espectrales directamente de los datos de *SWATH* brutos. Para controlar la posible pérdida desigual de muestra en las diferentes muestras durante el proceso de preparación de las mismas, se realizó una normalización global basada en la suma total de todas las áreas de los picos extraídos de todos los péptidos y transiciones a través de las repeticiones de cada muestra. Se realizó un análisis estadístico multivariante no supervisado empleando el análisis del componente principal para comparar los datos entre las muestras, utilizando escalamiento de Pareto y autoescala. El área de pico promedio de cada proteína derivó de las réplicas del *SWATH-MS* de cada muestra seguido del análisis estadístico *t* de *Student* empleando el *software Marker-View* para la comparación entre muestras basada en la suma de las áreas promediadas de todas las transiciones derivadas para cada proteína. La prueba *t* de *Student* nos indica lo bien que distingue cada variable a los dos grupos expresado como un *p-valor*. Para cada librería, se seleccionó un conjunto de proteínas expresadas diferencialmente (*p-valor* <0.05) con un aumento o disminución de 1,5 veces.

#### 4.3.11 Herramientas Informáticas

##### 4.3.11.1 Herramientas bioinformáticas para la predicción de dianas de los *miRs*

Para la predicción bioinformática de dianas de los *miRs*, se emplearon diferentes herramientas informáticas como las bases de datos y algoritmos que se detallan a continuación (*Tabla 23*):

Base de Datos	Dirección Web
<i>miRanda</i>	<a href="http://www.microrna.org/">http://www.microrna.org/</a>
<i>miRBase</i>	<a href="http://microrna.sanger.ac.uk/">http://microrna.sanger.ac.uk/</a>
<i>TargetScan</i>	<a href="http://www.targetscan.org/">http://www.targetscan.org/</a>
<i>miRWalk</i>	<a href="http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/">http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/</a>

**Tabla 23.** Herramientas bioinformáticas para la predicción de dianas de los *miRs*.

***miRanda*** es un algoritmo que genera un conjunto formado por todos los ARNm candidatos a ser diana de un *miRs* y somete este conjunto a un proceso de filtrado, considerando dianas válidas a aquellas que superen estos filtros, estos filtros tienen en cuenta el nivel de complementariedad entre el *miRs* y su posible diana así como la energía de enlace (223). Este algoritmo es empleado en la base de datos *microrna.org*, la cual recoge información de las predicciones de dianas de los *miRs* así como sus patrones de expresión (223). En cuanto a la información de los patrones de expresión, procede de un proyecto de secuenciación masiva llevado a cabo en múltiples tejidos y líneas celulares animales y patológicas (223). Los datos de los *miRs* son obtenidos de *miRbase* mientras que los datos génicos del navegador *UCSC* (223). Por tanto, esta base de datos nos permite realizar búsquedas de los genes que están potencialmente regulados por un *miR* concreto, los *miRs* que pueden estar actuando sobre un determinado ARNm, dónde se posicionan los sitios de unión de los *miRs* a los ARNm diana y los patrones de expresión de *miRs* por tejidos (223).

***miRBase*** es una base de datos en la que se incluyen todos los *miRs* que se van descubriendo. Cada vez que se incorpora uno a la base de datos, le designan un identificador numérico. Además, esta base de datos emplea un prefijo de 3-4 letras para identificar la especie de forma abreviada (ej. El prefijo *hsa* para *Homo sapiens*) (224-227). Nos proporciona información sobre la ubicación y secuencia madura de un *miR* entre otros datos de interés, además de emplear el algoritmo “*miRanda*” para predecir posibles genes diana de los *miR* (224-227).

***TargetScan*** es un programa informático alojado en un servicio web que incorpora un algoritmo de búsqueda de dianas de los *miRs* (116, 117). Incluye predicciones para mamíferos, pez cebra, insectos y nematodos, entre los que podemos incluir humanos, ratones, *Drosophi-*



*la melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* (116, 117).

**miRWalk** es una base de datos de *miRs* humanos, de ratón y de rata, presenta un módulo de predicción de dianas asociadas con genes, vías de señalización, enfermedades, órganos, líneas celulares y factores de transcripción y otro módulo de dianas ya validadas. El algoritmo está basado en una aproximación informática que identifica la complementariedad consecutiva más larga entre los *miR* y las secuencias de los genes (228, 229).

#### 4.3.11.2 Otros programas informáticos

Además de las herramientas bioinformáticas detalladas con anterioridad, también se empleó el *software* de imagen de microscopía *NIS-Elements* (Nikon) para la toma de imágenes de microscopía. El programa de acceso libre de procesamiento de imagen digital *ImageJ* para realizar las densitometrías de las proteínas de la técnica de *Western blot*. El *software* *Protein Pilot* versión 5.0.1, *PeakView* versión 2.2 y *Marker View* 1.3.1 todos ellos de *Sciex* para los análisis proteómicos. El paquete estadístico *SigmaStat 3.5* y *SigmaPlot 11.0* para la realización de los análisis estadísticos y gráficas. La herramienta web *BioVenn* para la realización de los diagramas de Venn (230). El *software* *Ingenuity Pathways Analysis (IPA)* (Qiagen) para la elaboración de redes de *miRs* y sus posibles dianas. Y el paquete ofimático *Microsoft Office* y la aplicación *Adobe InDesign* para la elaboración del manuscrito.



## **5. Resultados y Discusión**



## 5. Resultados y Discusión

### 5.1 *MiRs* relacionados con la obesidad y la adipogénesis

#### 5.1.1 Análisis de *miRs* mediante algoritmos bioinformáticos

Tal y como se describió en la introducción, existe una interacción entre la insulina y la leptina debido principalmente a que comparten parte de su vía de señalización, además existe también una coexistencia de los estados de resistencia a insulina y de resistencia a leptina en individuos obesos. Se sabe que la obesidad presenta un papel importante en la patogénesis de la resistencia a la insulina y la *T2DM*, así como la resistencia a la leptina, lo que nos llevó a estudiar e intentar describir nuevos mecanismos que pudiesen estar relacionados con estos hechos, especialmente la implicación de los *miRs*, un campo que ha ido cobrando importancia en la última década.

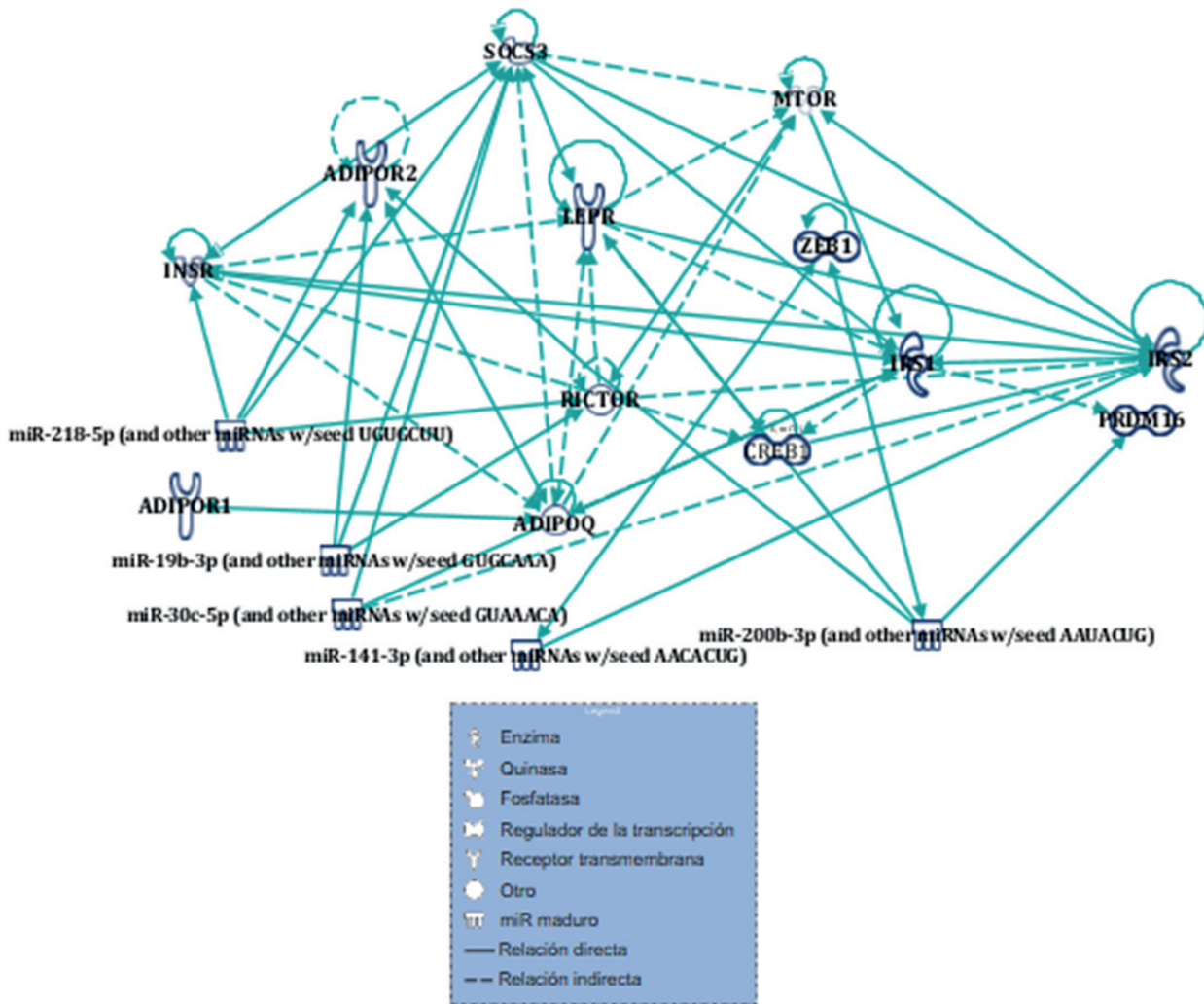
Una de las moléculas más importantes implicada tanto en los procesos de resistencia a la insulina como a la leptina es la proteína *SOCS3*. Por ello, en primer lugar, mediante el empleo de distintos programas y algoritmos informáticos buscamos posibles *miRs* reguladores o que tuvieran por potencial diana a *SOCS3* en ratón (*Mus musculus*) y que estuviesen conservados al menos en vertebrados. Mediante el empleo de la herramienta *TargetScan*, los *miRs* predichos con mayor probabilidad de regular esta proteína y que además presentan una probabilidad de conservación preferencial evolutiva elevada se detallan a continuación (Tabla 24):

<i>miR</i>	Percentil de Puntuación (0-100)	Probabilidad de dianas conservadas (0-1)
<i>mm-miR-218-5p</i>	98	0,84
<i>mm-miR-30a-5p</i>	98	0,95
<i>mm-miR-30b-5p</i>	98	0,95
<i>mm-miR-30c-5p</i>	98	0,95
<i>mm-miR-30d-5p</i>	98	0,95
<i>mm-miR-30e-5p</i>	98	0,95
<i>mm-miR-19a-3p</i>	98	0,86
<i>mm-miR-19b-3p</i>	98	0,86

**Tabla 24.** Potenciales *miRs* reguladores de *SOCS3*. Resultados obtenidos mediante el empleo de *TargetScan*.

Posteriormente decidimos comprobar si más de una base de datos predecían a estas tres familias de *miRs* (*MIR-218*, *MIR-30* y *MIR-19*) como posibles reguladoras de la proteína SOCS3. Para ello hicimos uso del programa informático *MirWalk 2.0*, que compara de forma simultánea los resultados de 12 herramientas informáticas, (*MirWalk*, *MicroT4*, *miRanda*, *mirbridge*, *miRDB*, *miRMap*, *miRNAMap*, *Pictar2*, *PITA*, *RNA22*, *RNAhybrid* y *TargetsScan*), en base a esto, pudimos confirmar que *SOCS3* se predecía como potencial diana de *mmu-miR-19a-3p*, de *mmu-miR-30b-5p*, *mmu-miR-30c-5p* y *mmu-miR-30e-5p* por 9 bases de datos y de *mmu-miR-19b-3p*, *mmu-miR-30a-5p* y *mmu-miR-218-5p* por 8 bases de datos. Finalmente, mediante el empleo de las mismas herramientas informáticas, la familia *MIR-200* también presenta varios miembros que fueron predichos como potenciales *miRs* reguladores de SOCS3, además de otras proteínas relacionadas con la ruta de la señalización de la insulina como IRS1, IRS2, JNK, PI3K, FAS y AMPK.

Posteriormente, mediante el empleo de nuevo de las herramientas *TargetScan* y *miRWalk*, elegimos representantes de cada familia (*MIR-218*, *MIR-200*, *MIR-30* y *MIR-19*) para continuar trabajando con ellos. La elección se realizó en base a varios criterios: a) que sus posibles dianas fueran predichas por 4 o más programas bioinformáticos, b) que sus posibles dianas estuvieran implicadas en la regulación de rutas alteradas durante la obesidad, como la regulación de las vías de señalización de la insulina, leptina y/o adiponectina y/o procesos inflamatorios y c) que la bibliografía existente sugiera que están implicados en alteraciones metabólicas. En la *Figura 28* se esquematizan las interrelaciones entre *miRs* de las familias citadas y sus potenciales dianas implicadas en las vías de señalización de la insulina y leptina:



**Figura 28.** Esquema en el que se representa la interacción entre los *miRs* y sus potenciales diana de las vías de señalización de la insulina, leptina y adiponectina. El análisis se realizó empleando el software *Ingenuity Pathway Analysis (IPA)*. *ADIPOR1* y *ADIPOR2*: Receptores 1 y 2 de la adiponectina. *ADIPOQ*: Adiponectina. *INSR*: Receptor de la insulina. *LEPR*: Receptor de la leptina. *IRS1* e *IRS2*: Sustratos 1 y 2 del receptor de la insulina. *SOCS3*: Supresor 3 de la señalización por citoquinas. *MTOR*: Diana de rapamicina en células de mamíferos. *RICTOR*: Compañero de mTOR insensible a rapamicina. *PRDM16*: Dominio que contiene la proteína 16. *ZEB1*: Dedo de zinc caja E de unión homeobox 1. *CREB1*: Gen que codifica para la proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos.

Inicialmente, nuestro principal objetivo era estudiar la posible implicación de distintos *miRs* en los niveles de expresión de la proteína *SOCS3*, por ser clave en las rutas de señalización de la insulina y la leptina. Para ello, decidimos usar la línea celular 3T3-L1 y sobreexpresantes e inhibidores de los *miRs* antes mencionados. Nuestro objetivo era comprobar si factores como la leptina y/o IL-6 alteraban de igual modo los niveles de expresión de *SOCS3* tras modular la expresión de los *miRs* elegidos. Sin embargo, tuvimos que descartar esta línea de investigación, porque en condiciones basales, y a diferencia de lo descrito por otros autores (84, 231, 232), nosotros no conseguimos detectar cambios ni a nivel génico ni a nivel

proteico en SOCS3, empleando una amplia batería de tiempos y dosis, tanto para la leptina como para la IL-6 en preadipocitos y adipocitos maduros. A pesar de ello, estos estudios preliminares nos sirvieron para establecer una posible implicación de las familias *MIR-19* y *MIR-200* en la adipogénesis, vía por la que finalmente continuamos nuestros estudios.

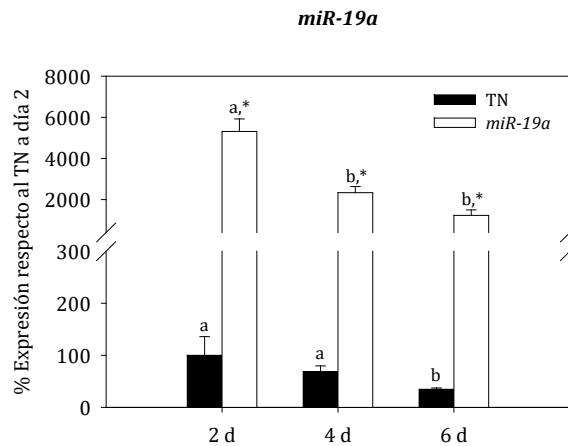
### 5.1.2 Regulación de la adipogénesis por *miRs*

#### • Regulación de la adipogénesis por miembros de la familia *MIR-19*

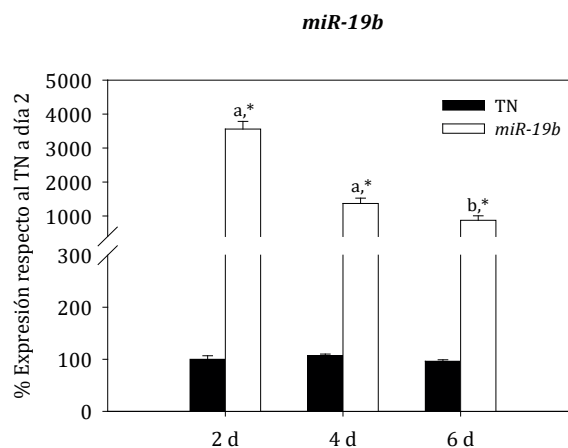
El proceso de adipogénesis incluye tanto a la proliferación celular como a la diferenciación, procesos que se sabe que están regulados por *miRs*. Estudios previos han revelado que el clúster *miR-17-92* promueve la proliferación celular y está regulado positivamente durante la etapa de expansión clonal de la diferenciación de los adipocitos (233). En nuestro caso, hemos decidido estudiar el papel de la familia *MIR-19* (perteneciente al clúster mencionado) en la adipogénesis, para lo que se transfectaron de forma transitoria células 3T3-L1 sin diferenciar (preadipocitos) con imitadores comerciales para *miR-19a* y *miR-19b* de forma individual y posteriormente de forma conjunta tal y como se describió en el apartado de material y métodos.

En primer lugar se comprobó la efectividad de la sobreexpresión de ambos *miRs* y debido al empleo de una técnica de transfección transitoria, también testamos su duración en el tiempo. Tal y como se puede comprobar en la *Figura 29* y *Figura 30*, los niveles de expresión de *miR-19a* y *miR-19b* fueron superiores en las células transfectadas con los sobreexpresantes respecto a las células control, lo que nos demostró que la transfección funcionó y que además se mantuvo elevada durante todo el tiempo de duración del experimento, manteniéndose a día 6 los niveles de expresión 20 veces superiores en el caso de *miR-19a* y de 10 veces en el caso de *miR-19b*, e incluso a día 14 la expresión todavía era casi 4 veces superior al control en ambos casos (*datos no mostrados*). Además, también se detectó un descenso en los niveles de expresión de *miR-19a* en el grupo control a medida que avanzaba la diferenciación (*Figura 29*), efecto que no se observó para *miR-19b* (*Figura 30*).





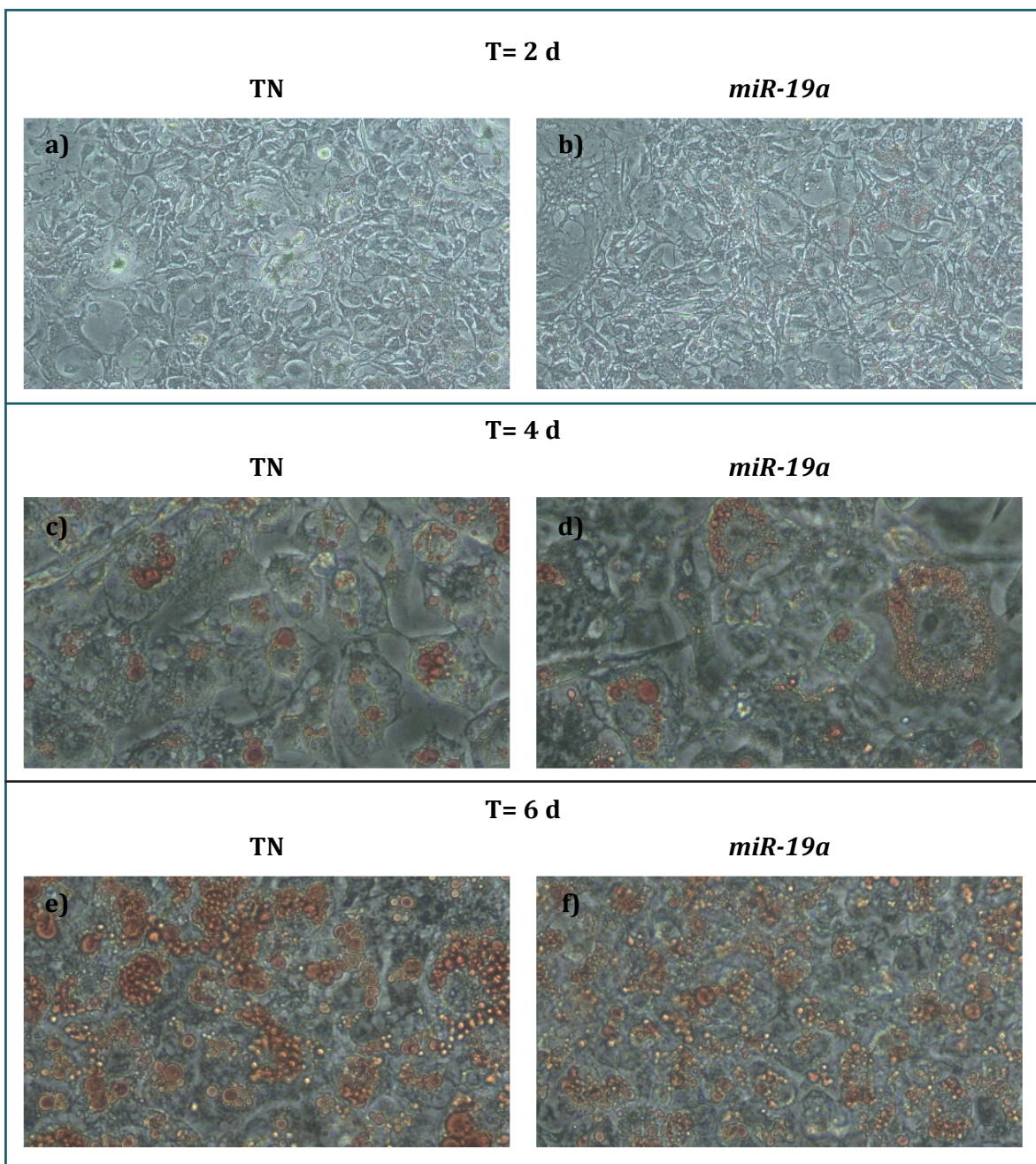
**Figura 29. Niveles de expresión de *miR-19a*.** Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde 100 %  $\equiv$  transfectado negativo a día 2.  $P < 0.05$  se considera estadísticamente significativo. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas a lo largo del tiempo, mientras que \* indica diferencias por la transfección dentro de cada tiempo. Anova de 2 vías, test *post hoc* de Tukey.  $N = 4$  para todos los grupos. TN: células transfectadas con *mimic* negativo a una concentración de 17 nM. *miR-19a*: células tratadas con sobreexpresante para *miR-19a* una concentración de 17 nM. D: días. Datos normalizados respecto a *U6*.

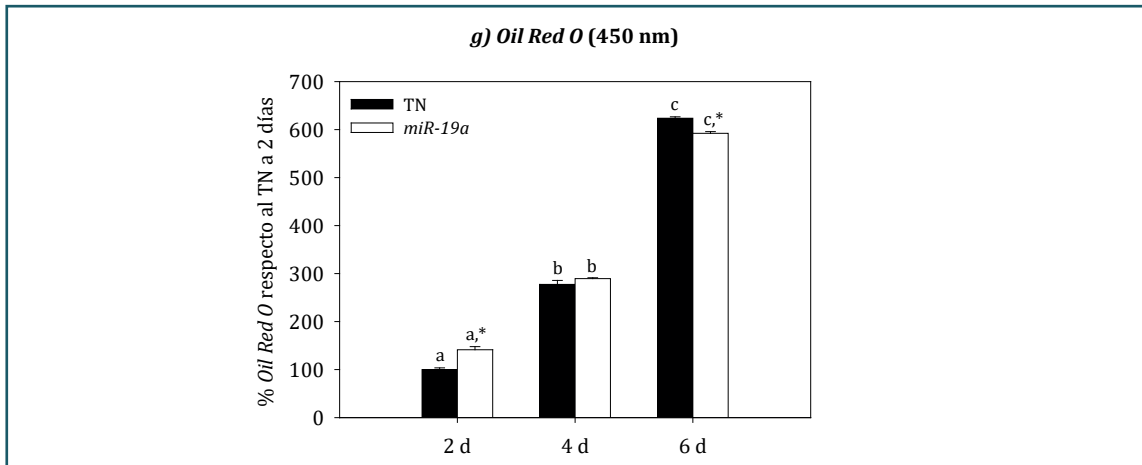


**Figura 30. Niveles de expresión de *miR-19b*.** Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde 100 %  $\equiv$  transfectado negativo a día 2.  $P < 0.05$  se considera estadísticamente significativo. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas a lo largo del tiempo, mientras que \* indica diferencias por la transfección dentro de cada tiempo. Anova de 2 vías, test *post hoc* de Tukey.  $N = 4$  para todos los grupos. TN: células transfectadas con *mimic* negativo 17, *miR-19b*: células tratadas con sobreexpresante para *miR-19*. En ambos casos la concentración usada fue de 17 nM. D: días. Datos normalizados respecto a *U6*.

Una vez comprobada la efectividad de la sobreexpresión de *miR-19a* y tras inducir la diferenciación de las células, se observó que a medida que avanzaba la diferenciación, éstas iban cambiando la morfología fibroblástica característica de esta línea celular en el estadio de preadipocitos, hacia una forma más redondeada característica de los adipocitos maduros (observar diferencias a lo largo del tiempo en la *Figura 31a-f*). Además, también como cabría esperar, a medida que avanzó el proceso de adipogénesis, las células comenzaron a almace-

nar una mayor cantidad de lípidos tal y como se puede observar en la misma figura (teñidos con *Oil Red O*). A día 2, todavía no fue perceptible de forma clara la cantidad de lípidos ni el tamaño de las gotas lipídicas mediante microscopía (*Figura 31a-b*), mientras que a día 4 se detectó como las células con *miR-19a* sobreexpresado poseían unas gotas lipídicas de mayor tamaño pero no un mayor porcentaje de células diferenciadas respecto al control (*Figura 31c-d*). Por el contrario a día 6, las gotas lipídicas de las células con *miR-19a* sobreexpresado tenían un tamaño significativamente inferior respecto al grupo control (*Figura 31e-f*), datos que concuerdan con el descenso observado en la absorbancia cuando se extrajo el *Oil Red O* incorporado por las células tal y como se muestra en la gráfica de la *Figura 31g*.





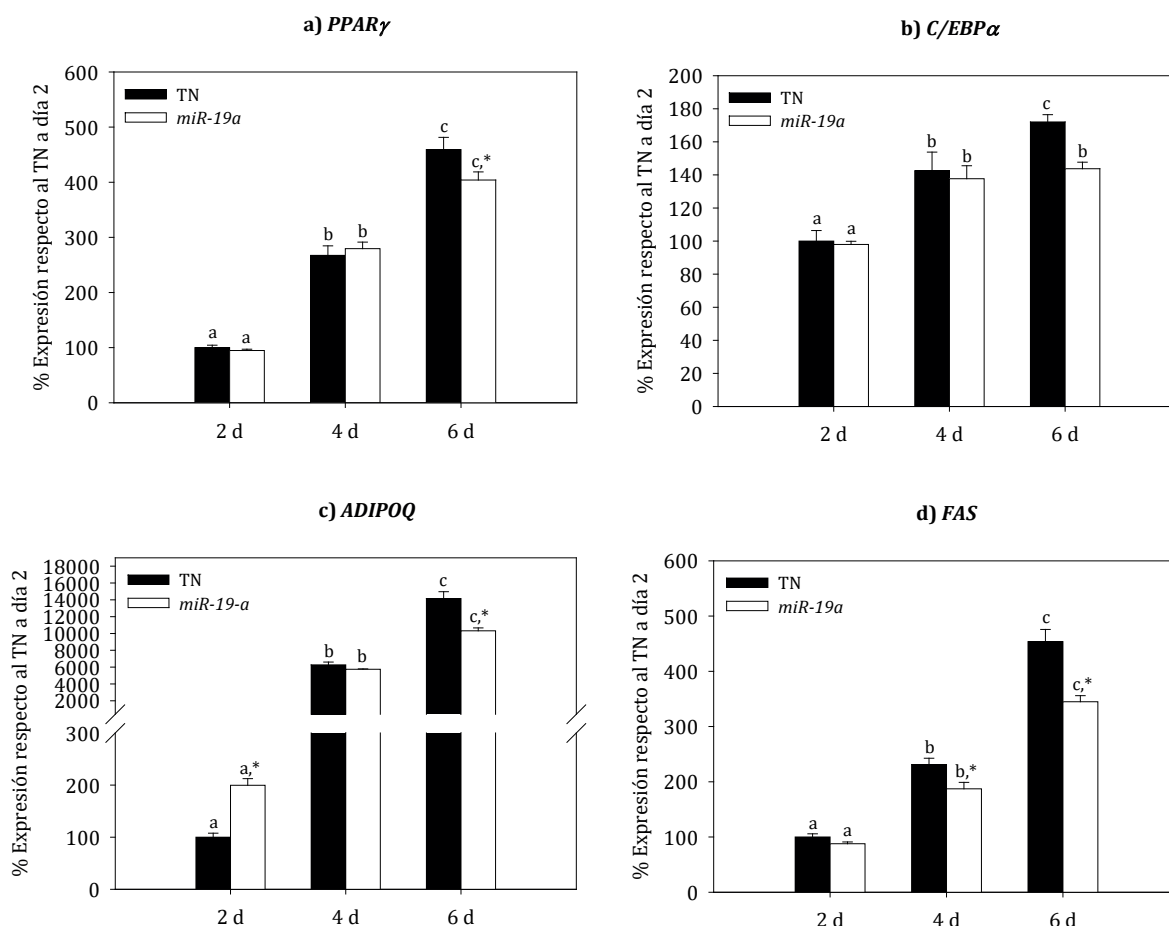
**Figura 31. Fotografías de la tinción *Oil Red O* y cuantificación de la deposición de lípidos en las células 3T3-L1 a distintos tiempos de diferenciación.** En la figura en a), c) y e) podemos ver las células tratadas con TN a días 2, 4 y 6 respectivamente, en b), d) y f) las células tratadas con *miR-19a* a los mismos tiempos y en g) el histograma con la cuantificación del *Oil Red O*. Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde 100 %  $\equiv$  transfectado negativo a día 2.  $P < 0.05$  se considera estadísticamente significativo. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas a lo largo del tiempo, mientras que \* indica diferencias por la transfección dentro de cada tiempo. Anova de 2 vías, test *post hoc* de Tukey.  $N = 2$  para todos los grupos. TN: células transfectadas con *mimic* negativo, *miR-19a*: células tratadas con sobreexpresante *miR-19a*. En ambos casos la concentración empleada fue de 17 nM. D: días.

En vista de las diferencias detectadas y para explicar la relación entre la sobreexpresión de *miR-19a* y la adipogénesis, se analizaron los niveles de expresión del ARNm de *PPAR $\gamma$* , *C/EBP $\alpha$* , *ADIPOQ* y *FAS*.

La diferenciación de los adipocitos o adipogénesis *in vitro* sigue una secuencia temporal bien caracterizada. Inicialmente es necesario que los preadipocitos entren en arresto celular; posteriormente una red de factores transcripcionales comienzan a expresarse, en primer lugar aumenta la expresión de *C/EBP $\beta$*  y *C/EBP $\delta$*  seguidos de *PPAR $\gamma$* , el cual activa a *C/EBP $\alpha$*  y este último a su vez ejerce un *feedback* positivo sobre *PPAR $\gamma$*  para mantener la diferenciación (234). Por otro lado, existen una serie de marcadores de adipocitos maduros que nos informan sobre si las células están más o menos diferenciadas tales como *ADIPOQ* y *FAS* (235).

Tal y como cabría esperar, los niveles de expresión de los factores de transcripción que inducen la adipogénesis, *PPAR $\gamma$*  y *C/EBP $\alpha$*  y los marcadores de adipocitos, *ADIPOQ* y *FAS*, aumentaron tras la inducción y avance de la adipogénesis en ambos grupos (Figura 32a-d). Sin embargo, la sobreexpresión de *miR-19a* provocó un descenso en los niveles de expresión de ARNm de *PPAR $\gamma$* , *ADIPOQ* y *FAS* a tiempos tardíos de la diferenciación (6 días) con respecto al control (Figura 32a-c y 32d), concordando a su vez con los resultados obtenidos mediante tinción *Oil Red O* (Figura 31g). *C/EBP $\alpha$* , siguió la misma tendencia, aunque en este caso las

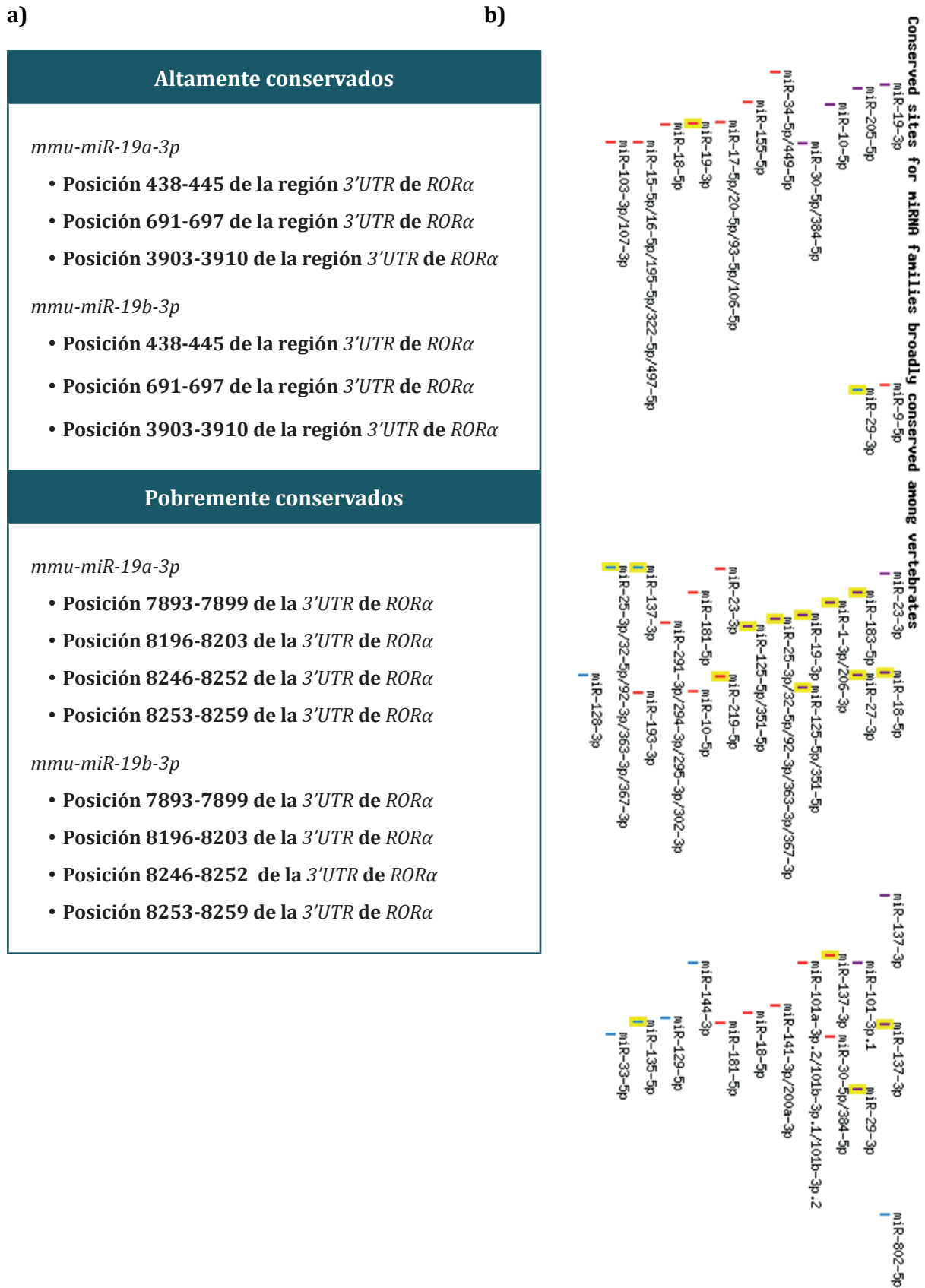
diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 32b).



**Figura 32.** Niveles de expresión del ARNm de *PPAR $\gamma$*  (a), *C/EBP $\alpha$*  (b), *ADIPOQ* (c) y *FAS* (d). Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde 100 %  $\equiv$  transfectado negativo a 2 días.  $P < 0.05$  se considera estadísticamente significativo. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas a lo largo del tiempo, mientras que \* indica diferencias por la transfección dentro de cada tiempo. Anova de 2 vías, test *post hoc* de Tukey.  $N = 4$  para todos los grupos. TN: células transfectadas con sobreexpresante negativo, *miR-19a*: células sobreexpresadas con sobreexpresante *miR-19a*. En ambos casos la concentración empleada fue de 17 nM. D: días. Datos normalizados respecto a *S11*.

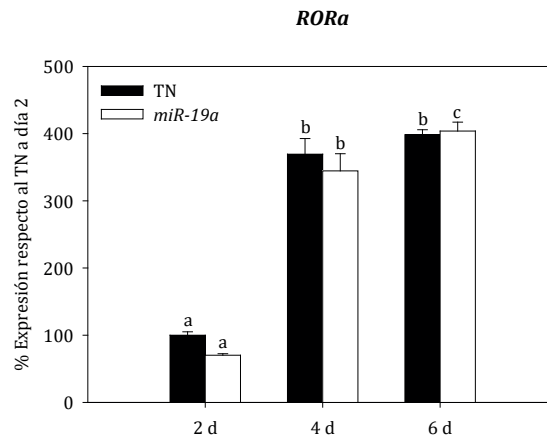
En base a los resultados obtenidos, podemos afirmar que la sobreexpresión de *miR-19a* modifica el proceso de adipogénesis de la línea celular 3T3-L1, especialmente en etapas tardías. Tras consultar distintas herramientas bioinformáticas no parece probable que ninguno de los factores de transcripción analizados sea una diana directa de la familia *MIR-19*, si bien si podemos concluir que los efectos negativos de esta familia en la adipogénesis están mediados por *PPAR $\gamma$*  y *C/EBP $\alpha$* . Con la finalidad de conocer sobre qué genes diana podría ejercer la familia *MIR-19* su efecto en la adipogénesis, se analizaron los datos aportados por los algoritmos informáticos. Diferentes algoritmos informáticos sugieren con un *score* alto que *ROR $\alpha$*  es una de las dianas potenciales de esta familia. En la Figura 33, se muestra un esquema en el que se representan los sitios de unión de *miR-19a-3p* y *miR-19b-3p*, miembros de

la familia *MIR-19*, a este gen, prediciéndose en ambos casos no un único sitio de unión, sino varios sitios de unión altamente conservados y otros tantos pobremente conservados. En la actualidad existen numerosos estudios que relacionan a *RORα* con la adipogénesis, aunque existen discrepancias sobre cómo actúa sobre ésta. En ratones *staggerer*, que poseen la proteína *RORα* no funcional, se observa una menor adiposidad y la diferenciación de los adipocitos es menos potente (236, 237), mientras que en ratones *knockout* para *RORα* en hígado se observa el efecto contrario (238), si bien es cierto que en el tejido adiposo podría presentar un efecto distinto. Mientras que *in vitro*, unos autores observaron una regulación negativa de la adipogénesis a través de *RORα* (239) y otros sin embargo, el efecto contrario tanto *in vivo* como *in vitro* (58).



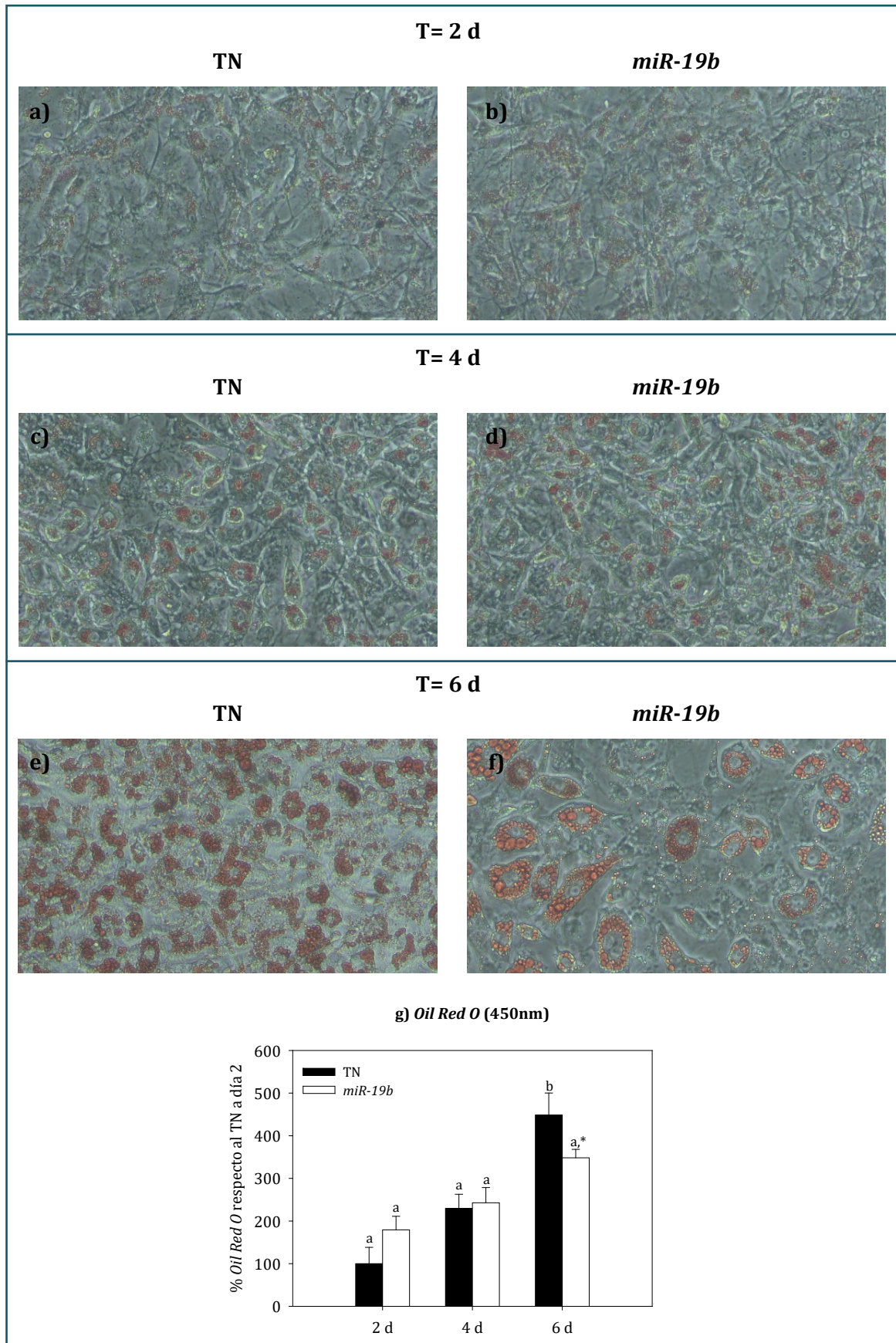
**Figura 33.** Resumen de los sitios de unión de *miR-19a* y *miR-19b* a *RORα* según *TargetScan*. En la tabla se muestran tanto los ampliamente conservados como los menos conservados en vertebrados (a) y en la figura se representan los ampliamente conservados en vertebrados (b).

Por ello, se analizaron los niveles de expresión del ARNm de *RORα* en las mismas condiciones que los genes y *Oil Red O* anteriores. Tal y como se muestra en la *Figura 34*, los niveles de expresión génica aumentaron tras la diferenciación independientemente de si las células presentaban mayores valores de *miR-19a* o no. Se pudo apreciar además una tendencia a disminuir tras la sobreexpresión de *miR-19a* a tiempos tempranos de la diferenciación, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.



**Figura 34. Niveles de expresión del ARNm de *RORα*.** Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde 100 %  $\equiv$  transfectado negativo a 2 días.  $P < 0.05$  se considera estadísticamente significativo. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas a lo largo del tiempo. Anova de 2 vías, test *post hoc* de Tukey.  $N = 4$  para todos los grupos. TN: células transfectadas con sobreexpresante negativo, *miR-19a*: células tratadas con sobreexpresante para *miR-19a*. En ambos casos la concentración empleada fue de 17 nM. D: días. Datos normalizados respecto a *S11*.

Diversos estudios han sugerido que distintos miembros de una misma familia de *miRs* pueden tener acciones similares e incluso sinérgicas (240), por ello decidimos estudiar si la sobreexpresión de *miR-19b* tiene efectos similares a los observados con *miR-19a*. Al sobreexpresar *miR-19b* en células 3T3-L1 e inducir posteriormente la diferenciación, se detectaron cambios en la morfología de las células, tal y como se puede observar en la *Figura 35a-f*; dos días después de inducir la diferenciación, las células comenzaron a almacenar lípidos y perder su forma fibroblástica, aunque no se detectaron diferencias entre ambas condiciones (*Figura 35a-b*), sin embargo sí se produjo una disminución de la deposición de lípidos a tiempos tardíos de la diferenciación (6 días) (*Figura 35e-f*), pudiéndose observar un menor número de células diferenciadas con respecto al control, diferencias que también se detectaron tras la elución del *Oil Red O*, previamente incorporado por las células y posterior análisis de absorbancia (*Figura 35g*).



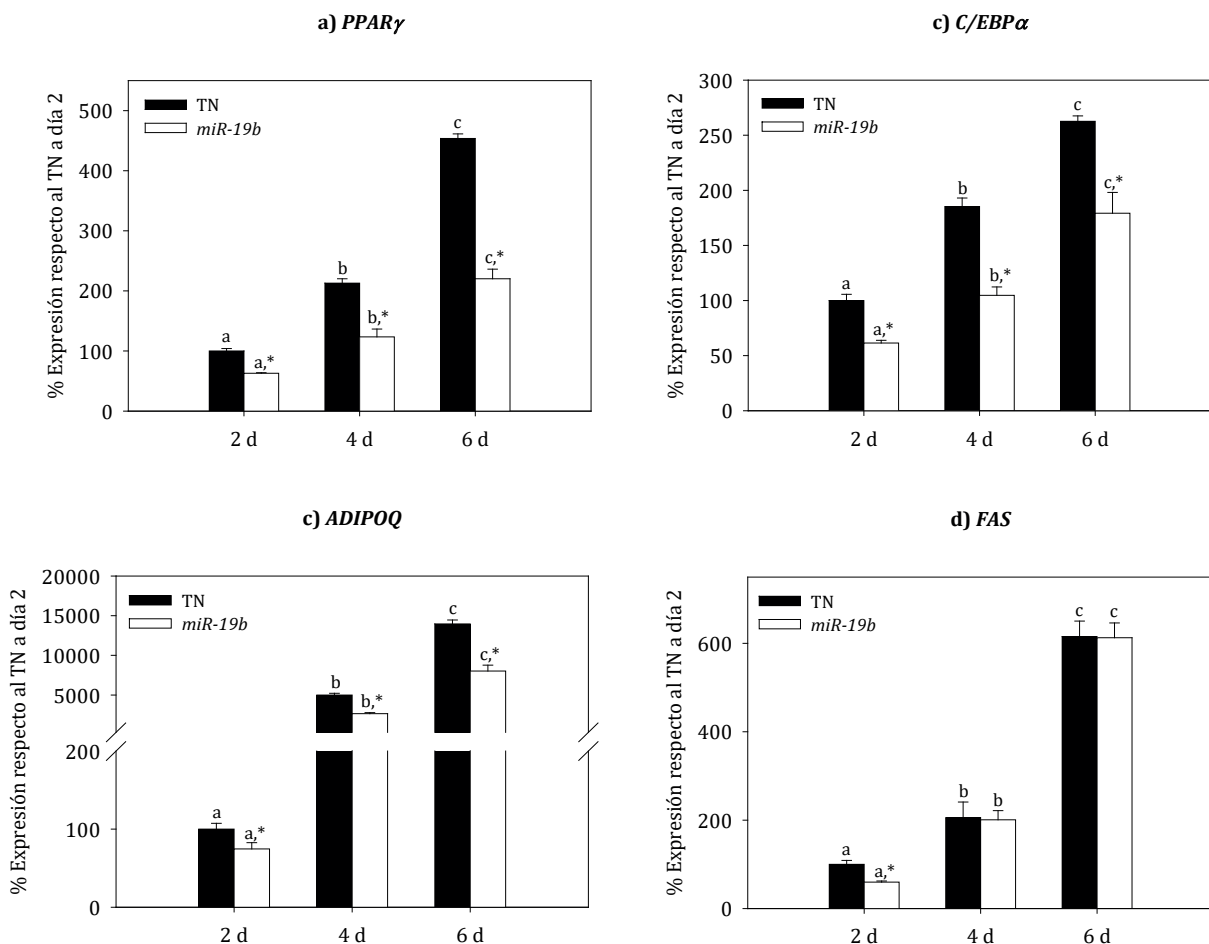
**Figura 35.** Fotografías de la tinción *Oil Red O* y cuantificación de la deposición de lípidos en las células 3T3-L1 a distintos tiempos de diferenciación. En la figura a, c y e podemos ver las células tratadas con TN a



días 2, 4 y 6 respectivamente, en b, d y f las células tratadas con *miR-19b* a los mismos tiempos y en g el histograma con la cuantificación del *Oil Red O*. Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde 100 %  $\equiv$  transfectado negativo a día 2.  $P < 0.05$  se considera estadísticamente significativo. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas a lo largo del tiempo, mientras que \* indica diferencias por la transfección dentro de cada tiempo. Anova de 2 vías, test *post hoc* de Tukey.  $N = 2$  para todos los grupos. TN: células transfectadas con sobreexpresante negativo, *miR-19b*: células tratadas con sobreexpresante *miR-19b*. En ambos casos la concentración empleada fue de 17 nM. D: días.

Nuevamente en vista de las diferencias detectadas y para estudiar la relación entre la sobreexpresión de *miR-19b* y la adipogénesis, se analizaron los niveles de expresión del ARNm de *PPAR $\gamma$* , *C/EBP $\alpha$* , *ADIPOQ* y *FAS*.

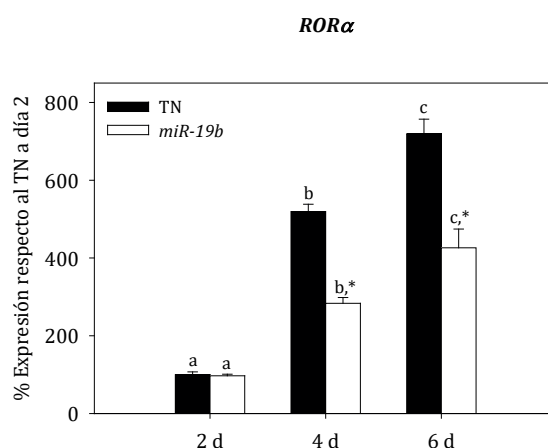
Los análisis revelaron que los niveles de expresión del ARNm de *PPAR $\gamma$* , *C/EBP $\alpha$*  y *ADIPOQ* disminuyeron significativamente con la sobreexpresión de *miR-19b* respecto a las células no transfectadas dentro de cada tiempo (Figura 36a-c), mientras que no se observaron diferencias al analizar *FAS* a tiempos tardíos de la diferenciación (Figura 36d).



**Figura 36.** Niveles de expresión del ARNm de *PPAR $\gamma$*  (a), *C/EBP $\alpha$*  (b), *ADIPOQ* (c) y *FAS* (d). Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde 100 %  $\equiv$  transfectado negativo a 2 días.  $P < 0.05$  se considera estadísticamente significativo. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas a lo largo del tiempo, mientras que \* indica diferencias por la transfección dentro de cada tiempo. Anova de 2 vías, test *post hoc* de Tukey.  $N = 2$  para todos los grupos. TN: células transfectadas con sobreexpresante negativo, *miR-19b*: células tratadas con sobreexpresante *miR-19b*. En ambos casos la concentración empleada fue de 17 nM. D: días.

va de 2 vías, test *post hoc* de Tukey. N= 4 para todos los grupos. TN: células transfectadas con sobreexpresante negativo, *miR-19b*: células sobreexpresadas con sobreexpresante *miR-19b*. En ambos casos la concentración empleada fue de 17 nM. D: días. Datos normalizados respecto a *S11*.

También se analizaron los niveles de expresión del ARNm de *ROR $\alpha$*  a distintos tiempos de diferenciación. Observándose un aumento de sus niveles de expresión con la diferenciación tal y como se observó en el experimento anterior, y una disminución estadísticamente significativa de su expresión a partir del día 4 en las muestras sobreexpresadas respecto al control tal y como se muestra en la *Figura 37*.

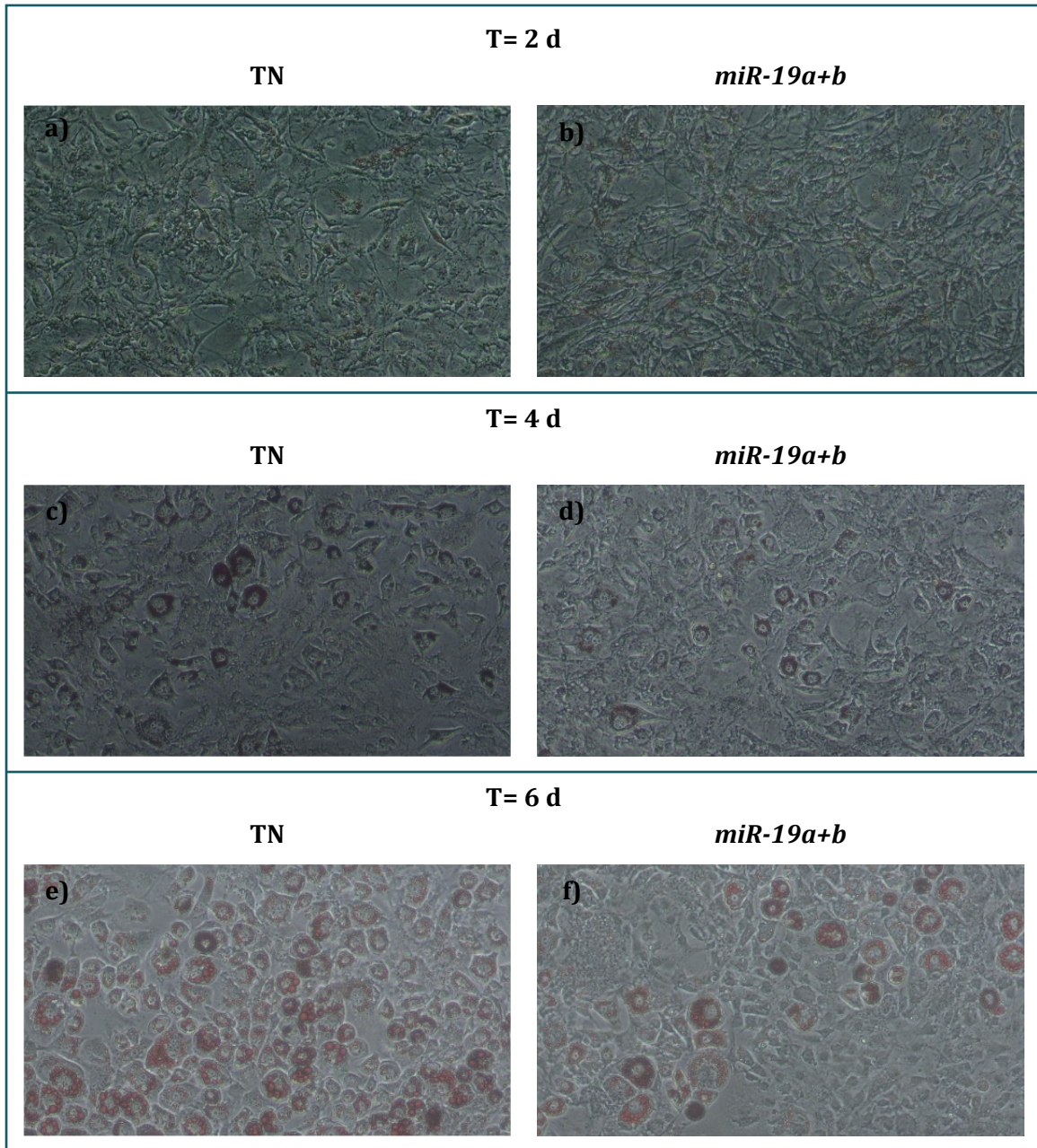


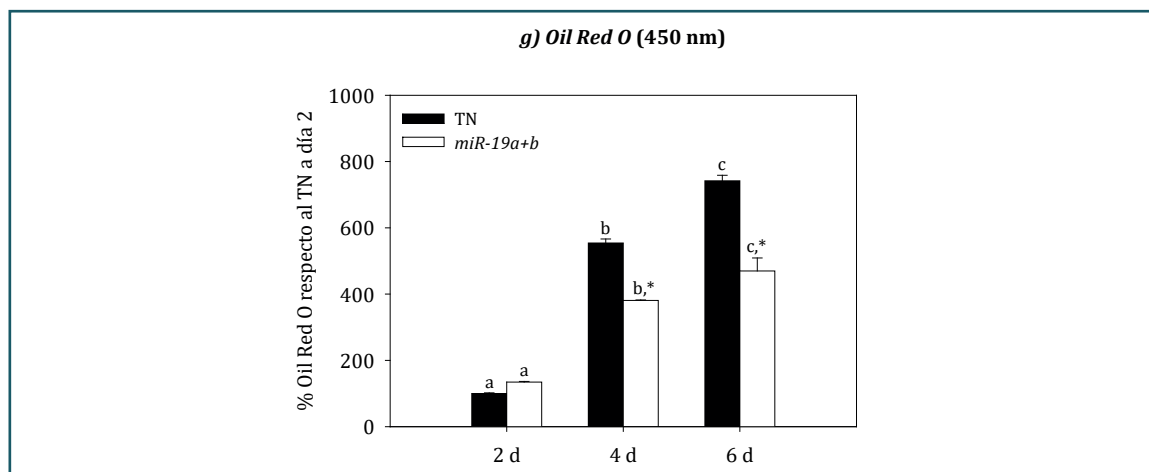
**Figura 37. Niveles de expresión del ARNm de *ROR $\alpha$* .** Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde 100 %  $\equiv$  transfectado negativo a 2 días.  $P < 0.05$  se considera estadísticamente significativo. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas a lo largo del tiempo, mientras que \* indica diferencias por la transfección dentro de cada tiempo. Anova de 2 vías, test *post hoc* de Tukey. N= 4 para todos los grupos. TN: células transfectadas con sobreexpresante negativo, *miR-19b*: células sobreexpresadas con sobreexpresante *miR-19b*. En ambos casos la concentración empleada fue de 17 nM. D: días. Datos normalizados respecto a *S11*.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos hasta aquí, podemos decir que los miembros estudiados de la familia *MIR-19* presentan efectos similares sobre la diferenciación de la línea 3T3-L1 aunque más marcados en el caso de *miR-19b*, por ello, quisimos estudiar si los efectos de la sobreexpresión simultánea de *miR-19a* y *miR-19b* sobre la adipogénesis son sinérgicos, para ello se realizó el mismo experimento sobreexpresando de modo simultáneo ambos miembros de la familia *MIR-19*.

A nivel microscópico se constató un aumento en la deposición de lípidos con la diferenciación como cabría esperar (observar diferencias morfológicas en la *Figura 38* a medida que avanzan los días de diferenciación), y una disminución en la deposición de éstos tras la sobreexpresión de *miR-19a* y *miR-19b* respecto al control no sobreexpresado a partir del cuarto día de diferenciación (*Figura 38c-f*), datos que concordaron con los obtenidos mediante *Oil Red O* (*Figura 38g*) y con los resultados del análisis del ARNm de los factores transcripciona-

les y marcadores de adipogénesis que se analizaron posteriormente (*Figura 39*). Los efectos observados al sobreexpresar ambos miembros de la familia *MIR-19* de forma simultánea son más marcados que cuando los sobreexpresamos de forma individual.

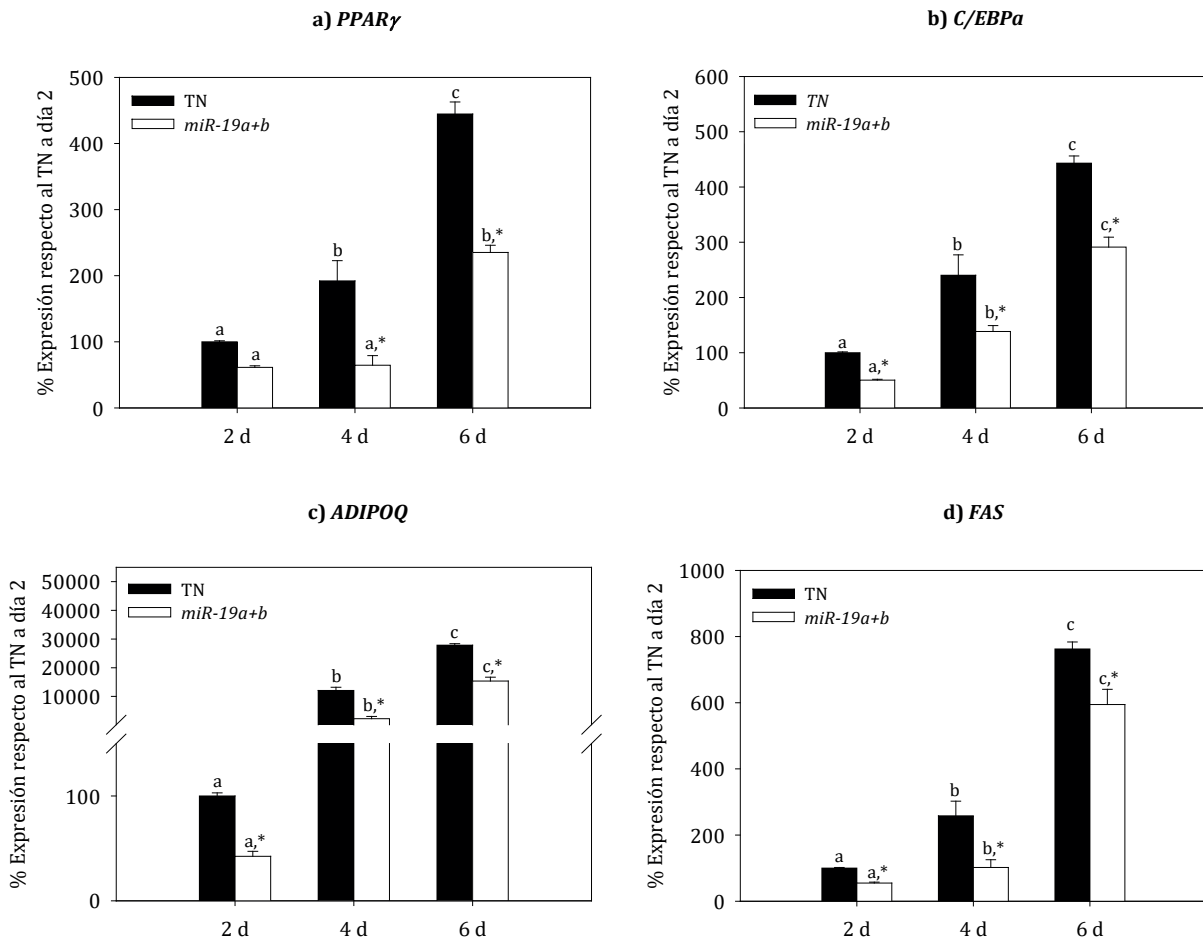




**Figura 38. Fotografías de la tinción *Oil Red O* y cuantificación de la deposición de lípidos en las células 3T3-L1 a distintos tiempos de diferenciación.** En la figura a, c y e podemos ver las células tratadas con TN a días 2, 4 y 6 respectivamente, en b, d y f las células tratadas con *miR-19a* y *miR-19b* a los mismos tiempos y en g el histograma con la cuantificación del *Oil Red O*. Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde 100 %  $\equiv$  transfectado negativo a día 2.  $P < 0.05$  se considera estadísticamente significativo. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas a lo largo del tiempo, mientras que \* indica diferencias por la transfección dentro de cada tiempo. Anova de 2 vías, test *post hoc* de Tukey.  $N = 2$  para todos los grupos. El experimento se realizó dos veces. TN: células transfectadas con sobreexpresante negativo, *miR-19a+b*: células tratadas con sobreexpresante para *miR-19a* y *miR-19b*. En todos los casos la concentración empleada fue de 17 nM. D: días.

En este caso también se analizaron los niveles de expresión *PPAR $\gamma$* , *C/EBP $\alpha$* , *ADIPOQ* y *FAS*.

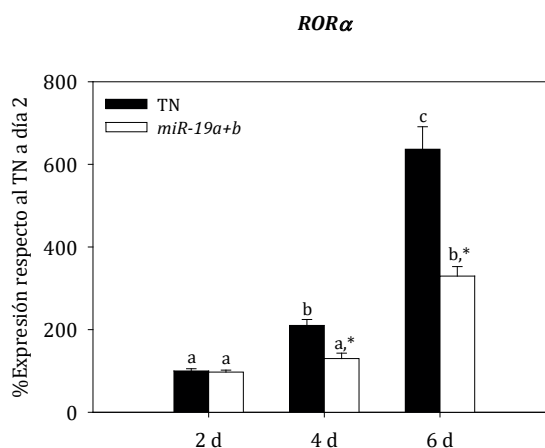
Tal y como se muestra en la *Figura 39*, los niveles de expresión génica de los factores de transcripción analizados aumentaron de manera directamente proporcional a la diferenciación al igual que en los experimentos anteriores y como cabría esperar, este aumento fue significativamente inferior tras la sobreexpresión de ambos miembros de la familia *MIR-19* con respecto al grupo control (*Figura 39a-b*), efecto que también se observó al analizar los niveles de expresión del ARNm de los marcadores de adipocitos maduros *ADIPOQ* y *FAS* (*Figura 39c-d*).



**Figura 39.** Niveles de expresión del ARNm de *PPAR $\gamma$*  (a), *C/EBP $\alpha$*  (b), *ADIPOQ* (c) y *FAS* (d). Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde 100 %  $\equiv$  transfectado negativo a 2 días.  $P < 0.05$  se considera estadísticamente significativo. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas a lo largo del tiempo, mientras que \* indica diferencias por la transfección dentro de cada tiempo. Anova de 2 vías, test *post hoc* de Tukey.  $N = 4$  para todos los grupos. El experimento se realizó dos veces. TN: células transfectadas con sobreexpresante negativo, *miR-19a+b*: células sobreexpresadas con sobreexpresante *miR-19a* y sobreexpresante *miR-19b*. En todos los casos la concentración empleada fue de 17 nM. D: días. Datos normalizados respecto a *S11*.

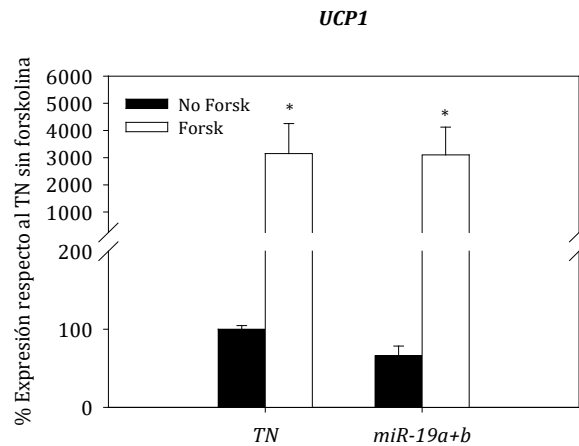
Si comparamos los niveles de expresión génica de los factores de transcripción y marcadores de adipocitos maduros tras la sobreexpresión de *miR-19a* y *miR-19b* de forma simultánea, con sus niveles de expresión tras la sobreexpresión de cualquiera de estos *miRs* de forma individual, este descenso fue más pronunciado para *C/EBP $\alpha$* , *ADIPOQ* y *FAS* indicándonos un efecto sumatorio. Mientras que los niveles de expresión de *PPAR $\gamma$*  fueron similares en el caso de la sobreexpresión de *miR-19b* de forma individual y de *miR-19a+b*, sin embargo en ambos casos, los cambios son más pronunciados que tras la sobreexpresión de *miR-19a* de forma individual.

También se analizaron los niveles de expresión de *ROR $\alpha$* , y se observó que éstos fueron significativamente inferiores tras la sobreexpresión de ambos miembros de la familia *MIR-19* respecto al control no sobreexpresado, tal y como se muestra en la *Figura 40* a partir del cuarto día de diferenciación.



**Figura 40. Niveles de expresión del ARNm de *ROR $\alpha$* .** Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde 100 %  $\equiv$  transfectado negativo a 2 días.  $P < 0.05$  se considera estadísticamente significativo. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas a lo largo del tiempo, mientras que \* indica diferencias por la transfección dentro de cada tiempo. Anova de 2 vías, test *post hoc* de Tukey.  $N = 4$  para todos los grupos. El experimento se realizó dos veces. TN: células transfectadas con sobreexpresante negativo, *miR-19a+b*: células sobreexpresadas con sobreexpresante para *miR-19a* y sobreexpresante para *miR-19b*. En todos los casos la concentración empleada fue de 17 nM. D: días. Datos normalizados respecto a *S11*.

Para descartar que la disminución en la diferenciación y por tanto en la acumulación de lípidos tras la sobreexpresión de *miR-19a* y *miR-19b*, no fuese debida a un proceso de *browning*, se analizaron los niveles de expresión del ARNm de *UCP1* seis días después de inducir la diferenciación de las células, tanto en condiciones basales como tras su estimulación con forskolina. Tal y como se muestra en la *Figura 41*, los niveles de expresión de *UCP1* no se vieron alterados por la sobreexpresión simultánea de ambos miembros de la familia *MIR-19*; sin embargo, sí detectamos el aumento esperado en los niveles de expresión de este ARNm tras un estímulo con forskolina independientemente de la sobreexpresión de *miR-19a* y *miR-19b*; este aumento en los niveles de expresión de *UCP1* en adipocitos con forskolina ya se había descrito previamente (241). La inexistencia de diferencias estadísticamente significativas por la sobreexpresión de *miR-19a* y *miR-19b* en los niveles de expresión de *UCP1*, nos indica que estos dos miembros de la familia *MIR-19* parecen no estar implicados en la regulación de la diferenciación de los preadipocitos a adipocitos beige. En este experimento volvimos a observar que la adipogénesis de las células transfectadas con *miR-19a* y *miR-19b* de forma simultánea era considerablemente inferior a las células control (*datos no mostrados*), confirmando la solidez de los resultados anteriores.



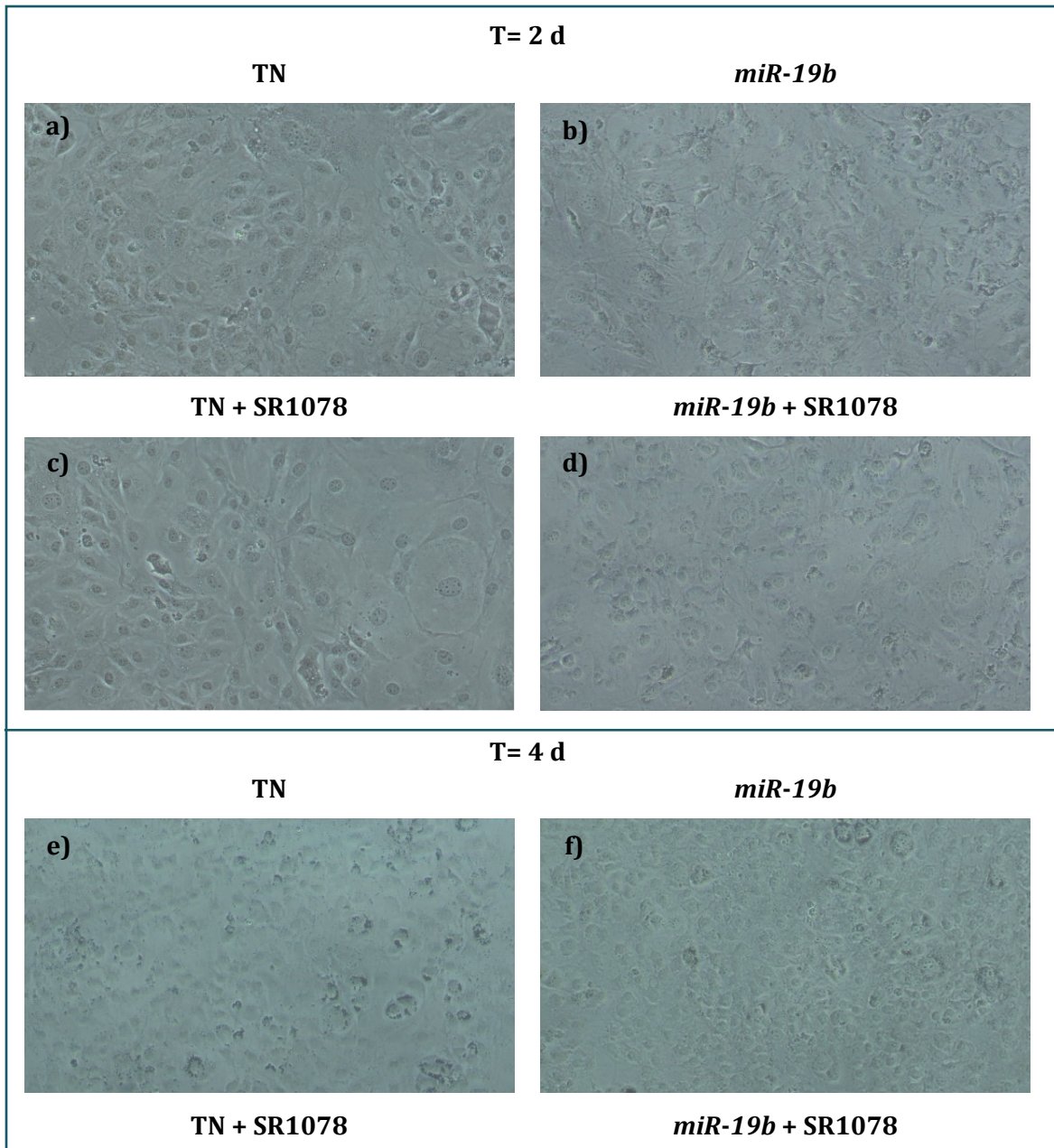
**Figura 41. Niveles de expresión del ARNm de UCP1.** Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde 100 %  $\equiv$  transfectado negativo sin estímulo de forskolina.  $p < 0.05$  se considera estadísticamente significativo. Símbolo \* indica diferencias estadísticamente significativas por el estímulo de forskolina. Anova de 2 vías, test *post hoc* de Tukey.  $N = 3$  para todos los grupos. El experimento se realizó 2 veces. TN: células transfectadas con sobreexpresante negativo, *miR-19a+b*: células sobreexpresadas con sobreexpresante para *miR-19a* y sobreexpresante para *miR-19b*. En todos los casos la concentración empleada fue de 17 nM. D: días. No forsk: células sin estímulo de forskolina. Forsk: células tratadas con un estímulo de forskolina 10  $\mu$ M durante 4 horas. D: días. Datos normalizados respecto a *S11*.

Con los datos mostrados hasta este momento, observamos una disminución clara en la adipogénesis con la sobreexpresión de *miR-19b* individual y *miR-19a* y *miR-19b* de forma simultánea y unos efectos menos marcados al sobreexpresar únicamente *miR-19a*. Además, se observó una disminución de los niveles de expresión génica de *ROR $\alpha$*  proporcional al descenso de la adipogénesis y un aumento a medida que avanzaba la misma, sin embargo, no podemos concluir si este descenso en los niveles de expresión de *ROR $\alpha$*  después de la sobreexpresión de *miR-19a/b* son la causa o la consecuencia del descenso de la adipogénesis.

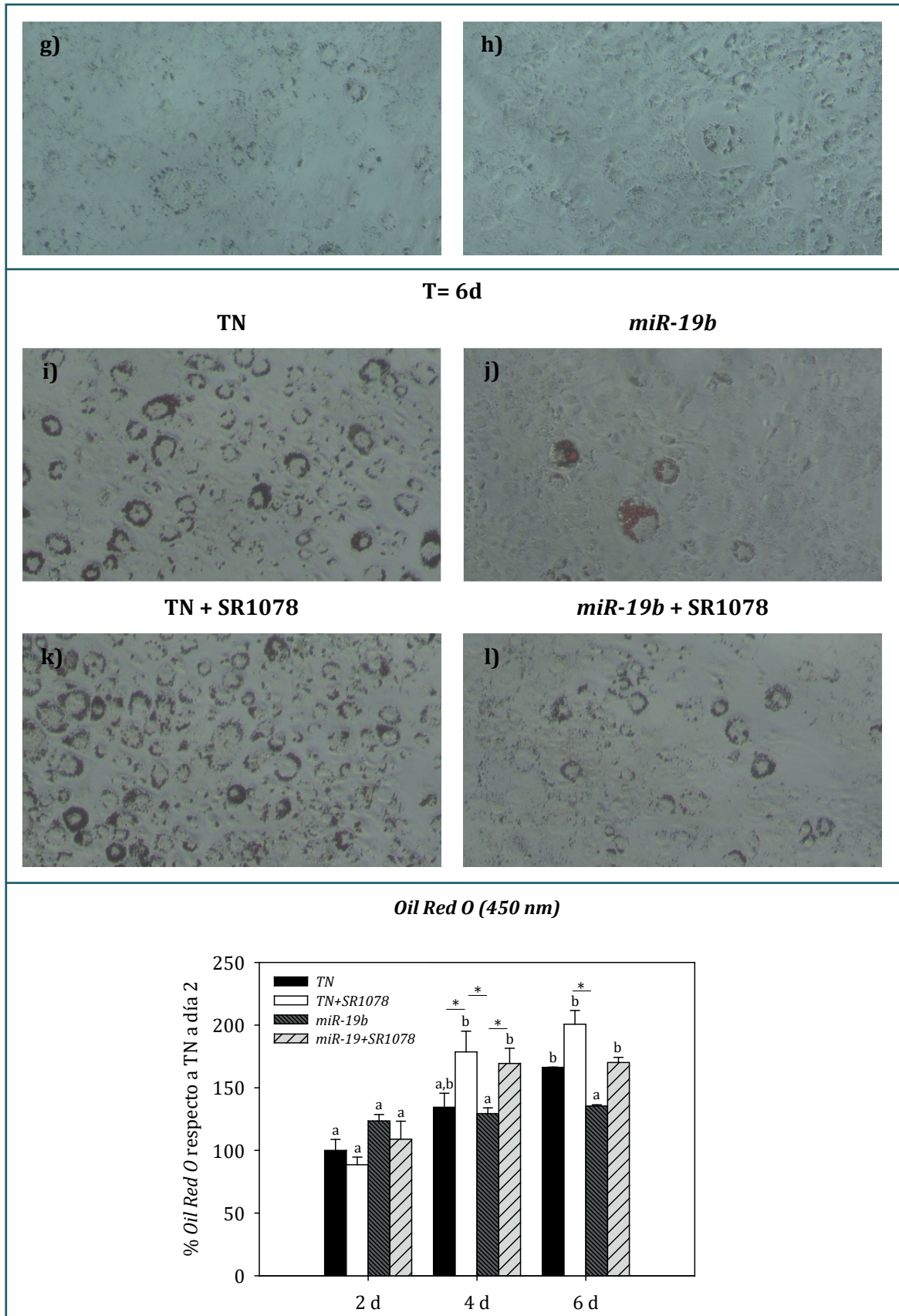
Por ello, en vista de estos resultados, decidimos repetir el experimento en el que sobreexpresamos *miR-19b* (por ser el *miR* que ejercía un mayor efecto sobre la diferenciación y la expresión de *ROR $\alpha$* ) pero esta vez empleando un agonista de *ROR $\alpha$* , con el objetivo de comprobar si se restablecían/recuperaban los niveles de expresión de los factores transcripcionales y marcadores de adipogénesis. Para ello se empleó el agonista SR1078, un agonista sintético de *ROR $\alpha$*  que puede emplearse tanto *in vivo* como *in vitro* (60).

A nivel microscópico se constató, como cabría esperar, un aumento en la deposición de lípidos con la diferenciación (observar diferencias morfológicas en la *Figura 42* a medida que avanzaron los días de diferenciación) y una disminución en la deposición de éstos en las células sobreexpresadas con *miR-19b* con respecto a las células control, visible a partir del cuarto día y mucho más evidente a partir del sexto día de diferenciación (comparar *Figura 42a* con *b*, *Figura 42e* con *f* y *Figura 42i* con *j*). En tiempos tardíos de la diferenciación,

las células tratadas con el agonista de *ROR $\alpha$* , SR1078, presentaron una mayor deposición de lípidos respecto a las no tratadas con el agonista, independientemente de si estaban transfectadas o no (comparar *Figura 42i* con *k* y *Figura 42j* con *l*). Aunque el agonista estimuló la diferenciación en las células sobreexpresadas, en ningún caso alcanzaron los valores de las células no transfectadas (comparar *Figura 42k* con *l*). Resultados comparables a estos se obtuvieron mediante la tinción y posterior cuantificación de *Oil Red O* (*Figura 42m*).





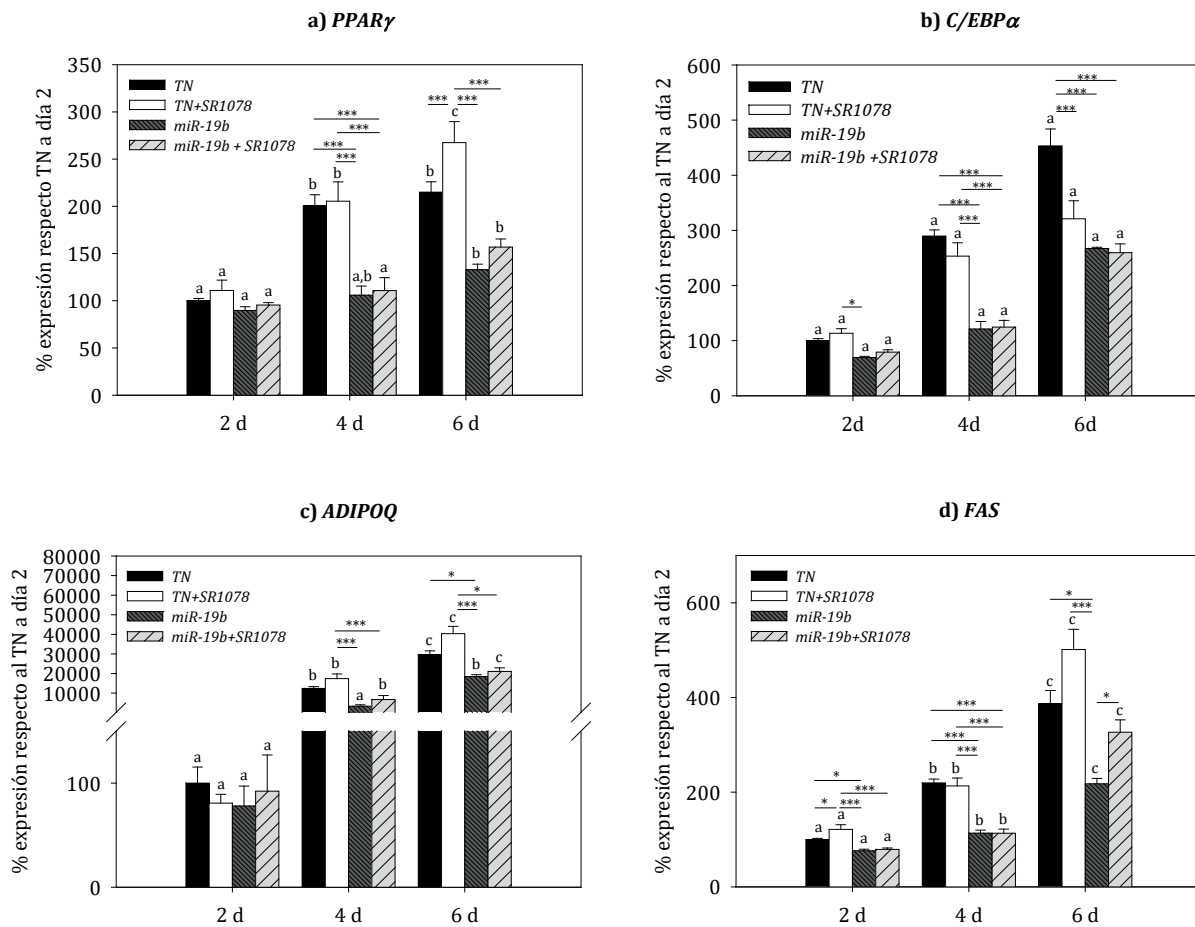


**Figura 42.** Fotografías de la tinción *Oil Red O* y cuantificación de la deposición de lípidos en las células 3T3-L1 a distintos tiempos de diferenciación. En la figura a, e y i podemos ver las células tratadas con TN

a días 2, 4 y 6 respectivamente, en b, f y j las células tratadas con *miR-19b* a los mismos tiempos; en c, g y k podemos ver las células tratadas con TN + SR1078 a días 2, 4 y 6 respectivamente y en d, h y l las células tratadas con *miR-19b* +SR1078 a los mismos tiempos; en m podemos observar el histograma con la cuantificación del *Oil Red O*. Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde 100 %  $\equiv$  transfectado negativo a día 2 sin tratamiento crónico con agonista. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas a lo largo del tiempo para cada uno de los grupos de tratamiento, mientras que \* indica diferencias por el tratamiento dentro de cada tiempo,  $P < 0.05$  se considera estadísticamente significativo en ambos casos. Anova de 2 vías, test *post hoc* de Tukey. TN: células transfectadas con sobreexpresante negativo. TN+SR1078: células transfectadas con sobreexpresante negativo y estimuladas con el agonista SR1078. *MiR-19b*: células sobreexpresadas con sobreexpresante *miR-19b*. *MiR-19b* +SR1078: células sobreexpresadas con sobreexpresante *miR-19b* y estimuladas con el agonista SR1078. D: días. En todos los casos la concentración empleada de los imitadores comerciales fue de 17 nM y 25  $\mu$ M la del agonista SR1078. N= 2 para todos los grupos.

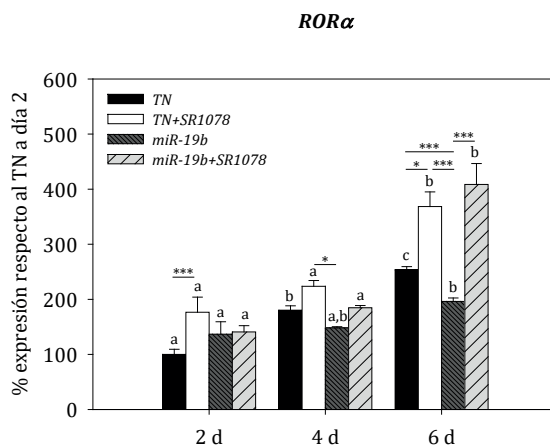
Para comprobar si a nivel génico veíamos diferencias más marcadas, se analizaron los niveles de expresión del ARNm de *PPAR $\gamma$* , *C/EBP $\alpha$* , *ADIPOQ* y *FAS*.

Los análisis revelaron que los niveles de expresión del ARNm de *PPAR $\gamma$* , *C/EBP $\alpha$* , *ADIPOQ* y *FAS* disminuyeron significativamente con la sobreexpresión de *miR-19b* (al igual que en experimentos anteriores) respecto a las células no transfectadas dentro de cada tiempo y en especial a partir del cuarto día tras la diferenciación (*Figura 43a-d*). Tras un tratamiento con el agonista SR1078 en las células control, observamos una tendencia a aumentar los niveles de expresión de *PPAR $\gamma$* , *ADIPOQ* y *FAS* 6 días después de la diferenciación, alcanzando únicamente *PPAR $\gamma$*  y *FAS* diferencias estadísticamente significativas (*Figura 43a, c y d* a tiempo 6) y una disminución de los de *C/EBP $\alpha$*  (observar *Figura 43b* a tiempo 6). Al tratar con el agonista SR1078 las células transfectadas con el sobreexpresante de *miR-19b*, únicamente observamos un aumento estadísticamente significativo de los niveles de expresión de *FAS* 6 días después de la diferenciación (comparar en la *Figura 43d* a tiempo 6) no recuperando sin embargo, los niveles de expresión de su control negativo sin transfectar y tratado con el agonista (comparar en *Figura 43d*).



**Figura 43.** Niveles de expresión del ARNm de *PPAR $\gamma$*  (a), *C/EBP $\alpha$*  (b), *ADIPOQ* (c) y *FAS* (d). Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde 100 %  $\equiv$  transfectado negativo a 2 días sin agonista. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas a lo largo del tiempo para cada uno de los grupos de tratamiento,  $P < 0,05$  se considera estadísticamente significativo, mientras que \* y \*\*\* indican diferencias estadísticamente significativas por el tratamiento dentro de cada tiempo,  $P < 0,05$  y  $P < 0,001$ . Anova de 2 vías, test *post hoc* de Tukey.  $N = 4$  para todos los grupos. TN: células transfectadas con sobreexpresante negativo. TN+SR1078: células transfectadas con sobreexpresante negativo y tratadas con el agonista SR1078. *MiR-19b*: células sobreexpresadas con sobreexpresante *miR-19b*. *MiR-19b* +SR1078: células sobreexpresadas con sobreexpresante *miR-19b* y tratadas con el agonista SR1078. En todos los casos la concentración empleada de los imitadores comerciales fue de 17 nM y 25  $\mu$ M la del agonista SR1078. D: días. Datos normalizados respecto a *S11*.

Nuevamente examinamos los niveles de expresión de *ROR $\alpha$*  y pudimos comprobar como el tratamiento con el agonista SR1078 produjo un aumento de la expresión de este gen, mucho más marcado a tiempos tardíos de la diferenciación, correspondiéndose además con el sexto día de tratamiento con el citado agonista, demostrándose por tanto, tal y como se describe en la bibliografía existente (58), que el tratamiento con SR1078 funcionó correctamente en nuestro modelo de trabajo.



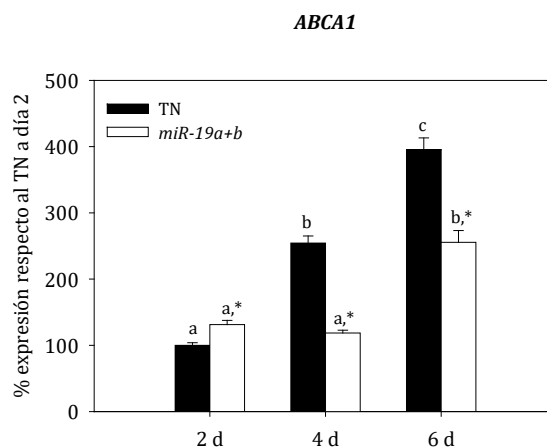
**Figura 44. Niveles de expresión del ARNm de *ROR $\alpha$* .** Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde 100 %  $\equiv$  transfectado negativo a 2 días.  $P < 0.05$  se considera estadísticamente significativo. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas a lo largo del tiempo para cada uno de los grupos de tratamiento,  $P < 0,05$  se considera estadísticamente significativo, mientras que \* y \*\*\* indican diferencias estadísticamente significativas por el tratamiento dentro de cada tiempo,  $P < 0,05$  y  $P < 0,001$ . Anova de 2 vías, test *post hoc* de Tukey. TN: células transfectadas con sobreexpresante negativo. TN+SR1078: células transfectadas con sobreexpresante negativo y tratadas con el agonista SR1078. *MiR-19b*: células sobreexpresadas con sobreexpresante *miR-19b*. *MiR-19b* +SR1078: células sobreexpresadas con sobreexpresante *miR-19b* y tratadas con el agonista SR1078. En todos los casos la concentración empleada de los imitadores comerciales fue de 17 nM y 25  $\mu$ M la del agonista SR1078. D: días. N= 4 para todos los grupos. Datos normalizados respecto a *S11*.

Estos resultados nos demuestran que el tratamiento con el agonista de *ROR $\alpha$*  aumenta la acumulación de lípidos, como pudimos comprobar mediante la tinción *Oil Red O* (aunque no se alcanzaron los mismos valores que el control tratado con el agonista), sin aumentar los marcadores de adipogénesis y factores de transcripción, a excepción de *FAS*, que mostró un aumento en sus niveles de expresión 6 días después de inducir la diferenciación, independientemente de si las células tenían altos niveles de *miR-19b* o no, proceso que podría explicar, al menos parcialmente, el aumento en la acumulación de lípidos observados con el agonista de *ROR $\alpha$* . La acción de *ROR $\alpha$*  todavía es controvertida y existen diferentes estudios que muestran resultados opuestos; en nuestro caso, parece bastante claro que el tratamiento con un agonista de *ROR $\alpha$*  estimula la deposición de lípidos, por estimulación de la lipogénesis *de novo*, sin embargo algunos autores han descrito que *ROR $\alpha$*  es capaz de inducir la activación de AMPK e inhibir la función lipogénica de *LXR $\alpha$*  y a su vez, a través de un mecanismo de retroalimentación, la activación de AMPK induce la activación transcripcional del receptor de *ROR $\alpha$*  (242), mientras que otros autores, al igual que nosotros, obtuvieron resultados opuestos, en los que mediante el truncamiento de la proteína *ROR $\alpha$* , se producía un aumento de los niveles de pAMPK y un descenso de los niveles de expresión de *LXR $\alpha$*  y *SREBP-1c* (243).

Tras el empleo del agonista de *ROR $\alpha$* , conseguimos incrementar los niveles de expresión de *ROR $\alpha$*  (al menos a día 6) en células sobreexpresadas con *miR-19b*, sin embargo, no

conseguimos restaurar la acumulación lipídica, aunque sí mejorarla, en comparación con las mismas células sin este tratamiento y que además, coincidió con una mayor expresión de *FAS* pero no de los factores de transcripción, por ello nos planteamos el estudio de otras vías y/u otras dianas (ya confirmadas por otros autores) de la familia *MIR-19* distintas de *RORα*. Puesto que aunque la familia *MIR-19* podría regular a *RORα*, los cambios detectados en este gen/proteína parecen estar más implicados en la alteración de la lipogénesis *de novo* que en los procesos adipogénicos.

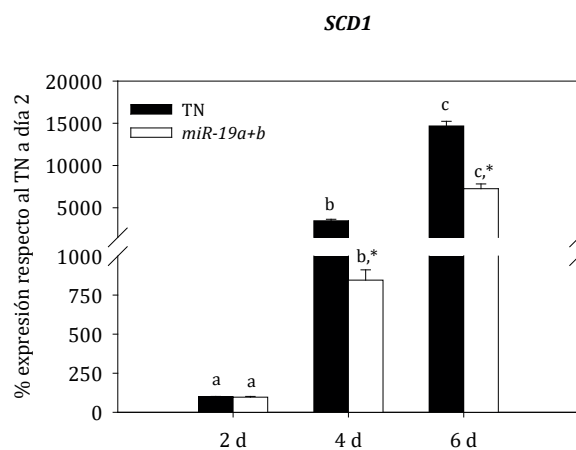
Una diana ya validada de la familia *MIR-19* es *ABCA1* (244). Esta proteína facilita el flujo de salida de colesterol, siendo esencial en las etapas iniciales de la biogénesis de las lipoproteínas de alta densidad. Hay evidencias que sugieren que *ABCA1* regula el contenido lipídico, la tolerancia a glucosa y la sensibilidad a la insulina en el tejido adiposo (245). Además se sabe que su expresión está regulada durante el proceso de diferenciación, en concreto, varios autores señalan que los niveles de expresión del ARNm de *ABCA1* y los niveles de expresión proteica aumentan durante la diferenciación de células 3T3-L1 mientras que el flujo de colesterol se mantiene estable; sin embargo, atendiendo a la localización del colesterol en la membrana de la célula, este es menor en la membrana de los adipocitos que en la de los preadipocitos, lo que sugiere que el colesterol se dirige hacia la vacuola lipídica (246). Tal y como se observa en la *Figura 45*, los niveles de expresión aumentaron significativamente a medida que avanzó el proceso de diferenciación y se detectó una clara reducción de sus niveles de expresión en las células tratadas con el sobreexpresante de *miR-19a+b* a partir del cuarto día de diferenciación.



**Figura 45. Niveles de expresión del ARNm de *ABCA1*.** Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde 100 %  $\equiv$  transfectado negativo a 2 días.  $P < 0.05$  se considera estadísticamente significativo. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas a lo largo del tiempo, mientras que \* indica diferencias por la transfección dentro de cada tiempo. Anova de 2 vías, test *post hoc* de Tukey. TN: células transfectadas con sobreexpresante negativo. *MiR-19a+b*: células sobreexpresadas con sobreexpresante para *miR-19a* y sobreexpresante para *miR-19b*. En todos los casos la concentración empleada de los imitadores comerciales fue de 17 nM y 25  $\mu$ M la del agonista SR1078. D: días. N= 4 para todos los grupos. Datos normalizados respecto a *S11*.

Cabe mencionar que los resultados que hemos mostrado, al igual que los siguientes, hacen referencia a los niveles de expresión del ARNm y por tanto a nivel proteico podrían diferir de los resultados mostrados.

Posteriormente se analizaron los niveles de expresión del ARNm de *SCD1*, una de las enzimas clave en la biosíntesis de ácidos grasos monoinsaturados (247) y también diana validada de la familia *MIR-19* (248). Como se muestra en la *Figura 46* los niveles de expresión del ARNm de *SCD1* aumentaron significativamente a medida que avanzó la diferenciación, mientras que detectamos un descenso estadísticamente significativo en sus niveles de expresión a partir del día 4 en las células transfectadas con los sobreexpresantes de *miR-19a* y *miR-19b* de manera simultánea respecto a las células no sobreexpresadas.

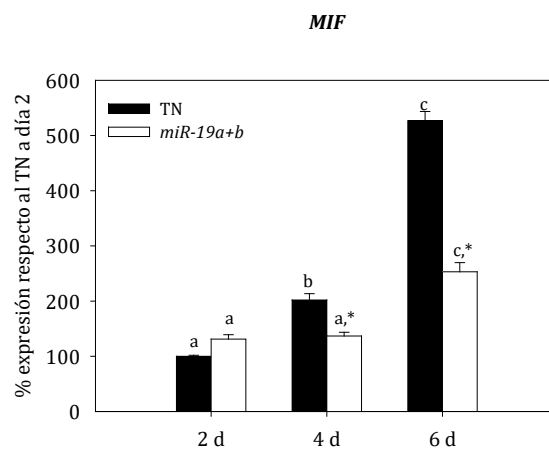


**Figura 46. Niveles de expresión del ARNm de *SCD1*.** Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde 100 %  $\equiv$  transfectado negativo a 2 días.  $P < 0.05$  se considera estadísticamente significativo. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas a lo largo del tiempo, mientras que \* indica diferencias por la transfección dentro de cada tiempo. Anova de 2 vías, test *post hoc* de Tukey. TN: células transfectadas con sobreexpresante negativo. *MIR-19a+b*: células sobreexpresadas con sobreexpresante para *miR-19a* y sobreexpresante para *miR-19b*. En todos los casos la concentración empleada de los imitadores comerciales fue de 17 nM y 25  $\mu$ M la del agonista SR1078. D: días. N= 4 para todos los grupos. Datos normalizados respecto a *S11*.

Dado el papel crítico de *SCD1* en el metabolismo lipídico y el notable aumento en sus niveles de expresión durante la adipogénesis que hemos observado, es posible que el descenso de los niveles de expresión del ARNm de *SCD1* ejerza una influencia en la capacidad de los adipocitos para acumular lípidos.

Tanto *ABCA1* como *SCD1*, fueron analizados teniendo en cuenta que son dianas validadas de la familia *MIR-19*, pero sus rutas de señalización están “por debajo” de los factores de transcripción analizados, por tanto, no esperaríamos que fueran los principales contribuyentes del descenso de la adipogénesis, es decir, podría estar implicados, pero no serían las mo-

léculas clave. Además, ambos genes aumentan considerablemente con la diferenciación, por lo tanto, no podemos discernir si el descenso observado en las células transfectadas con la familia *MIR-19* son una causa o una consecuencia de la adipogénesis disminuida. Es por ello que se decidió también comprobar si los efectos que observábamos se estaban produciendo “más arriba” en las vías de señalización que regulan la adipogénesis, para lo que analizamos los niveles de expresión del ARNm de *MIF*, ya que este factor se expresa en adipocitos, su contenido intracelular incrementa durante la adipogénesis y también está validado como diana de la familia *MIR-19* (249); además, se ha demostrado que regula el ciclo celular y la angiogénesis (249) y estudios *in vitro* en la línea celular 3T3-L1 han demostrado que su silenciamiento inhibe el aumento típico de los niveles de expresión génica de *PPARγ* y *C/EBPα* que se produce tras inducir la diferenciación (249). Como se puede ver en la *Figura 47* los niveles de expresión del ARNm de *MIF* aumentaron con la diferenciación mientras que en las células con *miR-19a* y *miR-19b* sobreexpresado, se detectó una disminución en su expresión respecto a las células sin transfectar a partir del día 4 tras la inducción de la diferenciación.



**Figura 47. Niveles de expresión del ARNm de *MIF*.** Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde 100 %  $\equiv$  transfectado negativo a 2 días.  $P < 0.05$  se considera estadísticamente significativo. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas a lo largo del tiempo, mientras que \* indica diferencias por la transfección dentro de cada tiempo. Anova de 2 vías, test *post hoc* de Tukey. TN: células transfectadas con sobreexpresante negativo 17 nm. *MiR-19a+b*: células sobreexpresadas con sobreexpresante para *miR-19a* 17 nm y sobreexpresante para *miR-19b* 17 nm. D: días. N= 4 para todos los grupos. Datos normalizados respecto a *S11*.

A pesar de que los factores anteriores son dianas validadas de los miembros de la familia *MIR-19*, nuestros resultados parecen indicar que no son el punto crítico de la inhibición de la adipogénesis, puesto que sus valores sólo disminuyen a partir del cuarto día tras la inducción de la diferenciación de los adipocitos, nuevamente sus bajos niveles en las células transfectadas parecen ser una causa del descenso de la adipogénesis y no la causa de la misma, aunque con los datos aquí mostrados no podemos descartar que si puedan presentar una cierta con-

tribución al descenso que se observa en la adipogénesis tras la sobreexpresión de *MIR-19*.

Creemos que una posible explicación de nuestros resultados es que la familia *MIR-19* inhibe la adipogénesis a través de un aumento del arresto del ciclo celular, inhibiendo de este modo la expansión clonal mitótica (250). Esta hipótesis se ve reforzada por estudios previos en células endoteliales en los que demostraron que la sobreexpresión de *miR-19b* era capaz de bloquear el ciclo celular (arresto celular en la fase S) a través del precursor del receptor 2 del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR2) diana del citado *miR* o través de otras dianas como la ciclina D1 (251); mientras que en otras líneas celulares como la Hela o MCF7, se ha revelado que la sobreexpresión endógena de *miR-19b* causa la salida de la fase G1 del ciclo celular y la entrada en la fase S o G2/M (252). Sin embargo, son necesarios más estudios para poder confirmar/descartar esta hipótesis.

En vista de los resultados anteriores, en los que detectamos que *miR-19a* y *miR-19b* están implicados en el proceso de adipogénesis, quisimos comprobar si están desregulados durante la obesidad. Para ello analizamos sus niveles de expresión en muestras de tejido adiposo subcutáneo de humanos: 22 pacientes control y 38 muestras de obesos mórbidos. A continuación en la *Tabla 25* y en la *Tabla 26* se detalla la caracterización e información clínica de los pacientes de cada grupo:

	EDAD (años)	IMC	Glucosa (mg/dl)
Control	47,12 ± 2,26	24,10 ± 0,28 a	86,64 ± 1,77
Obesos	42,52 ± 1,37	48,28 ± 1,25 b	102,39 ± 5,42

**Tabla 25. Caracterización de los pacientes.** Se detalla la edad en años, el IMC y los niveles de glucosa en ayunas (m/dl). Los datos se expresan como la media ± el error. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (test paramétrico *t-student* y test no paramétrico Mann-Whitney). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas si  $p < 0.05$ . N= 22 en el grupo control y n=38 en el grupo obesos.

Tal y como se detalla en *Tabla 25* los pacientes incluidos en el estudio no presentaban diferencias estadísticamente significativas en cuanto a edad y niveles de glucosa en sangre.

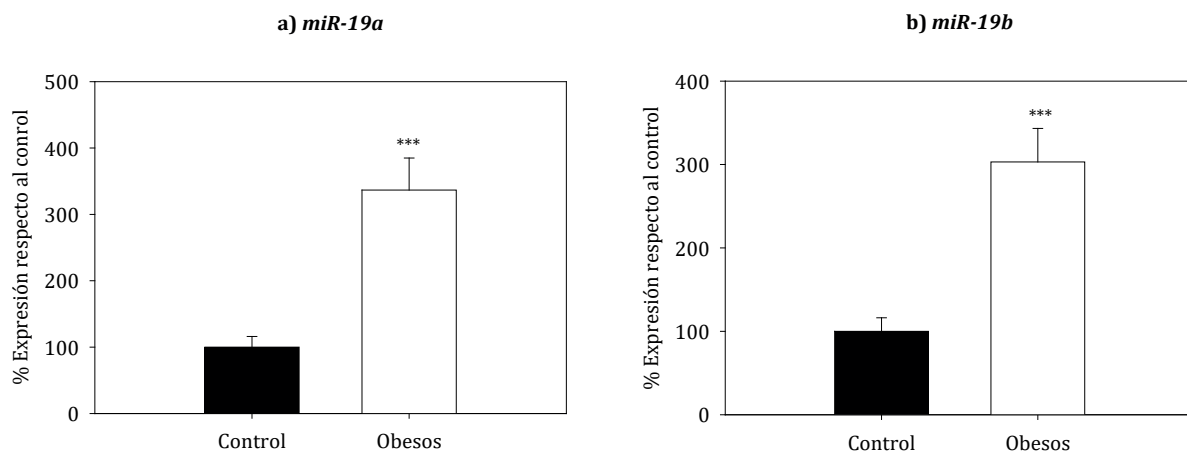


	Control	Obesos
Sin medicación	72,73 %	31,58 %
Psicofármacos	13,64 %	23,68 %
Antidiabéticos	0 %	44,74 %
Antihipertensivos	9,09 %	23,68 %
Estatinas	4,55 %	13,16 %

**Tabla 26. Medicación de los pacientes.** Se detalla el porcentaje de pacientes que toman alguna medicación del grupo descrito. N= 22 en el grupo control y n= 38 en el grupo obesos.

En cuanto a la medicación, como podemos observar en la *Tabla 26* la mayoría de los pacientes control no estaban sometidos a ninguna medicación, mientras que casi el 70 % de los pacientes obesos estaban tomando alguna medicación, principalmente antidiabéticos.

Tras analizar los niveles de expresión de *miR-19a* y *miR-19b* en tejido adiposo humano, observamos tal y como se muestra en la *Figura 48*, un aumento de los niveles de expresión en ambos casos con la obesidad, similar al observado para *miR-19a* y *miR-19b* por otros autores en humanos a nivel circulante e incluso en tejido adiposo subcutáneo y visceral de otras especies (253).



**Figura 48. Niveles de expresión de *miR-19a* (a) y *miR-19b* (b) en grasa subcutánea humana.** Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde 100 %  $\equiv$  control. \*\*\* indica diferencias estadísticamente significativas respecto al control,  $p < 0.001$ . Test no paramétrico de Mann-Whitney. Control (pacientes no obesos y no sometidos a cirugía para la pérdida de peso). Obesos (pacientes obesos mórbidos). N= 22 para el grupo control y n= 38 para el grupo obesos. Datos normalizados respecto a *U6*.

En vista de los resultados anteriores, en los que detectamos que los niveles de expresión de los 2 *miRs* analizados están desregulados positivamente durante la obesidad, decidimos analizar también los niveles de expresión de *miR-19a* y *miR-19b* en 6 pacientes durante el

estadio de obesidad mórbida y en los mismos pacientes 2-3 años después tras la pérdida de peso inducida por la cirugía bariátrica, con el objetivo de comprobar si los niveles de expresión de estos *miRs* se restablecían total o parcialmente tras la pérdida de peso. Además de estos dos grupos de pacientes cuyas características clínicas se detallan en la *Tabla 27* y en *Tabla 28*, se han incluido en los análisis los pacientes control descritos previamente en la *Tabla 25* y en la *Tabla 26*:

	EDAD (años)	IMC	Glucosa (mg/dl)
Control	47,12 ± 2,26	24,10 ± 0,28 a	86,64 ± 1,77a,b
Obesidad mórbida	50,80 ± 5,01	48,42 ± 3,75 b	96,83 ± 6,67a
Tras pérdida de peso	53,14 ± 4,98	29,73 ± 0,98 a	85,5 ± 2,85b

**Tabla 27. Caracterización de los pacientes.** Se detalla la edad en años, el IMC y los niveles de glucosa en ayunas (mg/dl). Los datos se expresan como la media ± el error. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (Anova de 1 vía, test paramétrico de Tukey y test no paramétrico de Kruskal Wallis). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas si  $p < 0.05$ . N= 22 en el grupo control, n= 6 en el grupo obesidad mórbida y n= 6 en el grupo tras pérdida de peso.

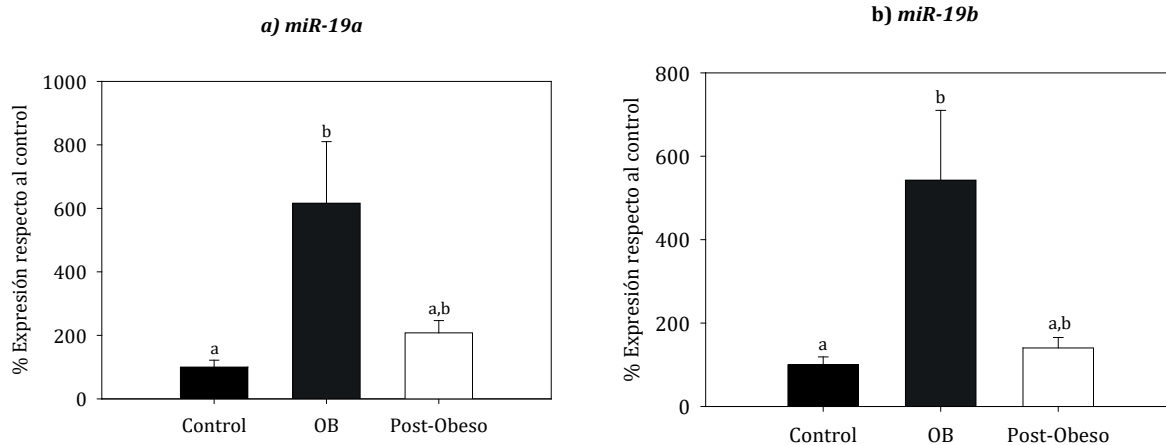
Tal y como se muestra en la *Tabla 27*, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los 3 grupos de pacientes en cuanto a edad, en cambio sí se detectaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a IMC y niveles de glucosa en sangre entre el grupo de pacientes obesos mórbidos y los grupos control (pacientes no obesos y los pacientes obesos mórbidos tras la pérdida de peso). Respecto al IMC, es importante mencionar que tal y como se detalla en los datos recogidos en la *Tabla 27*, aunque los pacientes ya no se encontraban en el estadio de obesidad, alguno todavía presentaba un ligero sobrepeso el día que se sometieron a la cirugía plástica, momento en el que nuevamente recogimos muestras de grasa.

	Obesidad mórbida	Tras pérdida de peso	Control
Sin medicación	33,33 %	50 %	72,73 %
Psicofármacos	33,33 %	50 %	13,64 %
Antidiabéticos	16,67 %	0%	0%
Antihipertensivos	33,33 %	16,67 %	9,09 %
Estatinas	33,33 %	33,33 %	4,55 %

**Tabla 28. Medicación de los pacientes.** Se detalla el porcentaje de pacientes que toman alguna medicación del grupo descrito. N= 22 en el grupo control, n= 6 en el grupo obesidad mórbida y n= 6 en el grupo tras pérdida de peso.

En cuanto a la medicación detallada en la *Tabla 28*, cabe destacar que la mayoría de pacientes control no tomaban ningún tipo de medicación, y tras la cirugía bariátrica, aumenta el porcentaje de pacientes no medicados, reduciéndose el porcentaje de aquellos que toman antihipertensivos y antidiabéticos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el número de pacientes empleados en este caso es muy bajo, debido al número reducido de pacientes que se someten a abdominoplastia tras una cirugía bariátrica, y el tiempo que tiene que transcurrir entre ambas operaciones para que los pacientes cumplan los criterios de inclusión.

Al analizar los cambios en los niveles de expresión de estos 2 *miRs* observamos un claro descenso en los mismos con la pérdida de peso inducida por la cirugía bariátrica, alcanzando valores similares a los detectados en el grupo control; aunque las diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas (*Figura 49a-b*), posiblemente a consecuencia del bajo “n” del grupo de pacientes obesos/post-obesos.



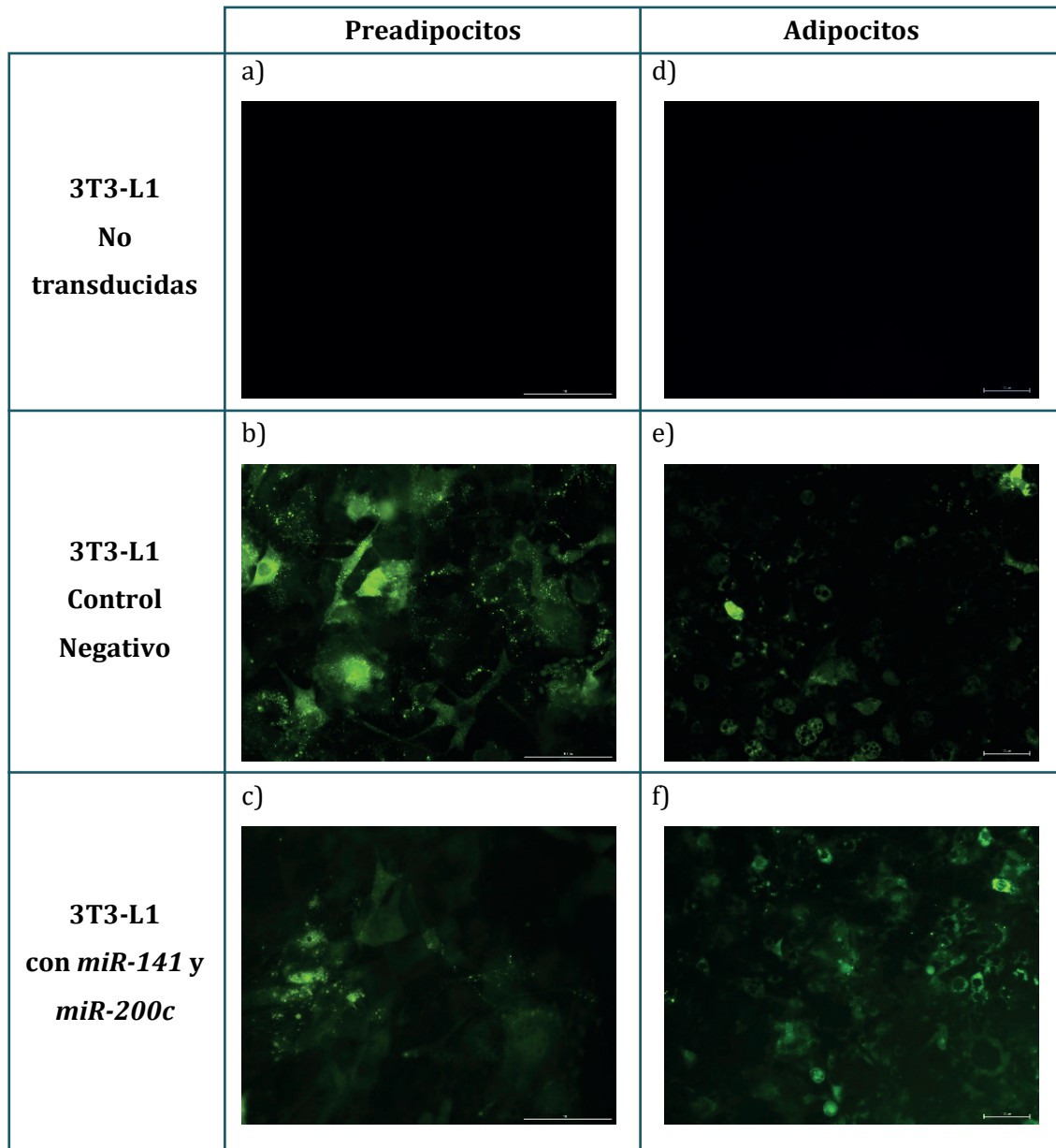
**Figura 49. Niveles de expresión de *miR-19a* (a) y *miR-19b* (b) en grasa subcutánea humana.** Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde 100 %  $\equiv$  control. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas,  $p < 0.05$ . Test no paramétrico de Dunn's. Control (pacientes no obesos y no sometidos a cirugía para la pérdida de peso), OB (pacientes obesos mórbidos) y Post-Obeso (pacientes tras la pérdida de peso inducida por la cirugía bariátrica). N= 22 para el grupo control, n= 6 para el grupo obesos y n = 6 para el grupo post-obeso. Datos normalizados respecto a *S11*.

Todos estos resultados en conjunto nos sugieren que ambos *miRs* estudiados en el tejido adiposo subcutáneo se encuentran desregulados durante la obesidad severa y que la pérdida de peso inducida por la cirugía bariátrica ejerce cambios en su perfil de expresión, tendiendo a recuperarse unos niveles de expresión similares al grupo control. Teniendo en cuenta que la sobreexpresión de la familia *MIR-19* provoca un descenso de la adipogénesis, tal vez el aumento observado de esta familia durante la obesidad mórbida es un mecanismo compensatorio para evitar una acumulación excesiva de grasa corporal, no obstante, son necesarios más experimentos para confirmar esta hipótesis.

- **Regulación de la adipogénesis por miembros de la familia *MIR-200***

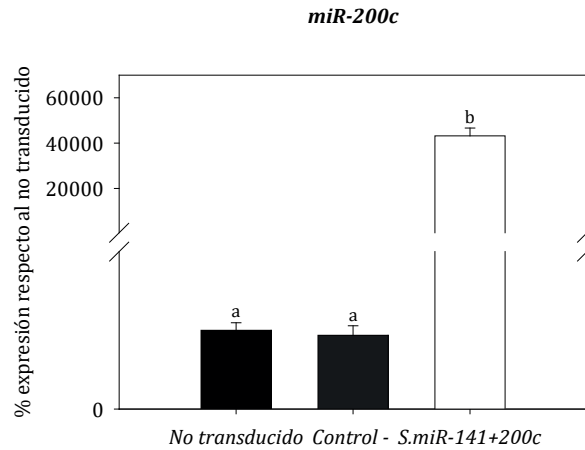
La familia *MIR-200* está altamente conservada a lo largo de la evolución y en vertebrados está formada por cinco miembros distintos que pertenecen a dos clúster, por una parte *miR-200a*, *miR-200b* y *miR-429* y por otra parte *miR-200c* y *miR-141* (153). Estudios recientes han descrito que varios miembros de esta familia podrían estar implicados en la regulación de la adipogénesis, y por tanto, podrían ser clave para la intervención terapéutica tanto de la obesidad como del síndrome metabólico, en concreto se ha descrito que en ratones el silenciamiento de *miR-200a*, *miR-200b* y *miR-429* específicamente en adipocitos, es por ello que decidimos indagar en la regulación de la adipogénesis por varios miembros de la familia *MIR-200* creando 2 líneas celulares estables mediante el uso de lentivirus: una línea celular control y una línea celular con *miR-141* y *miR-200c* sobreexpresado, en todas ellas partimos de la línea celular 3T3-L1.

Tras el tratamiento de las células con los lentivirus lo que hicimos fue comprobar la efectividad de la transducción en nuestras células. Para ello llevamos a cabo dos aproximaciones, la primera de ellas, mediante el uso de microscopía de fluorescencia para comprobar la existencia de la misma, puesto que los plásmidos de los que partimos expresan, tanto en preadipocitos co-*GFP* (*Figura 50a*, *b* y *c*) como tras la diferenciación (*Figura 50d*, *e* y *f*). Tal y como podemos observar en las figuras citadas, las células 3T3-L1 no transducidas no presentaron fluorescencia como era de esperar, mientras que las condiciones transducidas con el vector vacío o con los sobreexpresantes, presentaban fluorescencia tanto cuando eran preadipocitos como tras la inducción de la diferenciación.



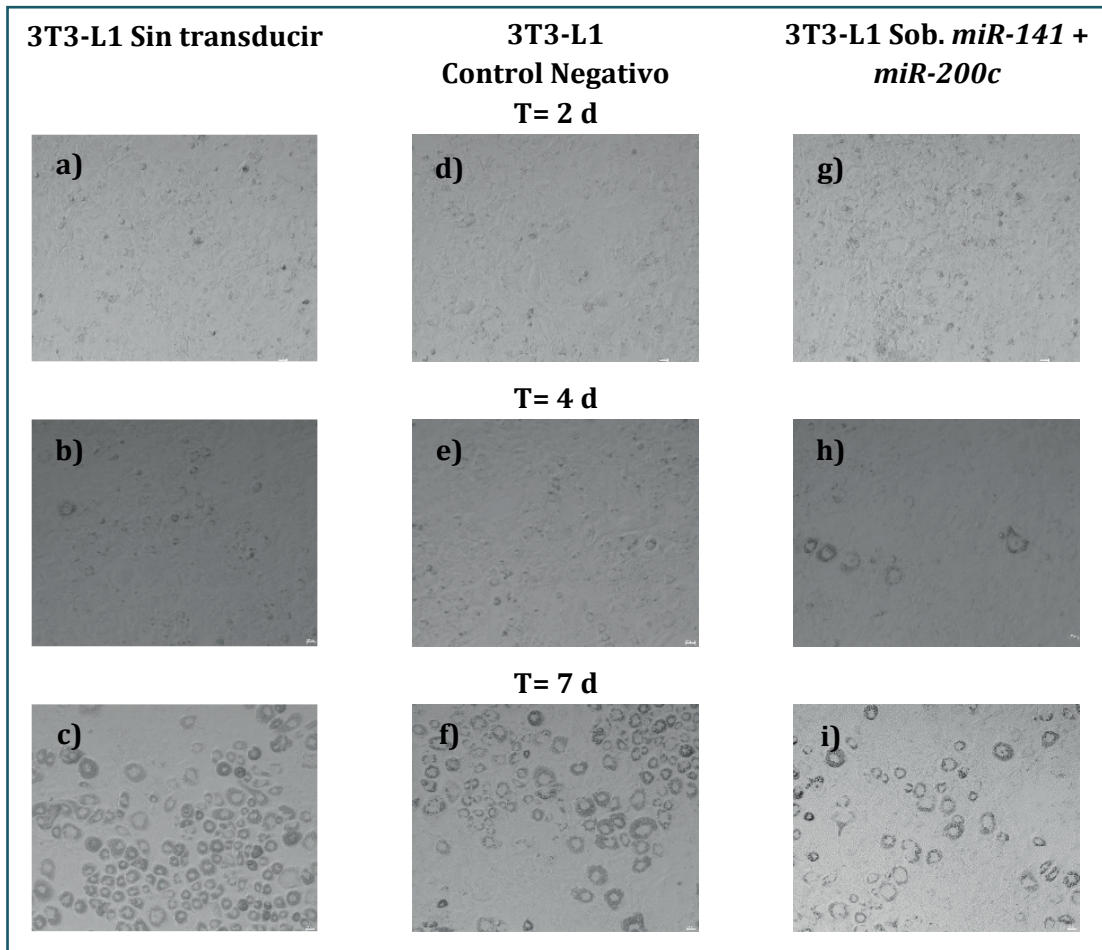
**Figura 50. Fotografías al microscopio de fluorescencia de la línea celular 3T3-L1.** Imágenes tomadas cuando las células estaban próximas a la confluencia (pre-adipocitos) y 6 días después de inducir la diferenciación (adipocitos). Línea celular 3T3-L1 sin transducir (no presenta fluorescencia) (a y d). Línea celular 3T3-L1 estable transducida con control negativo (b y e) y línea celular estable 3T3-L1 con sobreexpresión de *miR-141* y *miR-200c* (c y f).

En la segunda aproximación analizamos la eficiencia de la transducción mediante *qPCR* 7 días después de inducir la diferenciación, para comprobar que ésta se mantenía. Tal y como se puede comprobar en la *Figura 51*, los niveles de expresión de *miR-200c* eran superiores en las células 3T3-L1 en las que se había sobreexpresado respecto a ambos controles, siendo en estos dos últimos sus niveles de expresión muy bajos, lo que nos llevó a decidir emplear únicamente sobreexpresantes para estudiar las funciones de esta familia de *miRs* en la adipogénesis y descartar el uso de inhibidores del mismo.



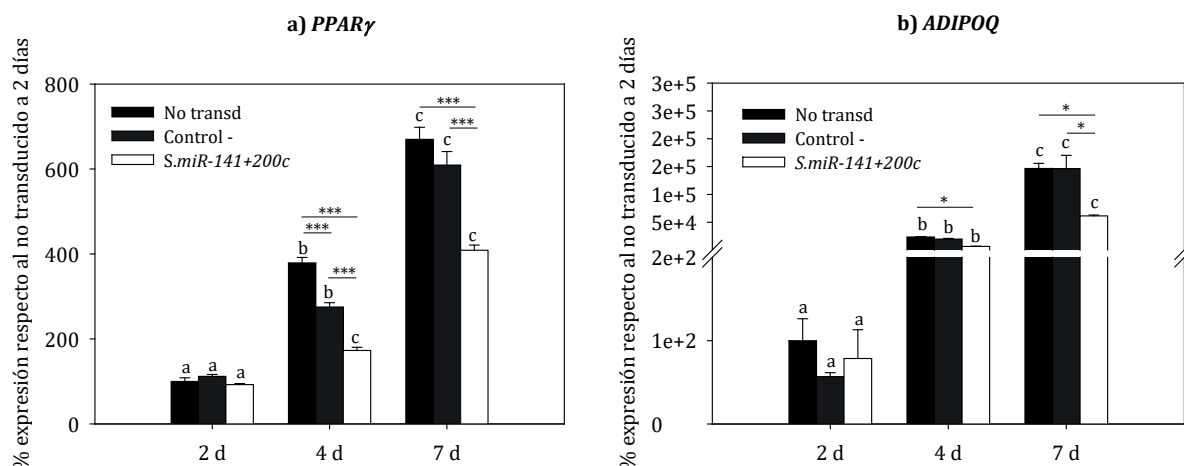
**Figura 51. Niveles de expresión de *miR-200c* 7 días después de inducir la diferenciación.** Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde 100 %  $\equiv$  Células no transducidas. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Anova de 1 vías, test *post hoc* de Tukey. No transducido: células no transducidas. Control -: células transducidas con un vector lentiviral con una secuencia sin dianas. *S. miR-141+200c* células transducidas con un vector lentiviral con un pre-*miR* de *miR-141* y *miR-200c*. N= 3-5 para todos los grupos. Datos normalizados respecto a *U6*.

Tras inducir la diferenciación de las células, se observó que a medida que avanzaban los días, las células fueron cambiando desde la morfología fibroblástica característica de esta línea celular, hacia una forma más redondeada característica de los adipocitos maduros (observar diferencias a lo largo del tiempo en la *Figura 52a-c* y *d-f*). Sin embargo aquellas células con *miR-141* y *miR-200c* sobreexpresado (*Figura 50g-i*), presentaron un menor porcentaje de células diferenciadas.



**Figura 52. Fotografías de microscopía.** Se observan los efectos sobre la adipogénesis tras la modificación de la expresión de los miembros de la familia *MIR-200*. Células 3T3-L1 sin transducir, 2, 4 y 7 días tras la diferenciación (a, b y c respectivamente). Control negativo, células 3T3-L1 transducidas con un vector lentiviral con una secuencia sin dianas 2, 4 y 7 días tras la diferenciación (d, e y f respectivamente). Células 3T3-L1 con *miR-141* y *miR-200c* sobreexpresado, 2, 4 y 7 días tras la diferenciación (g, h e i respectivamente).

En vista de los resultados observados a nivel microscópico en los que la sobreexpresión de *miR-141* y *miR-200c* parecía regular negativamente la adipogénesis, decidimos comprobar a nivel génico los efectos de la sobreexpresión de esta familia en un factor transcripcional de la adipogénesis (*PPAR $\gamma$* ) así como un marcador de adipocitos maduros (*ADIPOQ*). Tal y como se muestra en la *Figura 53a* y *b*, se confirmaron los resultados descritos con anterioridad, los niveles de expresión génica de ambos ARNm aumentaron con la diferenciación, sin embargo este aumento en las células con *miR-141* y *miR-200c* sobreexpresado fue inferior respecto a ambos controles.



**Figura 53. Niveles de expresión del ARNm de *PPARγ* (a) y *ADIPOQ* (b).** Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde 100 %  $\equiv$  Células no transducidas a 2 días. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas a lo largo del tiempo dentro de cada transducción ( $p < 0,05$ ), mientras que \* y \*\*\* indican diferencias estadísticamente significativas dentro de cada tiempo respecto al control no transducido  $p < 0,05$  y  $p < 0,001$  respectivamente. Anova de 2 vías, test *post hoc* de Tukey. No transd: células no transducidas. Control -: células transducidas con un vector lentiviral con una secuencia sin dianas. *S. miR-141+200c* células transducidas con un vector lentiviral con un pre-miR de *miR-141* y *miR-200c*. D: días. N= 3-5 para todos los grupos. Datos normalizados respecto a *S11*.

Nuestros resultados están de acuerdo con los obtenidos por otros autores, quienes sobreexpresaron algunos miembros de esta familia de *miRs* (*miR-200b*) y detectaron un aumento de la proliferación de los preadipocitos y una inhibición de la diferenciación de los adipocitos en la línea celular 3T3-L1, y el efecto contrario empleando inhibidores. Estos estudios demostraron además, que esta inhibición se lleva a cabo a través de *KLF4*, regulador transcripcional directo de *C/EBPβ*, quien induce tanto la expresión de *C/EBPα* como de *PPARγ* (este último analizado en nuestro estudio), factores descritos todos ellos por su papel en la regulación de la adipogénesis (254). Además, los mismos autores confirmaron una mayor proliferación de las células 3T3-L1 sobreexpresadas respecto a su control negativo mediante el análisis con el *cell counting kit-8* (*CCK8*), resultados que nosotros también pudimos corroborar en nuestro estudio al comparar las células 3T3-L1 con *miR-200c* y *miR-141* sobreexpresados respecto al control negativo tanto el día de inducción de la diferenciación, como 2 y 7 días después (*datos no mostrados*).

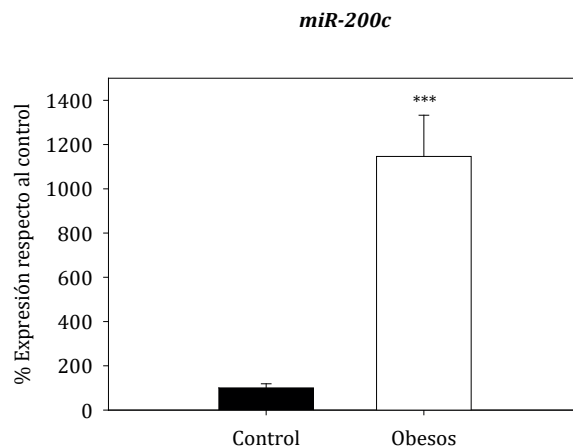
Estos resultados nos confirman que varios miembros de la familia *MIR-200* ejercen un papel importante en la proliferación de los preadipocitos y su diferenciación, al menos *in vitro*, en la línea celular 3T3-L1 y que su sobreexpresión presenta un efecto regulador negativo en la adipogénesis, efecto que parece estar mediado, al menos parcialmente, por *PPARγ*.

Por último decidimos analizar los niveles de expresión de *miR-200c* en muestras de tejido adiposo subcutáneo de humanos, ya que como hemos descrito, parece estar implicado en



el proceso de adipogénesis, con el objetivo de comprobar si sus niveles de expresión estaban asociados con la obesidad. Para realizar estos análisis se emplearon las muestras de los 22 pacientes control y de 38 obesos mórbidos cuya caracterización se mostró en la *Tabla 25* y en la *Tabla 26*.

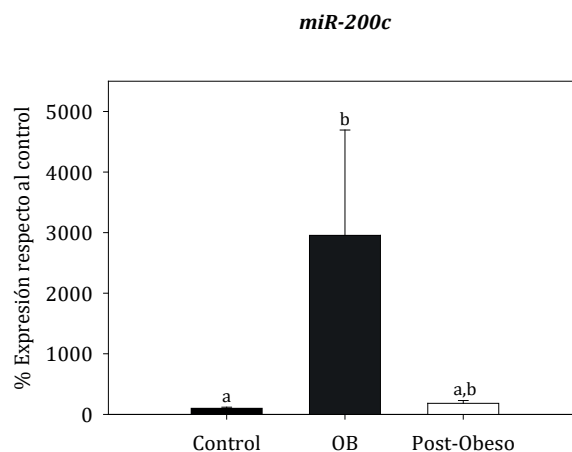
En nuestro estudio, pudimos comprobar que los niveles de expresión de *miR-200c* en el tejido adiposo subcutáneo humano aumentaron con el porcentaje de grasa corporal (*Figura 54*), siendo sus niveles de expresión muy bajos en el grupo control, aunque perfectamente cuantificables (255).



**Figura 54. Niveles de expresión de *miR-200c* en grasa subcutánea humana.** Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde 100 %  $\equiv$  control. \*\*\* indica diferencias estadísticamente significativas respecto al control,  $p < 0,001$ . Test no paramétrico de Mann-Whitney. Control (pacientes no obesos y no sometidos a cirugía para la pérdida de peso). Obesos (pacientes obesos mórbidos). N= 22 en el grupo control y n= 38 en el grupo obesos. Datos normalizados respecto a U6.

En vista de los resultados anteriores, decidimos analizar también los niveles de expresión de *miR-200c* en 6 pacientes durante el estadio de obesidad mórbida y los mismos pacientes 2-3 años después de la pérdida de peso inducida por la cirugía bariátrica, con el objetivo de comprobar si los niveles de expresión de estos *miRs* se restablecían total o parcialmente tras la pérdida de peso. Las características clínicas de los pacientes obesos y los mismos tras la pérdida de peso, ya se detallaron previamente en la *Tabla 27* y en la *Tabla 28*.

Al analizar los cambios en los niveles de expresión de *miR-200c*, observamos que el aumento detectado con la obesidad se corregía tras la pérdida de peso; aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, posiblemente a consecuencia del bajo “n” de los grupos de pacientes obesos y post-obesos (*Figura 55*).



**Figura 55. Niveles de expresión de *miR-200c* en grasa subcutánea humana.** Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde 100 %  $\equiv$  control. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control,  $p < 0,05$ . Test no paramétrico de Dunn's. Control (pacientes no obesos y no sometidos a cirugía para la pérdida de peso), OB (pacientes obesos mórbidos) y Post-Obeso (pacientes obesos mórbidos tras la pérdida de peso inducida por la cirugía bariátrica).  $N = 22$  para el grupo control,  $n = 6$  para el grupo obesos y  $n = 6$  para el grupo post-obeso. Datos normalizados respecto a *U6*.

*MiR-200c* es uno de los *miRs* que se encuentra inducido durante la adipogénesis en estudios *in vitro* (178, 233) y también se encuentra regulado positivamente en pacientes obesos, lo que nos hace pensar en su implicación en la adipogénesis y en la obesidad. Como ya se ha mencionado, estudios previos han demostrado que ratones *knockout* para varios miembros de la familia *MIR-200* únicamente en el tejido adiposo, presentan un aumento en la obesidad inducida por la dieta. Teniendo en cuenta estos datos previos y los nuestros propios, creemos que la familia *miR-141/miR-200c* en el tejido adiposo subcutáneo podría estar implicada en los mecanismos que controlan la capacidad de este tejido para almacenar grasa, ya que durante la obesidad mórbida, la capacidad de éste se ve saturada y se inicia una exportación ectópica de triglicéridos (256). En esta situación hemos observado que los niveles de *miR-200c* aumentan considerablemente, probablemente en un intento de restaurar/compensar los procesos de síntesis y almacenamiento de lípidos en el tejido adiposo. Esta hipótesis se vería reforzada por el descenso de los niveles de expresión de este *miR* tras la pérdida de peso, tras la cual, se inhibe el exporte ectópico de grasas al corregirse la capacidad del tejido adiposo subcutáneo de almacenar grasas. Las principales limitaciones de nuestros resultados son el bajo tamaño muestral en pacientes "post-obesos", la imposibilidad de obtención de muestras de tejido adiposo subcutáneo a distintos tiempos tras la cirugía bariátrica para poder realizar un perfil de expresión de este *miR* a lo largo del tiempo, así como la imposibilidad para obtener muestras de tejido adiposo visceral de los mismos pacientes para realizar la comparación entre ambos tejidos. Sin embargo, hasta donde sabemos, es uno de los primeros estudios en los que se describen los niveles de expresión de este *miR* durante el estadio

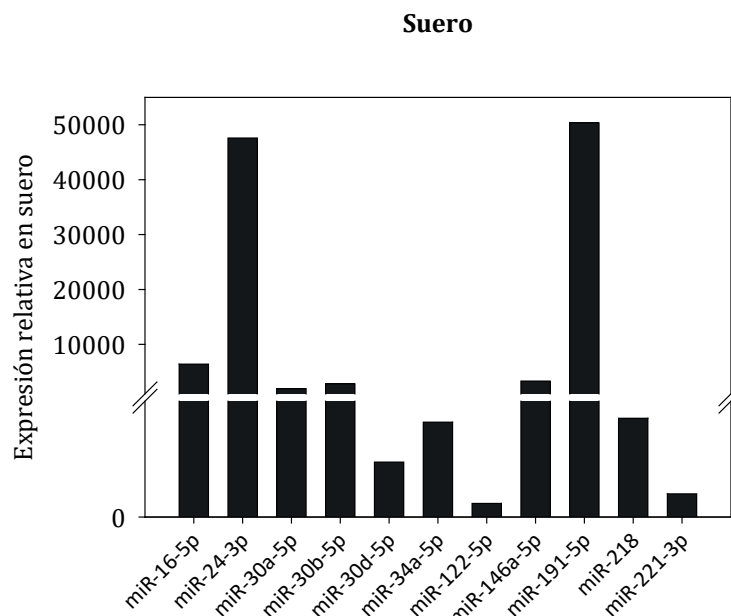
de obesidad mórbida y los mismos pacientes tras la pérdida de peso inducida por la cirugía bariátrica en humanos.

### 5.1.3 *MiRs* que se ven alterados a nivel circulante y en tejidos en ratas sometidas a distintas dietas a largo plazo.

Debido a las dificultades propias para la obtención de muestras humanas y que los donantes sean homogéneos en edad, sexo, medicación, patologías, etc. decidimos profundizar en el conocimiento de *miRs* relacionados con la obesidad empleando un modelo animal que nos permitiese controlar los factores mencionados. Se analizaron los niveles de expresión de 11 *miRs* predichos mediante las herramientas informáticas ya mencionadas a lo largo de esta tesis y/o identificados en distintas publicaciones por su posible relación con genes/proteínas desreguladas en comorbilidades de la obesidad como la resistencia a insulina, *T2DM*, hígado graso etc., en un total de 30 ratas macho de la cepa *Wistar* que fueron sometidas a distintas dietas (DN, RC o *HFD*).

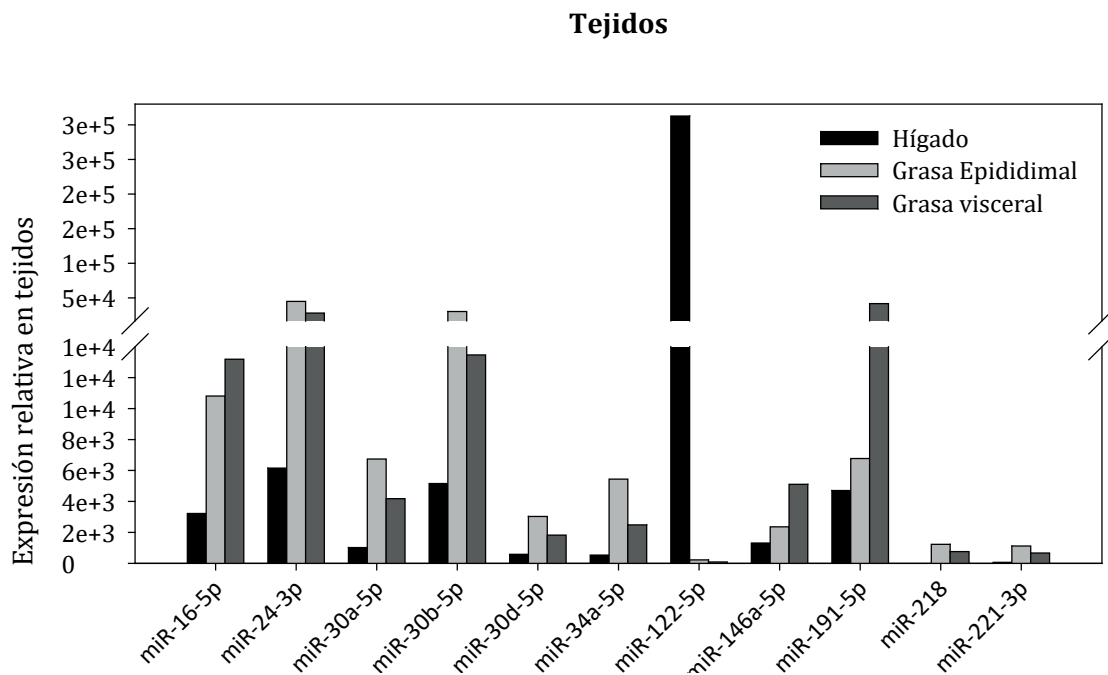
En primer lugar, se realizó un perfil de expresión para estos 11 *miRs* en suero, con el objetivo de conocer si alguno de ellos podría ser un potencial biomarcador de diagnóstico y/o pronóstico de la obesidad y comorbilidades asociadas como el hígado graso no alcohólico. También se realizó un perfil de expresión de los mismos *miRs* en tejidos directamente relacionados con el síndrome metabólico. Debido a nuestro interés en biomarcadores de obesidad o de comorbilidades de la misma, cabría pensar que el tejido que más contribuiría a los niveles circulantes fuera el tejido adiposo, por ello decidimos analizar distintos depósitos grasos, como el tejido adiposo intra-abdominal epididimal y el tejido adiposo visceral mesentérico (“verdadero” tejido adiposo visceral en roedores), sin embargo el tejido adiposo no es el único que sufre alteraciones con la obesidad, un ejemplo de ello también es el hígado, ya que durante la obesidad se produce el almacenamiento ectópico de grasa en este órgano, y varios autores han sugerido que la resistencia a insulina inducida por la dieta en roedores también podría ser debida a esta acumulación ectópica de grasa (257), por lo que decidimos comparar si los niveles de expresión de estos *miRs* durante la obesidad se comportaban de igual modo en los distintos depósitos adiposos y si el patrón de expresión de los *miRs* circulantes era coincidente con el observado en alguno de los tejidos estudiados.

En la *Figura 56* se muestran los niveles de expresión de los *miRs* analizados en el suero de ratas control. De los 11 *miRs* analizados, *miR-191-5p* fue el que presentó los mayores niveles de expresión. Seguido de *miR-24-3p*. *MiR-16-5p* también presentó niveles de expresión elevados así como, varios miembros de la familia *MIR-30* y *miR-146a-5p*. *Mir-218* presentaron niveles de expresión más modestos, mientras que los niveles de expresión más bajos detectados vinieron dados por *miR-122-5p* y *miR-221-3p*.



**Figura 56. Perfil de expresión de los *miRs* analizados en suero.** Los datos de expresión se representan como unidades arbitrarias.

De los *miRs* analizados en suero, nos planteamos comprobar en cuál de los tejidos periféricos estudiados se expresaban de modo mayoritario, por lo que decidimos realizar el perfil de expresión de los *miRs* anteriores en hígado y tejido adiposo visceral y epididimal (Figura 57). Se puede observar que de todos los *miRs* analizados, el que presentó mayor expresión fue *miR-122-5p* en hígado, lo cual era esperable porque se sabe que *miR-122* constituye aproximadamente el 70% de los *miRs* hepáticos, siendo prácticamente exclusivo de este órgano, si bien se han detectado bajos niveles de expresión en otros tejidos y en sangre (258). Los *miRs* que presentaron sus mayores niveles de expresión en grasa fueron *miR-16-5p*, *miR-24-3p*, *miR-30b-5p*, *miR-146a-5p* y *miR-191-5p* aunque los valores nunca fueron tan pronunciados como el caso de *miR-122* en hígado.

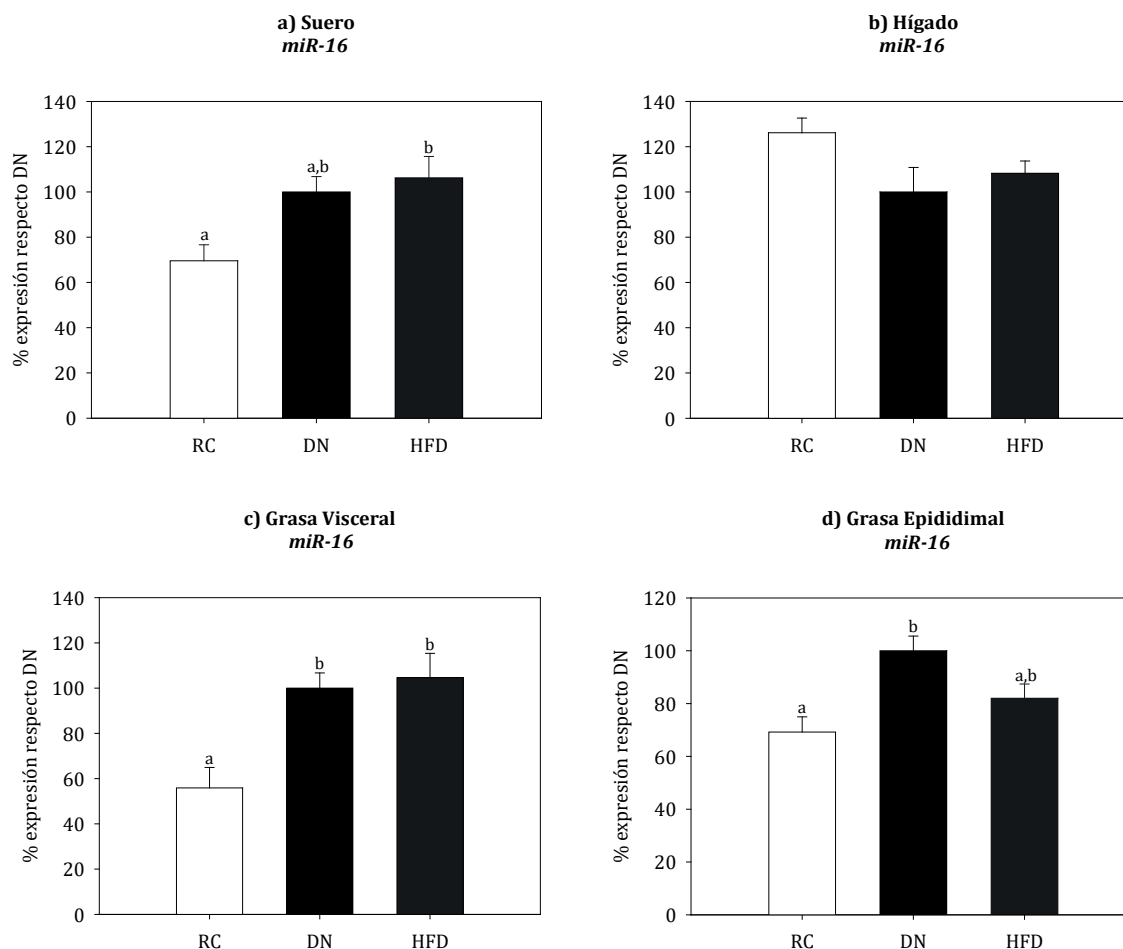


**Figura 57.** Perfil de expresión de los *miRNAs* analizados en tejidos. Los datos se representan como unidades arbitrarias.

Posteriormente se procedió al análisis individual de los niveles de expresión de los *miRNAs* seleccionados (nombrados en adelante con el prefijo *miR* seguido de un guión y su número), tanto a nivel circulante (en suero) como hepático y de tejido adiposo en animales sometidos a diferentes dietas (RC, *HFD* y como grupo control, animales sometidos a DN). Continuamos los estudios con el objetivo de comprobar si podrían ser empleados como biomarcadores, su especificidad de expresión en un tejido concreto de los mencionados, o su posible implicación en la regulación de la adipogénesis u obesidad descrita en la bibliografía existente o basada en predicciones bioinformáticas.

Tal y como se muestra en la *Figura 58*, la RC indujo cambios en los niveles de expresión de *miR-16a-5p* únicamente en los depósitos de grasa visceral (*Figura 58c*) y epididimal (*Figura 58d*), siendo significativamente inferior respecto al grupo sometido a DN. Mientras que la *HFD* no produjo alteraciones ni a nivel circulante (*Figura 58a*) ni en los tejidos analizados (*Figura 58b-d*).

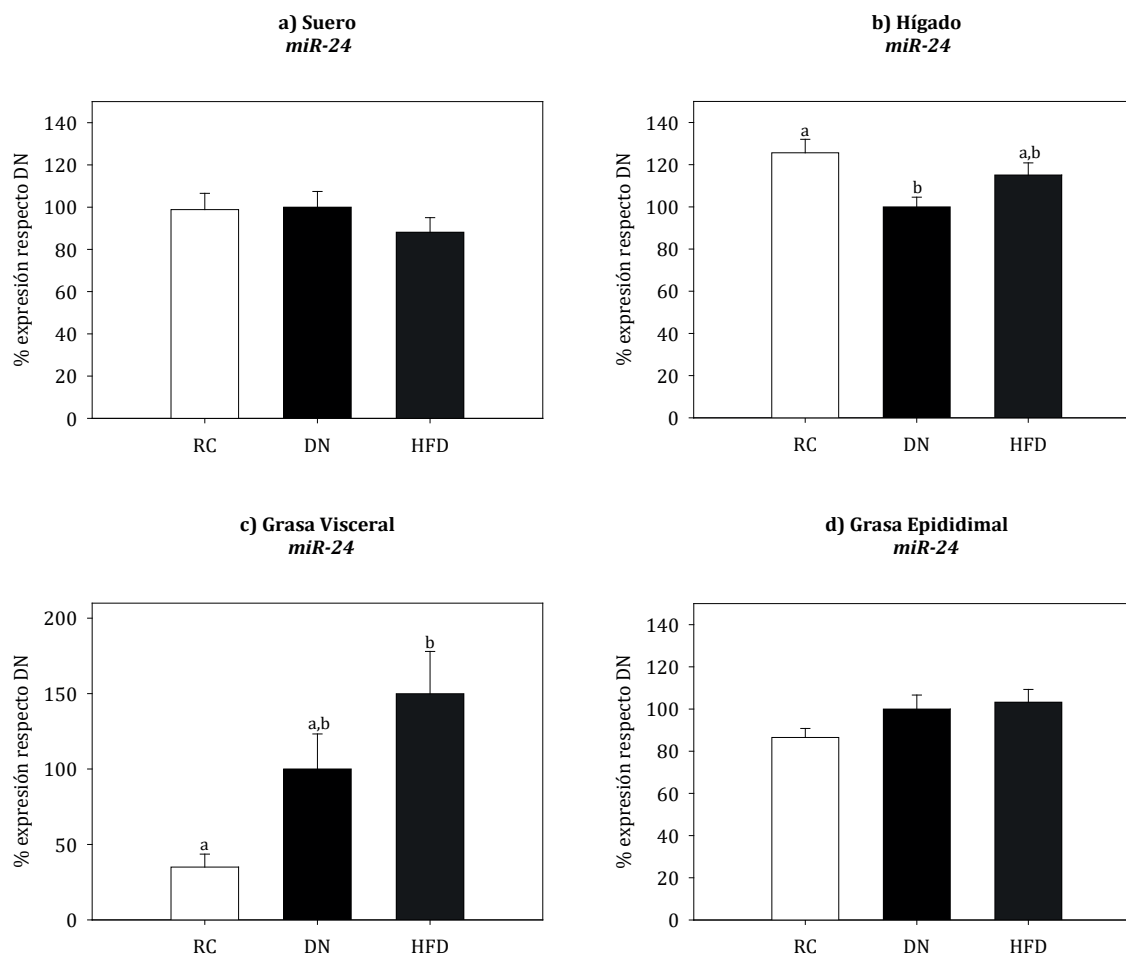
El patrón de expresión de *miR-16a-5p* a nivel circulante se correlaciona con el observado en el tejido adiposo tanto epididimal como visceral, tejidos en los que se expresa principalmente este *miR* tal y como han descrito otros autores (130) y como hemos corroborado nosotros nuevamente, todo ello parece indicar que de los órganos analizados en este estudio, el tejido adiposo parece tener una mayor contribución a nivel circulante, lo cual podría ser debido, al menos parcialmente, al hecho de que los niveles de expresión de este *miR* son mayores en el tejido adiposo que en el hígado.



**Figura 58.** Efecto de la *HFD* y *RC* durante 3 meses sobre los niveles de expresión de *miR-16* en suero (a), hígado (b), grasa visceral (c) y grasa epididimal (D). Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde DN  $\equiv$  100 %. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas. ANOVA de una vía, test *post hoc* de Tukey, para  $p < 0.05$  se consideraron diferencias estadísticamente significativas. RC: restricción calórica, DN: dieta normal y *HFD*: dieta alta en grasa. N= 9-10 en todos los grupos. Datos normalizados respecto a *U6*.

*MiR-24* es un *miR* altamente conservado en varias especies, que ha sido estudiado previamente en modelos de roedores, y aunque se sabe que sus niveles de expresión en hepatocitos son elevados (259), en nuestro estudio, observamos que sus niveles de expresión son superiores en el tejido adiposo tanto visceral como epididimal (Figura 57). Además, de los *miRs* estudiados en este trabajo, junto con *miR-191*, es el que presenta mayores niveles de expresión en suero (Figura 56). Cuando analizamos su expresión a nivel circulante se observó una tendencia a disminuir con la *HFD*, aunque no se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 59a). Sin embargo, este patrón no coincidió con el observado en ninguno de los tejidos analizados en estas mismas dietas, puesto que su expresión aumentó con el porcentaje de masa grasa tanto en el tejido adiposo visceral como en el epididimal (aunque en este último el efecto fue más suave y no se alcanzaron diferencias estadísticamente signifi-

cativas) (*Figura 59c* y *Figura 59d* respectivamente), y a nivel hepático se produjo un aumento con la RC (*Figura 59b*). Los resultados en suero nos sugieren que los niveles de expresión de este *miR* a nivel circulante podrían correlacionarse inversamente con los niveles de glucosa en sangre, tal y como ya ha sido descrito de forma similar en pacientes humanos con niveles de glucosa elevados, en modelos de ratón sometidos a *HFD* y en modelos *in vitro* de células endoteliales (260). A nivel hepático, se ha descrito un aumento de los niveles de expresión de *miR-24* en ratones con esteatosis hepática no alcohólica y en humanos con hígado graso no alcohólico (259, 261). En nuestro estudio, observamos una tendencia a aumentar con la *HFD* sin embargo, tal vez por la duración de la misma, nuestros animales no han llegado a desarrollar una esteatosis hepática grave, lo que podría explicar que el efecto fuese inferior al de los estudios mencionados. En la actualidad, no existen datos previos sobre la alteración de los niveles de expresión de *miR-24* con la dieta en tejido adiposo visceral de ratas. Aquí demostramos una correlación positiva entre los niveles de expresión de este *miR* con el porcentaje de masa grasa tanto en el tejido adiposo visceral como epididimal, efecto que va en la misma dirección que los resultados obtenidos por otros autores en tejido adiposo abdominal de personas obesas (204). Estos resultados junto con los observados en suero y los descritos por otros autores en humanos, parecen indicar que *miR-24* podría ejercer un papel en la regulación de la adiposidad y de efectos patológicos asociados a la obesidad como la sensibilidad a la insulina, sin embargo siguen siendo necesarios más estudios. También podemos concluir que a nivel circulante, los niveles de *miR-24* no se correlacionan de modo positivo y/o negativo con el patrón de expresión observado en los distintos tejidos analizados o con parámetros como el % de masa grasa, IMC, sensibilidad a la insulina, etc.

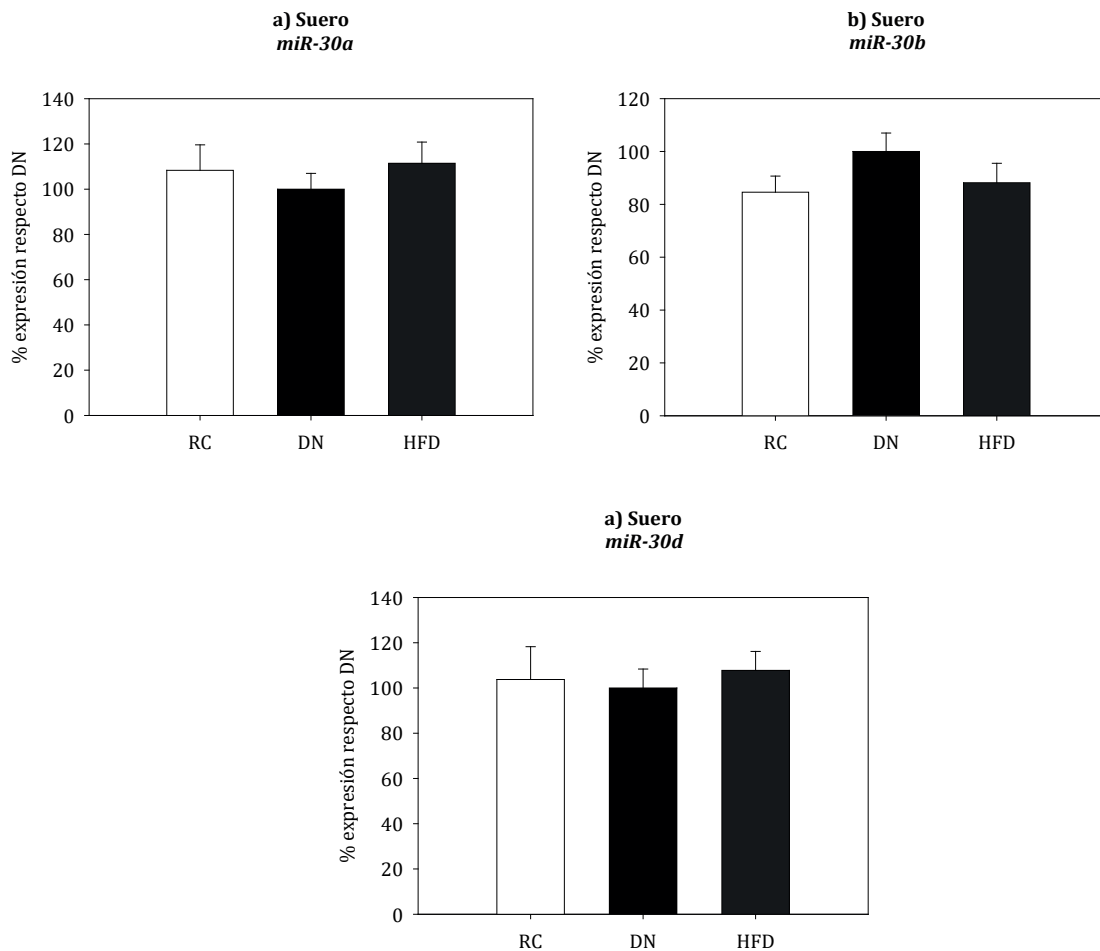


**Figura 59.** Efecto de la *HFD* y *RC* durante 3 meses sobre los niveles de expresión de *miR-24* en suero (a), hígado (b), grasa visceral (c) y grasa epididimal (d). Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde *DN*  $\equiv$  100 %. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas. ANOVA de una vía, test *post hoc* de Tukey, para  $p < 0.05$  se consideraron diferencias estadísticamente significativas. *RC*: restricción calórica, *DN*: dieta normal y *HFD*: dieta alta en grasa.  $N = 9-10$  en todos los grupos. Datos normalizados respecto a *U6*.

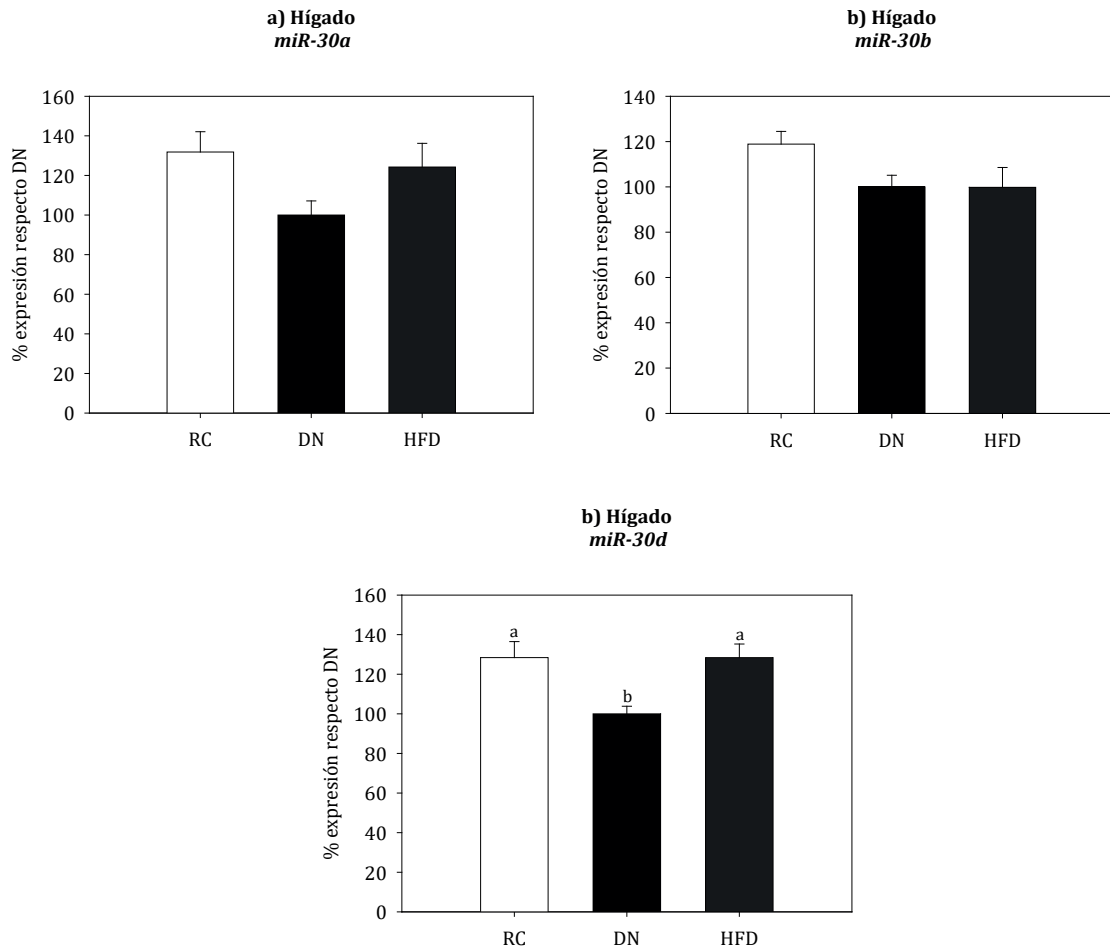
La familia *MIR-30* está compuesta por 5 miembros que en total dan lugar a 6 moléculas de *miRs* maduros (262). Estos *miRs* maduros a pesar de ser similares, pueden tener diferentes ARNm como diana y por tanto pueden regular distintas funciones biológicas (262). En la actualidad se sabe que juegan papeles importantes en el desarrollo de órganos y tejidos así como en la patogénesis de varias enfermedades (262). Cabe mencionar que se ha relacionado a la familia *MIR-30* con la diferenciación de los adipocitos y su expresión aumenta con la diferenciación de los mismos tanto en el tejido adiposo humano como en el de roedores (162, 263), también se ha demostrado que su sobreexpresión promueve la lipogénesis posiblemente a través de *Runx2* (diana de la familia *MIR-30*) (262). Además se ha relacionado a esta familia con la regulación del *BAT*, puesto que la inhibición de *miR-30b* y *miR-30c* induce la inhibición de la expresión de *UCP1* y *Cidea* en adipocitos marrones (264).



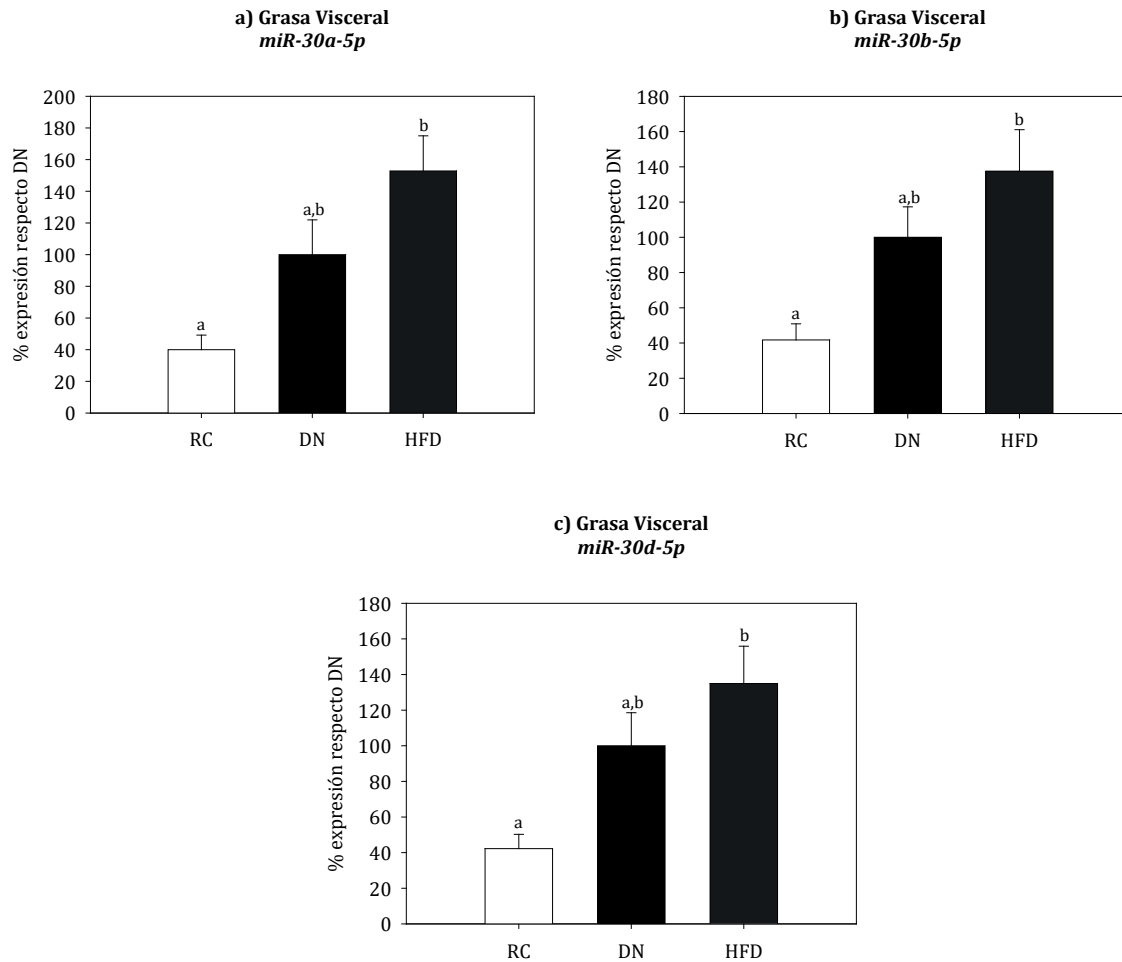
En este estudio analizamos los niveles de expresión de varios miembros de la familia *MIR-30*, *miR-30a-5p*, *miR-30b-5p* y *miR-30d-5p* en suero, hígado, tejido adiposo visceral y tejido adiposo epididimal. Cabe destacar que todos ellos presentan un patrón predominante en el tejido adiposo en comparación con el hígado, especialmente marcado en el caso de *miR-30b*. Para ninguno de los 3 *miRs* se observaron diferencias estadísticamente significativas por el tipo de dieta ni en su expresión en suero ni en el tejido adiposo epididimal (*Figura 60a-c* y *Figura 62a-c* respectivamente). Todos ellos presentaron el mismo patrón de expresión en hígado, tendiendo a aumentar con la RC (*Figura 61a-c*) y en grasa visceral, aumentando su expresión de manera directamente proporcional al porcentaje de masa grasa (*Figura 63a-c*). Nuevamente, el patrón circulante no coincide con ninguno de los observados en los distintos tejidos analizados.



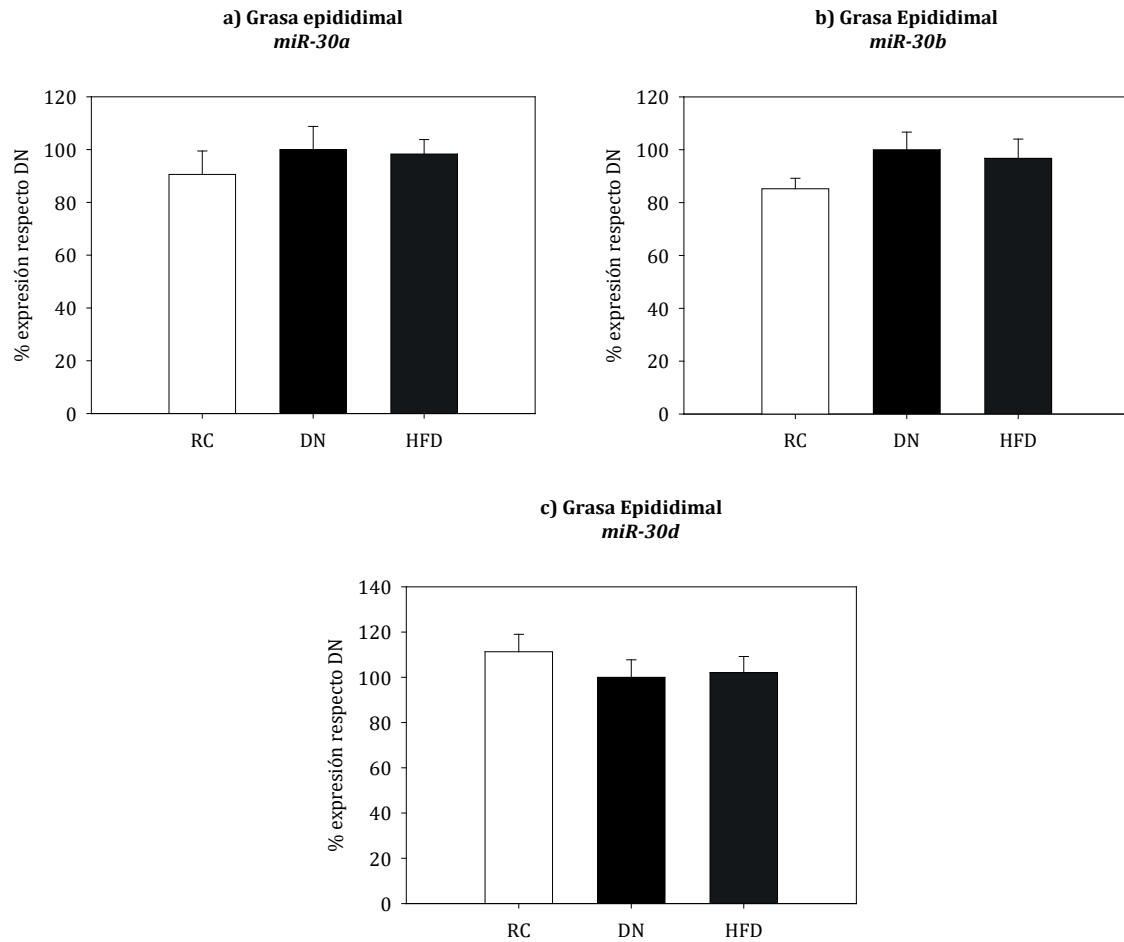
**Figura 60.** Efecto de la *HFD* y *RC* durante 3 meses sobre los niveles de expresión de *miR-30a* (a), *miR-30b* (b) y *miR-30d* (c) en suero. Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde  $DN \equiv 100\%$ . Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas. ANOVA de una vía, test *post hoc* de Tukey, para  $p < 0.05$  se consideraron diferencias estadísticamente significativas. RC: restricción calórica, DN: dieta normal y *HFD*: dieta alta en grasa.  $N = 8-10$  en todos los grupos. Datos normalizados respecto a *U6*.



**Figura 61.** Efecto de la *HFD* y *RC* durante 3 meses sobre los niveles de expresión de *miR-30a* (a), *miR-30b* (b) y *miR-30d* (c) en hígado. Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde DN  $\equiv$  100 %. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas. ANOVA de una vía, test *post hoc* de Tukey, para  $p < 0.05$  se consideraron diferencias estadísticamente significativas. RC: restricción calórica, DN: dieta normal y *HFD*: dieta alta en grasa. N= 8-10 en todos los grupos. Datos normalizados respecto a *U6*.



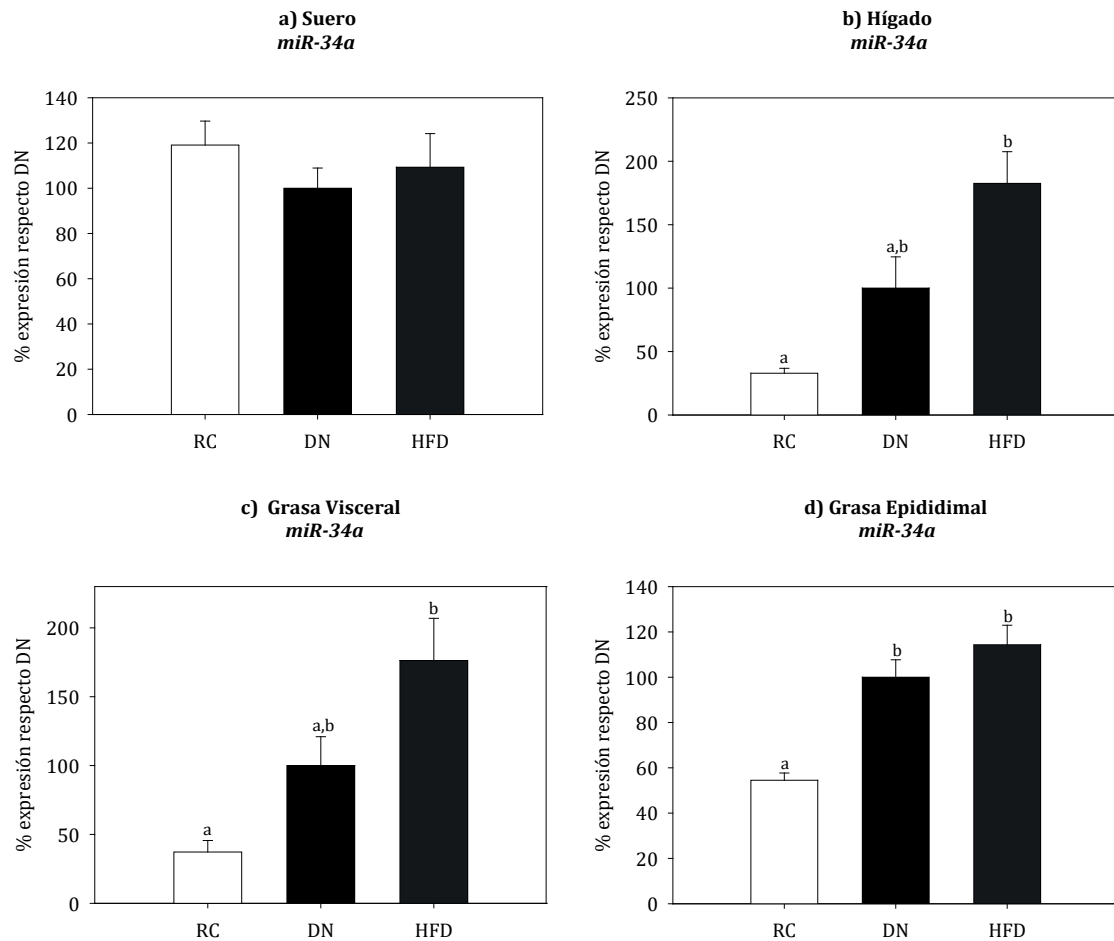
**Figura 62.** Efecto de la *HFD* y *RC* durante 3 meses sobre los niveles de expresión de *miR-30a-5p* (a), *miR-30b-5p* (b) y *miR-30d-5p* (c) en grasa visceral mesentérica. Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde DN  $\equiv$  100 %. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas. ANOVA de una vía, test *post hoc* de Tukey para los análisis paramétricos y de Dunn's para los análisis no paramétricos, para  $p < 0.05$  se consideraron diferencias estadísticamente significativas. RC: restricción calórica, DN: dieta normal y *HFD*: dieta alta en grasa. N=9-10 en todos los grupos. Datos normalizados respecto a *U6*.



**Figura 63.** Efecto de la HFD y RC durante 3 meses sobre los niveles de expresión de *miR-30a* (a), *miR-30b* (b) y *miR-30d* (c) en grasa epididimal. Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias ± el error, donde DN ≡ 100 %. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas. ANOVA de una vía, test *post hoc* de Tukey, para  $p < 0.05$  se consideraron diferencias estadísticamente significativas. RC: restricción calórica, DN: dieta normal y HFD: dieta alta en grasa. N= 9-10 en todos los grupos. Datos normalizados respecto a *U6*.

Aunque para todos los miembros de la familia *MIR-30* se predicen dianas comunes, éstos también podrían ejercer diferentes funciones en los distintos tipos celulares (264), sin embargo, no observamos diferencias destacables entre los patrones de expresión de los *miRs* analizados dentro de cada tejido, siendo muy semejantes en todos los análisis realizados y presentándose las diferencias más marcadas en el tejido adiposo visceral. Como ya se ha mencionado, estudios previos han detectado niveles de expresión elevados en el tejido adiposo omental y subcutáneo de individuos obesos y una correlación positiva de éstos con el porcentaje de masa grasa tal y como hemos observado nosotros en el tejido adiposo visceral, lo que podría ser explicado por el papel descrito para estos *miRs* en la regulación de la adipogénesis (204, 265). Por ello, sería lógico pensar que la desregulación observada de este *miR* durante la obesidad en el tejido adiposo visceral, contribuya a una mayor adipogénesis, agravando la obesidad.

Existen estudios en los que se ha analizado la implicación de *miR-34a* en la regulación del hígado graso no alcohólico y también se han descrito niveles hepáticos elevados para este *miR* en ratones obesos (266). Nosotros observamos que mientras que en el hígado y tejido adiposo visceral y epididimal un claro aumento de su expresión con el porcentaje de masa grasa corporal (Figura 64b y Figura 64d), a nivel circulante, no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 64a).

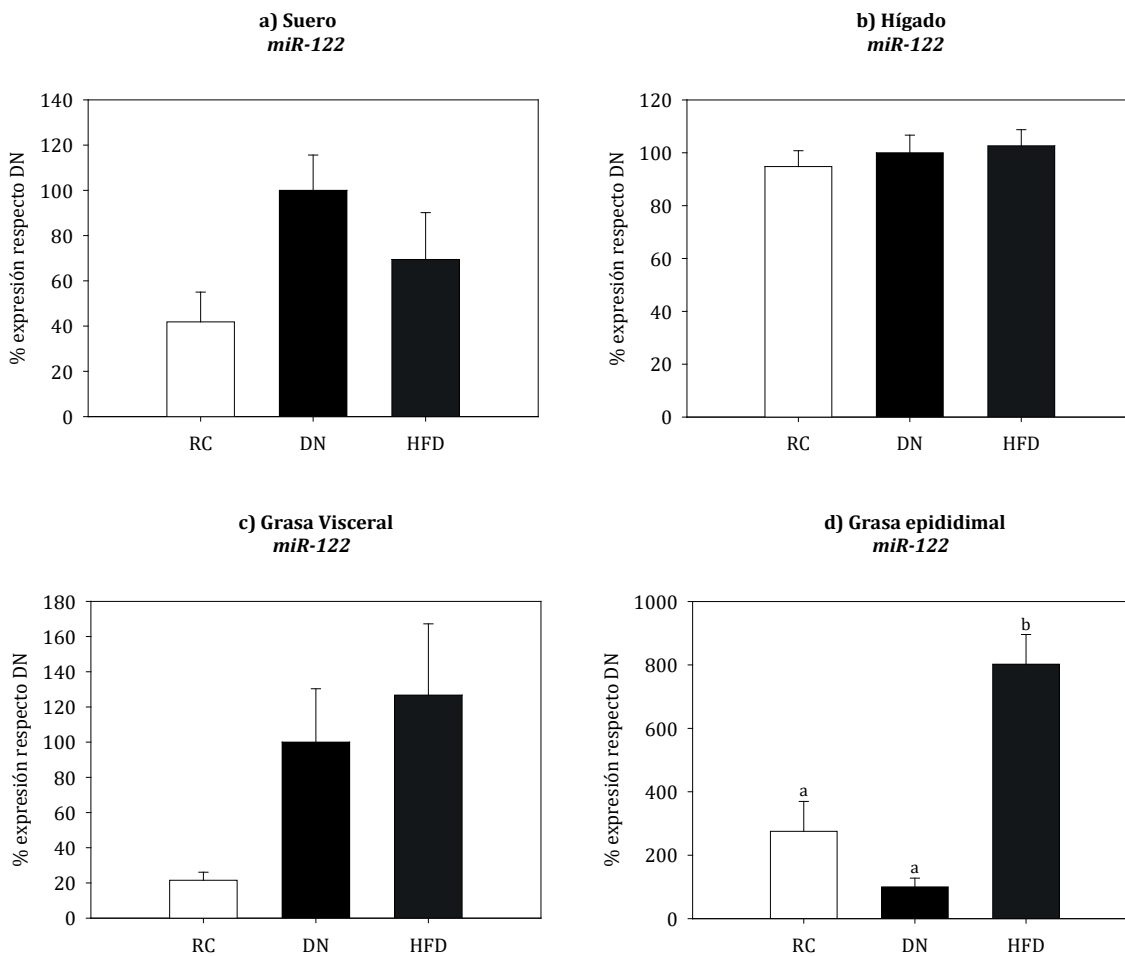


**Figura 64.** Efecto de la *HFD* y *RC* durante 3 meses sobre los niveles de expresión de *miR-34a* en suero (a), hígado (b), grasa visceral (c) y grasa epididimal (d). Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde DN  $\equiv$  100 %. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas. ANOVA de una vía, test *post hoc* de Tukey para los análisis paramétricos y de Dunn's para los análisis no paramétricos, para  $p < 0.05$  se consideraron diferencias estadísticamente significativas. RC: restricción calórica, DN: dieta normal y *HFD*: dieta alta en grasa. N= 9-10 en todos los grupos. Datos normalizados respecto a *U6*.

Estudios recientes demostraron que los niveles de expresión de *miR-34a* circulantes, se asocian con la esteatosis hepática tanto en humanos como en roedores (267, 268), algo que no observamos en nuestro estudio, sin embargo, por el tipo de dieta que nosotros empleamos y la duración de la misma no tenemos la certeza de que sea suficiente para el desarrollo de esta patología, aunque sí para inducir hígado graso no alcohólico (comprobado mediante tinción *Oil Red O* en nuestros animales, *datos no mostrados*), lo que sí parece claro es que a medida que aumenta la obesidad inducida por la dieta, también incrementan los niveles de expresión de este *miR* en los tejidos analizados. Por lo tanto, parece plausible pensar que este *miR* podría ser un marcador de esteatosis a nivel hepático, pero no circulante, proporcionando más evidencias que apoyan la hipótesis planteada previamente de que el aumento de sus niveles de expresión hepática pueden jugar un papel importante en el desarrollo de anomalías metabólicas en este tejido (269). En el tejido adiposo subcutáneo y visceral los niveles que observamos de expresión de *miR-34a* se correlacionan con el IMC/% de masa grasa, algo ya visto previamente tanto en humanos como en roedores (195, 270). Todos estos resultados parecen sugerir que altos niveles de *miR-34a* contribuyen a un aumento de la acumulación de grasa. Hipótesis que se vería apoyada por el hecho de que el silenciamiento de *miR-34a* es capaz de reducir la adiposidad en ratones con obesidad inducida por la dieta y además mejorar la esteatosis hepática (271).

Como ya se ha dicho, *miR-122* es el *miR* más abundante en el hígado humano (272), su expresión está relacionada con el desarrollo del hígado, su diferenciación, homeostasis y funciones metabólicas como la lipogénesis *de novo* y el tráfico lipídico, así como con fibrosis, hepatitis C y tumores entre otras enfermedades (258). En seres humanos es uno de los *miRs* más estudiados, a nivel circulante sus niveles de expresión aumentan durante la obesidad tanto en adultos como en niños y disminuyen tras la cirugía bariátrica, también se ha visto que su expresión en hígado disminuye de forma significativa en presencia de esteatosis hepática, justo el efecto contrario al observado a nivel circulante, donde sus valores aumentan notablemente con esta patología (273). En nuestro estudio nosotros también hemos observado que de los *miRs* analizados, *miR-122* es el que presenta los niveles de expresión más altos en el hígado de ratas (*Figura 56*), siendo además el que presenta los niveles de expresión más altos de todos los tejidos y *miRs* analizados. Sin embargo, las alteraciones en la dieta no provocaron ninguna variación estadísticamente significativa en los niveles de expresión circulantes o hepáticos, aunque sí se observa una ligera disminución con la RC. Creemos que estos resultados son debidos a que la *HFD*, si bien provocó un aumento del porcentaje de masa grasa y un aumento de la acumulación de grasa ectópica en el hígado, no fue suficiente para provocar un daño hepático considerable, y por lo tanto, no fue suficiente para provocar alteraciones estadísticamente significativas en su expresión. Sin embargo

sí detectamos un aumento estadísticamente significativo de su expresión en el depósito de grasa epididimal de las ratas sometidas a *HFD* (Figura 65d) y una tendencia a aumentar en el depósito de grasa visceral directamente relacionado con el porcentaje de masa grasa pero los resultados en este último caso tampoco fueron estadísticamente significativos (Figura 65c). Cabe mencionar que la expresión de este *miR* a nivel del tejido adiposo es muy baja y por tanto podría dificultar ver su reflejo a nivel circulante, mientras que los elevados niveles de expresión de este *miR* en el hígado, podrían ser suficientes para justificar el ligero descenso que observamos con la RC en suero.

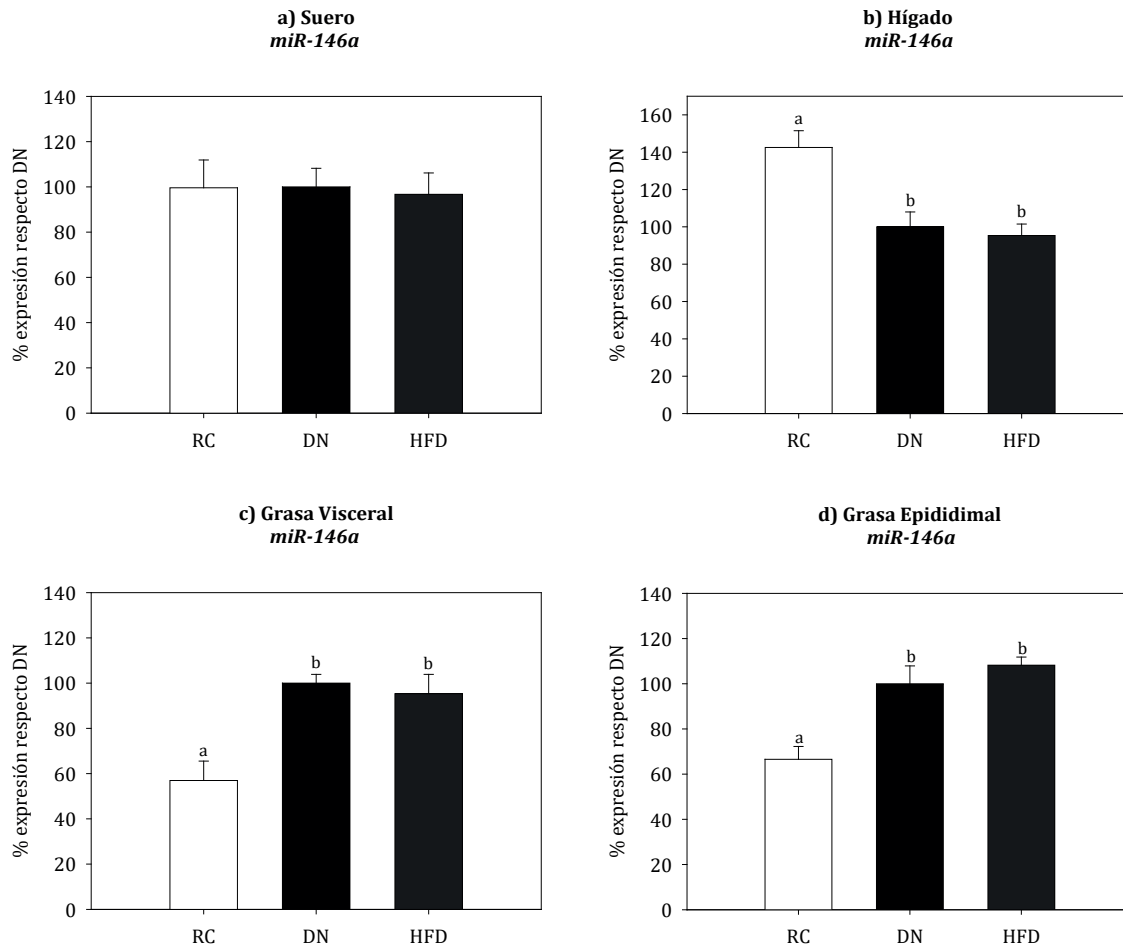


**Figura 65.** Efecto de la *HFD* y *RC* durante 3 meses sobre los niveles de expresión de *miR-122* en suero (a), hígado (b), grasa visceral (c) y grasa epididimal (d). Los valores se expresan como unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde DN  $\equiv$  100 %. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas. ANOVA de una vía, test *post hoc* de Tukey para los análisis paramétricos y de Dunn's para los análisis no paramétricos, para  $p < 0.05$  se consideraron diferencias estadísticamente significativas. RC: restricción calórica, DN: dieta normal y *HFD*: dieta alta en grasa. N= 8-10 en todos los grupos. Datos normalizados respecto a *U6*.

En la actualidad, el conocimiento de las funciones de *miR-146a* en humanos son limitadas, sin embargo, estudios previos en roedores demostraron que una *HFD* aumenta los niveles de expresión de *miR-146a* en tejido adiposo blanco y lleva a cabo un papel importante en

la respuesta inflamatoria mediada por *NF-K $\beta$*  y en la diferenciación de los adipocitos a través de APOE, a pesar de que la función exacta de este *miR* en los adipocitos todavía es desconocida (274-276). Nosotros observamos un aumento en los niveles de expresión de *miR-146a* en hígado (Figura 66b) y un descenso en grasa visceral y epididimal con la RC respecto al grupo control (Figura 66c-d). No detectándose diferencias en suero bajo las condiciones testadas (Figura 66a). Cabe destacar, que a nivel hepático los niveles de expresión de este *miR* descienden en modelos de roedores con esteatohepatitis y fibrosis hepática (277), sin embargo, en nuestro caso, aunque sus niveles de expresión tendieron a descender con el porcentaje de grasa corporal, este descenso no fue tan acusado, puesto que como ya se mencionó anteriormente, en nuestro modelo animal aunque observamos un aumento en la acumulación ectópica de grasa en el hígado, no se llegó a desarrollar esteatosis hepática ni fibrosis grave, lo que nos hace pensar que para observar diferencias más marcadas quizás sea necesario un daño hepático más severo. A nivel circulante, no se observan diferencias estadísticamente significativas, por lo que sus niveles de expresión podrían ser una combinación de la contribución de distintos tejidos.

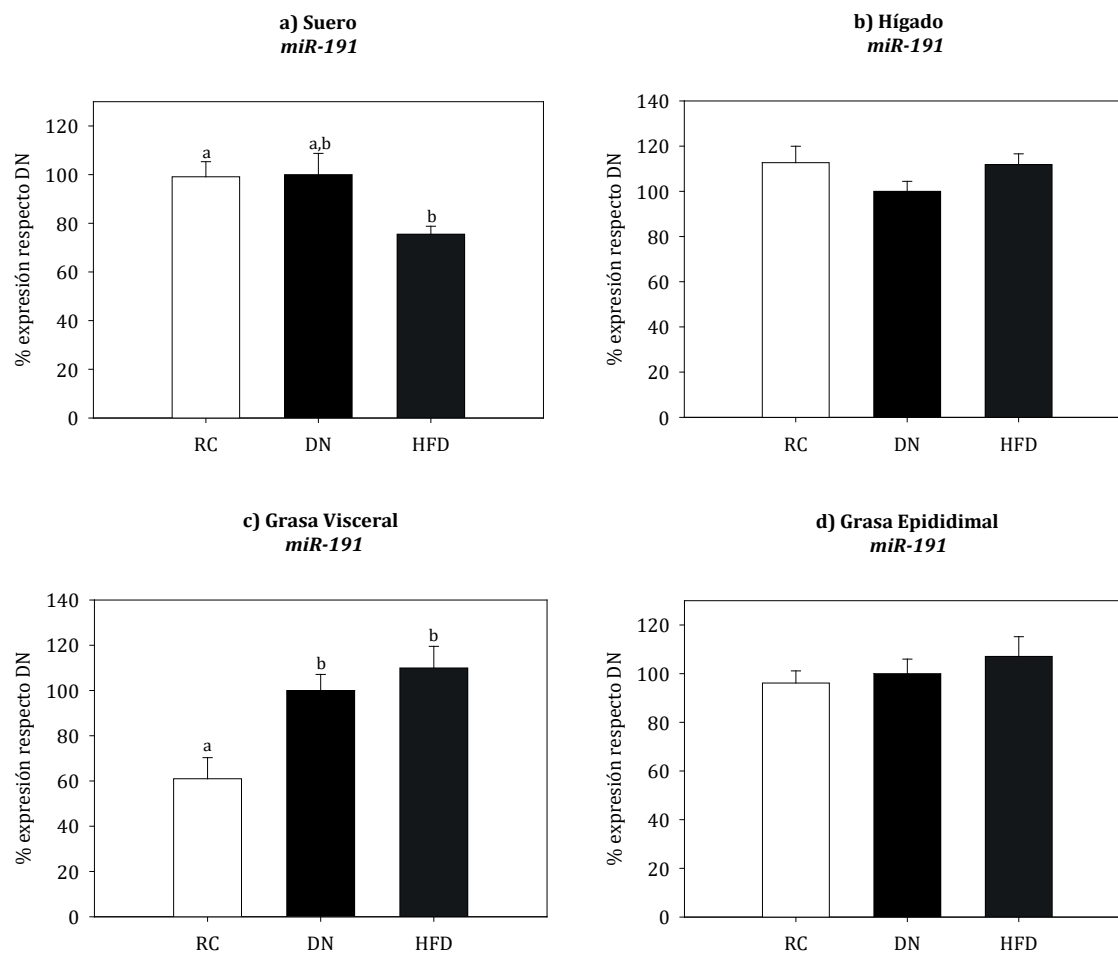




**Figura 66.** Efecto de la *HFD* y *RC* durante 3 meses sobre los niveles de expresión de *miR-146a* en suero (a), hígado (b), grasa visceral (c) y grasa epididimal (d). Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde DN  $\equiv$  100 %. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas. ANOVA de una vía, test *post hoc* de Tukey para los análisis paramétricos y de Dunn's para los análisis no paramétricos, para  $p < 0.05$  se consideraron diferencias estadísticamente significativas. RC: restricción calórica, DN: dieta normal y *HFD*: dieta alta en grasa. N = 8-10 en todos los grupos. Datos normalizados respecto a *U6*.

*MiR-191* es un *miR* que juega un papel importante en el desarrollo de enfermedades y su progresión, en concreto varios estudios indican que sus niveles de expresión se ven alterados en más de 20 tipos distintos de cáncer y en otras enfermedades como la *T2DM* el Alzheimer o la enfermedad de Crohn, sin embargo el impacto funcional de este *miR* en estas enfermedades no se conoce (278). En este estudio observamos que sus niveles de expresión a nivel circulante fueron los más elevados de los *miRs* estudiados, apreciándose un descenso en los animales alimentados con *HFD* (Figura 67a), mientras que en el tejido adiposo visceral detectamos el patrón contrario (Figura 67c). En el hígado y tejido adiposo epididimal no se observaron diferencias estadísticamente significativas bajo las dietas testadas (Figura 67b y Figura 67d). Zampetaki *et al.*, han identificado varios *miRs* cuyos niveles de expresión descienden a nivel circulante en personas diabéticas respecto a los pacientes no diabéticos,

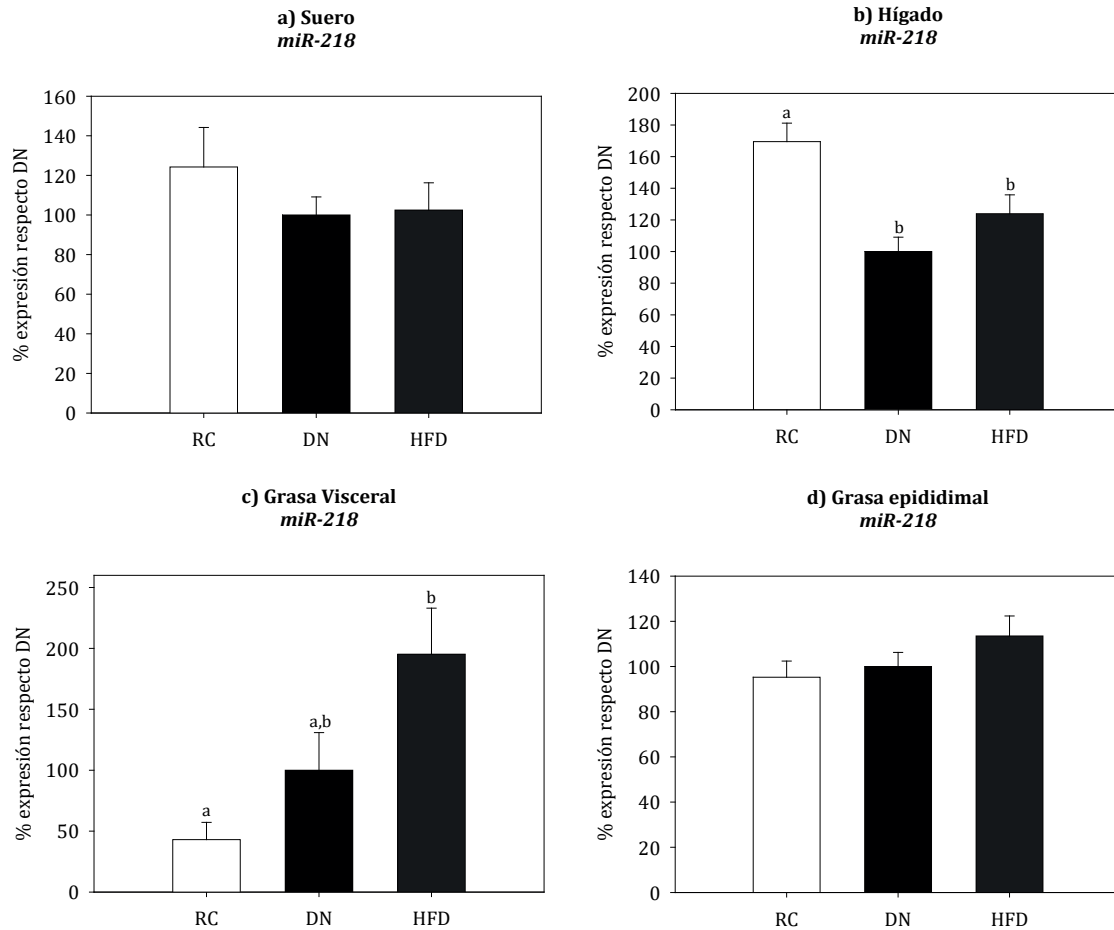
entre ellos *miR-191* (134), en nuestro caso, los niveles de expresión de *miR-191* circulantes tienen a disminuir con el aumento del porcentaje de masa grasa y por tanto, con el descenso de la sensibilidad a la insulina, lo que concordaría con los resultados mencionados en estudios previos. Cabe resaltar que los datos existentes para este *miR* en la actualidad siguen siendo escasos y en concreto, en el tejido adiposo son prácticamente inexistentes.



**Figura 67.** Efecto de la HFD y RC durante 3 meses sobre los niveles de expresión de *miR-191* en suero (a), hígado (b), grasa visceral (c) y grasa epididimal (d). Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde DN  $\equiv$  100%. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas. ANOVA de una vía, test *post hoc* de Tukey para los análisis paramétricos y de Dunn's para los análisis no paramétricos, para  $p < 0.05$  se consideraron diferencias estadísticamente significativas. RC: restricción calórica, DN: dieta normal y HFD: dieta alta en grasa. N= 8-10 en todos los grupos. Datos normalizados respecto a U6.

*MiR-218* fue uno de los *miRs* predichos anteriormente mediante el empleo de las herramientas bioinformáticas, y además el receptor de la adiponectina 2 y *SOCS3* son algunas de las potenciales diana del mismo. Los niveles de expresión de *miR-218* detectados tanto a nivel circulante como en hígado y tejido adiposo visceral y epididimal fueron muy bajos respecto a los otros *miRs* que estudiamos, aunque fueron perfectamente detectables. Observamos

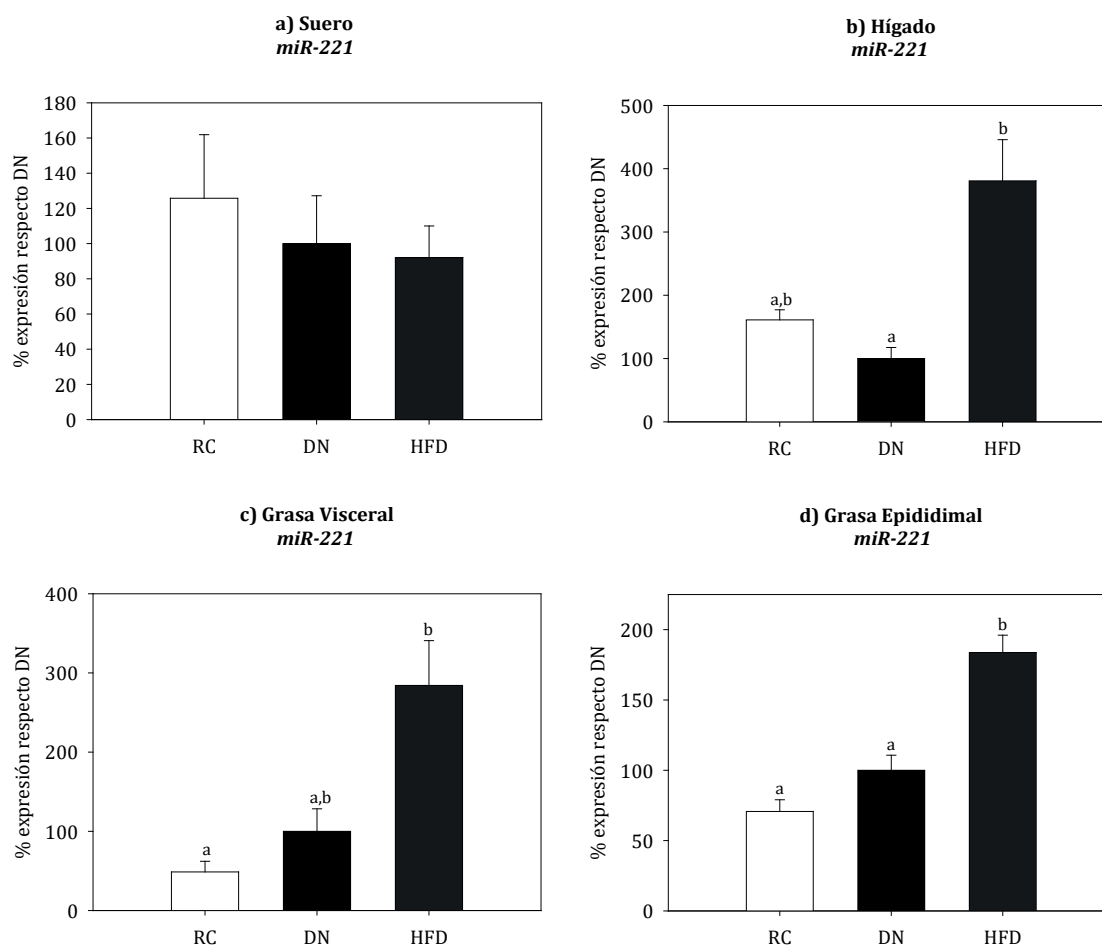
un aumento de su expresión en el hígado con la RC y la misma tendencia en suero, pero sin llegarse a detectar diferencias estadísticamente significativas (Figura 68b y Figura 68a respectivamente). Mientras que en el tejido adiposo visceral encontramos el patrón contrario (una tendencia a aumentar con el porcentaje de masa grasa) (Figura 68c). No se observaron diferencias en el tejido adiposo epididimal (Figura 68d).



**Figura 68.** Efecto de la HFD y RC durante 3 meses sobre los niveles de expresión de *miR-218* en suero (a), hígado (b), grasa visceral (c) y grasa epididimal (d). Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde DN  $\equiv$  100 %. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas. ANOVA de una vía, test *post hoc* de Tukey, para  $p < 0.05$  se consideraron diferencias estadísticamente significativas. RC: restricción calórica, DN: dieta normal y HFD: dieta alta en grasa. N= 9-10 en todos los grupos. Datos normalizados respecto a *U6*.

Se sabe que la obesidad presenta un estadio inflamatorio crónico de bajo grado y que una de sus repercusiones es favorecer el desarrollo de la resistencia a la insulina (279). Estudios previos *in vitro* con adipocitos del tejido adiposo subcutáneo humano, sugirieron que las citoquinas proinflamatorias son capaces de inducir la regulación negativa de la expresión de *miR-221* aumentando los niveles de expresión de dianas como la fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN) y el gen de la proteína C-ets-1 (*ETS-1*), el cual promueve la inflamación del tejido adiposo (280).

En nuestro estudio, los niveles de expresión de *miR-221* en hígado y tejido adiposo epididimal (*Figura 69b* y *Figura 69d* respectivamente), presentaron la misma tendencia que en el tejido adiposo visceral (*Figura 69c*). Mientras que a nivel circulante, no se observaron diferencias en los distintos grupos analizados (*Figura 69a*), lo que parece indicar que a sus niveles de expresión podrían contribuir más otros tejidos no analizados en este estudio.



**Figura 69.** Efecto de la *HFD* y *RC* durante 3 meses sobre los niveles de expresión de *miR-221* en suero (a), hígado (b), grasa visceral (c) y grasa epididimal (d). Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias ± el error, donde DN ≡ 100%. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas. ANOVA de una vía, test *post hoc* de Tukey para los análisis paramétricos y de Dunn's para los análisis no paramétricos, para  $p < 0.05$  se consideraron diferencias estadísticamente significativas. RC: restricción calórica, DN: dieta normal y *HFD*: dieta alta en grasa. N= 8-10 en todos los grupos. Datos normalizados respecto a *U6*.

Todos estos resultados nos sugieren que con frecuencia existe una correlación positiva entre los niveles de expresión de los *miRs* que se expresan en tejido adiposo visceral y el porcentaje de masa grasa, no observándose este patrón a nivel circulante, donde o bien no se observaron cambios con la *HFD*, o incluso disminuyeron los niveles de expresión tal y como ocurrió con *miR-191*. Estos resultados sugieren que el tejido adiposo no es la principal fuente de *miRs* circulantes, no al menos durante el estadio de obesidad. Sin embargo, Thomou *et*

*al.*, afirmaron que el tejido adiposo es la mayor fuente de *miRs* contenidos en exosomas circulantes (130), si bien, en nuestro estudio analizamos *miRs* totales y no exclusivamente los contenidos en exosomas. Por lo tanto, no podemos descartar que para usar *miRs* circulantes como biomarcadores de la obesidad y/o comorbilidades asociadas, tengamos que diferenciar entre los distintos “compartimentos” que conforman el total de los *miRs* circulantes: aquellos que están en exosomas o microvesículas, los que circulan libres o los que están unidos a proteínas (especialmente a Ago2).

En este trabajo queda patente que la *HFD* ejerce un efecto más acusado (o más temprano) en el tejido adiposo visceral mesentérico que en el epididimal, evidenciado por la existencia de diferencias más marcadas en la expresión de la mayoría de los *miRs* analizados. Queda por comprobar si con dietas con mayores contenidos grasos y/o de mayor duración, el tejido adiposo epididimal presentaría el mismo tipo de cambios que el tejido adiposo visceral o si por el contrario presentan patrones de expresión diferentes.

A nivel hepático hemos demostrado que el aumento del porcentaje de masa grasa no produce grandes cambios en los *miRs* estudiados, únicamente en *miR-34a* observamos un aumento de su expresión de manera directamente proporcional al porcentaje de masa grasa corporal. En hígado, el cambio más común entre los *miRs* estudiados fue el aumento de sus niveles de expresión con la RC, tal y como observamos para *miR-24*, *miR-30d*, *miR-146a*, *miR-218* y *miR-221* e incluso para *miR-30d* y *miR-221* observamos un aumento en sus niveles de expresión tanto con la RC como con la *HFD*. Se sabe que durante la RC crónica, el organismo sufre adaptaciones que implican un descenso del gasto energético, cambios en las mitocondrias que mejoran la eficiencia energética (281) y cambios en los tipos de sustratos usados como fuente energética (282). A medida que la restricción calórica se prolonga en el tiempo, la obtención de la energía se lleva a cabo mayoritariamente a partir de la oxidación de los ácidos grasos (282), algo que también ocurre durante la alimentación con *HFD* (283). Nosotros hipotetizamos que los cambios de expresión en algunos de los *miRs* hepáticos podrían estar mostrando el cambio que se produce en el uso de sustratos energéticos como combustible, el cambio de glucosa a ácidos grasos mencionado.

## 5.2 Diferencias en el proteoma de grasa subcutánea humana durante los estadios de obesidad mórbida y tras la pérdida de peso.

Según la bibliografía existente, podemos afirmar que la obesidad está asociada con el síndrome metabólico y la resistencia a insulina, proponiéndose al tejido adiposo visceral como aquel que posee una correlación más fuerte con estos problemas, frente al tejido adi-

poso subcutáneo al que incluso se le otorgó un papel protector (284). En síndromes lipodistróficos, la ausencia de grasa subcutánea da lugar a la acumulación de grasa ectópica en el músculo e hígado y resistencia a insulina, evidencia que se usó para apoyar la hipótesis de que el tejido adiposo subcutáneo ejerce un papel beneficioso (285). Sin embargo, también existen estudios que sugieren que grandes volúmenes de tejido adiposo subcutáneo podrían asociarse con un mayor riesgo cardiometabólico y de desarrollo de resistencia a insulina (285, 286).

A pesar de todo esto, la contribución del tejido adiposo subcutáneo a las comorbilidades de la obesidad aún no está completamente esclarecida, por ello nos propusimos avanzar en este campo con distintos experimentos llevados a cabo en pacientes con obesidad mórbida e IMC normal (controles).

La alteración de la estructura, función, expresión e interacción entre proteínas, es en parte uno de los mecanismos que contribuyen al desarrollo de muchas enfermedades, entre ellas la obesidad (287). Hasta la actualidad varias investigaciones se han centrado en la realización de estudios metabolómicos para avanzar en las estrategias que existen para la pérdida de peso, sin embargo a nivel proteómico estos estudios son más escasos y se basan principalmente en la comparación del perfil proteómico del tejido adiposo subcutáneo vs. el visceral, en comparar el perfil proteómico entre los distintos depósitos de grasa abdominal o analizar y comparar el perfil proteómico del tejido adiposo entre individuos diabéticos vs. no diabéticos con IMC normal por unos autores y en pacientes con obesidad mórbida por otros (288, 289). En cuanto a estudios basados en los cambios proteómicos asociados a la pérdida de peso, éstos han sido llevados a cabo principalmente a nivel circulante y no en tejidos (290).

Para ampliar el conocimiento sobre la implicación del tejido adiposo subcutáneo en la obesidad decidimos realizar un análisis proteómico comparativo, tanto cualitativo como cuantitativo empleando muestras de tejido adiposo subcutáneo de 4 pacientes con obesidad mórbida recogidas durante operaciones de cirugía bariátrica y muestras de tejido adiposo subcutáneo de los mismos pacientes tras la pérdida de peso inducida por la misma y que fueron recogidas durante operaciones de cirugía plástica reconstructiva (abdominoplastia), 2-3 años después. Hasta donde nosotros sabemos, este es el primer estudio en el que se analiza el proteoma de grasa subcutánea de los mismos pacientes antes y después de la pérdida de peso mediante cirugía bariátrica. A continuación se resumen las características clínicas de cada paciente (*Tabla 29*):

	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4
Género	Mujer	Mujer	Mujer	Hombre
Edad (años)	45	31	58	45
Peso inicial (kg)	123 kg	130,4 kg	105,8 kg	196 kg
IMC	48,65	44,59	39,82	66,25
% masa grasa inicial	53 %	51,4 %	51,7 %	47,2 %
Diabetes	No	No	<i>T2DM</i>	No
Medicación para la diabetes pre-bariátrica	No	No	Metformina	No
Tipo cirugía bariátrica	Gastrectomía tubular	Gastrectomía tubular	<i>Bypass gástrico</i>	Gastrectomía tubular
Peso (kg) perdido	57,5 kg	47,7 kg	28,0 kg	107,1 kg
% masa grasa perdida	20 %	19,0 %	12,4 %	35,8 %
Medicación para la diabetes post-bariátrica	No	No	No	No
Tiempo entre ambas cirugías	27 meses	33 meses	24 meses	22 meses

**Tabla 29.** Características clínicas de los pacientes.

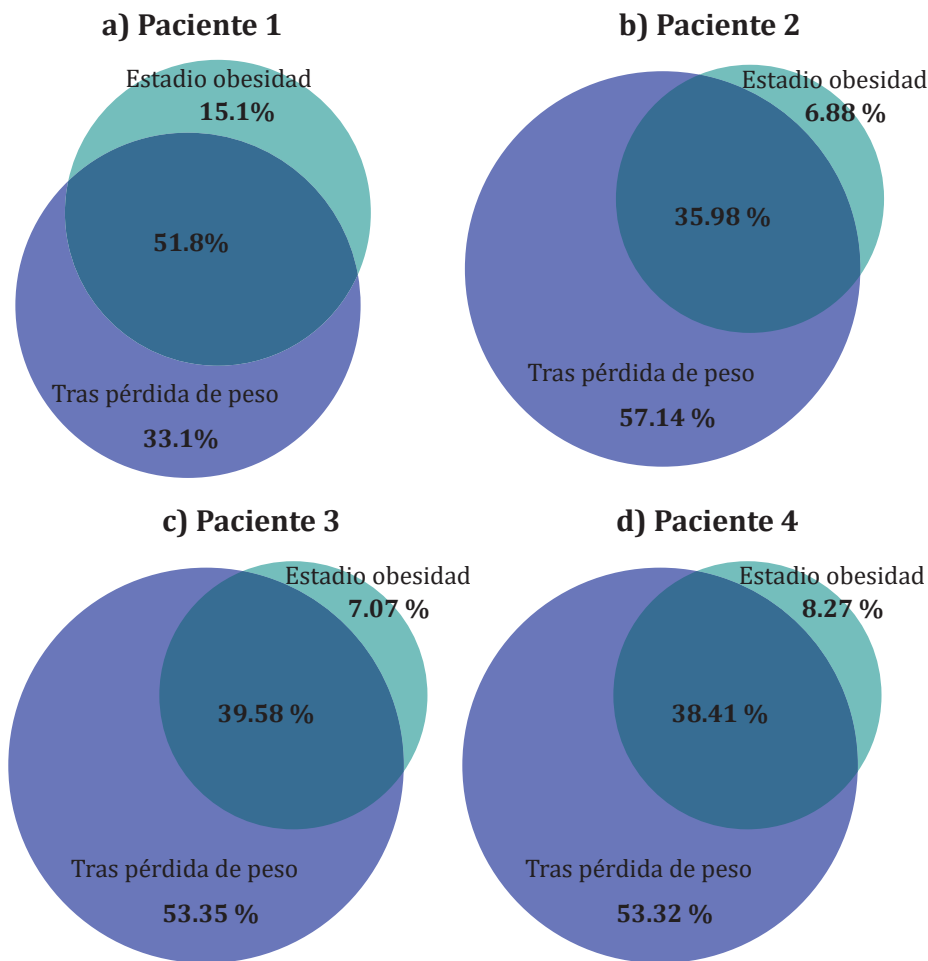
Tal y como se describe en la *Tabla 29* los pacientes que se sometieron a cirugía bariátrica, sufrieron, como era de esperar, una disminución del peso corporal y en concreto del porcentaje de masa grasa, alcanzando la normalización y estabilización del mismo aproximadamente 2 años después de la primera cirugía, todo ello acompañado de una remisión de la *T2DM* en aquella paciente que la padecía.

### 5.2.1 Perfil proteómico del tejido adiposo subcutáneo durante la obesidad mórbida y tras la pérdida de peso: Diferencias cualitativas.

Derivado de los cambios anatómicos y por tanto fisiológicos y metabólicos surgidos tras la cirugía bariátrica, decidimos en primer lugar comparar el perfil proteómico del tejido adiposo subcutáneo en pacientes con obesidad mórbida y los mismos pacientes tras la pérdida de peso para comprobar si también existían cambios a este nivel.

Con una *FDR* del 1 % para todos los análisis, en el paciente 1 se identificaron 722 proteínas, 109 de ellas (el 15,1 %) sólo se expresaron durante el estadio de obesidad mórbida, 239 (el 33,1 %) se expresaron exclusivamente tras la pérdida de peso y 374 (el 51,8 %) se expresaron en ambos estadios tal y como se esquematiza en la *Figura 70a*. En el paciente 2, se detectaron 942 proteínas, de las cuales 65 (el 6,88 %) solo se expresaron durante el estadio de obesidad mórbida, 540 (el 57,14 %) solo se expresaron tras bajar de peso y 340 (el 35,98 %) se expresaron en ambos estadios (ver *Figura 70b*). En el paciente 3, se detectaron un total de 1046 proteínas, 74 de ellas (el 7,07 %) solo se expresaron durante el estadio de obesidad mórbida, 558 (el 53,35 %) tras bajar de peso y 414 (el 39,58 %) durante ambos estadios (ver *Figura 70c*). Mientras que de las 919 proteínas detectadas en el paciente 4, 76 (el 8,27 %) solo se expresaron durante el estadio de obesidad mórbida, 490 (el 53,32 %) tras bajar de peso y 353 (el 38,41 %) se expresaron durante ambos estadios (ver *Figura 70d*).

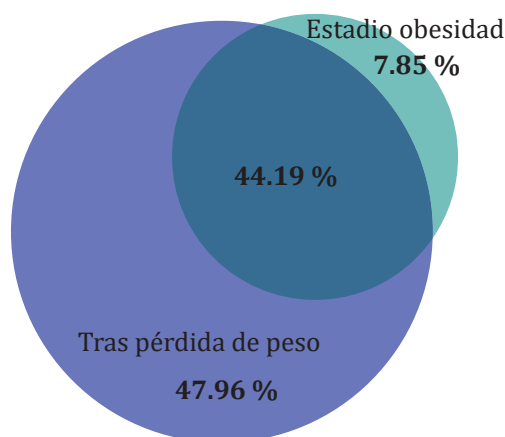




**Figura 70. Diagramas de Venn del análisis cualitativo proteómico del tejido adiposo subcutáneo antes y después de la cirugía bariátrica.** Se representa el porcentaje de proteínas que se han identificado en cada uno de los pacientes estudiados de modo exclusivo durante la obesidad, y tras la pérdida significativa de peso así como el porcentaje de las que se expresan en ambos estadios.

De las 1351 proteínas totales identificadas en el conjunto de los 4 pacientes antes y tras la pérdida de peso (detalladas en el *Anexo 5*), únicamente 106 de ellas (el 7,85 %) se expresaron solo en los pacientes durante el estadio de obesidad mórbida, mientras que 684 (el 47,96 %) se expresaron solo tras la bajada de peso; en cambio, 597 (el 44,19 %) de las proteínas se expresaron tanto durante el estadio de obesidad mórbida como tras la bajada de peso (*Figura 71*). Todos estos resultados en conjunto nos demuestran que durante el estadio de obesidad mórbida, se expresa un menor número de proteínas con respecto al estadio en el que ya habían perdido peso y por tanto, existen diferencias muy claras en el perfil proteómico del mismo individuo durante la obesidad y tras la normalización del peso corporal y/o el porcentaje de masa grasa. Mardinoglu *et al.* (291) integraron los datos transcriptómicos y proteómicos de grasa subcutánea de pacientes obesos frente a delgados y Abu-Farha *et al.* (292), llevaron a cabo un análisis proteómico comparativo del tejido adiposo subcutá-

neo de pacientes obesos con el de pacientes obesos tras la pérdida de peso inducida por un programa de ejercicio. En ambos estudios detectaron diferencias en el perfil proteómico entre ambos estadios, destacando la identificación de un mayor número de proteínas en el tejido adiposo subcutáneo durante el estadio de pérdida de peso, tal y como identificamos en nuestro estudio, y éstas estaban implicadas en un amplio rango de funciones celulares relacionadas con el metabolismo, regulación de procesos biológicos, respuesta a estímulos, transporte, organización celular y biogénesis celular (291, 292). Sin embargo, a diferencia de los estudios mencionados, en nuestro trabajo hemos analizado el mismo paciente antes y después de la pérdida de peso inducida por la cirugía bariátrica a largo plazo, lo que aporta robustez a nuestro estudio.



**Figura 71. Diagrama de Venn del análisis cualitativo proteómico del tejido adiposo subcutáneo antes y después de la cirugía bariátrica.** Se representa el porcentaje de identificadas de modo exclusivo durante la obesidad, de modo exclusivo tras la pérdida significativa de peso, así como el porcentaje de las que se expresan en ambos estadios. Estos datos representan el conjunto total de los 4 pacientes analizados. N= 4.

Para centrarnos más en detalle en qué tipo de proteínas se expresan de forma común durante el estadio de obesidad y tras la pérdida de peso, realizamos un análisis de las rutas en las que están implicadas empleando la herramienta *String* y pudimos comprobar que destacaron sobre todo proteínas implicadas en procesos biológicos como la hemostasia, respuesta a estrés, coagulación de la sangre o activación de las plaquetas entre otros (todos ellos con *FDRs* inferiores a  $1,15E-16$ ).

Tras la realización de un análisis empleando la misma herramienta se detallan a continuación algunas de las rutas principales (no todas ellas) con una menor *FDR* en las que están implicadas las proteínas que se expresan de forma exclusiva durante la obesidad y de forma exclusiva tras la pérdida de peso (*Tabla 30*):

Obesidad		Tras la pérdida de peso	
Proceso biológico	FDR	Proceso biológico	FDR
Degradación de las plaquetas	0,000957	Procesos metabólicos de pequeñas moléculas	3,38E-24
Deslizamiento de los filamentos musculares	0,000957	Procesos de oxidación-reducción	4,86E-14
Procesos del sistema inmune	0,00113	Procesos catabólicos	4,85E-10
Respuestas de defensa	0,00138	Procesos del metabolismo de los lípidos	2,08E-09
Activación de las plaquetas	0,00138	Procesos metabólicos de los ácidos grasos	2,59E-09
Cicatrización de heridas	0,00323	Cadena de transporte de electrones	3,33E-08
Respuesta al estrés	0,00541	Respiración celular	1,79E-06
Coagulación de la sangre	0,00542	Oxidación de los ácidos grasos	3E-06
Regulación de la actividad peptidasa	0,011	Respuesta al estrés	5,84E-06
Regulación negativa de la actividad peptidasa	0,013	$\beta$ -oxidación de los ácidos grasos	2,71E-05
Procesos basados en filamentos de actina	0,013	Respuesta del sistema inmune innato	4,29E-05
Respuesta inmune	0,0167	Activación del sistema inmune	0,000194
Activación de integrinas	0,0167	Procesos metabólicos	0,00693

**Tabla 30.** Procesos biológicos con una menor *FDR* en los que están implicadas las proteínas que se expresan de forma exclusiva en el estadio de obesidad y tras la pérdida de peso. Datos analizados empleando la herramienta *String* (293).

También se analizaron los componentes celulares empleando la misma herramienta; se detallan en la *Tabla 31* los 10 con una *FDR* más baja para cada uno de los estadios (obesidad y tras la pérdida de peso) y en el *Anexo 6* el mapa de componentes de forma esquemática para cada uno de los estadios:

Obesidad		Tras la pérdida de peso	
Componente celular	FDR	Componente celular	FDR
Espacio extracelular	0,0001	Exosomas extracelulares	5,43E-62
Lumen de los gránulos alfa de las plaquetas	0,0001	Vesículas limitadas por membrana	1,41e-55
Vesículas limitadas por membrana	0,0001	Región extracelular	3,34E-41
Exosomas extracelulares	0,0001	Partes citoplasmáticas	1,2E-18
Gránulos alfa de las plaquetas	0,0002	Citosol	1,25e-17
Complejo miosina del músculo	0,0003	Citoplasma	7,88E-12
Partes de la región extracelular	0,0004	Orgánulos limitados por membrana	1,73E-11
Región extracelular	0,0006	Mitocondrias	1,27E-10
Gránulos de secreción	0,0047	Adhesiones focales	5,13E-10
Complejo fibrinógeno	0,0049	Orgánulos	2,14E-08

**Tabla 31.** Componentes celulares con una menor *FDR* en los que se expresan las proteínas de forma exclusiva en el estadio de obesidad y de forma exclusiva tras la pérdida de peso. Datos analizados empleando la herramienta *String* (293).

También se analizaron las funciones moleculares en las que están implicadas las proteínas que se expresaban exclusivamente durante el estadio de obesidad y exclusivamente tras la pérdida de peso; se detallan a continuación todas las funciones detectadas por la herramienta *String* para el estadio de obesidad y las 10 con una *FDR* más baja para el estadio tras la pérdida de peso (Tabla 32), también en el Anexo 6 se esquematizan los mapas de funciones para ambos estadios:

Obesidad		Tras la pérdida de peso	
Función molecular	FDR	Función molecular	FDR
Unión de integrinas	0,0144	Actividad catalítica	3,68E-09
Regulador de la actividad peptidasa	0,0152	Actividad óxido-reductasa	2,12E-07
Inhibidor de la actividad endopeptidasa	0,0416	Unión de coenzimas	2,12E-07
Unión de la heparina	0,0416	Actividad CoA carboxilasa	1,53E-06
Complejos de unión a proteínas	0,0416	Unión de aniones	1,53E-06
		Unión de moléculas pequeñas	1,59E-06
		Unión de cofactores	2,44E-06
		Unión de nucleótidos	4,07E-06
		Actividad biotina carboxilasa	4,34E-05
		Unión de compuestos sulfuro	8,29E-05

**Tabla 32.** Funciones moleculares con una menor *FDR* en las que están implicadas las proteínas que se expresan de forma exclusiva en el estadio de obesidad y de forma exclusiva tras la pérdida de peso. Datos analizados empleando la herramienta *String* (293).

Estos resultados nos sugieren que durante el estadio de obesidad mórbida se expresa un menor número de proteínas en el tejido adiposo subcutáneo y por tanto, la variedad de funciones en las que están implicadas es menor; tras la pérdida de masa grasa, aumenta el número de proteínas que se expresan, estando además implicadas en una mayor variedad de funciones biológicas. En cuanto a los componentes celulares en los que se expresan también hemos observado diferencias, por un lado, durante el estadio de obesidad las proteínas detectadas se localizaron principalmente en diferentes regiones de las plaquetas y regiones extracelulares y por otro, tras la pérdida de peso, la localización de las mismas fue más heterogénea, localizándose además de en los componentes citados durante el estadio de obesidad, en regiones citoplasmáticas, orgánulos y exosomas extracelulares con una menor *FDR* que en el estadio de obesidad.

### 5.2.2 Perfil proteómico del tejido adiposo subcutáneo durante la obesidad mórbida y tras la pérdida de peso: Diferencias cuantitativas.

La importancia del estudio comparativo del proteoma del tejido adiposo subcutáneo durante el estadio de obesidad y tras la pérdida de peso, no radica únicamente en la identificación de cuántas proteínas se expresan en ambos estadios, qué tipo de proteínas se expresan durante cada uno de ellos y qué funciones realizan, sino si existen además diferencias en la expresión de aquellas proteínas que se expresan tanto durante la obesidad como tras la bajada de peso, por ellos nos planteamos realizar un análisis cuantitativo del perfil proteómico del tejido adiposo subcutáneo de pacientes obesos y los mismos pacientes tras la pérdida de peso. Del total de proteínas analizadas en este apartado, los niveles de expresión de 224 de ellas aumentaron de forma estadísticamente significativa tras la bajada de peso respecto al estadio de obesidad, y los niveles de expresión de 131 disminuyeron de forma estadísticamente significativa tras la pérdida de peso, detalladas todas ellas en el *Anexo 7* de este manuscrito junto con su p-valor correspondiente.

Tal y como se realizó para los datos de proteómica cualitativa, se analizaron los procesos biológicos, las funciones y los componentes biológicos en los que se expresan principalmente las proteínas cuyos niveles de expresión descendieron con la pérdida de peso y para aquellas cuyos niveles de expresión aumentaron con la misma.

En la *Tabla 33*, se detallan los procesos biológicos principales en los que están implicadas las proteínas cuyos niveles de expresión descienden con la pérdida de peso. De entre los más de 500 procesos biológicos detectados mediante la herramienta *String*, se muestran los 20 con una *FDR* más baja:

Proceso biológico	FDR
Degradación de las plaquetas	4,55E-11
Respuesta al estrés	4,55E-11
Regulación de la proteólisis	1,28E-10
Procesos del sistema inmune	3,38E-10
Respuestas de defensa	4,39E-09
Respuestas inmunes	4,39E-09
Regulación positiva de respuesta a estímulos	6,26E-09

Proceso biológico	FDR
Respuestas a sustancias inorgánicas	1,2E-08
Regulación positiva de procesos del sistema inmune	1,21E-08
Regulación negativa de funciones moleculares	2,4E-08
Respuesta inmune innata	2,59E-08
Regulación de funciones moleculares	2,59E-08
Procesos metabólicos de moléculas pequeñas	2,6E-08
Regulación de la respuesta a estímulos externos	2,77E-08
Regulación negativa de proteínas de procesos metabólicos	2,77E-08
Regulación de la respuesta a estrés	5,24E-08
Regulación negativa de la actividad catalítica	5,26E-08
Regulación de procesos del sistema inmune	7,72E-08
Procesos catabólicos	1,05E-07
Regulación del metabolismo celular de aminoácidos	1,19E-07

**Tabla 33. Procesos biológicos con una menor FDR en los que están implicadas las proteínas cuya expresión desciende con la pérdida de peso.** Datos analizados empleando la herramienta *String* (293).

En la *Tabla 34*, se detallan los componentes celulares principales en los que se expresaron las proteínas cuyos niveles de expresión descendieron con la pérdida de peso. De entre los más de 70 componentes detectados mediante la herramienta *String*, se muestran los 20 con una FDR más baja:

Componentes celulares	FDR
Exosomas extracelulares	3,77E-53
Vesículas rodeadas de membrana	2,92E-45
Partes de las regiones extracelulares	4,99E-44
Regiones extracelulares	1,39E-38

Componentes celulares	FDR
Micropartículas de la sangre	1,05E-30
Espacio extracelular	8,64E-18
Vesículas del lumen rodeadas de membrana	1,86E-14
Citosol	4,74E-12
Gránulos de secreción	3,25E-11
Vesículas rodeadas de membrana citoplasmática	9,7E-11
Complejo fibrinógeno	1,51E-10
Gránulos alfa de las plaquetas	3,58E-10
Partes citoplasmáticas	4,13E-10
Lumen de los gránulos de secreción	1,23E-09
Vesículas citoplasmáticas	3,54E-09
Citoplasma	7,05E-07
Complejo del núcleo del proteasoma	7,8E-07
Partes de vesículas citoplasmáticas	1,1E-06
Citoesqueleto de actina	1,22E-06
Orgánulos rodeados de membrana	1,37E-06

**Tabla 34.** Componentes celulares con una menor *FDR* en los que se expresan las proteínas cuyos niveles de expresión descienden tras la pérdida de peso. Datos analizados empleando la herramienta *String* (293).

En la *Tabla 35*, se detallan las funciones principales en las que están implicadas las proteínas cuyos niveles de expresión descendieron con la pérdida de peso. De entre las más de 50 funciones detectadas mediante la herramienta *String*, se muestran las 20 con una *FDR* más baja:



Funciones	FDR
Unión de proteínas	1,47E-08
Actividad antioxidante	1,77E-08
Unión de compuestos sulfuro	5,14E-07
Constitución estructural del citoesqueleto	5,26E-07
Actividad treonina tipo endopeptidasa	1,32E-06
Actividad estructural de moléculas	5,72E-06
Unión de heparina	1,25E-05
Unión de glucosaminoglucanos	1,44E-05
Actividad endopeptidasa	9,59E-05
Unión	0,000101
Actividad reguladora peptidasa	0,000144
Actividad inhibidora endopeptidasa	0,000214
Actividad peptidasa	0,000224
Unión de complejos proteicos	0,000224
Unión de aniones	0,000252
Unión de derivados de carbohidratos	0,000312
Actividad oxidoreductasa	0,0005
Unión de iones	0,000672
Unión de cofactores	0,000792
Unión de proteasas	0,0023

**Tabla 35.** Funciones con una menor *FDR* en las que están implicadas las proteínas cuyos niveles de expresión descienden tras la pérdida de peso. Datos analizados empleando la herramienta *String* (293).

Tal y como podemos concluir con los datos aportados en la *Tabla 33*, *Tabla 34* y *Tabla 35*, las proteínas cuyos niveles de expresión descienden en el tejido adiposo subcutáneo tras la

pérdida de peso, están implicadas principalmente en las vías del sistema inmune, respuesta al estrés y procesos inflamatorios (294). Como ya se ha descrito en la introducción, la obesidad se caracteriza por un estado bajo de inflamación crónica en el que se cree que pueden estar involucrados muchos de los mecanismos responsables de los efectos perjudiciales de la ganancia de peso, y se ha comprobado que el incremento de la expansión de la masa grasa causa un incremento de la inflamación del tejido adiposo, que se manifiesta en alteraciones en las poblaciones celulares del sistema inmune del tejido adiposo, así como en un incremento de la expresión de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias, lo que contribuye a la inflamación sistémica y al desarrollo de resistencia a insulina (294). Por otro lado, también se ha descrito que tanto el exceso de nutrientes como la expansión de los adipocitos desencadena estrés del RE, contribuyendo a la inflamación, a la resistencia a la insulina y a la resistencia a la leptina (295), y además la hipoxia que ocurre en el tejido adiposo hipertrofiado estimula tanto la expresión de genes inflamatorios como la activación de células del sistema inmune (296). Es lógico pensar por lo tanto que tras la pérdida de peso y descenso de la masa grasa, disminuya la inflamación, la respuesta al estrés, y todo ello mejore el perfil metabólico, lo que concuerda con los resultados aquí presentados, tanto en el tipo de proteínas modificadas como en la mejora de la sensibilidad a la insulina, lo que queda patente tras observar valores normales de glucosa en ayunas en estos pacientes sin necesidad de tomar medicamentos anti-diabéticos.

Si nos centramos de forma concreta en las proteínas cuya expresión desciende más con la pérdida de peso, cabe destacar la proteína Talina 2 (TLN2), cuya expresión desciende drásticamente (casi un 90 %), así como SPTA1 (80 %), ambas proteínas citoesqueléticas, que están relacionadas con la formación de vínculos entre la matriz extracelular y los filamentos de actina. En la actualidad, los estudios que relacionan los niveles de expresión de estas proteínas con el porcentaje de masa grasa son escasos, sin embargo, mediante espectrometría de masas se ha detectado un aumento de los niveles de expresión de TLN2 en el tejido adiposo de ratones sometidos a HFD (297). Se sabe que durante la obesidad, se produce un remodelado de la matriz extracelular, dando lugar a procesos como la fibrosis del tejido adiposo (366). Por lo tanto no podemos descartar que los cambios observados en estas proteínas sean un reflejo de este proceso. Cabe destacar el alto número de proteínas cuyos niveles de expresión descendieron con la pérdida de peso que están relacionadas con las plaquetas (por ejemplo implicadas en la activación de las plaquetas o agregación de las plaquetas entre otros) tales como ITGA2B, THBS1 y PPBP, todas ellas alcanzando un descenso superior al 80 % respecto al estadio de obesidad. Durante el estadio de obesidad, diferentes autores han descrito varias funciones alteradas de las plaquetas (que podrían explicar la tendencia a la trombosis que existe en la obesidad), entre las que se incluyen su hiperactivación, su sensibilidad a agonistas fisiológicos e incluso han demostrado que el estrés oxidativo y el bajo grado de inflamación que define la obesidad están directamente relacionados con su activación, lo

que nos hace pensar que un descenso del peso corporal derivará en un descenso de la inflamación y estrés oxidativo y por tanto se esperaría que disminuyera la hiperactivación de las mismas (298, 299). También varias proteínas de la familia S100A, como S100A4, S100A8 o S100A9, mostraron un descenso acusado en sus niveles de expresión tras la pérdida de peso (aproximadamente 33, un 80 y un 70 % respectivamente). Se ha descrito que estas proteínas de unión al calcio presentan niveles de expresión elevados en el citosol de neutrófilos y monocitos durante condiciones inflamatorias, y se ha propuesto un papel proinflamatorio para ellas (300), cabe destacar que durante la respuesta inflamatoria, los neutrófilos migran desde la sangre hacia tejidos donde se involucran en la defensa inmune (301, 302), detectándose también su expresión en el WAT de humanos, ratones y en adipocitos diferenciados de la línea celular 3T3-L1 (300). Los niveles de expresión proteica de DEFA3, también descendieron considerablemente tras la cirugía bariátrica (aproximadamente un 85 %), esta proteína es muy abundante en los neutrófilos aunque en la actualidad se sabe que también se expresa en otros tejidos. Resultados similares fueron obtenidos en estudios previos donde observaron un descenso para esta proteína tanto a nivel génico como proteico, en sangre circulante y en tejido adiposo subcutáneo tras la pérdida de peso inducida por cirugía bariátrica (303). Tal y como explican en otros estudios, este descenso en los niveles de expresión de las defensinas, podría estar relacionado con los niveles de triglicéridos en plasma, esteatosis hepática e inflamación, quienes mejoran tras la pérdida de peso (304). Otra proteína cuyo nivel de expresión disminuyó considerablemente tras la pérdida de peso, fue el transportador de glucosa GLUT1, cuya expresión descendió aproximadamente un 80 % respecto al estadio de obesidad mórbida. Esta proteína se expresa en células distribuidas por todo el cuerpo y es responsable del mantenimiento de la tasa de captación de glucosa basal. El hecho de que los niveles de expresión sean inferiores tras la pérdida de peso, podría estar relacionado con una mejora de la sensibilidad a la insulina tal y como han descrito de forma similar autores como Yin et al. (305). Otros estudios también han demostrado que la exposición a niveles de glucosa elevados, impulsa la inflamación de los adipocitos y la infiltración de macrófagos, estos macrófagos que exhiben un perfil proinflamatorio interfieren con la sensibilidad a la insulina y perpetúan la inflamación inducida por la obesidad, en este proceso, podría estar implicado GLUT1 mediante la captación de glucosa y el metabolismo de la misma a través de la vía de las pentosas fosfato ya que se ha visto que la respuesta proinflamatoria produce un aumento de los niveles de expresión de GLUT1, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la hexoquinasa y la captación de glucosa (306).

En la *Tabla 36* se detallan los procesos biológicos principales detectados mediante la herramienta *String*, en los que están implicadas las proteínas cuyos niveles de expresión aumentan con la pérdida de peso, al igual que antes sólo se muestran los 20 con una *FDR* más baja:

Proceso biológico	FDR
Procesos de oxidación-reducción	1,26E-28
Generación de precursores de metabolitos y energía	5,41E-21
Energía derivada de la oxidación de compuestos orgánicos	1,06E-20
Procesos metabólicos de moléculas pequeñas	8,72E-18
Respiración celular	3,33E-12
Procesos metabólicos de los monosacáridos	2,1E-10
Procesos metabólicos de la glucosa	2,1E-10
Procesos metabólicos de los triglicéridos	2,16E-10
Procesos de biosíntesis de compuestos de sulfuro	4,47E-10
Procesos de biosíntesis de monosacáridos	6,21E-10
Procesos metabólicos de los carbohidratos	1,92E-09
Procesos metabólicos de los ácidos monocarboxílicos	1,92E-09
Procesos catabólicos	2,75E-09
Procesos catabólicos de sustancias orgánicas	2,85E-09
Procesos metabólicos del acilglicerol	3,97E-09
Ciclo de los ácidos tricarboxílicos	5,22E-09
Procesos catabólicos de los triglicéridos	9,04E-09
Procesos metabólicos de cofactores	9,04E-09
Procesos de biosíntesis de acil-CoA	9,04E-09
Gluconeogénesis	1,32E-08

**Tabla 36. Procesos biológicos con una menor FDR en los que están implicadas las proteínas cuya expresión aumenta con la pérdida de peso.** Datos analizados empleando la herramienta *String* (293).

En la *Tabla 37* se detallan los componentes celulares principales, en los que se expresaban las proteínas cuyos niveles de expresión descendieron con la pérdida de peso, detectados mediante la herramienta *String*, mostrándose también los 20 con una FDR más baja:

Componentes celulares	FDR
Exosomas extracelulares	1,07E-86
Partes de la región extracelular	6,17E-75
Vesículas rodeadas de membrana	1,48E-73
Región extracelular	6,59E-64
Citosol	3,15E-20
Vaina de mielina	3,34E-20
Mitocondrias	2,29E-19
Melanosoma	9,65E-17
Adhesiones focales	1,83E-16
Partes citoplasmáticas	2,46E-16
Partes mitocondriales	1,89E-15
Espacio extracelular	6,49E-14
Orgánulos rodeados de membrana	2,74E-10
Matriz mitocondrial	2,75E-10
Partes intracelulares de orgánulos	1,38E-09
Matriz extracelular	2,27E-09
Micropartículas de la sangre	6,68E-09
Membrana interna mitocondrial	7,04E-09
Membrana incluida en el lumen	1,32E-08
Lumen de orgánulos	1,64E-08

**Tabla 37. Componentes celulares con una menor FDR en los que se expresan las proteínas cuyos niveles de expresión aumentan tras la pérdida de peso.** Datos analizados empleando la herramienta *String* (293).

En la *Tabla 38* se detallan las funciones principales en las que estaban implicadas las proteínas cuyos niveles de expresión descendieron con la pérdida de peso. De entre las más de 50 funciones detectadas mediante la herramienta *String*, se muestran las 20 con una FDR más baja:

Funciones	FDR
Unión de aniones	1,53E-09
Actividad catalítica	2,33E-09
Actividad oxidoreductasa	2,33E-09
Unión de proteínas	6,25E-09
Actividad de transporte de electrones	3,18E-08
Unión de moléculas pequeñas	4,04E-08
Unión de enzimas	2,34E-07
Actividad antioxidante	7,98E-07
Unión de derivados de carbohidratos	7,98E-07
Unión de iones	1,68E-06
Actividad GTPasa	1,99E-05
Unión de GTP	2,11E-05
Unión de nucleótidos	5,19E-05
Unión de ARN	6,54E-05
Unión de proteínas quinasa	7,42E-05
Uniones quinasa	7,97E-05
Unión de compuestos sulfuro	0,000261
Uniones lipídicas	0,000264
Unión del colesterol	0,00037
Unión de complejos proteicos	0,00037

**Tabla 38.** Funciones con una menor *FDR* en las que están implicadas las proteínas cuyos niveles de expresión aumentan tras la pérdida de peso. Datos analizados empleando la herramienta *String* (293).

Con respecto a las proteínas cuyos niveles de expresión aumentaron de forma estadísticamente significativa con la pérdida de peso estaban implicadas principalmente en vías metabólicas, entre ellas el metabolismo de los triglicéridos, integración del metabolismo energético, regulación de la señalización de insulina, la cadena de transporte de electrones y la formación de *ATP* tal y como se puede concluir de la información aportada en la *Tabla 36*, *Tabla 37* y *Tabla 38*.

Como ya se ha mencionado, durante la obesidad aumentan procesos como la lipogénesis sin embargo, en estadios más avanzados como durante la obesidad mórbida, el tejido adiposo subcutáneo excede la lipogénesis *de novo* y deja de tener capacidad para almacenar más ácidos grasos, lo que conlleva al almacenamiento de grasa ectópica (307). El aumento de varias vías metabólicas, como el metabolismo de los triglicéridos observado en nuestro estudio tras la pérdida de peso, pueden ser debidos a la movilización nuevamente de los ácidos grasos y triglicéridos (por una recuperación de la capacidad de almacenamiento de reservas) y mejora del perfil lipídico (308). La obesidad causa con frecuencia resistencia a insulina y ello conlleva a un aumento del riesgo de padecer diabetes, sin embargo con la cirugía bariátrica además de inducirse la pérdida de peso también se mejoran desórdenes metabólicos como la resistencia a la insulina y la *T2DM* gracias al incremento de la sensibilidad a la misma, aunque cómo mejora el control glucémico tras esta cirugía no está todavía del todo claro (309). En este estudio hemos detectado un aumento en la expresión de proteínas implicadas en la señalización de la insulina lo que contribuirían a la mejora en la sensibilidad de la misma (309, 310). El análisis cuantitativo del perfil proteómico del tejido adiposo subcutáneo de pacientes obesos y los mismos pacientes tras la pérdida de peso también nos permitió comprobar un aumento de los niveles de expresión de proteínas implicadas en la cadena de transporte de electrones y la formación de *ATP*. Hasta donde sabemos en la actualidad, la obesidad afecta al metabolismo mitocondrial favoreciendo la producción de especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo, conduciendo además a la acumulación del *ATP* y disminución de la fosforilación oxidativa liberando electrones y radicales libres pudiendo dañar los tejidos y las células, desencadenando inflamación, aumento de la expresión de adipoquinas proinflamatorias y aumento de la infiltración de macrófagos (311). Un descenso del IMC, y en concreto de la masa grasa tras la cirugía bariátrica, presumiblemente mejora estos procesos y por tanto, además de disminuir el estrés oxidativo como ya se ha descrito, hipotetizamos que restauraría, al menos en parte, la cadena de transporte de electrones y a su vez la producción de *ATP*, lo que podría explicar el aumento de los niveles de expresión de proteínas implicadas en estos procesos.

Respecto a las proteínas que aumentaron con la pérdida de peso, vamos a hacer un breve repaso por aquellas que presentan los mayores cambios. Cabe destacar el aumento de hasta 9 veces en los niveles de expresión de FAS, enzima limitante de la lipogénesis *de novo*, respecto al estadio de obesidad mórbida, siendo la proteína que presentó mayores diferencias de expresión entre ambos estadios. Creemos que este aumento está relacionado con la recuperación de la capacidad de acumular grasa en el tejido adiposo tras la pérdida de peso, tal y como se ha mencionado anteriormente (312). La proteína con el menor p-valor, de aquellas que aumentaron su expresión tras la pérdida de peso, fue ADH1B, implicada en varias vías

metabólicas. Estudios previos, han propuesto que el gen que codifica para esta proteína podría ser un posible candidato de la regulación génica de la obesidad y la resistencia a la insulina y se ha descrito que sus niveles de expresión génica y proteica así como los de ADH1A, de la misma familia, analizados en tejido adiposo subcutáneo se correlacionan inversamente con el IMC y niveles de insulina en plasma en ayunas lo que apoyaría nuestros resultados, pues observamos una mayor expresión de ADH1B cuando los pacientes disminuyen su IMC (313). Aunque se expresa en varios tejidos, los mayores niveles de expresión se encuentran en el tejido adiposo seguido por el hígado, sin embargo no está esclarecido el porqué de su expresión en grasa así como la función en este tejido y su relación con la obesidad y resistencia a insulina (313), aunque queda claro que se encuentra desregulada negativamente durante la obesidad. Otra de las proteínas con un menor p-valor y cuyos niveles de expresión aumentaron con la pérdida de peso fue APOA, proteína implicada en el transporte de colesterol de los tejidos al hígado y que puede de forma sinérgica regular la adipogénesis y el metabolismo lipídico, nuestros resultados fueron similares a los descrito por otros autores, quienes detectaron un descenso de sus niveles de expresión en pacientes obesos mórbidos respecto a individuos delgados (314).

Es importante mencionar que desconocemos si la presencia de muchas de las proteínas analizadas es originaria de la sangre periférica presente en las muestras y no del propio tejido adiposo en sí, puesto que fueron recogidas por el equipo de cirugía y congeladas de forma inmediata hasta su uso sin ningún lavado ni tratamiento previo. Con respecto a esto es importante decir que la cirugía bariátrica es una cirugía “limpia” puesto que se lleva a cabo mediante laparoscopia y el sangrado es bajo, sin embargo, durante la cirugía plástica el sangrado suele ser mayor.

Las diferencias observadas en la expresión proteica entre ambos estadios pueden contribuir a la comprensión de los mecanismos moleculares responsables de las diferencias metabólicas entre individuos obesos y no obesos, así como la pronta restauración de la sensibilidad a la insulina tras la cirugía bariátrica. Aunque parezca reducido el número de pacientes empleados en este estudio, cabe indicar que la mayoría de estudios clínicos en los que se realizan análisis proteómicos están realizados en un número menor de pacientes tal y como se puede comprobar en ellos (315-318). A pesar de emplear un número bajo de muestras, el análisis proteómico realizado es una técnica robusta. Con los resultados aquí mostrados, pudimos constatar una mejoría en procesos inflamatorios, de estrés oxidativo e incluso de sensibilidad a la insulina tras la pérdida de peso inducida por la cirugía bariátrica, pero no podemos afirmar si parte de los resultados obtenidos son debidos a otros factores como las variaciones en los niveles de hormonas gastrointestinales y no a la propia pérdida de peso, ni tampoco podemos afirmar si los beneficios de la pérdida de peso sobre el proteoma y

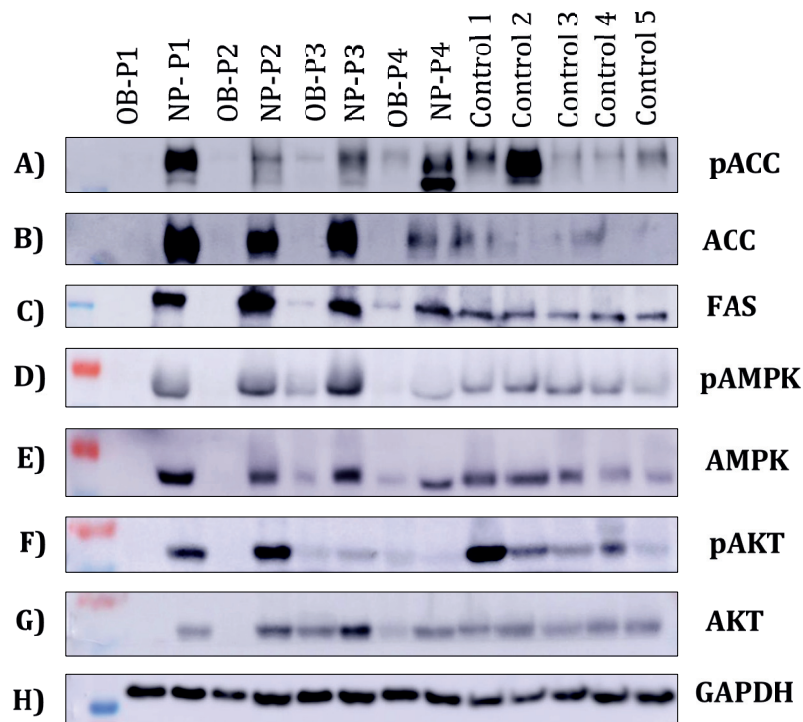


sobre el metabolismo llegan a restaurar completamente el perfil de una persona que nunca fue obesa, o si simplemente mejora, ya que en este análisis no se han incluido pacientes con un IMC y porcentaje de masa grasa normal que nunca hayan sido obesos. Para intentar esclarecer esta última cuestión, nos hemos planteado validar estos resultados mediante Western blot y qPCR empleando además muestras de pacientes sanos, no obesos como grupo control.

### 5.2.3 Análisis de la expresión proteica mediante *Western blot*

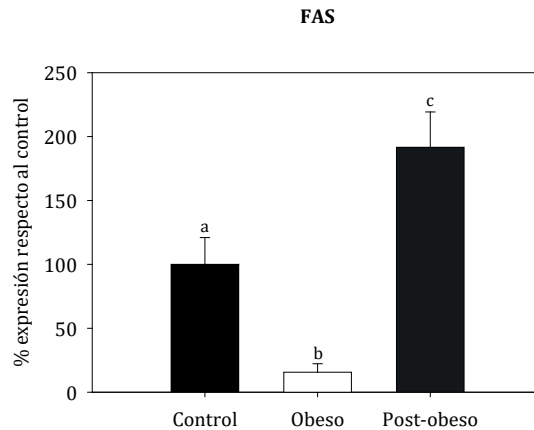
Un factor importante para determinar la salud metabólica de una persona es la capacidad de su tejido adiposo subcutáneo para almacenar el exceso de grasa, en lugar de permitir que se acumule en depósitos ectópicos, como el hígado (enfermedad del hígado graso no alcohólico), los músculos, el corazón, o incluso el epicardio/pericardio, depósitos todos ellos que promueven las complicaciones metabólicas de la obesidad. La capacidad de reclutar y diferenciar células precursoras en células adiposas (adipogénesis) en el tejido adiposo subcutáneo está bajo regulación genética y se ha observado que se encuentra reducida en individuos de alto riesgo que tienen familiares de primer grado con *T2DM* (319). La desregulación de las vías de señalización que controlan estos procesos se asocia con un deterioro de la adipogénesis y una capacidad reducida para responder a la necesidad de almacenar el exceso de lípidos en el tejido adiposo subcutáneo. Esto conduce a células adiposas hipertróficas, disfuncionales y resistentes a la insulina con un contenido reducido de *GLUT4*, el principal transportador de glucosa regulado por la insulina, que a su vez reduce la captación de glucosa en el tejido adiposo y la ruta de la lipogénesis *de novo* (319).

Tal y como se ha observado en el estudio de proteómica, la proteína que presentó un mayor aumento tras la pérdida de peso fue FAS, por ello decidimos validar estos resultados tanto por *qPCR* como por *Western blot*. Decidimos incorporar al estudio además de pacientes obesos antes y tras la pérdida de peso, pacientes controles (en normopeso) de edades similares para comprobar si las alteraciones producidas durante la obesidad desaparecen una vez que se normaliza el peso corporal. Además del estudio de FAS decidimos analizar en este apartado otras proteínas implicadas en la lipogénesis *de novo* así como en la señalización de la insulina (*Figura 72*).



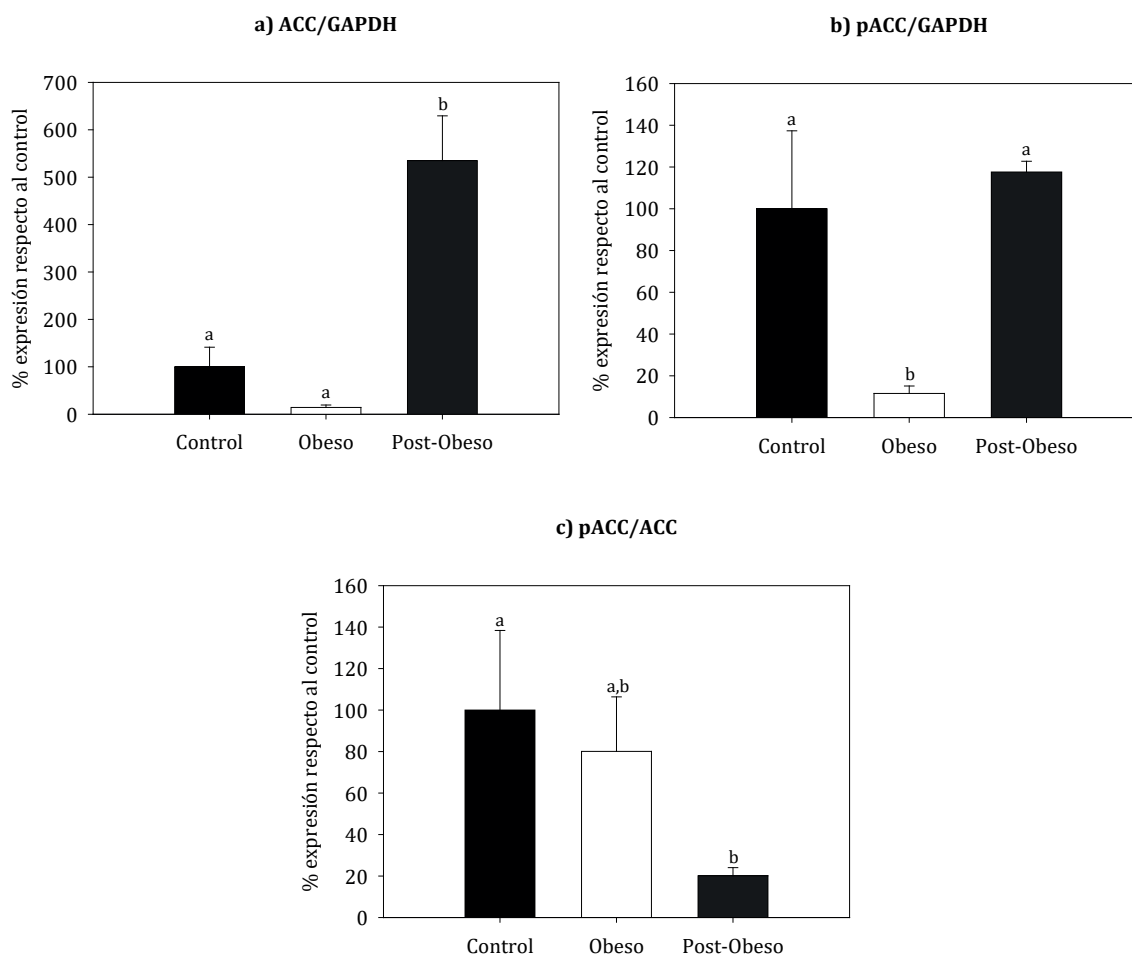
**Figura 72. Western blot de muestras de tejido adiposo subcutáneo humano.** Se cargaron muestras de 4 pacientes en el estado de obesidad (OB), los mismos pacientes tras la pérdida de peso tras la cirugía bariátrica (NP) y 5 muestras de pacientes control. P (paciente).

Como puede verse tanto en la *Figura 72c* como en la *Figura 73* los niveles de expresión proteica de FAS aumentaron de manera estadísticamente significativa tras la pérdida de peso, corroborando los resultados descritos previamente en los análisis de espectrometría de masas. Además en este caso pudimos ver que tras la pérdida de peso, los pacientes obesos no sólo recuperaron los valores de pacientes controles, sino que incluso los llegan a superar, demostrando una capacidad lipogénica superior.



**Figura 73. Niveles de expresión proteica relativa de FAS en pacientes control, obesos y obesos tras la normalización del peso.** Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde el control  $\equiv$  100 % y el resto de datos están referidos a ese valor. Los valores de expresión de FAS están corregidos por los niveles de expresión de GAPDH. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas. ANOVA de una vía, test *post hoc* de Tukey, para  $p < 0.05$  se consideraron diferencias estadísticamente significativas. N=4-5 en todos los grupos.

También se analizaron los niveles de expresión de la proteína ACC total así como exclusivamente su forma fosforilada, pACC. Tanto los niveles de expresión de ACC como de pACC aumentaron de forma estadísticamente significativa tras la pérdida de peso (*Figura 72a-b* *Figura 74a-b*). Y se detectó además una disminución en la proporción de pACC respecto a ACC tras la pérdida de peso tal y como se puede visualizar en la *Figura 74c*, lo que nos indica que la cantidad de proteína fosforilada (inactiva) respecto a la proteína total fue menor, resultados que apuntan a que la pérdida de peso en los pacientes que padecían obesidad mórbida mejoró notablemente la lipogénesis *de novo* y por lo tanto el perfil metabólico del tejido adiposo subcutáneo.

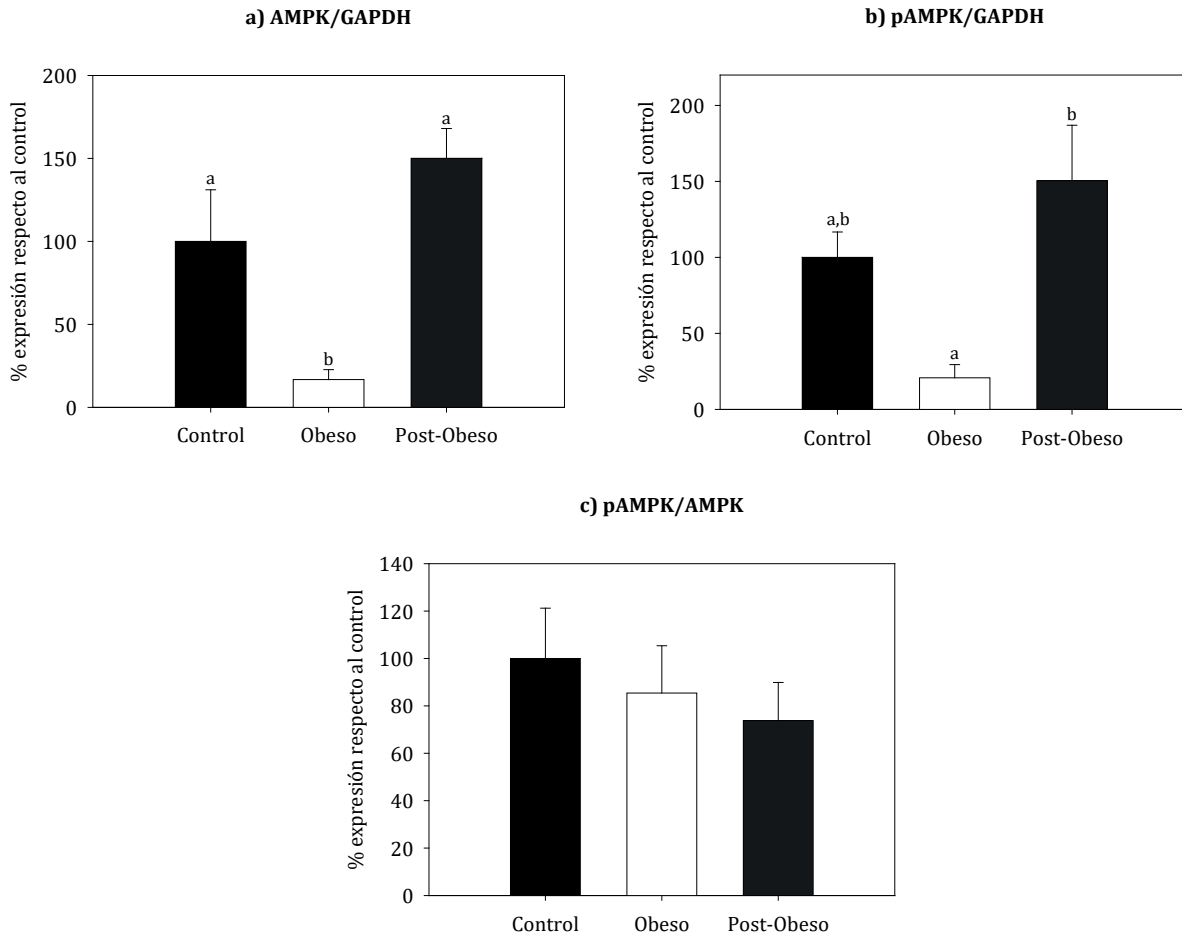


**Figura 74. Niveles de expresión proteica de ACC, pACC y el ratio entre ambas en pacientes control, obesos y obesos tras la normalización del peso.** Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde el control  $\equiv$  100 % y el resto de datos están referidos a ese valor. Los valores de expresión de ACC y pACC están corregidos por los niveles de expresión de GAPDH. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas. ANOVA de una vía, test post hoc de Tukey, para  $p < 0.05$  se consideraron diferencias estadísticamente significativas.  $N=4-5$  en todos los grupos.

De acuerdo con nuestros resultados, otros estudios en humanos han mostrado que durante la obesidad, los adipocitos presentan reducida su capacidad de almacenaje de lípidos, dando lugar a un incremento de la lipólisis y por tanto de la liberación de ácidos grasos libres, agentes inflamatorios y adipoquinas, estos ácidos grasos libres tenderían a almacenarse como triglicéridos en órganos como el hígado desde donde pueden ser liberados como partículas lipoproteicas de baja densidad dando lugar todo ello a los distintos efectos descritos a lo largo de esta tesis como resistencia a insulina, hiperlipidemia, deposición de lípidos en los diferentes órganos, etc (320).

Posteriormente decidimos analizar los niveles de expresión de AMPK (forma total) y pAMPK ya que actúa como regulador negativo de la lipogénesis *de novo* fosforilando a ACC. Tal y como podemos observar en la *Figura 72d-e* y en la *Figura 75a-b*, los niveles de expresión

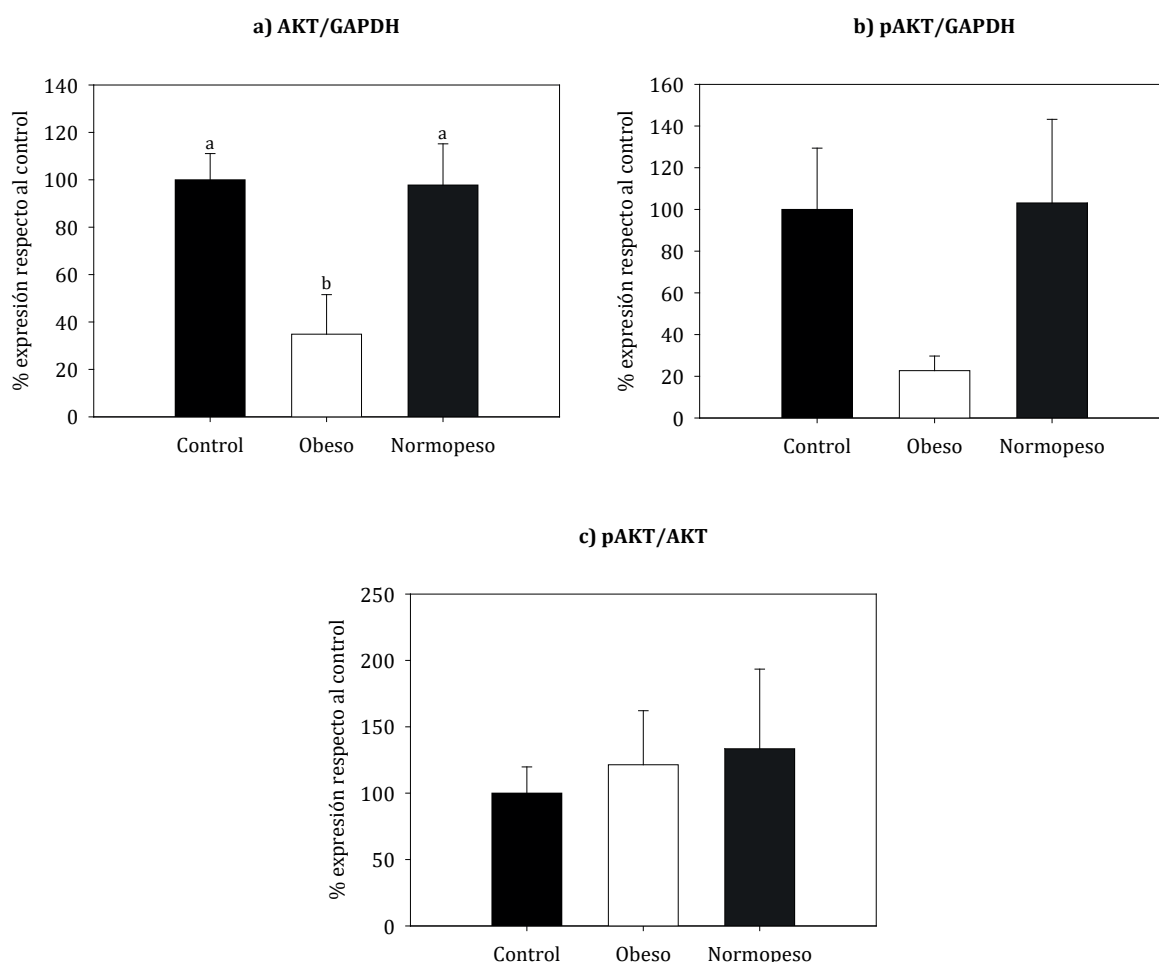
tanto de AMPK como de pAMPK aumentaron de forma estadísticamente significativa tras la pérdida de peso, recuperándose valores similares a los de pacientes control, de forma similar a lo observado para FAS y ACC. Sin embargo, a pesar de detectarse una tendencia a disminuir el ratio de pAMPK respecto a AMPK total tras la pérdida de peso, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los 3 grupos (*Figura 75c*).



**Figura 75. Niveles de expresión proteica relativa de AMPK, pAMPK y el ratio entre ambas en pacientes control, obesos y obesos tras la normalización del peso.** Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde el control  $\equiv$  100 % y el resto de datos están referidos a ese valor. Los valores de expresión de AMPK y pAMPK están corregidos por los niveles de expresión de GAPDH. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas. ANOVA de una vía, test *post hoc* de Tukey, para  $p < 0.05$  se consideraron diferencias estadísticamente significativas. N=4-5 en todos los grupos.

Por último se analizaron los niveles de expresión totales de la proteína AKT así como su forma activa (pAKT). Una correcta activación de esta enzima es imprescindible para que las células lleven a cabo una captación de glucosa adecuada tras la estimulación por la insulina, tanto en el músculo como en el tejido adiposo, siendo por tanto una proteína clave en la resistencia/sensibilidad a la insulina (321). Tal y como podemos observar en la *Figura 72f-g* y *Figura 76a-b*, los niveles de expresión de AKT y pAKT aumentaron tras la pérdida de peso,

alcanzando valores similares al grupo control. Sin embargo el cociente entre los niveles de proteína activa con respecto a la proteína total no presentó variaciones (Figura 76c).



**Figura 76. Niveles de expresión proteica relativa de AKT, pAKT y el ratio entre ambas en pacientes control, obesos y obesos tras la normalización del peso.** Los valores se expresan como la media en unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde el control  $\equiv$  100 % y el resto de datos están referidos a ese valor. Los valores de expresión de AKT y pAkt están corregidos por los niveles de expresión de GAPDH. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas. ANOVA de una vía, test *post hoc* de Tukey, para  $p < 0.05$  se consideraron diferencias estadísticamente significativas. N=4-5 en todos los grupos.

Los datos anteriores nos sugieren un aumento de la expresión tanto de la proteína AKT total como de su forma activa, sin embargo, no observamos un aumento de pAKT/AKT. En la actualidad, está ampliamente descrito el aumento de la expresión de pAKT si hay sensibilidad a la insulina tras un estímulo con la misma (321), sin embargo en nuestro estudio no hemos podido corroborar un aumento del ratio pAKT/AKT posiblemente por el empleo de muestras que fueron tomadas en pacientes sometidos a ayuno de varias horas para la realización de la cirugía y sin ser, por tanto, estimulados con insulina, además el hecho de que este experimento sea a largo plazo (2-3 años), hace que la cantidad de proteína total se haya adecuado a la cantidad que necesita el organismo y es por ello, que aunque no observamos

cambios en el ratio mencionado, no significa que no hubiese mejorado la sensibilidad a la insulina, pues el aumento de pAKT detectado es una evidencia de esta mejoría.

Todos estos resultados a nivel proteico, nos sugirieron que durante el estadio de obesidad mórbida se excede la capacidad de almacenar lípidos llegando alcanzar un *feedback* negativo inhibiendo las vías lipogénicas y que tras la pérdida de masa grasa, se recupera nuevamente esta capacidad y se produce una mejora de la sensibilidad a la insulina.

#### 5.2.4 Análisis de la expresión génica mediante qPCR

Por último, teniendo en cuenta algunas de las proteínas más desreguladas en los estudios proteómicos, decidimos llevar a cabo el análisis de la expresión del ARNm de *FAS*, *GLUT1*, *GLUT4* y *ADH1B* ya que, entre otras ventajas, este análisis hace viable el empleo de un alto número de muestras (algo prácticamente imposible en los estudios proteómicos) y además nos permite estudiar si hay diferencias en la expresión génica durante la obesidad en función del tipo de patologías que puedan presentar los pacientes (*T2DM*, esteatosis, etc.) Se emplearon muestras de pacientes con un IMC normal (como control) y muestras de pacientes obesos mórbidos. A continuación se describe la caracterización de los pacientes incluidos en el estudio:

	EDAD (años)	IMC	Glucosa (mg/dl)
Control	50,38 ± 2,40	24,69 ± 0,30 a	89,07 ± 1,64
Obesidad mórbida	46,33 ± 0,83	49,61 ± 0,69 b	104,55 ± 2,29

**Tabla 39. Caracterización de los pacientes.** Se detalla la edad en años, el IMC y los niveles de glucosa en ayunas (mg/dl). Los datos se expresan como la media ± el error. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (Anova en Rangos, Test no paramétrico de Dunn's). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas si  $p < 0.05$ . N= 32 para el grupo control y n= 148 para el grupo obesos mórbidos.

Los datos recogidos en la *Tabla 39* nos indican que no existieron diferencias estadísticamente significativas en la edad de los pacientes de los 2 grupos. Se detectó un IMC superior en los pacientes con obesidad mórbida respecto a los pacientes control. Y tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas en los niveles de glucosa entre los 2 grupos, consecuencia de la medicación (antidiabéticos) que reciben los pacientes con *T2DM*.

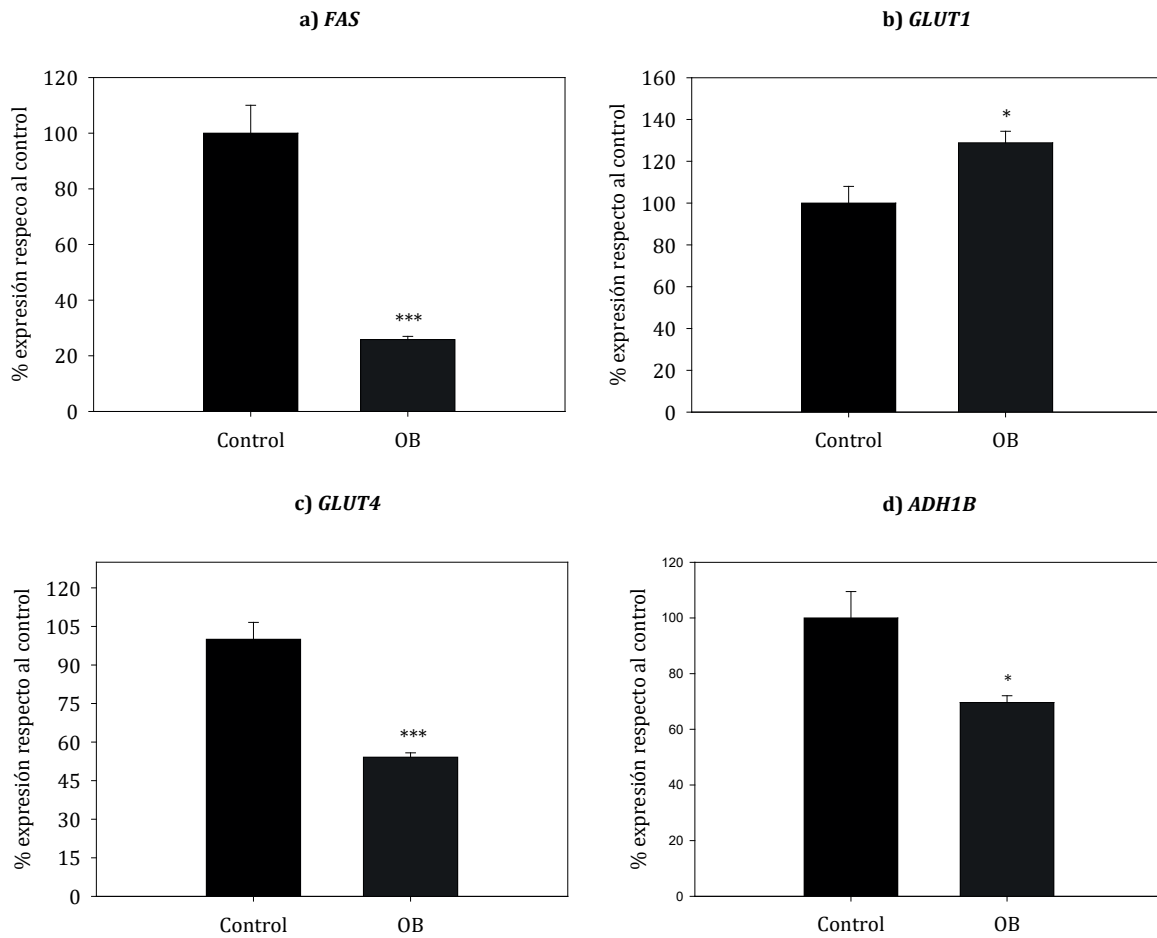
	Obesidad mórbida	Control
Sin medicación	22,30 %	62,50 %
Psicofármacos	39,86 %	15,63 %
Antidiabéticos	31,08 %	3,13 %
Antihipertensivos	35,81 %	12,50 %
Estatinas	22,97 %	9,38 %
Antilipemiantes	5,40 %	0%
Tratamiento tiroides	18,24 %	3,13 %

**Tabla 40. Medicación de los pacientes.** Se detalla el porcentaje de pacientes que toman alguna medicación del grupo descrito. N=148 en el grupo obesidad mórbida y n=32 en el grupo control.

Tal y como se muestra en la *Tabla 40* los pacientes con obesidad mórbida son aquellos con un mayor número de medicamentos prescritos entre los que destacan los antidiabéticos, antihipertensivos y estatinas.

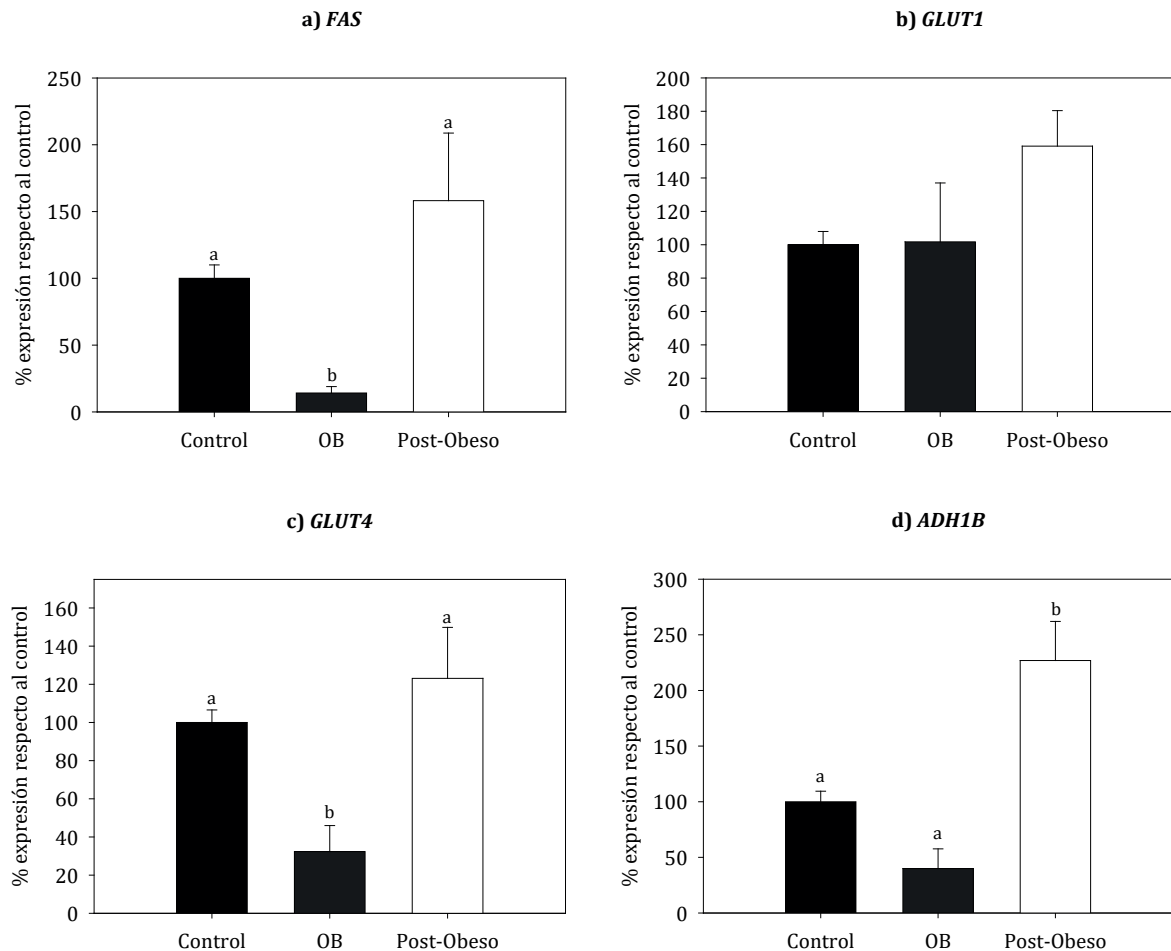
En la *Figura 77* se muestran los resultados obtenidos para los cuatro genes analizados. Se puede observar que los niveles de expresión génica de *FAS*, *GLUT4* y *ADH1B* descendieron considerablemente con la obesidad mórbida. Mientras que para *GLUT1* (a diferencia de los resultados obtenidos en los estudios proteómicos), observamos un ligero aumento en sus niveles de ARNm durante el estadio de obesidad mórbida.





**Figura 77.** Niveles de expresión del ARNm de *FAS* (a), *GLUT1* (b), *GLUT4* (c) y *ADH1B* (d) en WAT subcutáneo abdominal. Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error, donde el control  $\equiv$  100 %. Símbolos sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas (Test paramétrico de Tukey, test no paramétrico de Dunn's). Para  $p < 0.001$  y  $p < 0.05$  se consideraron diferencias estadísticamente significativas, \* y \*\*\* respectivamente. Control (pacientes con IMC normal) y OB (pacientes obesos mórbidos).  $N=32$  para el grupo control y  $n=148$  para el grupo obesos. Datos normalizados respecto a la media geométrica de los genes *IPO8* y *FBLX10*.

Posteriormente, realizamos el análisis de los niveles de expresión de los genes anteriores en 5 pacientes durante el estadio de obesidad mórbida y los mismos pacientes 2-3 años después de la pérdida de peso inducida por la cirugía bariátrica, con el objetivo de comprobar si los niveles de expresión de éstos se restablecían total o parcialmente tras la normalización del peso corporal, empleando para ello nuevamente el grupo control anterior, resultados que se muestran en la *Figura 78*. La caracterización de los pacientes del grupo obesos mórbidos y post-obesos ya fue detallada en la *Tabla 27* y en la *Tabla 28*, pues se emplearon muestras de los mismos pacientes que se incluyeron para los análisis de *miRs*.



**Figura 78. Niveles de expresión del ARNm de *FAS* (a), *GLUT1* (b), *GLUT4* (c) y *ADH1B* (d) en WAT subcutáneo abdominal.** Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error, donde el control  $\equiv$  100 %. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de 1 vía, test *post hoc* de Tukey y ANOVA en rangos, test *post hoc* no paramétrico de Dunn's). Para  $p < 0.05$  se consideraron diferencias estadísticamente significativas. Control (pacientes con IMC normal), OB (pacientes obesos mórbidos) y Post-Obeso (pacientes obesos mórbidos tras la pérdida de peso inducida por la cirugía bariátrica). N=32 para el grupo control, n= 5 para el grupo obesos y n=6 para el grupo post-obeso. Datos normalizados respecto a la media geométrica de los genes *IPO8* y *FBLX10*.

Los niveles de expresión génica de *FAS* (ver Figura 78a) aumentaron de manera estadísticamente significativa tras la pérdida de peso, recuperando los valores del grupo control, corroborándose los resultados mostrados previamente en los análisis de espectrometría de masas y *Western blot*. Estos resultados coinciden con estudios llevados a cabo por otros autores (319), y demuestran que la ruta de la lipogénesis *de novo* está regulada negativamente durante la obesidad, vía que se recupera tras la pérdida de peso, incluso se observa una tendencia a superar los valores de los controles tras la cirugía bariátrica, tanto a nivel proteico (*Western blot*) como génico (*qPCR*). Cabe mencionar, que a diferencia de otros estudios similares en los que emplearon únicamente muestras de mujeres (322), nosotros hemos empleado muestras tanto de hombres como de mujeres, no detectándose diferencias por

sexos, ni tampoco por patologías (sanos vs *T2DM*) o por medicación (*datos no mostrados, pero sí analizados*), lo que refuerza los resultados y hace que puedan ser extrapolables a otras cohortes de pacientes. Tras analizar todos estos datos, podemos concluir que el tejido adiposo subcutáneo durante la obesidad mórbida presenta una capacidad lipogénica disminuida, que se recupera, e incluso supera, al normalizar el peso corporal, demostrando todo ello que los problemas metabólicos de la obesidad mórbida en este tejido no son irreversibles.

En la *Figura 78b*, podemos ver los resultados obtenidos en la expresión génica de *GLUT1*. No se detectó un descenso en el tejido adiposo subcutáneo de individuos obesos tal como habíamos observado en los análisis de espectrometría de masas. Sin embargo, diferencias similares a estas han sido descritas por otros autores en otros tejidos, como el músculo esquelético, quienes informan de un descenso en los niveles de expresión proteicos de *GLUT1* analizado mediante *Western blot* y no a nivel génico en individuos con niveles de glucosa circulante más elevados (323), por tanto, esto nos sugiere que la mayor desregulación de *GLUT1* se produce a nivel postranscripcional. En el tejido adiposo los niveles de *GLUT4* (y no de *GLUT1*) y su translocación desde el citoplasma hasta la membrana celular son realmente el paso limitante en el uso de la glucosa dependiente de insulina (324). Además, se ha observado que la expansión del tejido adiposo durante la obesidad, está asociada con un descenso de los niveles de expresión génica y proteica de *GLUT4* (325). Por todo ello, aunque esta proteína no fue identificada en los análisis proteómicos llevados a cabo en esta tesis, decidimos estudiar su expresión génica en pacientes obesos y controles y obtuvimos resultados distintos a los observados para *GLUT1* (*Figura 78c*). En este caso, los valores de *GLUT4* se redujeron algo más de un 50 % durante la obesidad mórbida, y tras la pérdida de peso alcanzaron valores similares a los de los pacientes del grupo control, este descenso en los niveles de expresión en el tejido adiposo de individuos obesos, puede estar correlacionado con una desregulación del metabolismo de la glucosa y la resistencia a insulina (326). *GLUT4* ejerce un papel importante en la homeostasis de la glucosa mediada por insulina y su pérdida en la membrana celular está correlacionada con la resistencia a esta hormona (326). También se ha descrito que *GLUT4* no solo proporciona el sustrato para la lipogénesis *de novo* sino que también parece ser crítico para la activación del factor de transcripción *ChREBP* por el flujo de glucosa, lo que podría explicar los bajos niveles de expresión de los genes responsables de la lipogénesis *de novo* durante la obesidad (327). Otras publicaciones han sugerido que los cambios en los niveles de expresión génica de *GLUT4* en el tejido adiposo, parecen estar más relacionados con la resistencia a insulina y con la *T2DM* (325), sin embargo, en nuestro estudio, no hemos observado diferencias estadísticamente significativas entre individuos diabéticos y no diabéticos, lo que podría achacarse por una parte a la medicación que reciben los pacientes diabéticos y por otra parte al hecho de que estamos analizando expresión

génica y no proteína y/o localización celular de este transportador. Teniendo en cuenta la bibliografía previa y el marcado descenso de los niveles de expresión de *GLUT4* en el tejido adiposo durante la obesidad y posterior recuperación tras la pérdida de peso, estos valores podrían causar resistencia a insulina en otros órganos diana de la insulina distintos del tejido adiposo e incrementar el riesgo de padecer diabetes, riesgo que disminuiría tras la pérdida de peso. Esta teoría ya fue previamente planteada por otros autores, que demostraron que ratones *knockout* para *GLUT4* únicamente en el tejido adiposo, incrementaban la resistencia a la insulina en otros tejidos dependientes de la misma, demostrando un papel central para este tejido adiposo como órgano endocrino en el mantenimiento de la sensibilidad a la insulina y el balance energético (328). Los resultados en *GLUT4*, podrían contribuir a explicar por qué tras la cirugía bariátrica mejora mucho la sensibilidad a la insulina y por lo tanto disminuye considerablemente el número de pacientes que toman antidiabéticos. Los niveles de expresión génica de *ADH1B*, tal y como podemos observar en la *Figura 78d* son inferiores en el grupo de pacientes obesos respecto al grupo control, pero además su expresión se recupera tras la pérdida de peso inducida por la cirugía bariátrica, estos resultados corroboran los obtenidos previamente mediante espectrometría de masas y nuevamente nos confirman, que los niveles de expresión tanto génica como proteica de *ADH1B* se correlacionan negativamente con el IMC. Esta relación entre *ADH1B* y el IMC, fue detectada en pacientes de ambos sexos y también independientemente de la patología (diabéticos vs. no diabéticos) (*datos no mostrados pero sí analizados*). Como ya se mencionó en el apartado de proteómica, otros autores han publicado previamente la existencia de una elevada y específica expresión de *ADH1B* en el tejido adiposo, así como su implicación en la glucólisis y metabolismo de los ácidos grasos (313); todo ello, junto con los resultados aquí mostrados, nos revelan que la *ADH1B* presenta un papel importante en el desarrollo de la obesidad y resistencia a insulina.

En conjunto, todos los resultados descritos en este apartado demuestran que durante la obesidad mórbida disminuyen rutas metabólicas como la lipogénesis y aumentan procesos como la inflamación, y cómo la pérdida de peso restaura o mejora todas estas alteraciones, lo que contribuiría, al menos parcialmente, a mejorar comorbilidades típicas de la obesidad como la resistencia a insulina.

### 5.3 Alteración de la expresión de *FNDC5* e irisina bajo diferentes estados metabólicos.

La irisina fue descrita inicialmente como una mioquina que inducía el proceso de “*browning*” de la grasa blanca *in vivo* e *in vitro* (97), y posteriormente como una adipoquina (103). Desde su descubrimiento se han ido publicando numerosos estudios sobre su regulación y su función, por ejemplo los niveles circulantes de irisina se ven modulados por diferentes factores como son la dieta, la obesidad, el ejercicio y diferentes agentes farmacológicos e incluso diferentes condiciones patológicas, pero a su vez, la irisina es capaz de ejercer influencia en diferentes funciones de los distintos sistemas corporales, por ello, ha cobrado importancia su posible empleo para el manejo de variedad de enfermedades, entre ellas las endocrinas y metabólicas (98).

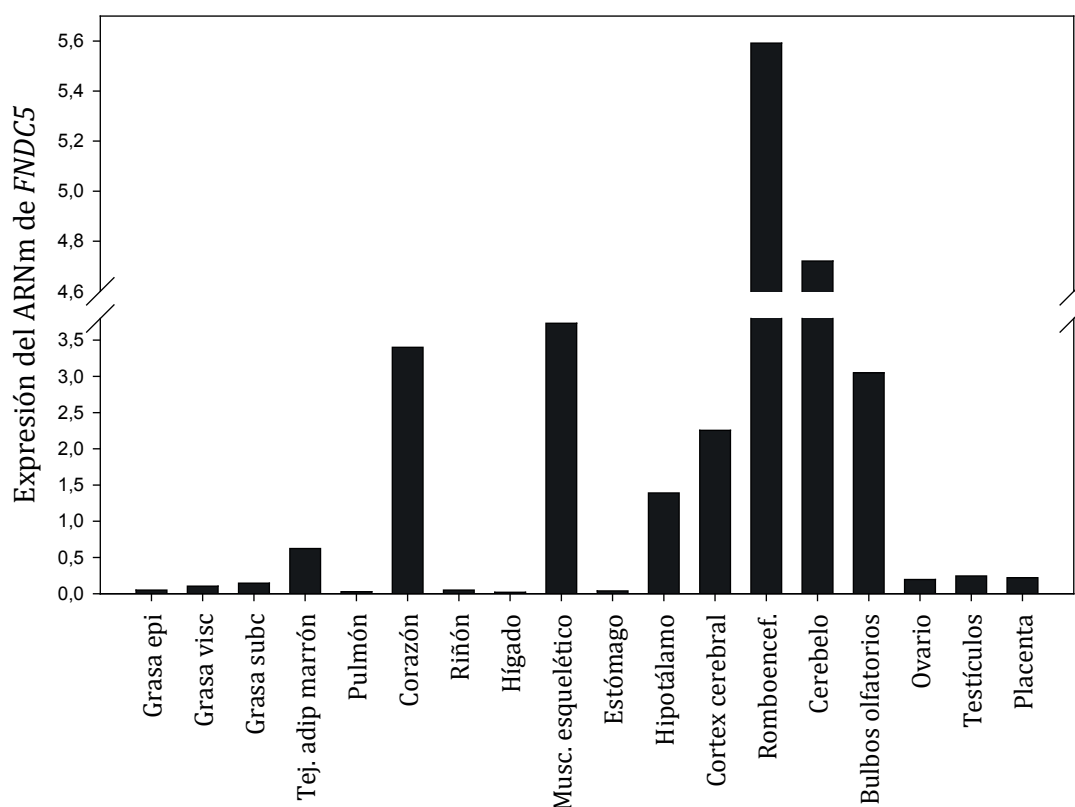
Böstrom *et al.* propusieron que el gen *FNDC5* es clave en la producción de la proteína soluble irisina, la cual incrementa el gasto de energía corporal y mejora la resistencia a insulina ligada a la obesidad, y que este efecto es resultado del proceso de *browning* producido por la irisina en el tejido adiposo (97). Tanto en humanos como en roedores, se correlaciona la formación de tejido adiposo marrón con efectos contra la obesidad, sugiriendo un papel central de la termogénesis de los adipocitos beige en el metabolismo energético corporal (329-331). Sin embargo, ha surgido una gran controversia respecto a la asociación entre la irisina, obesidad y otras enfermedades metabólicas. Algunos estudios han sugerido, que la irisina mejora la obesidad e incluso la resistencia a la insulina (332-334) y que la irisina circulante se correlaciona negativamente con el índice de masa corporal y el porcentaje de masa grasa (102, 335). Sin embargo, otros estudios demostraron que la irisina se correlacionaba positivamente con estos parámetros (101, 335) mientras que otros no han detectado correlación entre la irisina y el índice de masa corporal (336-338). Además de estos estudios, existen otros que demostraron que *FNDC5* es capaz de atenuar la inflamación en el tejido adiposo así como la resistencia a insulina, observándose que ratones *FNDC5*<sup>-/-</sup> presentaban un empeoramiento de la obesidad, resistencia a insulina y una mayor acumulación de grasa e inflamación respecto a los ratones silvestres cuando ambos grupos eran alimentados con *HFD* (339). Sin embargo, en otros estudios vieron que adipocitos *knockout* para *FNDC5* mostraban unos niveles de expresión de *UCP1* más bajos y una mejora de la adipogénesis (340).

Para esclarecer la relación entre los niveles de irisina en suero y la expresión génica de *FNDC5* en diferentes tejidos, hemos evaluado los niveles de irisina en sangre y los niveles de expresión del ARNm de *FNDC5* en el hipotálamo (a nivel central), en músculo gastrocnemio y en diferentes depósitos de grasa (visceral, epididimal y subcutánea) a nivel periférico en diferentes modelos de metabolismo alterado en ratas *Wistar*, como ya hemos mencionado,

los niveles de irisina y los niveles de expresión génica de *FNDC5* han sido relacionados con el fenómeno de *browning* durante el cual los niveles de expresión de *UCP1* aumentan, por lo que hemos analizado si están correlacionados y además, se han estudiado los efectos de la irisina exógena sobre los niveles de insulina.

Lo primero que hicimos fue estudiar los niveles de expresión del ARNm de *FNDC5* en diferentes tejidos de rata (*Figura 79*).

### Perfil expresión *FNDC5*



**Figura 79.** Perfil de expresión del ARNm de *FNDC5* en un panel de tejidos de ratas *Wistar* adultas. Se emplearon ratas macho adultas para todos los tejidos excepto para ovario y placenta.

Tal y como se muestra en la *Figura 79* los niveles de expresión del ARNm de *FNDC5*, fueron especialmente altos en diferentes regiones cerebrales y en el músculo (tanto cardíaco como esquelético). Resultados similares a los descritos previamente por otros autores en los que el ARNm de *FNDC5* presentaba niveles de expresión elevados en músculo (94, 270) y en diferentes regiones cerebrales (271, 272) lo que nos sugirió que *FNDC5*/irisina podría jugar un papel tanto a nivel central como periférico. Esta teoría se vio apoyada por diferentes estudios acerca de la función de *FNDC5*/irisina en diferentes procesos cerebrales. El ejercicio

de resistencia aumenta la expresión de *FNDC5* en el hipocampo de ratones, lo que a su vez estimula la expresión génica del factor neurotrófico derivado del cerebro (*BDNF*) y hace que se exprese *FNDC5* en las neuronas corticales primarias aumentando la supervivencia celular (270). Además detectamos que los niveles de expresión fueron relativamente elevados en placenta, ovarios y testículos, lo que nos sugiere una implicación de la irisina en las funciones reproductoras, pero para esclarecer este punto son necesarios más estudios. Se pudo observar que los niveles de expresión del ARNm de *FNDC5* también fueron altos detectados en el tejido adiposo marrón, hecho que podría explicar el papel de este tejido en la liberación de calor a través de la acción de *UCP1* y en el control del metabolismo lipídico y de la glucosa (341), ya que se ha demostrado por una parte que la exposición al frío aumenta los niveles de irisina circulante (342) y además, ésta conduce al desarrollo de grasa beis a partir de grasa blanca y estimulaba la termogénesis a partir de un aumento en la expresión de *UCP1* (97), en cambio, detectamos niveles de expresión más modestos (aunque perfectamente cuantificables) en diferentes depósitos del *WAT*. Por último, en otros tejidos como los pulmones, hígado, riñón y estómago los niveles de expresión del ARNm de *FNDC5* fueron muy bajos o indetectables.

### 5.3.1 Alteración de la expresión de *FNDC5* y los niveles circulantes de irisina en ratas sometidas a distintas dietas – Experimento a largo plazo

Se analizaron los niveles de expresión de *FNDC5* en el hipotálamo y en distintos tejidos además de los niveles circulantes de irisina para estudiar su posible variación con el peso corporal y el porcentaje de masa grasa.

Tal y como se explicó anteriormente, para conseguir modelos animales con distinto porcentaje de masa grasa y peso corporal se emplearon distintas dietas. Para confirmar que funcionaron como se esperaba se analizaron diferentes parámetros corporales que se resumen en la *Tabla 41*. Efectivamente el porcentaje de masa grasa fue muy bajo en los animales sometidos a RC (aproximadamente un 2 %), mientras que en el grupo control alcanzaron un 9,5 % y un 18,8 % en el grupo alimentado con *HFD*. La ganancia de peso corporal mostró el mismo patrón mientras que el porcentaje de masa magra presentó un patrón contrario. Todos estos parámetros demostraron la efectividad de las dietas así como el tiempo empleado en las mismas.

	RC	DN	HDF
% Masa grasa	2,1 ± 0,6 a	9,5 ± 0,5 b	18,8 ± 0,9 c
% Masa magra	80,3 ± 0,7 a	73,1 ± 0,7 b	66,2 ± 0,8 c
Ganancia peso corporal (g)	173,2 ± 4,8 a	306,8 ± 9,0 b	362,0 ± 7,3 c

**Tabla 41. Efecto de la HDF y RC durante 3 meses sobre el % de grasa corporal (A), % de masa magra (B) y peso corporal (C).** Los datos se expresan como la media ± el error. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de una vía, test *post hoc* de Tukey). Para  $p < 0.05$  se consideraron diferencias estadísticamente significativas. RC: restricción calórica, DN: dieta normal y HDF: dieta alta en grasa. N= 10 para todos los grupos.

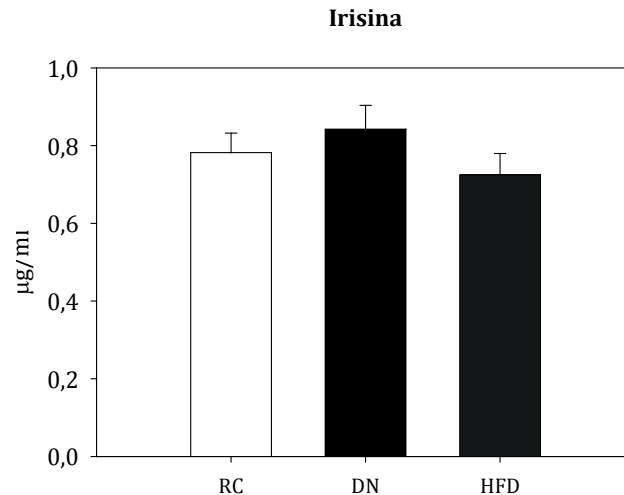
También se analizaron diferentes parámetros plasmáticos para comprobar si se habían producido alteraciones en la sensibilidad a la insulina. Tal y como se muestra en la *Tabla 42*, los animales sometidos a RC mostraban signos de incremento de la sensibilidad a la insulina, ya que presentaron los niveles de glucosa e insulina basales inferiores, mientras que los animales sometidos a HDF, presentaron signos de resistencia a insulina y desregulación metabólica, tal y como se puede comprobar por los niveles elevados de glucosa, triglicéridos, insulina y leptina en plasma superiores.

	RC	DN	HDF
Glucosa (mg/dl)	72,0 ± 1,4 a	78,44 ± 1,0 b	139,3 ± 4,0 c
Insulina (ng/ml)	1,01 ± 0,1 a	3,2 ± 0,3 b	4,1 ± 0,3 c
Leptina (ng/ml)	3,3 ± 0,6 a	8,5 ± 1,0 b	15,7 ± 0,8 c
Triglicéridos (mg/dl)	64,1 ± 3,9 a	120,8 ± 6,2 b	148,1 ± 8,3 c

**Tabla 42. Efecto de la HDF y RC durante 3 meses sobre los niveles circulantes de glucosa, insulina, leptina y triglicéridos.** Los datos se expresan como la media ± el error. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de una vía, test *post hoc* de Tukey). Para  $p < 0.05$  se consideraron diferencias estadísticamente significativas. RC: restricción calórica, DN: dieta normal y HDF: dieta alta en grasa. N= 10 para todos los grupos.

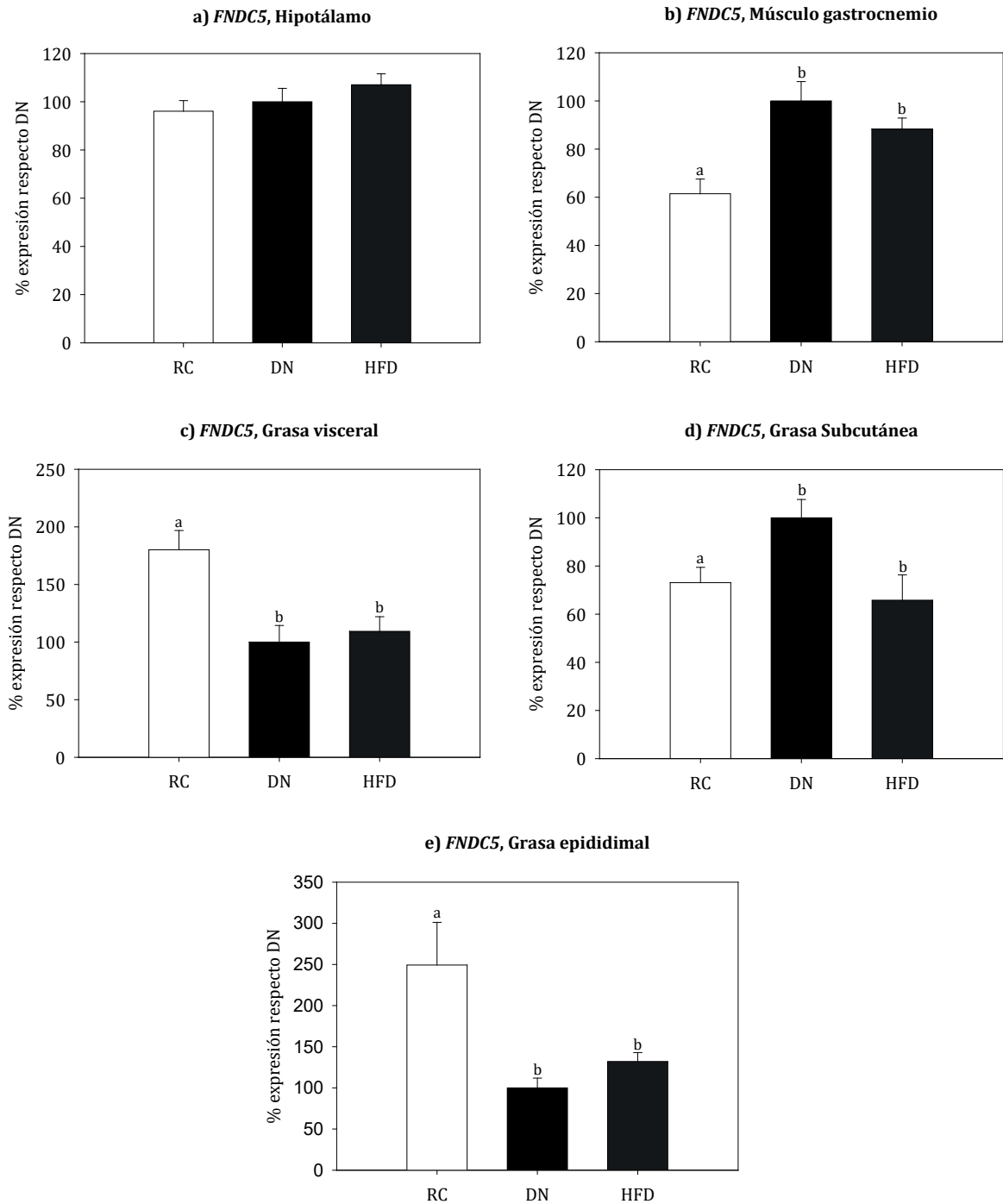


Para comprobar si las alteraciones metabólicas inducidas por la dieta modificaban los niveles circulantes de irisina, éstos se analizaron en suero. Tal y como se muestra en la *Figura 80*, los animales sometidos a *RC* y *HFD* mostraron niveles inferiores de irisina aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas respecto al grupo control sometido a dieta normal.



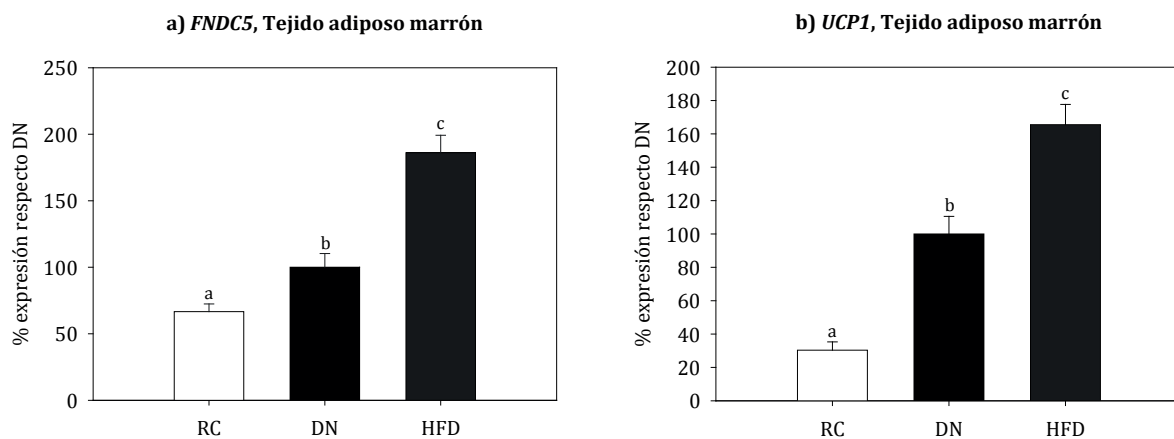
**Figura 80.** Efecto de la *HFD* y *RC* durante 3 meses sobre los niveles circulantes irisina. Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error. (ANOVA de una vía, test *post hoc* de Tukey). Para  $p < 0.05$  se consideraron diferencias estadísticamente significativas. *RC*: restricción calórica, *DN*: dieta normal y *HFD*: dieta alta en grasa.  $N = 10$  para todos los grupos.

Se analizaron los niveles de expresión génica de *FNDC5* mediante *qPCR* (*Figura 81*). Tal como se muestra en la *Figura 81a*, no se observaron cambios en su expresión a nivel hipotálamico. Los perfiles de expresión de *FNDC5* en músculo y tejido adiposo subcutáneo inguinal fueron similares al perfil de los niveles circulantes de irisina, con niveles inferiores en el grupo sometido a *RC* en ambos tejidos (*Figura 81b* y *81d*). Mientras que en el tejido adiposo visceral y epididimal los niveles de expresión génica de *FNDC5* aumentaron con la *RC* (*Figura 81c* y *Figura 81e* respectivamente).



**Figura 81.** Efecto de la *HFD* y *RC* durante 3 meses sobre los niveles de expresión del ARNm de *FNDC5* en hipotálamo (a), músculo gastrocnemio (b), *WAT* visceral (c), *WAT* subcutánea (d) y *WAT* epididimal (e). Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error, donde DN  $\equiv$  100 %. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de una vía, test *post hoc* de Tukey). Para  $p < 0.05$  se consideraron diferencias estadísticamente significativas. RC: restricción calórica, DN: dieta normal y *HFD*: dieta alta en grasa. N= 10 para todos los grupos. Datos normalizados respecto a *HPRT*.

Además, se analizaron los niveles de expresión del ARNm *FNDC5* y *UCP1* en el tejido adiposo marrón, por ser un tejido implicado en el control del metabolismo glucídico y lipídico y debido a la relación existente entre los niveles de expresión de *UCP1* y el *browning*. Los resultados mostraron un incremento de los niveles de expresión del ARNm de *FNDC5* y *UCP1* en proporción al porcentaje de masa grasa (*Figura 82a* y *82b*). Resultados que coincidieron con los observados por otros autores en roedores, demostrando que la *HFD* incrementa el nivel de expresión de *UCP1* y contenido proteico en el *BAT* (343).



**Figura 82.** Efecto de la *HFD* y *RC* durante 3 meses sobre los niveles de expresión del ARNm de *FNDC5* (a) y *UCP1* (b) en *BAT*. Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error, donde *DN*  $\equiv$  100 %. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de una vía, test *post hoc* de Tukey). Para  $p < 0.05$  se consideraron diferencias estadísticamente significativas. *RC*: restricción calórica, *DN*: dieta normal y *HFD*: dieta alta en grasa.  $N = 10$  para todos los grupos. Datos normalizados respecto a *HPRT*.

Este incremento de expresión de *FNDC5* en el tejido adiposo marrón proporcional al porcentaje de masa grasa que hemos descrito (*Figura 82a*), fue visto también por otros autores en ratones alimentados con dieta alta en carbohidratos (344). Sin embargo, en el *WAT* observamos que las diferencias de expresión de *FNDC5* dependían del depósito adiposo estudiado. Así en grasa blanca epididimal y visceral la expresión génica de *FNDC5* sólo se vio afectada de forma positiva por la *RC* (*Figura 81c* y *Figura 81e*) mientras que en el tejido adiposo subcutáneo disminuyeron con la *RC* y con la dieta alta en grasa (*Figura 81d*). Todo ello sugirió que el incremento observado en la expresión de *FNDC5* en el tejido adiposo visceral y epididimal durante la *RC* ocurrió, al menos en parte, como mecanismo de compensación del descenso de masa de estos depósitos, los cuáles se vieron más afectados que el tejido adiposo subcutáneo (257).

Hay que tener en cuenta también, que los distintos depósitos de tejido adiposo blanco tienen diferentes funciones fisiológicas (345). Un exceso de acumulación de tejido adiposo

visceral en la cavidad abdominal está asociado con el síndrome metabólico, diabetes, enfermedades cardiovasculares y mortalidad (345); sin embargo, en roedores, el *WAT* subcutáneo parece ser relativamente benigno, incluso el trasplante de tejido adiposo subcutáneo de donantes normales o donantes que realizan ejercicio a la cavidad visceral mejora el metabolismo de la glucosa y la sensibilidad a la insulina (346, 347). La irisina podría promover por tanto, el mantenimiento del tejido adiposo subcutáneo “saludable” ya que se sabe que el ejercicio induce la expresión de *FNDC5* en este depósito, estimulando el fenómeno de *browning* (97). Aunque la expresión génica de *FNDC5* en el *WAT* representa sólo una pequeña fracción del que se expresa en músculo, cerebro o incluso tejido adiposo marrón, algunos autores sugirieron que es la expresión de *FNDC5* del tejido adiposo y no del músculo esquelético la que se correlaciona con los niveles circulantes de irisina en humanos (102). De acuerdo con estos datos, otros autores han sugerido que la expresión proteica de *FNDC5* en el tejido adiposo, y no en el músculo esquelético, contribuye a los cambios en los niveles circulantes de irisina en ratones obesos inducidos por la *HFD*, aunque en este estudio únicamente analizaron el tejido adiposo subcutáneo abdominal (348).

En resumen, nuestros resultados mostraron un patrón muy semejante entre los niveles circulantes de irisina en plasma y los niveles de expresión en músculo gastrocnemio y grasa subcutánea, detectándose una tendencia a disminuir los niveles circulantes de irisina y de expresión génica de *FNDC5* con la RC, siendo únicamente estadísticamente significativo este descenso en los tejidos mencionados, lo que coincidió con estudios llevados a cabo en roedores (338, 349, 350) y similares a los obtenidos en humanos (102) por otros autores.

### **5.3.2 Alteración de la expresión de *FNDC5* y los niveles circulantes de irisina en ratas sometidas a ayuno – Experimento a corto plazo**

Para estudiar el impacto que ejerce la RC aguda sobre los niveles de expresión de *FNDC5* en el hipotálamo y en distintos tejidos y sobre los niveles circulantes de irisina, ratas macho de la cepa *Wistar* fueron sometidas a ayuno durante 48 h.

En primer lugar, se analizaron los principales parámetros corporales, y tal como se esperaba y se muestra en la *Tabla 43*, la ganancia de peso corporal y los índices somáticos hepáticos y de grasa visceral son inferiores en ratas sometidas a ayuno, mientras que no se observan cambios en el índice somático de grasa epididimal.

	Ganancia peso corporal (g)	Índice hepatosomático (%)	Índice somático Grasa epididimal (%)	Índice somático Grasa visceral (%)
Alimentadas	41,2 ± 2,5	3,7 ± 0,1	0,96 ± 0,05	0,68 ± 0,04
Ayuno	11,6 ± 4,4 *	2,6 ± 0,08 *	0,88 ± 0,05	0,49 ± 0,05 *

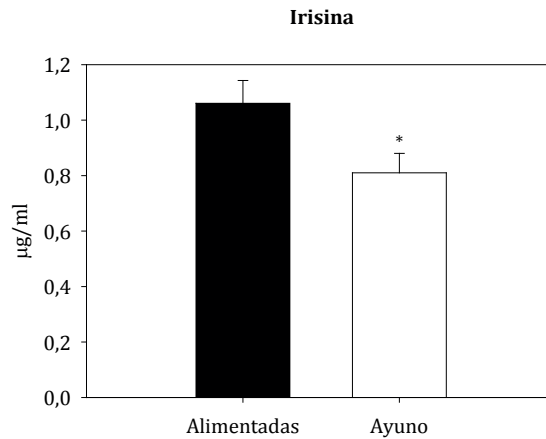
**Tabla 43. Efectos del ayuno durante 48 h sobre la ganancia de peso corporal e índices somáticos.** Los valores se expresan como la media ± el error. Símbolos indican diferencias estadísticamente significativas. \*p<0.05 vs. alimentadas, test *t-student*. Los índices somáticos se calcularon como el ratio entre el peso de los tejidos y el peso corporal total, expresado como g/100 g de peso corporal. N= 6 para todos los grupos.

En cuanto a los parámetros plasmáticos analizados, los niveles de glucosa, triglicéridos e insulina en plasma disminuyeron con el ayuno tal y como se esperaba (*Tabla 44*).

	Glucosa (mg/dl)	Triglicéridos (mg/dl)	Insulina (ng/ml)
Alimentadas	120 ± 1,5	162 ± 13	2,3 ± 0,3
Ayuno	91 ± 1,1 *	68 ± 4,7 *	0,44 ± 0,07 *

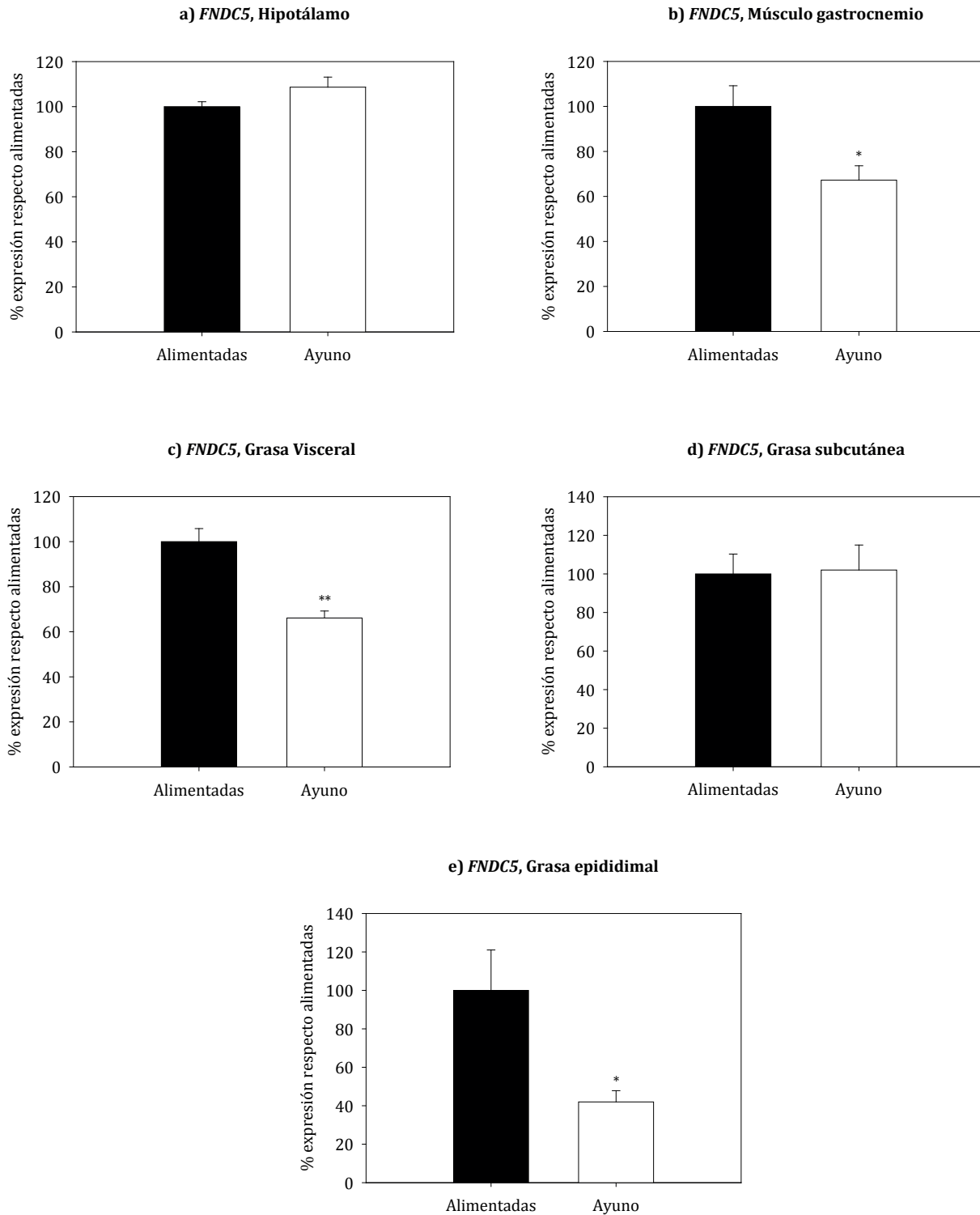
**Tabla 44. Efectos del ayuno durante 48 h sobre los niveles de glucosa en plasma, triglicéridos e insulina.** Los valores se expresan como la media ± el error. Símbolos indican diferencias estadísticamente significativas. \*p<0.05 vs. alimentadas, test *t-student*. N= 6 para todos los grupos.

A continuación se analizaron los niveles de irisina en suero (*Figura 83*). Y al contrario de lo que ocurrió en los experimentos a largo plazo, en los que ni la RC ni la *HDF* causaron cambios significativos en los niveles circulantes de irisina, tras 48 h de ayuno sus niveles circulantes disminuyeron (*Figura 83*).



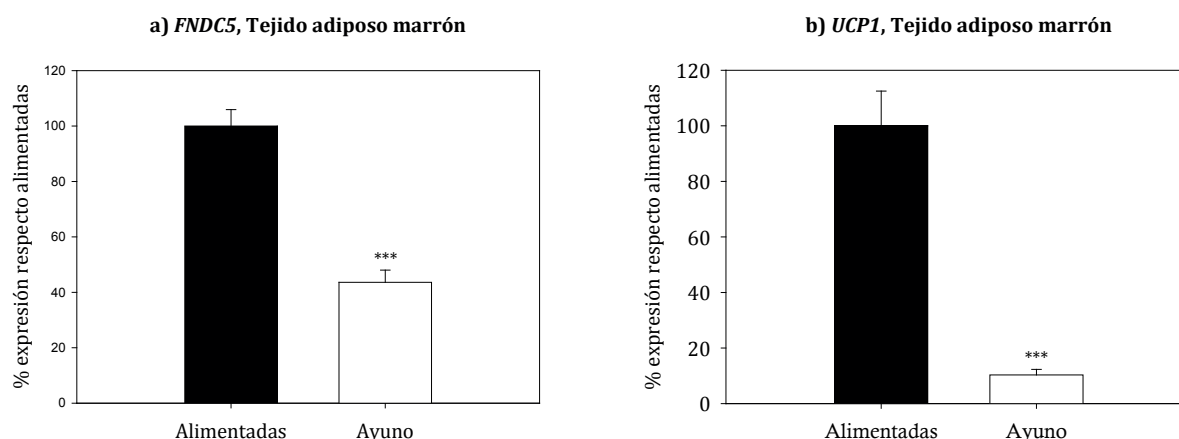
**Figura 83. Efectos del ayuno durante 48 h sobre los niveles de irisina en plasma.** Los valores se expresan como la media  $\pm$  el error. Símbolos sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas. \* $p < 0.05$  vs. alimentadas, test *t-student*. N= 6 para todos los grupos.

Para conocer el efecto del ayuno sobre los niveles de expresión del ARNm de *FNDC5* a nivel central y periférico, se analizaron sus niveles de expresión en diferentes tejidos. Los niveles circulantes de irisina tras el ayuno descendieron significativamente, similar al descenso observado en sus niveles en otros estudios bajo situaciones que tenían en común unos niveles de insulina bajos (351) y se correlacionaron con los niveles de expresión de *FNDC5* en músculo y tejido adiposo visceral y epididimal (*Figura 84b-c* y *Figura 84e*), pero no con los niveles de expresión génica de *FNDC5* en grasa subcutánea (*Figura 84d*) al contrario de lo que ocurría en los experimentos a largo plazo, donde los niveles circulantes de irisina se correlacionaban más con los niveles de expresión génica de *FNDC5* en músculo esquelético y grasa subcutánea.



**Figura 84.** Efecto del ayuno durante 48 h sobre los niveles de expresión del ARNm de *FNDC5* en hipotálamo (a), músculo gastrocnemio (b), *WAT* visceral (c), *WAT* subcutánea (d) y *WAT* epididimal (e). Los valores se expresan como unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde alimentadas  $\equiv$  100 %. Símbolos sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas. \* $p < 0.05$  vs. alimentadas, \*\* $p < 0.005$  vs. alimentadas, test *t-student*. N=6 para todos los grupos. Datos normalizados respecto a *HPRT*.

En el *BAT*, se observó una reducción de los niveles de expresión génica de *FNDC5* y *UCP1* con el ayuno (*Figura 85a* y *85b*) tal y como ocurrió con los niveles de expresión de irisina circulante (*Figura 83*) y los niveles de expresión del ARNm del músculo gastrocnemio y del tejido adiposo epididimal y visceral (*Figura 84b-e*). Estos resultados para *UCP1*, fueron similares a los observados en otros estudios en los que el ayuno disminuía sus niveles de expresión génica y proteica (343).



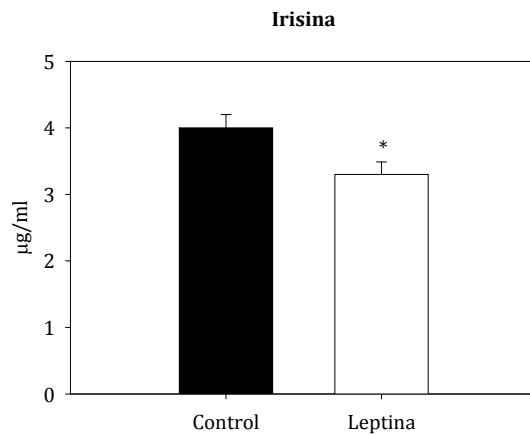
**Figura 85.** Efecto del ayuno durante 48 h sobre los niveles de expresión del ARNm de *FNDC5* (a) y *UCP1* (b) en *BAT*. Los valores se expresan como unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde alimentadas  $\equiv$  100 %. Símbolos sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas, \*\*\* $p < 0.001$  vs. alimentadas, test *t-student*.  $N=6$  para todos los grupos. Datos normalizados respecto a *HPRT*.

### 5.3.3 Efectos de la leptina sobre la expresión génica de *FNDC5* y los niveles circulantes de irisina en ratas alimentadas y sometidas a ayuno.

Nos propusimos comprobar si existían cambios en los niveles de expresión génica de *FNDC5* y los niveles circulantes de irisina en condiciones en las que la señalización de la leptina estaba alterada, ya que la leptina es una hormona que se ve alterada con la obesidad y con la RC, por tanto decidimos analizar si los efectos observados en el apartado anterior tras 48 h de ayuno eran debidos o estaban relacionados con el aumento en los valores de leptina que se produjeron durante el ayuno, más que a la privación de alimento propiamente dicha. Para ello llevamos a cabo dos experimentos independientes. En uno de ellos tratamos ratas alimentadas con leptina y en el segundo tratamos ratas con leptina tanto en condiciones de alimentación normales como de ayuno.

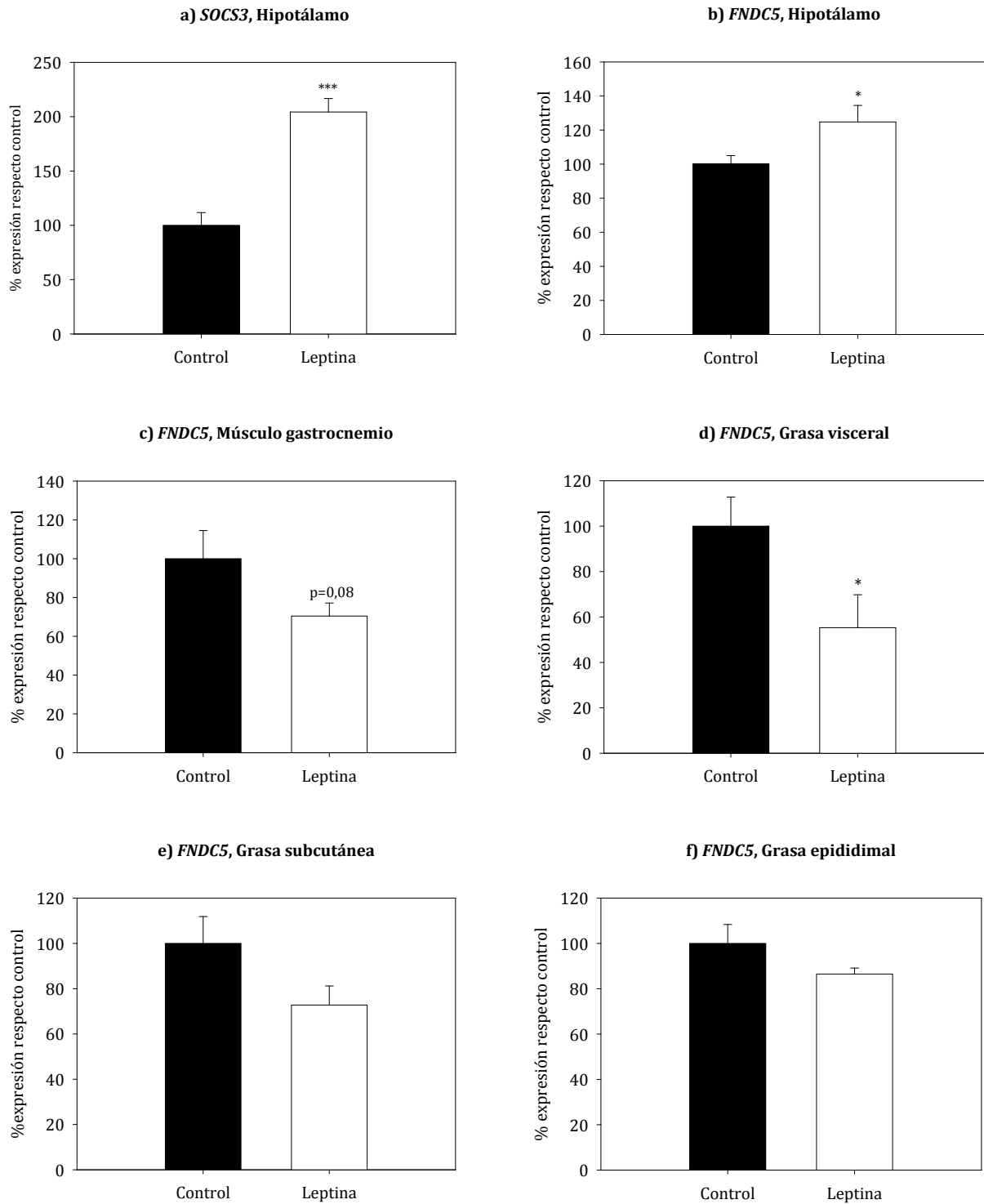
Tal y como se muestra en la *Figura 86* el tratamiento con leptina se asoció con un descenso en los niveles circulantes de irisina en ratas alimentadas.





**Figura 86.** Efecto de dos inyecciones IP de leptina (1 cada 24 h) sobre los niveles circulantes de irisina. Los valores se expresan como la media  $\pm$  el error. Diferentes símbolos sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas, \* $p < 0.05$  vs. control (salino), test *t-student*. N= 6-7 para todos los grupos.

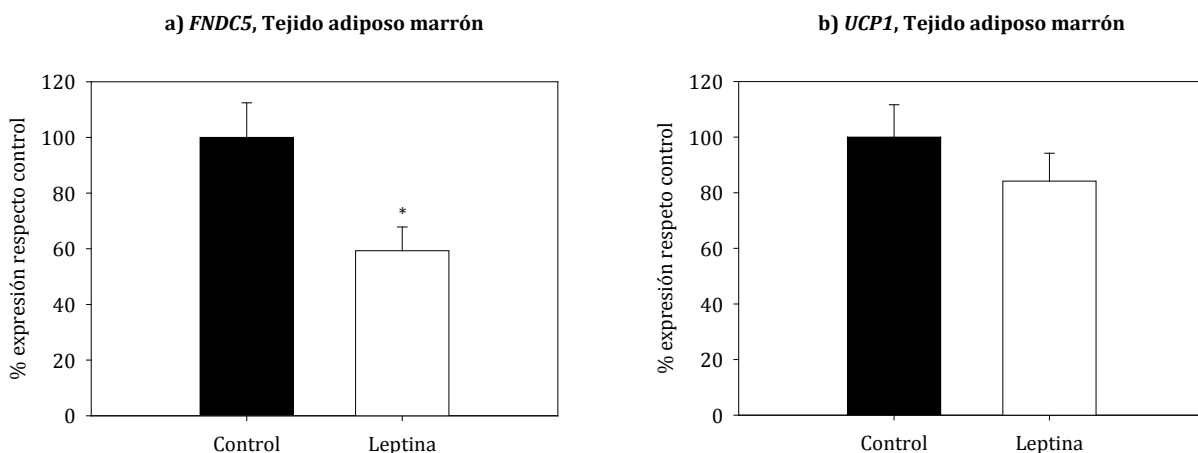
Para corroborar la eficiencia del tratamiento con leptina, se analizó tanto la ingesta de los animales (la leptina es una potente hormona anorexigénica) como los niveles de expresión génica hipotalámica de *SOCS3* (Figura 87a), puesto que es una de las principales dianas de la leptina a nivel central (352, 353). Pudimos comprobar que el tratamiento con leptina funcionó ya que se observó tanto un aumento de los niveles de expresión del ARNm de *SOCS3* en el hipotálamo (Figura 87a) como un descenso en la ingesta (*datos no mostrados*); el tratamiento con leptina se asoció con un incremento en los niveles de expresión de *FNDC5* hipotalámico (Figura 87b), mientras que a nivel periférico se observaron efectos contrarios, pues los niveles de expresión del ARNm de *FNDC5* disminuyeron en todos los tejidos estudiados (Figura 87c-f). Todos estos resultados sugieren que la leptina tiene diferentes efectos sobre la expresión génica central y periférica de *FNDC5* y que sus efectos fueron similares a los provocados por el ayuno.



**Figura 87.** Efecto de dos inyecciones IP de leptina (1 cada 24 h) sobre los niveles de expresión del ARNm de *SOCS3* y *FNDC5* en hipotálamo (a y b, respectivamente) y *FNDC5* en músculo gastrocnemio (c), grasa visceral (d), *WAT* subcutáneo (e) y *WAT* epididimal (f). Los valores se expresan como unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde control  $\equiv$  100 %. Diferentes símbolos sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas, \* $p < 0.05$  vs. control (salino) y \*\*\*  $p < 0.001$  vs. control, test *t-student*. N= 6-7 para todos los grupos. Datos normalizados respecto a *HPRT*.

Contrario a esto, estudios previos de otros autores observaron que la administración IP de leptina exógena a largo plazo se asociaba con un incremento en los niveles de expresión de *FNDC5* en el músculo gastrocnemio, un leve aumento en la irisina circulante en ratones y una regulación negativa de la expresión de *FNDC5* en adipocitos subcutáneos diferenciados de ratón, (354). Además, también se ha descrito una disminución de la expresión de *FNDC5* en explantes de tejido adiposo subcutáneo humanos tratados con leptina *in vitro* (355). Por lo que son necesarios estudios adicionales para identificar la fuente de las discrepancias entre experimentos distintos, y corroborar si el efecto de la leptina es dependiente de la duración del tratamiento, ya que esta variedad de diseños experimentales dificulta comparar los datos.

Aunque tras el tratamiento agudo con leptina se redujo la expresión de *FNDC5* en el tejido adiposo marrón (*Figura 88a*), no se observaron diferencias en los niveles de expresión del ARNm de *UCP1* en este tejido (*Figura 88b*). Sivitz *et al.* observaron que los efectos de la leptina sobre los niveles de ARNm y proteína de *UCP1* pueden no concordar (356), por lo que no podemos descartar que los niveles de ARNm y proteína de *UCP1* tras el tratamiento con leptina sean diferentes.

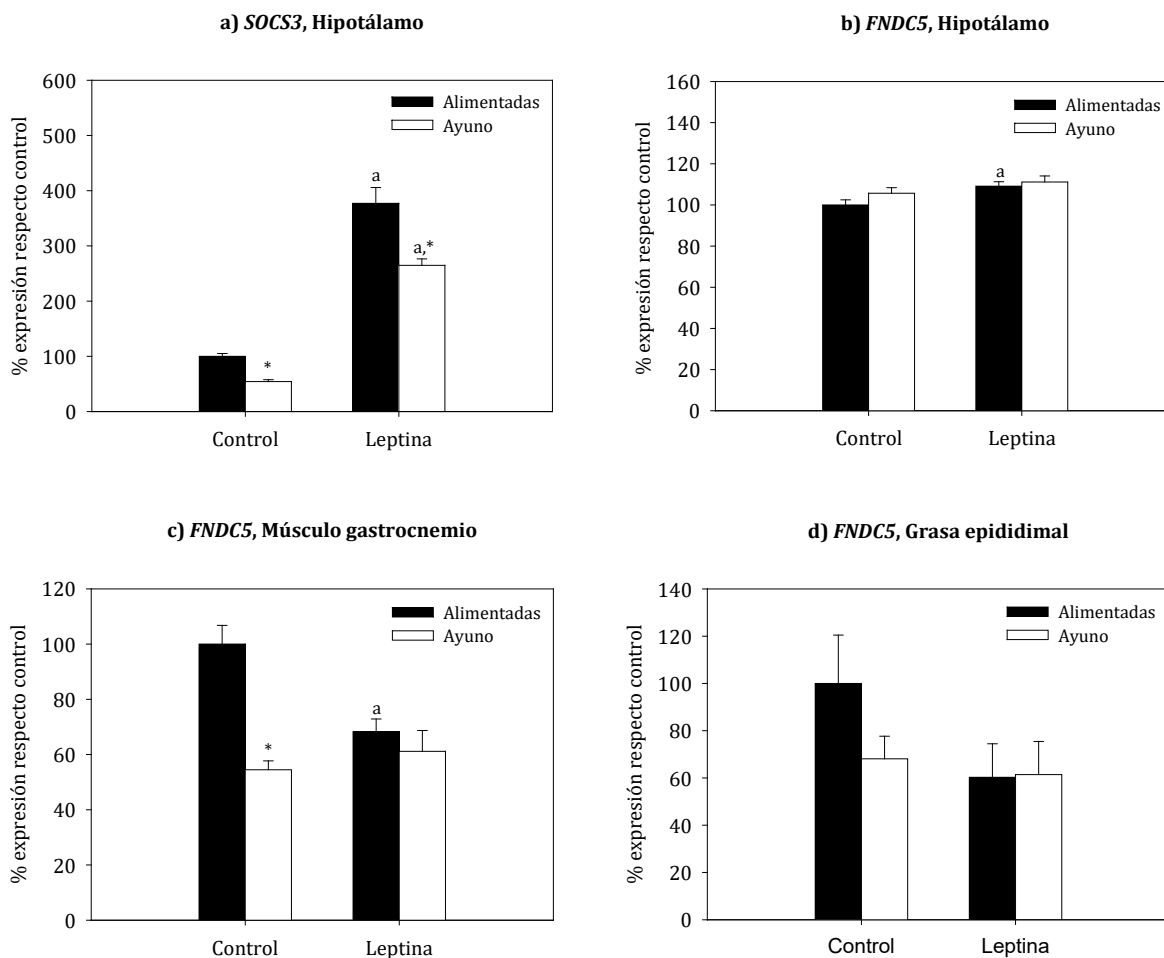


**Figura 88.** Efecto de dos inyecciones IP de leptina (1 cada 24 h) sobre los niveles de expresión del ARNm de *FNDC5* y *UCP1* en BAT (a y b, respectivamente). Los valores se expresan como unidades arbitrarias  $\pm$  el error; donde control  $\equiv$  100 %. Diferentes símbolos sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas, \* $p < 0.05$  vs. control (salino), test *t-student*. N= 6-7 para todos los grupos. Datos normalizados respecto a *HPRT*.

En vista de los resultados anteriores, también nos propusimos comprobar si además la leptina era o no capaz de regular la expresión del ARNm de *FNDC5* y los niveles de irisina circulantes de manera dependiente de la nutrición para lo que se repitió el experimento anterior empleando ratas alimentadas y ratas sometidas a ayuno.

Los niveles de expresión génica de *SOCS3* en el hipotálamo incrementaron en todos los animales tratados con leptina y disminuyeron con el ayuno (*Figura 89a*). Al igual que en

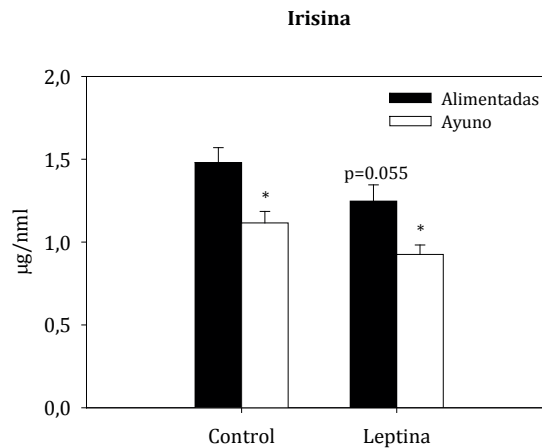
el experimento anterior, los niveles de expresión del ARNm de *FNDC5* disminuyeron en el músculo de animales tratados con leptina (Figura 89c), aunque este efecto desapareció con el ayuno, sugiriendo que la leptina periférica regula la expresión de *FNDC5* a nivel central y periférico de forma dependiente del estado nutricional. Efectos similares se observaron en el hipotálamo (Figura 89b), donde los niveles de expresión de *FNDC5* incrementaron en los animales alimentados tratados con leptina, efecto que no se observó en animales sometidos a ayuno. Mientras que en el tejido adiposo epididimal (Figura 89d) no se detectaron cambios.



**Figura 89.** Efecto de dos inyecciones IP de leptina (1 cada 24 h) en animales alimentados y sometidos a ayuno durante 48 h sobre los niveles expresión de expresión génica de *SOCS3* en hipotálamo (a), *FNDC5* en hipotálamo (b), músculo gastrocnemio (c) y *WAT* epididimal (d). Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error, donde el control alimentadas  $\equiv$  100 %. Letra "a" sobre las barras indica diferencias estadísticamente significativas por el tratamiento con leptina dentro de cada grupo de alimentación y símbolos distintos por la alimentación dentro de cada tratamiento (ANOVA de una vía, test *post hoc* de Tukey). Para  $p < 0.05$  se consideraron diferencias estadísticamente significativas.  $N = 6-7$  para todos los grupos. Datos normalizados respecto a *HPRT*.

Se detectaron diferencias estadísticamente significativas sobre el efecto del ayuno en los niveles de irisina circulante, mientras que no se observaron con la interacción entre el tratamiento con leptina y el estado nutricional (Figura 90). Cabe destacar que los niveles circulantes detectados en los animales alimentados tratados con leptina en este apartado

son similares a los obtenidos en los animales sometidos a ayuno analizados anteriormente (Figura 83).



**Figura 90.** Efecto de dos inyecciones IP de leptina (1 cada 24 h) en animales alimentados y sometidos a ayuno durante 48 h sobre los niveles plasmáticos de irisina. Los datos se expresan como la media ± el error, donde el control alimentadas ≡ 100 %. Símbolos distintos sobre las barras indican diferencias por la alimentación dentro de cada tratamiento (ANOVA de una vía, test *post hoc* de Tukey). Para  $p < 0.05$  se consideraron diferencias estadísticamente significativas. N= 6-7 para todos los grupos.

### 5.3.4 Efectos de la insulina y metformina sobre la expresión génica de *FNDC5* y los niveles circulantes de irisina en ratas.

Para estudiar una posible relación entre la insulina y la irisina se planteó la evaluación del impacto de la insulina y sensibilizadores de la insulina como la metformina en la expresión del ARNm de *FNDC5* y los niveles de irisina circulante en plasma.

Las inyecciones de insulina y metformina disminuyeron los niveles de glucosa demostrando su eficacia (Tabla 45). Los niveles de triglicéridos disminuyeron con ambos tratamientos, aunque solo se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el grupo sometido al tratamiento con insulina respecto el control (Tabla 45).

	Glucosa (mg/dl)	Triglicéridos (mg/dl)
Control	131,8 ± 4,7 a	116,6 ± 6,5 a
Metformina	91,0 ± 11,5 b	97,5 ± 10,5 a,b
Insulina	70,5 ± 10,5 c	69,76 ± 4,84 b

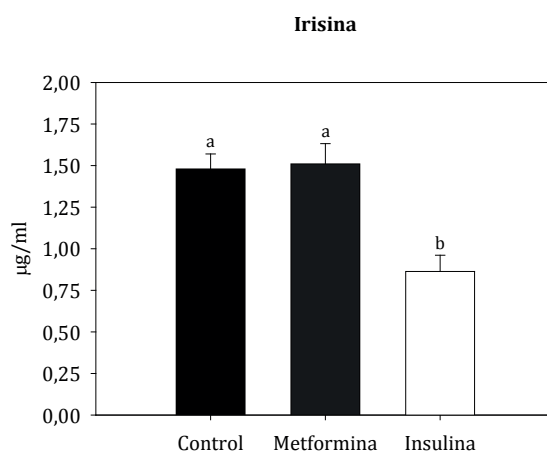
**Tabla 45.** Efectos del tratamiento con salino e insulina IP durante 14 días y metformina subcutánea sobre los niveles plasmáticos de glucosa, triglicéridos e insulina. Los datos se expresan como la media ± el error. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de una vía, test *post hoc* de Tukey). Para  $p < 0.05$  se consideraron diferencias estadísticamente significativas. N= 6-8 para todos los grupos.

Tal y como se muestra en la *Tabla 46*, los tratamientos con insulina y metformina provocaron una menor ganancia de peso corporal respecto al grupo control (especialmente el tratamiento con metformina). Los índices somáticos de grasa epididimal y visceral se mantuvieron sin cambios en los animales tratados con insulina, mientras que disminuyó el índice hepatosomático. Por otro lado, la metformina provocó un descenso en el índice somático de grasa epididimal respecto al grupo control y al grupo de animales tratados con insulina.

	Ganancia peso corporal (g)	Índice Hepatosomático (%)	Índice somático Grasa epididimal (%)	Índice somático Grasa visceral (%)
<b>Control</b>	50,0 ± 1,8 a	3,5 ± 0,1 a	1,57 ± 0,09 a	1,0 ± 0,06
<b>Metformina</b>	20,7 ± 7,4 b	3,3 ± 0,2 a,b	1,20 ± 0,03 b	0,9 ± 0,06
<b>Insulina</b>	41,4 ± 1,6 c	3,0 ± 0,1 b	1,63 ± 0,12 a	1,0 ± 0,04

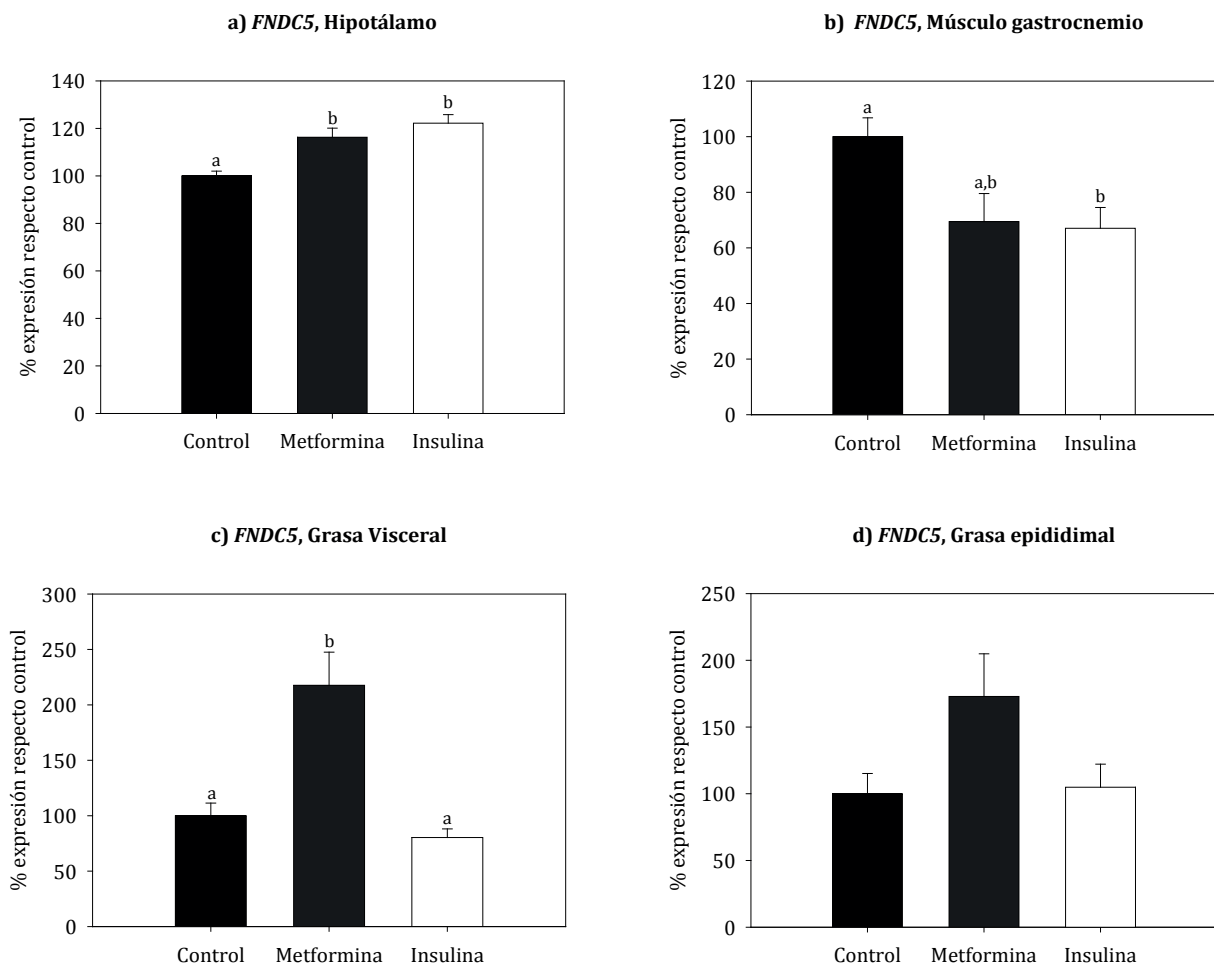
**Tabla 46.** Efectos del tratamiento con salino e insulina IP durante 14 días y metformina subcutánea sobre la ganancia de peso corporal e índices somáticos. Los datos se expresan como la media ± el error. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de una vía, test *post hoc* de Tukey). Para  $p < 0.05$  se consideraron diferencias estadísticamente significativas. N= 6-8 para todos los grupos.

Con respecto a los niveles circulantes de irisina en plasma, disminuyeron en los animales tratados con insulina, tal y como se muestra en la *Figura 91*.



**Figura 91.** Efectos del tratamiento con salino (control) e insulina IP durante 14 días y metformina subcutánea sobre los niveles plasmáticos de irisina. Los datos se expresan como la media ± el error. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de una vía, test *post hoc* de Tukey). Para  $p < 0.05$  se consideraron diferencias estadísticamente significativas. N= 6-8 para todos los grupos.

A nivel hipotalámico, los niveles de expresión del ARNm de *FNDC5* incrementaron con los tratamientos de insulina y metformina (Figura 92a). Si nos fijamos en los resultados obtenidos a nivel periférico, los niveles de expresión génica de *FNDC5*, disminuyeron en el músculo gastrocnemio tras el tratamiento con insulina y con metformina con respecto al grupo control, si bien con metformina las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 92b). En el tejido adiposo visceral se observó un aumento tras el tratamiento con metformina (Figura 92c) y el mismo patrón en el tejido adiposo epididimal aunque en este caso las diferencias, nuevamente no fueron estadísticamente significativas (Figura 92d).



**Figura 92.** Efectos del tratamiento con metformina e insulina subcutánea durante 14 días sobre los niveles de expresión del ARNm de *FNDC5* en el hipotálamo (a) músculo gastrocnemio (b), grasa visceral (c) y *WAT* epididimal (d). Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error, donde el control  $\equiv$  100 %. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de una vía, test *post hoc* de Tukey). Para  $p < 0.05$  se consideraron diferencias estadísticamente significativas.  $N = 6-8$  para todos los grupos. Datos normalizados respecto a *HPRT*.

Estudios recientes en ratones, demostraron que la metformina promueve la expresión génica de *FNDC5* y la secreción de irisina del músculo esquelético (357, 358), resultados que fueron discrepantes con los obtenidos en este estudio. Nosotros hemos mostrado que

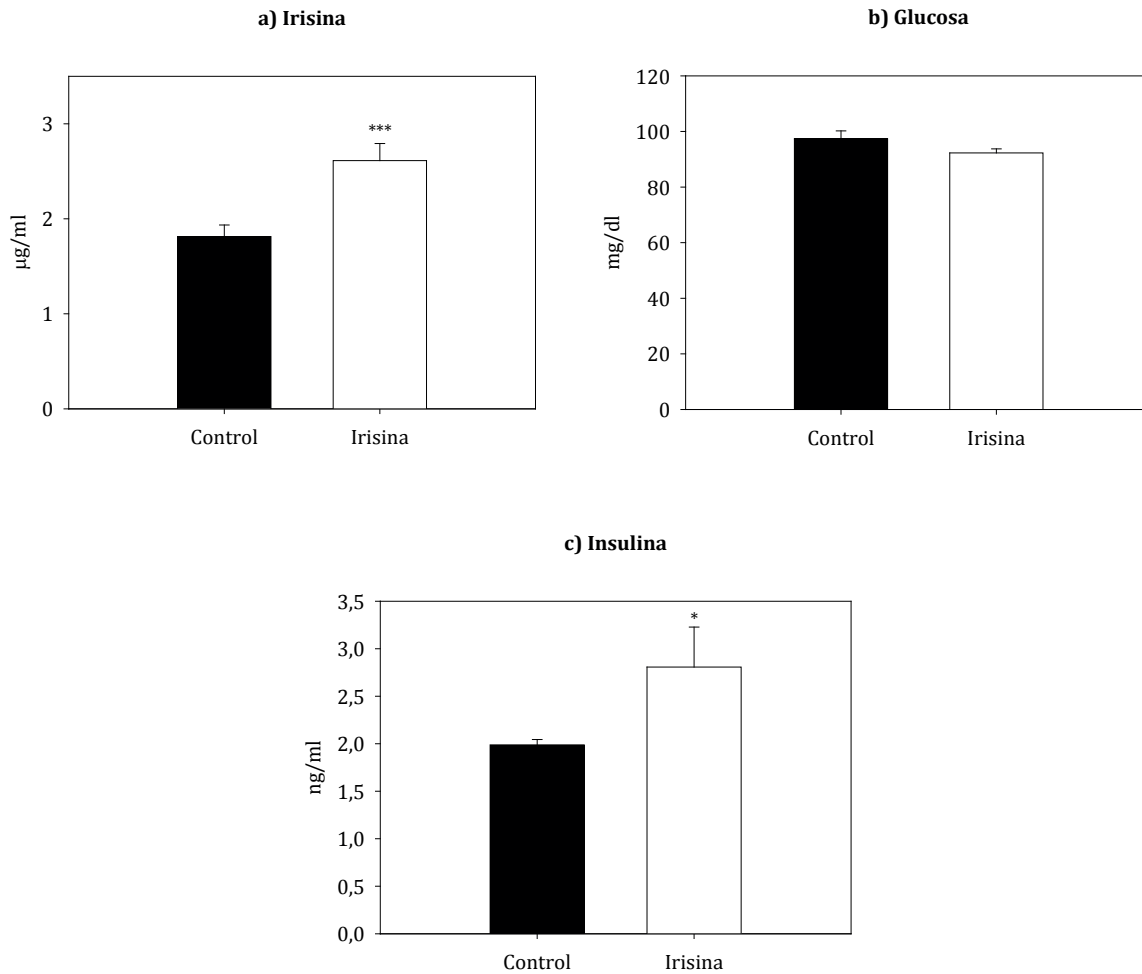
el tratamiento con metformina provoca en un descenso tanto del peso corporal como de la ganancia de masa grasa (*Tabla 46*), mientras que los trabajos mencionados, no observaron variaciones en el peso corporal de ratones tratados con metformina, estas diferencias en los cambios en el peso corporal podrían explicar las discordancias encontradas. Es plausible que el descenso que nosotros observamos en la expresión génica muscular de *FNDC5* se deba en gran parte al descenso en la ingesta que mostraron estos animales (*datos no mostrados*) y por lo tanto al descenso en el peso corporal más que al propio tratamiento con metformina. Sin embargo, autores como Li *et al.* demostraron que tras un tratamiento con metformina durante 6 meses, había un descenso significativo en el porcentaje de masa grasa, peso corporal e irisina circulante en mujeres con síndrome de ovarios poliquísticos (359). Para poder esclarecer este punto son necesarios más estudios.

### **5.3.5 Efectos de la irisina sobre los niveles circulantes de insulina y glucosa en ratas con alimentación normal.**

Para obtener más información sobre la relación o posible relación entre la irisina y la insulina, llevamos a cabo un experimento con un enfoque contrario al anterior. Esta vez inyectamos irisina recombinante a ratas macho adultas alimentadas y comprobamos si se alteraban los niveles de glucosa e insulina circulantes. Tras el tratamiento, lo primero que hicimos fue comprobar que efectivamente habíamos logrado un aumento fisiológico en los niveles circulantes de irisina (*Figura 93a*).

Una vez demostrada la eficacia del tratamiento, analizamos los niveles de glucosa e insulina en plasma (*Figura 93b* y *Figura 93c* respectivamente), observando que los valores de insulina aumentaron tras el tratamiento agudo con irisina mientras que los niveles de glucosa no se vieron alterados, si bien hubo un ligero descenso que no llegó a ser estadísticamente significativo.





**Figura 93** Efecto de la irisina IP durante 2 días sobre los niveles circulantes de irisina (a), glucosa (b) e insulina (c) en ratas macho alimentadas. Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error donde el control  $\equiv$  100 %. Símbolos sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas (test *t-student*). \* y \*\*\*  $p < 0.05$  y  $p < 0.001$  vs. control (salino) respectivamente. N= 7-8 para todos los grupos.

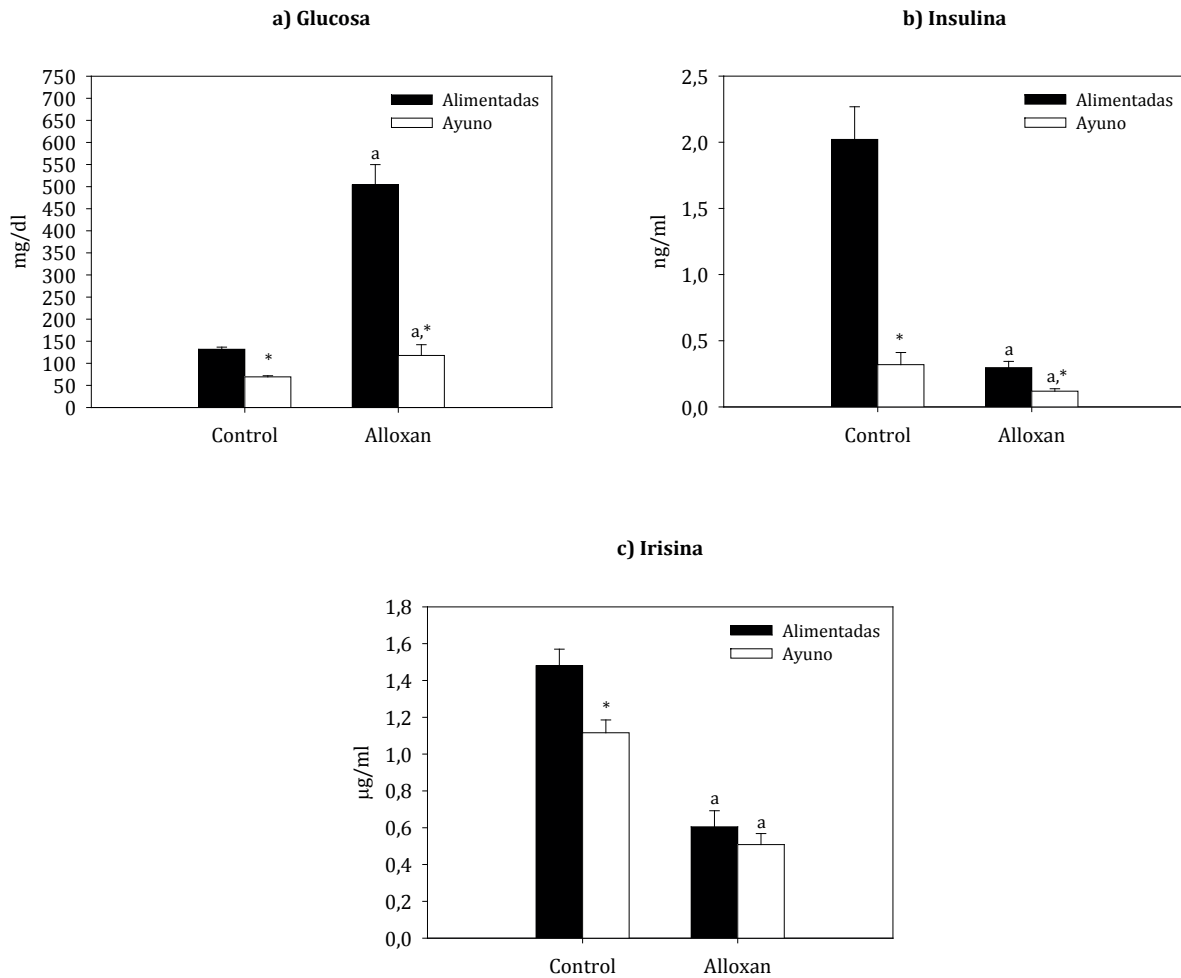
Este aumento de los niveles de insulina circulante por acción de la irisina exógena demostró la existencia de una relación entre la irisina y la producción de insulina. Además, en los estudios realizados en los que se analizaron diferentes situaciones en las que los niveles de insulina eran bajos, como durante el ayuno y RC, incluyendo además los tratamientos con leptina, alloxan, metformina o insulina (los cuáles disminuyeron la producción de insulina endógena) se detectó una asociación con una reducción en la expresión génica de *FNDC5* en el músculo pero también en la mayoría de los casos con una reducción de los niveles circulantes de irisina. Estos resultados coinciden con un estudio previo en el que sus autores demostraron que las concentraciones de irisina en suero eran bajas en pacientes con *T2DM* (351, 360) e incrementan tras el tratamiento continuado con insulina subcutánea (351). Sin embargo, numerosos estudios han revelado una asociación positiva entre *FNDC5*/irisina y

la resistencia a insulina, especulándose sobre el efecto negativo de desensibilización de la acción de la insulina por la irisina (101, 103, 361), los resultados aquí presentados apoyan la relación entre la producción de insulina y los niveles circulantes de irisina. También existen datos de experimentos a largo plazo en ratas en los que inyectaron irisina intracerebroventricular y observaron un descenso en los niveles de colesterol y triglicéridos y un aumento en los niveles de glucosa; curiosamente, también detectaron un incremento de la ingesta sin un aumento significativo del peso corporal (362), datos que en nuestro caso no pudimos corroborar/comparar por realizar un tratamiento IP de irisina y además a corto plazo.

### **5.3.6 Efectos de la diabetes sobre los niveles de expresión génica de *FNDC5* y los niveles circulantes de irisina en ratas alimentadas y sometidas a ayuno.**

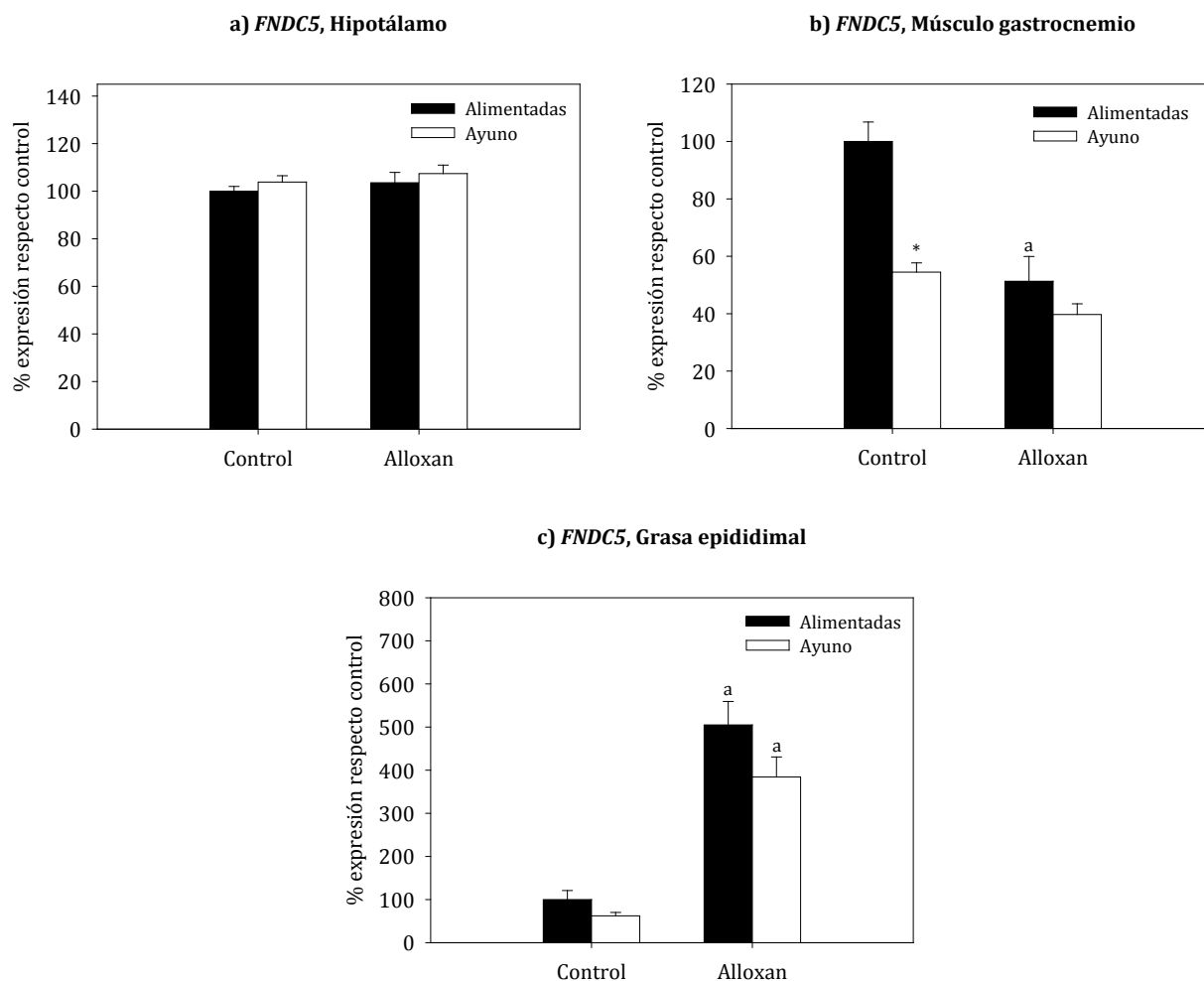
Puesto que los experimentos anteriores sugirieron una relación entre la insulina y la irisina, decidimos ahondar en esta relación. Para ello estudiamos los efectos de la diabetes sobre los niveles de expresión génica de *FNDC5* y los niveles circulantes de irisina, induciendo diabetes en ratas macho *Wistar* adultas. Llevamos a cabo dos grupos de experimentos, en el primero de ellos inducimos la diabetes con alloxan y una vez que ésta estuvo completamente insaturada (valores de glucosa superiores a 260 mg/dl), sometimos a parte de los animales a ayuno para ver si el descenso en los niveles de glucosa alteraba los resultados de la diabetes. En el segundo grupo de experimentos, una vez establecida la diabetes, parte de los animales se trataron con insulina hasta que los valores de glucosa se mantuvieron estables por debajo de los 150 mg/dl.

En el primer grupo de experimentos tal y como se esperaba, los niveles de glucosa en sangre tanto en ratas alimentadas como sometidas a ayuno, fueron superiores en los animales tratados con alloxan comparados con sus controles, y además el ayuno disminuyó significativamente los niveles de glucosa en plasma de las ratas diabéticas (*Figura 94a*). Los niveles de insulina disminuyeron de forma considerable tras el tratamiento con alloxan y con el ayuno (*Figura 94b*). En cuanto a los niveles de irisina en plasma, disminuyeron tras el tratamiento con alloxan tanto en animales alimentados como sometidos a ayuno respecto a sus controles; además, el ayuno también se asoció con la reducción de los niveles de irisina circulante en los animales control (*Figura 94c*) confirmando los datos obtenidos en experimentos previos con ayuno.



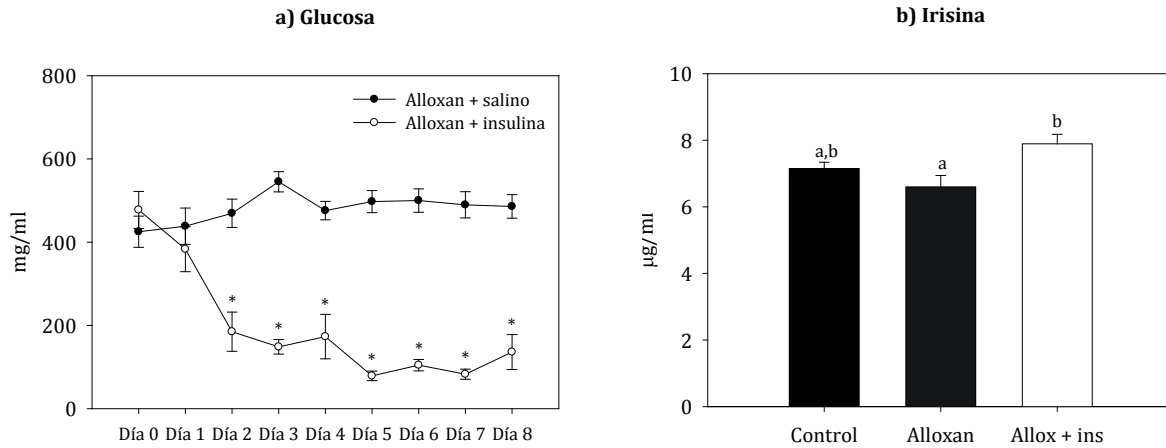
**Figura 94.** Efectos de la diabetes inducida por una inyección de alloxan en ratas alimentadas y sometidas a ayuno durante 48 h sobre los niveles de glucosa (a), insulina (b) e irisina (c) en plasma. Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error, donde el control alimentadas  $\equiv$  100 %. Letra “a” sobre las barras indica diferencias estadísticamente significativas por el tratamiento con alloxan dentro de cada grupo de alimentación y \* por la alimentación dentro de cada tratamiento (ANOVA de una vía, test *post hoc* de Tukey). Para  $p < 0.05$  se consideraron diferencias estadísticamente significativas. N= 8-10 para todos los grupos.

Independientemente del estado nutricional, la diabetes no provocó ningún tipo de alteración en los niveles de expresión de *FNDC5* en el hipotálamo tal y como puede verse en la *Figura 95a*, mientras que en músculo tanto el tratamiento con alloxan como el ayuno (aunque en este último caso sólo en las ratas control) disminuyeron su expresión (*Figura 95b*). Sin embargo, en el tejido adiposo epididimal, los niveles de expresión del ARNm de *FNDC5* aumentaron con el tratamiento con alloxan tanto en ratas alimentadas como sometidas a ayuno (*Figura 95c*).



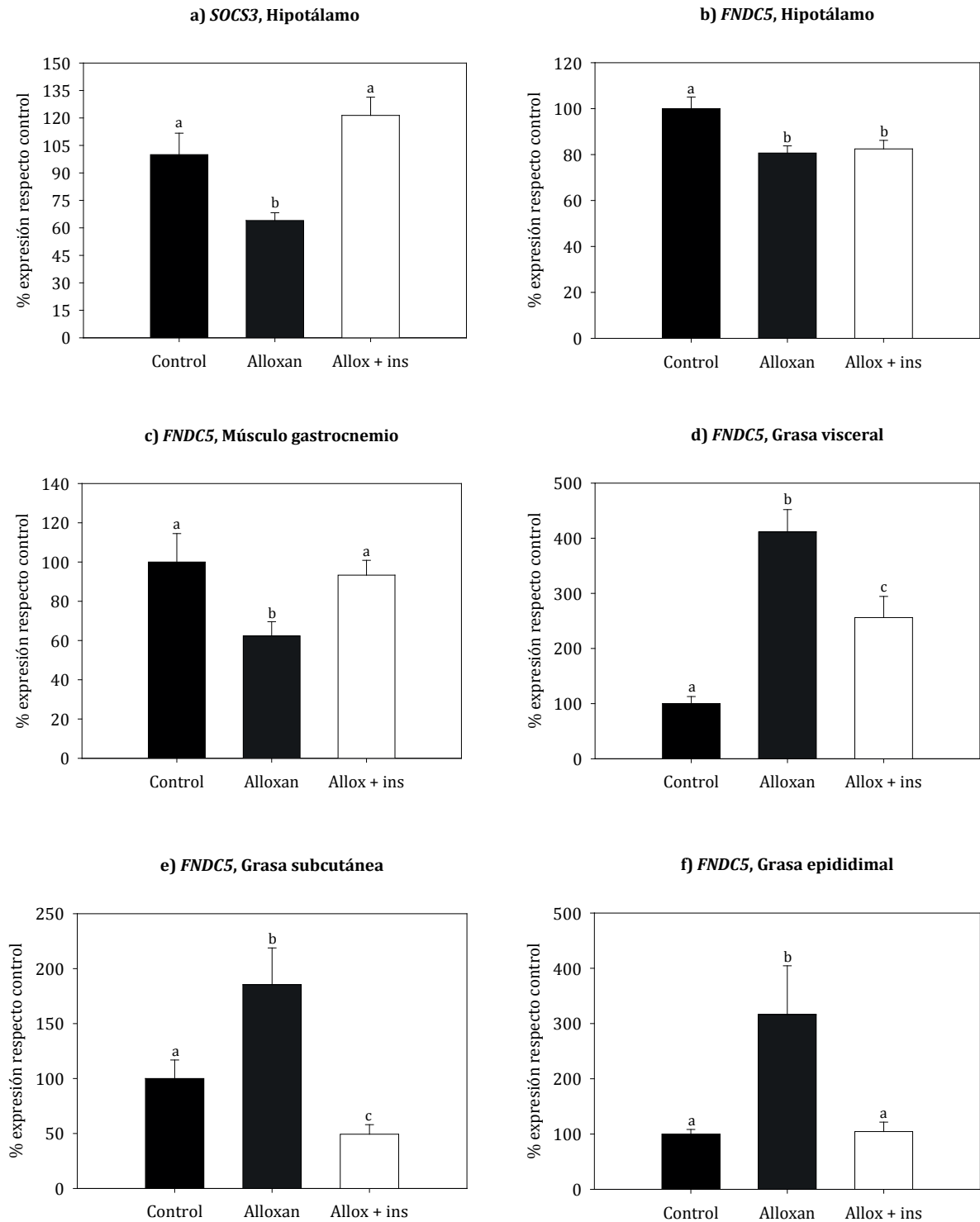
**Figura 95.** Efectos de la diabetes inducida por una inyección de alloxan en ratas alimentadas y sometidas a ayuno durante 48 h sobre los niveles de expresión del ARNm de *FND5* en hipotálamo (a), músculo gastrocnemio (b) y *WAT* epididimal (c). Los valores se expresan en unidades arbitrarias como unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde el control alimentadas  $\equiv$  100 %. Letra “a” sobre las barras indica diferencias estadísticamente significativas por el tratamiento con alloxan dentro de cada grupo de alimentación y \* por la alimentación dentro de cada tratamiento (ANOVA de una vía, test *post hoc* de Tukey). Para  $p < 0.05$  se consideraron diferencias estadísticamente significativas. N= 8-10 para todos los grupos. Datos normalizados respecto a *HPRT*.

El segundo experimento se llevó a cabo teniendo en cuenta los parámetros que se alteraban en el apartado anterior con el alloxán, decidiéndose testar si éstos podían ser revertidos con un tratamiento de insulina para mantener los niveles de glucosa circulante lo más próximo posible a la normogluemia. Tal y como se muestra en la *Figura 96a*, el tratamiento con alloxan indujo un aumento en los niveles de glucosa 9 días después de la inyección (día 0), sin embargo, tras el tratamiento con insulina, se observó un descenso significativo en los niveles de glucosa ya a las 48 h de comenzar el tratamiento y a los 5 días se alcanzan valores de normogluemia, que se mantuvieron hasta el sacrificio de los animales. En la *Figura 96b* no se observaron cambios en los niveles de irisina en plasma de los animales tratados con alloxan respecto al grupo control, sin embargo tenían niveles inferiores que las ratas tratadas con insulina.



**Figura 96.** Efecto del tratamiento de ratas macho diabéticas usando insulina *NPH* (9,5 UI/día) durante 8 días sobre los niveles plasmáticos de glucosa (a) e irisina (b). Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error para la glucosa y como la media en unidades arbitrarias para la irisina, donde el control  $\equiv$  100 %. Letras y símbolos distintos sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de una vía, test *post hoc* de Tukey). Para  $p < 0.05$  se consideraron diferencias estadísticamente significativas.  $N = 8$  para todos los grupos.

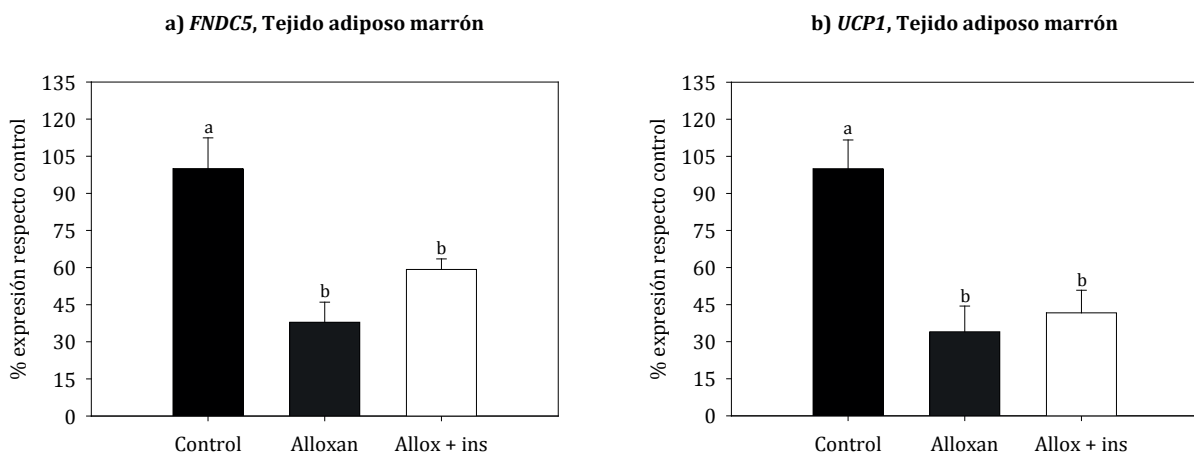
La expresión del ARNm de *SOCS3* y *FNDC5* en el hipotálamo (*Figura 97a* y *Figura 97b* respectivamente) descendió en las ratas diabéticas, además, los niveles de expresión del ARNm de *SOCS3* fueron revertidos con el tratamiento con insulina mientras que los de *FNDC5* no. En el músculo esquelético la expresión de *FNDC5* descendió en ratas diabéticas y se alcanzaron valores similares a los del grupo control tras el tratamiento con insulina (*Figura 97c*). Mientras que en todos los depósitos de *WAT* estudiado, los niveles de expresión de *FNDC5* aumentaron con la diabetes y descendieron de forma significativa (incluso por debajo de los niveles del grupo control) tras el tratamiento con insulina (*Figura 97d-f*).



**Figura 97.** Efecto del tratamiento de ratas macho diabéticas usando insulina *NPH* (9,5 UI/día) durante 8 días sobre los niveles de expresión del ARNm de *SOCS3* y *FNDC5* en hipotálamo (a y b respectivamente), *FNDC5* en músculo gastrocnemio (c), *FNDC5* en grasa visceral (d), *FNDC5* en grasa subcutánea (e) y *FNDC5* en grasa epididimal (f). Los datos se expresan como unidades arbitrarias  $\pm$  el error, donde el control  $\equiv$  100 %. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de una vía, test *post hoc* de Tukey). Para  $p < 0.05$  se consideraron diferencias estadísticamente significativas.  $N = 8$  para todos los grupos. Datos normalizados respecto a *HPRT*.

El descenso en el nivel de expresión génica de *FNDC5* en músculo gastrocnemio (*Figura 97c*) y el incremento en todos los depósitos de *WAT* en ratas diabéticas (*Figura 97d-f*) asociado con un descenso significativo en su masa grasa nos hace pensar que los niveles circulantes de irisina son un reflejo de la combinación de la irisina procedente de varios depósitos grasos y músculo, y que cuando el porcentaje de *WAT* disminuye de forma acentuada, los niveles de *FNDC5* incrementan en estos depósitos probablemente en un intento de compensar la pérdida de tejido, lo cual, podría explicar varias de las discrepancias observadas entre los niveles de insulina y los de *FNDC5*/irisina, como el tratamiento de metformina realizado en los experimentos anteriores o la RC a largo plazo, por tanto, estos niveles circulantes no serían únicamente un reflejo de la masa muscular como proponen otros autores (101, 361), ya que su producción no está limitada exclusivamente a este tejido.

En el *BAT* de ratas diabéticas, tanto los niveles de expresión génica de *FNDC5* como de *UCP1* disminuyeron y además no se consiguieron restaurar en ningún caso tras el tratamiento con insulina (*Figura 97a-b*), reforzando la hipótesis de que *UCP1* y *FNDC5* estarían relacionados.



**Figura 97.** Efecto del tratamiento de ratas macho diabéticas usando insulina *NPH* (9,5 UI/día) durante 8 días sobre los niveles de expresión de *FNDC5* y *UCP1*(a y b respectivamente) en *BAT*. Los datos se expresan como la media en unidades arbitrarias  $\pm$  el error donde el control  $\equiv$  100 %. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de una vía, test *post hoc* de Tukey). Para  $p < 0.05$  se consideraron diferencias estadísticamente significativas.  $N = 8$  para todos los grupos. Datos normalizados respecto a *HPRT*.

Este descenso de los niveles de expresión de *FNDC5* en el *BAT* con el tratamiento con alloxán, podría ser explicado por una reducción de la capacidad termogénica del tejido adiposo marrón; esta capacidad termogénica, como se ha descrito en otros estudios con modelos animales, disminuye en situaciones con deficiencia crónica de insulina (362, 364).

Es importante destacar, que siguen existiendo dudas y limitaciones respecto a la irisina

circulante y que no podemos descartar que el ensayo de *ELISA* empleado para analizar los niveles de irisina circulante detecte señales falsas de proteínas cruzadas. Autores como Jedrychowski *et al.* emplearon espectrometría de masas en tándem para demostrar que la irisina humana existe, es circulante y está regulada por el ejercicio (algo que incluso se llegó a cuestionar hace unos años) (108) y realizaron *immunoblots* de irisina con muestras de plasma usando un anticuerpo policlonal de la misma casa comercial que el *ELISA* empleado para la realización de nuestros estudios, detectando en su caso una banda de aproximadamente 12 kDa (tamaño predicho para el polipéptido irisina), sugiriendo que ese anticuerpo funcionaba correctamente y detectaba por tanto la irisina (108), sin embargo las dudas acerca de los anticuerpos existentes para la detección de irisina no han dejado de producirse a lo largo del desarrollo de la presente tesis doctoral, lo cual no puede ser obviado. Una de las fortalezas de los resultados aquí mostrados es que varios de los experimentos, como el del ayuno y los tratamientos con leptina y alloxan, se repitieron y los resultados fueron reproducibles para la expresión génica de *FNDC5* y los niveles de irisina en suero, con la rara excepción de los experimentos llevados a cabo con alloxan, aunque esto último podría ser explicado por la duración diferente entre los dos tratamientos de alloxan.



## **6. Conclusions**



## 6. Conclusions

The conclusions derived from this thesis are divided into the three main objectives to facilitate their compression and reading:

Objective 1 conclusions: Identify possible deregulated miRs during obesity and/or metabolic syndrome and its possible role in adipogenesis.

- 1) Through the use of computer algorithms, *miR-19a*, *miR-19b*, *miR-141* and *miR-200c* have been identified as miRs with potential targets that are altered during obesity.
- 2) *MIR-19* family, as well as the *miR-141/200c* cluster negatively regulate the adipogenesis in 3T3-L1 cells, inhibiting the proadipogenic transcription factors such as *PPAR $\gamma$* . The members of these families present increased values during morbid obesity in humans, probably due to a compensatory effect that disappears after the body weight normalization.
- 3) The expression pattern of the rat miRs studied in serum under the effect of different diets, does not correlate either with the percentage of fat mass nor the expression pattern observed in the different tissues analyzed.

Objective 2 conclusions: Study and compare the human proteomic profile of subcutaneous fat during the morbid obesity stage and after weight loss induced by bariatric surgery.

- 1) The proteomic profile, both qualitative and quantitative, changes in obese subjects after weight loss. Increasing the expression of proteins related to the insulin secretion/signaling and proteins involved in intermediate metabolism pathways such as the Krebs cycle or *de novo* lipogenesis, and decreasing proteins involved in inflammatory processes among others.
- 2) Through Western blot, we have been able to validate some of the proteomics results, demonstrating that *de novo* lipogenesis and that the insulin signaling pathway are diminished during morbid obesity and that bariatric surgery completely restores these alterations, demonstrating the efficacy of this type of surgery in the improvement of the obese patients metabolic profile.
- 3) At gene level, we corroborate a decrease in insulin sensitivity during the morbid obesity evidenced by a decrease in the *GLUT4* expression levels, as well as, the negative regulation of *de novo* lipogenesis by a decrease in the *FAS* expression levels, regardless of sex, medication and pathologies, recovering their normal values after the body fat mass lost.

Objective 3 conclusions:

- 1) The higher *FNDC5* expression levels are observed in muscle, brain and the neuroendocrine axis, also lower but quantifiable levels are observed in different white adipose tissue depots, liver and kidney.
- 2) The hypothalamus *FNDC5* gene expression does not change with any of the tested diets, suggesting that its regulation does not depend on feeding. While at peripheral level, under the tested diets, there are differences in the *FNDC5* expression depending on the adipose tissue depot analyzed; when the amount of one of these depots considerably decreases, the *FNDC5* mRNA expression increased probably as a compensatory effect.
- 3) Leptin, insulin and diabetes, cause different effects on the *FNDC5* gene expression at central and peripheral level.
- 4) The circulating irisin is able to exert an effect on the production of insulin and it is suggested that the combined *FNDC5* expression of the different adipose tissue depots and skeletal muscle, correlates with irisin circulating levels.

## **7. Bibliografía**



## 7. Bibliografía

1. Yang WM, Min KH, Lee W. Induction of miR-96 by Dietary Saturated Fatty Acids Exacerbates Hepatic Insulin Resistance through the Suppression of INSR and IRS-1. *PloS one*. 2016;11(12):e0169039.
2. Yang WM, Min KH, Lee W. MicroRNA expression analysis in the liver of high fat diet-induced obese mice. *Data in brief*. 2016;9:1155-9.
3. Schwartz MW, Seeley RJ, Zeltser LM, Drewnowski A, Ravussin E, Redman LM, et al. Obesity Pathogenesis: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine reviews*. 2017;38(1):267-96.
4. Afshin A, Forouzanfar MH, Reitsma MB, Sur P, Estep K, Lee A, et al. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *The New England journal of medicine*. 2017;377(1):13-27.
5. Aune D, Sen A, Schlesinger S, Norat T, Janszky I, Romundstad P, et al. Body mass index, abdominal fatness, fat mass and the risk of atrial fibrillation: a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *European journal of epidemiology*. 2017.
6. Masters RK, Reither EN, Powers DA, Yang YC, Burger AE, Link BG. The impact of obesity on US mortality levels: the importance of age and cohort factors in population estimates. *American journal of public health*. 2013;103(10):1895-901.
7. Fontaine KR, Barofsky I. Obesity and health-related quality of life. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2001;2(3):173-82.
8. Kelly T, Yang W, Chen CS, Reynolds K, He J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *International journal of obesity*. 2008;32(9):1431-7.
9. Yach D, Stuckler D, Brownell KD. Epidemiologic and economic consequences of the global epidemics of obesity and diabetes. *Nature medicine*. 2006;12(1):62-6.
10. Finkelstein EA, Khavjou OA, Thompson H, Trogdon JG, Pan L, Sherry B, et al. Obesity and severe obesity forecasts through 2030. *American journal of preventive medicine*. 2012;42(6):563-70.
11. Havel PJ. Role of adipose tissue in body-weight regulation: mechanisms regulating leptin production and energy balance. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2000;59(3):359-71.

12. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*. 2006;443(7109):289-95.
13. Maclean PS, Bergouignan A, Cornier MA, Jackman MR. Biology's response to dieting: the impetus for weight regain. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2011;301(3):R581-600.
14. Purcell SA, Elliott SA, Kroenke CH, Sawyer MB, Prado CM. Impact of Body Weight and Body Composition on Ovarian Cancer Prognosis. *Current oncology reports*. 2016;18(2):8.
15. OMS. Datos sobre la obesidad. 2018 [el 06 de Agosto de 2018]. Available from: <http://www.who.int/features/factfiles/obesity/facts/es/>.
16. SEEDO. Cálculo del IMC Madrid2018 [cited 2018 06 de Agosto]. Available from: <https://www.seedo.es/index.php/pacientes/calculo-imc>.
17. Klein S, Allison DB, Heymsfield SB, Kelley DE, Leibel RL, Nonas C, et al. Waist Circumference and Cardiometabolic Risk: a Consensus Statement from Shaping America's Health: Association for Weight Management and Obesity Prevention; NAASO, the Obesity Society; the American Society for Nutrition; and the American Diabetes Association. *Obesity*. 2007;15(5):1061-7.
18. Steinbrook R. Surgery for severe obesity. *The New England journal of medicine*. 2004;350(11):1075-9.
19. Lee WJ, Wang W. Bariatric surgery: Asia-Pacific perspective. *Obesity surgery*. 2005;15(6):751-7.
20. Angrisani L, Santonicola A, Iovino P, Formisano G, Buchwald H, Scopinaro N. Bariatric Surgery Worldwide 2013. *Obesity surgery*. 2015;25(10):1822-32.
21. Longitudinal Assessment of Bariatric Surgery C, Flum DR, Belle SH, King WC, Wahed AS, Berk P, et al. Perioperative safety in the longitudinal assessment of bariatric surgery. *The New England journal of medicine*. 2009;361(5):445-54.
22. English WJ, Williams DB. Metabolic and Bariatric Surgery: An Effective Treatment Option for Obesity and Cardiovascular Disease. *Progress in cardiovascular diseases*. 2018.
23. Albaugh VL, Flynn CR, Tamboli RA, Abumrad NN. Recent advances in metabolic and bariatric surgery. *F1000Research*. 2016;5.
24. le Roux CW, Aylwin SJ, Batterham RL, Borg CM, Coyle F, Prasad V, et al. Gut hormone profiles following bariatric surgery favor an anorectic state, facilitate weight loss, and improve metabolic parameters. *Annals of surgery*. 2006;243(1):108-14.



25. Papamargaritis D, le Roux CW, Sioka E, Koukoulis G, Tzovaras G, Zacharoulis D. Changes in gut hormone profile and glucose homeostasis after laparoscopic sleeve gastrectomy. *Surgery for obesity and related diseases : official journal of the American Society for Bariatric Surgery*. 2013;9(2):192-201.
26. Peterli R, Steinert RE, Woelnerhanssen B, Peters T, Christoffel-Courtin C, Gass M, et al. Metabolic and hormonal changes after laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy: a randomized, prospective trial. *Obesity surgery*. 2012;22(5):740-8.
27. Aarts EO, Dogan K, Koehestanie P, Aufenacker TJ, Janssen IM, Berends FJ. Long-term results after laparoscopic adjustable gastric banding: a mean fourteen year follow-up study. *Surgery for obesity and related diseases : official journal of the American Society for Bariatric Surgery*. 2014;10(4):633-40.
28. Arapis K, Tammaro P, Parenti LR, Pelletier AL, Chosidow D, Kousouri M, et al. Long-Term Results After Laparoscopic Adjustable Gastric Banding for Morbid Obesity: 18-Year Follow-Up in a Single University Unit. *Obesity surgery*. 2017;27(3):630-40.
29. English WJ, DeMaria EJ, Brethauer SA, Mattar SG, Rosenthal RJ, Morton JM. American Society for Metabolic and Bariatric Surgery estimation of metabolic and bariatric procedures performed in the United States in 2016. *Surgery for obesity and related diseases : official journal of the American Society for Bariatric Surgery*. 2018;14(3):259-63.
30. Sudan R, Maciejewski ML, Wilk AR, Nguyen NT, Ponce J, Morton JM. Comparative effectiveness of primary bariatric operations in the United States. *Surgery for obesity and related diseases : official journal of the American Society for Bariatric Surgery*. 2017;13(5):826-34.
31. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation*. 2003;112(12):1796-808.
32. Thompson D, Karpe F, Lafontan M, Frayn K. Physical activity and exercise in the regulation of human adipose tissue physiology. *Physiological reviews*. 2012;92(1):157-91.
33. Coelho M, Oliveira T, Fernandes R. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Archives of medical science : AMS*. 2013;9(2):191-200.
34. Esteve Rafols M. Adipose tissue: cell heterogeneity and functional diversity. *Endocrinología y nutrición : organo de la Sociedad Espanola de Endocrinología y Nutrición*. 2014;61(2):100-12.

35. Rutkowski JM, Stern JH, Scherer PE. The cell biology of fat expansion. *The Journal of cell biology*. 2015;208(5):501-12.
36. Aldiss P, Betts J, Sale C, Pope M, Symonds ME. Exercise-induced 'browning' of adipose tissues. *Metabolism: clinical and experimental*. 2017.
37. McArdle MA, Finucane OM, Connaughton RM, McMorrow AM, Roche HM. Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies. *Frontiers in endocrinology*. 2013;4:52.
38. Wajchenberg BL, Giannella-Neto D, da Silva ME, Santos RF. Depot-specific hormonal characteristics of subcutaneous and visceral adipose tissue and their relation to the metabolic syndrome. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*. 2002;34(11-12):616-21.
39. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology*. 2004;145(5):2273-82.
40. Sam S, Haffner S, Davidson MH, D'Agostino RB, Sr., Feinstein S, Kondos G, et al. Relation of abdominal fat depots to systemic markers of inflammation in type 2 diabetes. *Diabetes care*. 2009;32(5):932-7.
41. Rytka JM, Wueest S, Schoenle EJ, Konrad D. The portal theory supported by venous drainage-selective fat transplantation. *Diabetes*. 2011;60(1):56-63.
42. Virtue S, Vidal-Puig A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1801(3):338-49.
43. Lee EK, Lee MJ, Abdelmohsen K, Kim W, Kim MM, Srikantan S, et al. miR-130 suppresses adipogenesis by inhibiting peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression. *Molecular and cellular biology*. 2011;31(4):626-38.
44. Bargut TCL, Souza-Mello V, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Browning of white adipose tissue: lessons from experimental models. *Hormone molecular biology and clinical investigation*. 2017;31(1).
45. Sanchez-Gurmaches J, Hung CM, Guertin DA. Emerging Complexities in Adipocyte Origins and Identity. *Trends in cell biology*. 2016;26(5):313-26.
46. Pang T, Benicky J, Wang J, Orecna M, Sanchez-Lemus E, Saavedra JM. Telmisartan ameliorates lipopolysaccharide-induced innate immune response through peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation in human monocytes. *Journal of hypertension*. 2012;30(1):87-96.

47. Paschos P, Paletas K. Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hippokratia*. 2009;13(1):9-19.
48. Williams T. Metabolic Syndrome: Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *FP essentials*. 2015;435:24-9.
49. Asrih M, Jornayvaz FR. Metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease: Is insulin resistance the link? *Molecular and cellular endocrinology*. 2015;418 Pt 1:55-65.
50. Marino L, Jornayvaz FR. Endocrine causes of nonalcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology*. 2015;21(39):11053-76.
51. Jácome JF. Mecanismos cerebrales de la obesidad: Neurociencia y Actividad Física. *Rev Dig RINAD*. 2016;1:20-3.
52. González Hita ME, Ambrosio Macias KG, Sánchez Enríquez S. Regulación neuroendocrina del hambre, la saciedad y mantenimiento del balance energético. *Medigraphic Artemisa en línea*. 2006;8(3):191-200.
53. Al-Hamad D, Raman V. Metabolic syndrome in children and adolescents. *Translational pediatrics*. 2017;6(4):397-407.
54. Stern MP, Williams K, Gonzalez-Villalpando C, Hunt KJ, Haffner SM. Does the metabolic syndrome improve identification of individuals at risk of type 2 diabetes and/or cardiovascular disease? *Diabetes care*. 2004;27(11):2676-81.
55. Moore JX, Chaudhary N, Akinyemiju T. Metabolic Syndrome Prevalence by Race/Ethnicity and Sex in the United States, National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-2012. *Preventing chronic disease*. 2017;14:E24.
56. Mancuso P. The role of adipokines in chronic inflammation. *ImmunoTargets and therapy*. 2016;5:47-56.
57. Canello R, Clement K. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*. 2006;113(10):1141-7.
58. Liu Y, Chen Y, Zhang J, Liu Y, Zhang Y, Su Z. Retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha stimulates adipose tissue inflammation by modulating endoplasmic reticulum stress. *The Journal of biological chemistry*. 2017;292(34):13959-69.
59. Zhang Y, Luo XY, Wu DH, Xu Y. ROR nuclear receptors: structures, related diseases, and drug discovery. *Acta pharmacologica Sinica*. 2015;36(1):71-87.

60. Wang Y, Kumar N, Nuhant P, Cameron MD, Istrate MA, Roush WR, et al. Identification of SR1078, a synthetic agonist for the orphan nuclear receptors RORalpha and RORgamma. *ACS chemical biology*. 2010;5(11):1029-34.
61. Pearen MA, Muscat GE. Orphan nuclear receptors and the regulation of nutrient metabolism: understanding obesity. *Physiology*. 2012;27(3):156-66.
62. Banting FG, Best CH, Collip JB, Campbell WR, Fletcher AA. Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus. *Canadian Medical Association journal*. 1922;12(3):141-6.
63. Fu Z, Gilbert ER, Liu D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Current diabetes reviews*. 2013;9(1):25-53.
64. Kawasaki E. ZnT8 and type 1 diabetes. *Endocrine journal*. 2012;59(7):531-7.
65. Bratanova-Tochkova TK, Cheng H, Daniel S, Gunawardana S, Liu YJ, Mulvaney-Musa J, et al. Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion. *Diabetes*. 2002;51 Suppl 1:S83-90.
66. Kido Y, Nakae J, Accili D. Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001;86(3):972-9.
67. Malakar P, Chartarifsky L, Hija A, Leibowitz G, Glaser B, Dor Y, et al. Insulin receptor alternative splicing is regulated by insulin signaling and modulates beta cell survival. *Scientific reports*. 2016;6:31222.
68. Kahn BB. Lilly lecture 1995. Glucose transport: pivotal step in insulin action. *Diabetes*. 1996;45(11):1644-54.
69. Li MD. Leptin and beyond: an odyssey to the central control of body weight. *The Yale journal of biology and medicine*. 2011;84(1):1-7.
70. Carter S, Caron A, Richard D, Picard F. Role of leptin resistance in the development of obesity in older patients. *Clinical interventions in aging*. 2013;8:829-44.
71. Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *International journal of obesity*. 2002;26:1407.
72. Zhou Y, Rui L. Leptin signaling and leptin resistance. *Frontiers of medicine*. 2013;7(2):207-22.
73. Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annual review of physiology*. 2000;62:413-37.
74. Ahima RS. Revisiting leptin's role in obesity and weight loss. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(7):2380-3.

75. Thon M, Hosoi T, Ozawa K. Possible Integrative Actions of Leptin and Insulin Signaling in the Hypothalamus Targeting Energy Homeostasis. *Frontiers in endocrinology*. 2016;7:138.
76. Gorska E, Popko K, Stelmaszczyk-Emmel A, Ciepiela O, Kucharska A, Wasik M. Leptin receptors. *European journal of medical research*. 2010;15 Suppl 2:50-4.
77. Babon JJ, Yao S, DeSouza DP, Harrison CF, Fabri LJ, Liepinsh E, et al. Secondary structure assignment of mouse SOCS3 by NMR defines the domain boundaries and identifies an unstructured insertion in the SH2 domain. *The FEBS journal*. 2005;272(23):6120-30.
78. Babon JJ, Sabo JK, Soetopo A, Yao S, Bailey MF, Zhang JG, et al. The SOCS box domain of SOCS3: structure and interaction with the elonginBC-cullin5 ubiquitin ligase. *Journal of molecular biology*. 2008;381(4):928-40.
79. Yasukawa H, Nagata T, Oba T, Imaizumi T. SOCS3: A novel therapeutic target for cardioprotection. *Jak-Stat*. 2012;1(4):234-40.
80. Yang Z, Hulver M, McMillan RP, Cai L, Kershaw EE, Yu L, et al. Regulation of insulin and leptin signaling by muscle suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3). *PloS one*. 2012;7(10):e47493.
81. Torisu T, Sato N, Yoshiga D, Kobayashi T, Yoshioka T, Mori H, et al. The dual function of hepatic SOCS3 in insulin resistance in vivo. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 2007;12(2):143-54.
82. Ye J, Zheng R, Wang Q, Liao L, Ying Y, Lu H, et al. Downregulating SOCS3 with siRNA ameliorates insulin signaling and glucose metabolism in hepatocytes of IUGR rats with catch-up growth. *Pediatric research*. 2012;72(6):550-9.
83. Shi H, Cave B, Inouye K, Bjorbaek C, Flier JS. Overexpression of suppressor of cytokine signaling 3 in adipose tissue causes local but not systemic insulin resistance. *Diabetes*. 2006;55(3):699-707.
84. Shi H, Tzameli I, Bjorbaek C, Flier JS. Suppressor of cytokine signaling 3 is a physiological regulator of adipocyte insulin signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(33):34733-40.
85. Jorgensen SB, O'Neill HM, Sylow L, Honeyman J, Hewitt KA, Palanivel R, et al. Deletion of skeletal muscle SOCS3 prevents insulin resistance in obesity. *Diabetes*. 2013;62(1):56-64.
86. Piao L, Park J, Li Y, Shin S, Shin S, Kong G, et al. SOCS3 and SOCS6 are required for the risperidone-mediated inhibition of insulin and leptin signaling in neuroblastoma cells. *International journal of molecular medicine*. 2014;33(5):1364-70.

87. Chen W, Balland E, Cowley MA. Hypothalamic Insulin Resistance in Obesity: Effects on Glucose Homeostasis. *Neuroendocrinology*. 2017;104(4):364-81.
88. Kaur J. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiology research and practice*. 2014;2014:943162.
89. Hardy OT, Czech MP, Corvera S. What causes the insulin resistance underlying obesity? *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*. 2012;19(2):81-7.
90. Samuel VT, Shulman GI. The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *The Journal of clinical investigation*. 2016;126(1):12-22.
91. Kasuga M. Insulin resistance and pancreatic beta cell failure. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(7):1756-60.
92. Avalos-Soriano A, De la Cruz-Cordero R, Rosado JL, Garcia-Gasca T. 4-Hydroxyisoleucine from Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*): Effects on Insulin Resistance Associated with Obesity. *Molecules*. 2016;21(11).
93. Taguchi A, Wartschow LM, White MF. Brain IRS2 signaling coordinates life span and nutrient homeostasis. *Science*. 2007;317(5836):369-72.
94. Hosoi T, Ozawa K. Possible Pharmacological Approach Targeting Endoplasmic Reticulum Stress to Ameliorate Leptin Resistance in Obesity. *Frontiers in endocrinology*. 2016;7:59.
95. Sader S, Nian M, Liu P. Leptin: a novel link between obesity, diabetes, cardiovascular risk, and ventricular hypertrophy. *Circulation*. 2003;108(6):644-6.
96. Pedersen BK. A muscular twist on the fate of fat. *The New England journal of medicine*. 2012;366(16):1544-5.
97. Bostrom P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, et al. A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*. 2012;481(7382):463-8.
98. Mahgoub MO, D'Souza C, Al Darmaki R, Baniyas M, Adeghate E. An update on the role of irisin in the regulation of endocrine and metabolic functions. *Peptides*. 2018;104:15-23.
99. Gao M, Bu L, Ma Y, Liu D. Concurrent activation of liver X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor alpha exacerbates hepatic steatosis in high fat diet-induced obese mice. *PloS one*. 2013;8(6):e65641.
100. Kim SH, Plutzky J. Brown Fat and Browning for the Treatment of Obesity and Related Metabolic Disorders. *Diabetes & metabolism journal*. 2016;40(1):12-21.

101. Huh JY, Panagiotou G, Mougios V, Brinkoetter M, Vamvini MT, Schneider BE, et al. FNDC5 and irisin in humans: I. Predictors of circulating concentrations in serum and plasma and II. mRNA expression and circulating concentrations in response to weight loss and exercise. *Metabolism: clinical and experimental*. 2012;61(12):1725-38.
102. Moreno-Navarrete JM, Ortega F, Serrano M, Guerra E, Pardo G, Tinahones F, et al. Irisin is expressed and produced by human muscle and adipose tissue in association with obesity and insulin resistance. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2013;98(4):E769-78.
103. Roca-Rivada A, Castelao C, Senin LL, Landrove MO, Baltar J, Belen Crujeiras A, et al. FNDC5/irisin is not only a myokine but also an adipokine. *PloS one*. 2013;8(4):e60563.
104. Aydin S, Kuloglu T, Aydin S, Kalayci M, Yilmaz M, Cakmak T, et al. A comprehensive immunohistochemical examination of the distribution of the fat-burning protein irisin in biological tissues. *Peptides*. 2014;61:130-6.
105. Perakakis N, Triantafyllou GA, Fernandez-Real JM, Huh JY, Park KH, Seufert J, et al. Physiology and role of irisin in glucose homeostasis. *Nature reviews Endocrinology*. 2017;13(6):324-37.
106. Raschke S, Elsen M, Gassenhuber H, Sommerfeld M, Schwahn U, Brockmann B, et al. Evidence against a beneficial effect of irisin in humans. *PloS one*. 2013;8(9):e73680.
107. Albrecht E, Norheim F, Thiede B, Holen T, Ohashi T, Schering L, et al. Irisin - a myth rather than an exercise-inducible myokine. *Scientific reports*. 2015;5:8889.
108. Jedrychowski MP, Wrann CD, Paulo JA, Gerber KK, Szpyt J, Robinson MM, et al. Detection and Quantitation of Circulating Human Irisin by Tandem Mass Spectrometry. *Cell metabolism*. 2015;22(4):734-40.
109. Park KH, Zaichenko L, Brinkoetter M, Thakkar B, Sahin-Efe A, Joung KE, et al. Circulating irisin in relation to insulin resistance and the metabolic syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2013;98(12):4899-907.
110. Villarroya F. Irisin, turning up the heat. *Cell metabolism*. 2012;15(3):277-8.
111. Liu JJ, Liu S, Wong MD, Tan CS, Tavintharan S, Sum CF, et al. Relationship between circulating irisin, renal function and body composition in type 2 diabetes. *Journal of diabetes and its complications*. 2014;28(2):208-13.
112. Swick AG, Orena S, O'Connor A. Irisin levels correlate with energy expenditure in a subgroup of humans with energy expenditure greater than predicted by fat free mass. *Metabolism: clinical and experimental*. 2013;62(8):1070-3.

113. Cruz KJ, de Oliveira AR, Morais JB, Severo JS, Marreiro Ph DD. Role of microRNAs on adipogenesis, chronic low-grade inflammation, and insulin resistance in obesity. *Nutrition*. 2017;35:28-35.
114. Portius D, Sobolewski C, Foti M. MicroRNAs-Dependent Regulation of PPARs in Metabolic Diseases and Cancers. *PPAR research*. 2017;2017:7058424.
115. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009;136(2):215-33.
116. Agarwal V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife*. 2015;4.
117. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research*. 2009;19(1):92-105.
118. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-54.
119. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000;408(6808):86-9.
120. Friedlander MR, Lizano E, Houben AJ, Bezdan D, Banez-Coronel M, Kudla G, et al. Evidence for the biogenesis of more than 1,000 novel human microRNAs. *Genome biology*. 2014;15(4):R57.
121. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *Rna*. 2004;10(12):1957-66.
122. Kim J, Krichevsky A, Grad Y, Hayes GD, Kosik KS, Church GM, et al. Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(1):360-5.
123. Li Y, Kowdley KV. MicroRNAs in common human diseases. *Genomics, proteomics & bioinformatics*. 2012;10(5):246-53.
124. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*. 2003;115(2):209-16.
125. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. 2003;115(2):199-208.



126. Preall JB, Sontheimer EJ. RNAi: RISC gets loaded. *Cell*. 2005;123(4):543-5.
127. Obernosterer G, Leuschner PJ, Alenius M, Martinez J. Post-transcriptional regulation of microRNA expression. *Rna*. 2006;12(7):1161-7.
128. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014;15(8):509-24.
129. Du T, Zamore PD. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development*. 2005;132(21):4645-52.
130. Thomou T, Mori MA, Dreyfuss JM, Konishi M, Sakaguchi M, Wolfrum C, et al. Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues. *Nature*. 2017;542(7642):450-5.
131. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature reviews Genetics*. 2010;11(9):597-610.
132. Deiuliis 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.
133. Fernandez-Hernando C, Ramirez CM, Goedeke L, Suarez Y. MicroRNAs in metabolic disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2013;33(2):178-85.
134. Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, et al. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circulation research*. 2010;107(6):810-7.
135. Xiang Y. miR-24 in diabetes. *Oncotarget*. 2015;6(19):16816-7.
136. Chien HY, Lee TP, Chen CY, Chiu YH, Lin YC, Lee LS, et al. Circulating microRNA as a diagnostic marker in populations with type 2 diabetes mellitus and diabetic complications. *Journal of the Chinese Medical Association : JCMA*. 2015;78(4):204-11.
137. Williams MD, Mitchell GM. MicroRNAs in insulin resistance and obesity. *Experimental diabetes research*. 2012;2012:484696.
138. Zile MR, Mehurg SM, Arroyo JE, Stroud RE, DeSantis SM, Spinale FG. Relationship between the temporal profile of plasma microRNA and left ventricular remodeling in patients after myocardial infarction. *Circulation Cardiovascular genetics*. 2011;4(6):614-9.

139. Cermelli S, Ruggieri A, Marrero JA, Ioannou GN, Beretta L. Circulating microRNAs in patients with chronic hepatitis C and non-alcoholic fatty liver disease. *PloS one*. 2011;6(8):e23937.
140. Li S, Zhu J, Zhang W, Chen Y, Zhang K, Popescu LM, et al. Signature microRNA expression profile of essential hypertension and its novel link to human cytomegalovirus infection. *Circulation*. 2011;124(2):175-84.
141. Karolina DS, Tavintharan S, Armugam A, Sepramaniam S, Pek SL, Wong MT, et al. Circulating miRNA profiles in patients with metabolic syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97(12):E2271-6.
142. Wang YT, Tsai PC, Liao YC, Hsu CY, Juo SH. Circulating microRNAs have a sex-specific association with metabolic syndrome. *Journal of biomedical science*. 2013;20:72.
143. Hulsmans M, De Keyzer D, Holvoet P. MicroRNAs regulating oxidative stress and inflammation in relation to obesity and atherosclerosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2011;25(8):2515-27.
144. Heneghan HM, Miller N, McAnena OJ, O'Brien T, Kerin MJ. Differential miRNA expression in omental adipose tissue and in the circulation of obese patients identifies novel metabolic biomarkers. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96(5):E846-50.
145. Ortega FJ, Mercader JM, Catalan V, Moreno-Navarrete JM, Pueyo N, Sabater M, et al. Targeting the circulating microRNA signature of obesity. *Clinical chemistry*. 2013;59(5):781-92.
146. Chen J, Xu L, Hu Q, Yang S, Zhang B, Jiang H. MiR-17-5p as circulating biomarkers for the severity of coronary atherosclerosis in coronary artery disease. *International journal of cardiology*. 2015;197:123-4.
147. Rotllan N, Price N, Pati P, Goedeke L, Fernandez-Hernando C. microRNAs in lipoprotein metabolism and cardiometabolic disorders. *Atherosclerosis*. 2016;246:352-60.
148. Pirola CJ, Fernandez Gianotti T, Castano GO, Mallardi P, San Martino J, Mora Gonzalez Lopez Ledesma M, et al. Circulating microRNA signature in non-alcoholic fatty liver disease: from serum non-coding RNAs to liver histology and disease pathogenesis. *Gut*. 2015;64(5):800-12.
149. Willeit P, Skrobilin P, Moschen AR, Yin X, Kaudewitz D, Zampetaki A, et al. Circulating MicroRNA-122 Is Associated With the Risk of New-Onset Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2017;66(2):347-57.

150. Thompson MD, Cismowski MJ, Serpico M, Pusateri A, Brigstock DR. Elevation of circulating microRNA levels in obese children compared to healthy controls. *Clinical obesity*. 2017;7(4):216-21.
151. Marchand L, Jalabert A, Meugnier E, Van den Hende K, Fabien N, Nicolino M, et al. miRNA-375 a Sensor of Glucotoxicity Is Altered in the Serum of Children with Newly Diagnosed Type 1 Diabetes. *Journal of diabetes research*. 2016;2016:1869082.
152. Vienberg S, Geiger J, Madsen S, Dalgaard LT. MicroRNAs in metabolism. *Acta physiologica*. 2017;219(2):346-61.
153. Iacomino G, Siani A. Role of microRNAs in obesity and obesity-related diseases. *Genes & nutrition*. 2017;12:23.
154. Zebisch K, Voigt V, Wabitsch M, Brandsch M. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Analytical biochemistry*. 2012;425(1):88-90.
155. Kristensen MM, Davidsen PK, Vigelso A, Hansen CN, Jensen LJ, Jessen N, et al. miRNAs in human subcutaneous adipose tissue: Effects of weight loss induced by hypocaloric diet and exercise. *Obesity*. 2017;25(3):572-80.
156. An X, Ma K, Zhang Z, Zhao T, Zhang X, Tang B, et al. miR-17, miR-21, and miR-143 Enhance Adipogenic Differentiation from Porcine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *DNA and cell biology*. 2016;35(8):410-6.
157. Kim YJ, Hwang SJ, Bae YC, Jung JS. MiR-21 regulates adipogenic differentiation through the modulation of TGF-beta signaling in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. *Stem cells*. 2009;27(12):3093-102.
158. Kang M, Yan LM, Zhang WY, Li YM, Tang AZ, Ou HS. Role of microRNA-21 in regulating 3T3-L1 adipocyte differentiation and adiponectin expression. *Molecular biology reports*. 2013;40(8):5027-34.
159. Li G, Ning C, Ma Y, Jin L, Tang Q, Li X, et al. miR-26b Promotes 3T3-L1 Adipocyte Differentiation Through Targeting PTEN. *DNA and cell biology*. 2017;36(8):672-81.
160. Song G, Xu G, Ji C, Shi C, Shen Y, Chen L, et al. The role of microRNA-26b in human adipocyte differentiation and proliferation. *Gene*. 2014;533(2):481-7.
161. Xu G, Ji C, Song G, Zhao C, Shi C, Song L, et al. MiR-26b modulates insulin sensitivity in adipocytes by interrupting the PTEN/PI3K/AKT pathway. *International journal of obesity*. 2015;39(10):1523-30.

162. Zaragosi LE, Wdziekonski B, Brigand KL, Villageois P, Mari B, Waldmann R, et al. Small RNA sequencing reveals miR-642a-3p as a novel adipocyte-specific microRNA and miR-30 as a key regulator of human adipogenesis. *Genome biology*. 2011;12(7):R64.
163. Trajkovski M, Hausser J, Soutschek J, Bhat B, Akin A, Zavolan M, et al. MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity. *Nature*. 2011;474(7353):649-53.
164. Esau C, Kang X, Peralta E, Hanson E, Marcusson EG, Ravichandran LV, et al. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(50):52361-5.
165. Ahn J, Lee H, Jung CH, Jeon TI, Ha TY. MicroRNA-146b promotes adipogenesis by suppressing the SIRT1-FOXO1 cascade. *EMBO molecular medicine*. 2013;5(10):1602-12.
166. Qin L, Chen Y, Niu Y, Chen W, Wang Q, Xiao S, et al. A deep investigation into the adipogenesis mechanism: profile of microRNAs regulating adipogenesis by modulating the canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway. *BMC genomics*. 2010;11:320.
167. Li H, Chen X, Guan L, Qi Q, Shu G, Jiang Q, et al. MiRNA-181a regulates adipogenesis by targeting tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in the porcine model. *PloS one*. 2013;8(10):e71568.
168. Lin EA, Kong L, Bai XH, Luan Y, Liu CJ. miR-199a, a bone morphogenic protein 2-responsive MicroRNA, regulates chondrogenesis via direct targeting to Smad1. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(17):11326-35.
169. Huang J, Zhao L, Xing L, Chen D. MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation. *Stem cells*. 2010;28(2):357-64.
170. Ling HY, Ou HS, Feng SD, Zhang XY, Tuo QH, Chen LX, et al. CHANGES IN microRNA (miR) profile and effects of miR-320 in insulin-resistant 3T3-L1 adipocytes. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2009;36(9):e32-9.
171. Bork S, Horn P, Castoldi M, Hellwig I, Ho AD, Wagner W. Adipogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells is down-regulated by microRNA-369-5p and up-regulated by microRNA-371. *Journal of cellular physiology*. 2011;226(9):2226-34.
172. Ling HY, Wen GB, Feng SD, Tuo QH, Ou HS, Yao CH, et al. MicroRNA-375 promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation through modulation of extracellular signal-regulated kinase signalling. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2011;38(4):239-46.
173. Son YH, Ka S, Kim AY, Kim JB. Regulation of Adipocyte Differentiation via MicroRNAs. *Endocrinology and metabolism*. 2014;29(2):122-35.

174. Zhang JF, Fu WM, He ML, Wang H, Wang WM, Yu SC, et al. MiR-637 maintains the balance between adipocytes and osteoblasts by directly targeting Osterix. *Molecular biology of the cell*. 2011;22(21):3955-61.
175. Dong P, Mai Y, Zhang Z, Mi L, Wu G, Chu G, et al. MiR-15a/b promote adipogenesis in porcine pre-adipocyte via repressing FoxO1. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2014;46(7):565-71.
176. Karbiener M, Fischer C, Nowitsch S, Opriessnig P, Papak C, Ailhaud G, et al. microRNA miR-27b impairs human adipocyte differentiation and targets PPARgamma. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;390(2):247-51.
177. Kim SY, Kim AY, Lee HW, Son YH, Lee GY, Lee JW, et al. miR-27a is a negative regulator of adipocyte differentiation via suppressing PPARgamma expression. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;392(3):323-8.
178. McGregor RA, Choi MS. microRNAs in the regulation of adipogenesis and obesity. *Current molecular medicine*. 2011;11(4):304-16.
179. Cioffi M, Vallespinos-Serrano M, Trabulo SM, Fernandez-Marcos PJ, Firment AN, Vazquez BN, et al. MiR-93 Controls Adiposity via Inhibition of Sirt7 and Tbx3. *Cell reports*. 2015;12(10):1594-605.
180. Ji HL, Song CC, Li YF, He JJ, Li YL, Zheng XL, et al. miR-125a inhibits porcine preadipocytes differentiation by targeting ERRalpha. *Molecular and cellular biochemistry*. 2014;395(1-2):155-65.
181. Yang Z, Bian C, Zhou H, Huang S, Wang S, Liao L, et al. MicroRNA hsa-miR-138 inhibits adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells through adenovirus EID-1. *Stem cells and development*. 2011;20(2):259-67.
182. Skarn M, Namlos HM, Noordhuis P, Wang MY, Meza-Zepeda LA, Myklebost O. Adipocyte differentiation of human bone marrow-derived stromal cells is modulated by microRNA-155, microRNA-221, and microRNA-222. *Stem cells and development*. 2012;21(6):873-83.
183. Belarbi Y, Mejhert N, Lorente-Cebrian S, Dahlman I, Arner P, Ryden M, et al. MicroRNA-193b Controls Adiponectin Production in Human White Adipose Tissue. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2015;100(8):E1084-8.
184. Jeong BC, Kang IH, Hwang YC, Kim SH, Koh JT. MicroRNA-194 reciprocally stimulates osteogenesis and inhibits adipogenesis via regulating COUP-TFII expression. *Cell death & disease*. 2014;5:e1532.

185. Peng Y, Xiang H, Chen C, Zheng R, Chai J, Peng J, et al. MiR-224 impairs adipocyte early differentiation and regulates fatty acid metabolism. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2013;45(8):1585-93.
186. Chen H, Wang S, Chen L, Chen Y, Wu M, Zhang Y, et al. MicroRNA-344 inhibits 3T3-L1 cell differentiation via targeting GSK3beta of Wnt/beta-catenin signaling pathway. *FEBS letters*. 2014;588(3):429-35.
187. Chen L, Cui J, Hou J, Long J, Li C, Liu L. A novel negative regulator of adipogenesis: microRNA-363. *Stem cells*. 2014;32(2):510-20.
188. Sun L, Xie H, Mori MA, Alexander R, Yuan B, Hattangadi SM, et al. Mir193b-365 is essential for brown fat differentiation. *Nature cell biology*. 2011;13(8):958-65.
189. Kinoshita M, Ono K, Horie T, Nagao K, Nishi H, Kuwabara Y, et al. Regulation of adipocyte differentiation by activation of serotonin (5-HT) receptors 5-HT2AR and 5-HT2CR and involvement of microRNA-448-mediated repression of KLF5. *Molecular endocrinology*. 2010;24(10):1978-87.
190. Chen H, Mo D, Li M, Zhang Y, Chen L, Zhang X, et al. miR-709 inhibits 3T3-L1 cell differentiation by targeting GSK3beta of Wnt/beta-catenin signaling. *Cellular signalling*. 2014;26(11):2583-9.
191. Tabet F, Cuesta Torres LF, Ong KL, Shrestha S, Choteau SA, Barter PJ, et al. High-Density Lipoprotein-Associated miR-223 Is Altered after Diet-Induced Weight Loss in Overweight and Obese Males. *PloS one*. 2016;11(3):e0151061.
192. Desgagne V, Bouchard L, Guerin R. microRNAs in lipoprotein and lipid metabolism: from biological function to clinical application. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2017;55(5):667-86.
193. Karkeni E, Astier J, Tourniaire F, El Abed M, Romier B, Gouranton E, et al. Obesity-associated Inflammation Induces microRNA-155 Expression in Adipocytes and Adipose Tissue: Outcome on Adipocyte Function. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2016;101(4):1615-26.
194. Wu H, Zhang T, Pan F, Steer CJ, Li Z, Chen X, et al. MicroRNA-206 prevents hepatosteatosis and hyperglycemia by facilitating insulin signaling and impairing lipogenesis. *Journal of hepatology*. 2017;66(4):816-24.
195. Lavery CA, Kurowska-Stolarska M, Holmes WM, Donnelly I, Caslake M, Collier A, et al. miR-34a(-/-) mice are susceptible to diet-induced obesity. *Obesity*. 2016;24(8):1741-51.

196. Kim YJ, Hwang SH, Cho HH, Shin KK, Bae YC, Jung JS. MicroRNA 21 regulates the proliferation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and high-fat diet-induced obesity alters microRNA 21 expression in white adipose tissues. *Journal of cellular physiology*. 2012;227(1):183-93.
197. Wang L, Xu L, Xu M, Liu G, Xing J, Sun C, et al. Obesity-Associated MiR-342-3p Promotes Adipogenesis of Mesenchymal Stem Cells by Suppressing CtBP2 and Releasing C/EBPalpha from CtBP2 Binding. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2015;35(6):2285-98.
198. Zhu L, Chen L, Shi CM, Xu GF, Xu LL, Zhu LL, et al. MiR-335, an adipogenesis-related microRNA, is involved in adipose tissue inflammation. *Cell biochemistry and biophysics*. 2014;68(2):283-90.
199. Ortega FJ, Moreno-Navarrete JM, Pardo G, Sabater M, Hummel M, Ferrer A, et al. MiRNA expression profile of human subcutaneous adipose and during adipocyte differentiation. *PloS one*. 2010;5(2):e9022.
200. Mysore R, Zhou Y, Sadevirta S, Savolainen-Peltonen H, Nidhina Haridas PA, Soronen J, et al. MicroRNA-192\* impairs adipocyte triglyceride storage. *Biochimica et biophysica acta*. 2016;1861(4):342-51.
201. Ying W, Tseng A, Chang RC, Wang H, Lin YL, Kanameni S, et al. miR-150 regulates obesity-associated insulin resistance by controlling B cell functions. *Scientific reports*. 2016;6:20176.
202. Baldeon RL, Weigelt K, de Wit H, Ozcan B, van Oudenaren A, Sempertegui F, et al. Decreased serum level of miR-146a as sign of chronic inflammation in type 2 diabetic patients. *PloS one*. 2014;9(12):e115209.
203. Wu D, Xi QY, Cheng X, Dong T, Zhu XT, Shu G, et al. miR-146a-5p inhibits TNF-alpha-induced adipogenesis via targeting insulin receptor in primary porcine adipocytes. *Journal of lipid research*. 2016;57(8):1360-72.
204. Nunez Lopez YO, Garufi G, Pasarica M, Seyhan AA. Elevated and Correlated Expressions of miR-24, miR-30d, miR-146a, and SFRP-4 in Human Abdominal Adipose Tissue Play a Role in Adiposity and Insulin Resistance. *International journal of endocrinology*. 2018;2018:7351902.
205. Diawara MR, Hue C, Wilder SP, Venteclef N, Aron-Wisnewsky J, Scott J, et al. Adaptive expression of microRNA-125a in adipose tissue in response to obesity in mice and men. *PloS one*. 2014;9(3):e91375.

206. Alexander R, Lodish H, Sun L. MicroRNAs in adipogenesis and as therapeutic targets for obesity. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2011;15(5):623-36.
207. Karbiener M, Neuhold C, Opriessnig P, Prokesch A, Bogner-Strauss JG, Scheideler M. MicroRNA-30c promotes human adipocyte differentiation and co-represses PAI-1 and ALK2. *RNA biology*. 2011;8(5):850-60.
208. Chen Y, Pan R, Pfeifer A. Regulation of brown and beige fat by microRNAs. *Pharmacology & therapeutics*. 2017;170:1-7.
209. Sebastiani G, Po A, Miele E, Ventriglia G, Ceccarelli E, Bugliani M, et al. MicroRNA-124a is hyperexpressed in type 2 diabetic human pancreatic islets and negatively regulates insulin secretion. *Acta diabetologica*. 2015;52(3):523-30.
210. Ozcan S. Minireview: microRNA function in pancreatic beta cells. *Molecular endocrinology*. 2014;28(12):1922-33.
211. Karunakaran D, Richards L, Geoffrion M, Barrette D, Gotfrit RJ, Harper ME, et al. Therapeutic Inhibition of miR-33 Promotes Fatty Acid Oxidation but Does Not Ameliorate Metabolic Dysfunction in Diet-Induced Obesity. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2015;35(12):2536-43.
212. Loyer X, Paradis V, Henique C, Vion AC, Colnot N, Guerin CL, et al. Liver microRNA-21 is overexpressed in non-alcoholic steatohepatitis and contributes to the disease in experimental models by inhibiting PPARalpha expression. *Gut*. 2016;65(11):1882-94.
213. Yang WM, Jeong HJ, Park SY, Lee W. Induction of miR-29a by saturated fatty acids impairs insulin signaling and glucose uptake through translational repression of IRS-1 in myocytes. *FEBS letters*. 2014;588(13):2170-6.
214. Massart J, Sjogren RJO, Lundell LS, Mudry JM, Franck N, O'Gorman DJ, et al. Altered miR-29 Expression in Type 2 Diabetes Influences Glucose and Lipid Metabolism in Skeletal Muscle. *Diabetes*. 2017;66(7):1807-18.
215. Esteves JV, Enguita FJ, Machado UF. MicroRNAs-Mediated Regulation of Skeletal Muscle GLUT4 Expression and Translocation in Insulin Resistance. *Journal of diabetes research*. 2017;2017:7267910.
216. Heneghan HM, Miller N, Kerin MJ. Role of microRNAs in obesity and the metabolic syndrome. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2010;11(5):354-61.



217. Sangiao-Alvarellos S, Pena-Bello L, Manfredi-Lozano M, Tena-Sempere M, Cordido F. Perturbation of hypothalamic microRNA expression patterns in male rats after metabolic distress: impact of obesity and conditions of negative energy balance. *Endocrinology*. 2014;155(5):1838-50.
218. Uesugi A, Kozaki K, Tsuruta T, Furuta M, Morita K, Imoto I, et al. The tumor suppressive microRNA miR-218 targets the mTOR component Rictor and inhibits AKT phosphorylation in oral cancer. *Cancer research*. 2011;71(17):5765-78.
219. Mang GM, Pradervand S, Du NH, Arpat AB, Preitner F, Wigger L, et al. A neuron-specific deletion of the microRNA-processing enzyme DICER induces severe but transient obesity in mice. *PloS one*. 2015;10(1):e0116760.
220. Mendenhall A, Lesnik J, Mukherjee C, Antes T, Sengupta R. Packaging HIV- or FIV-based lentivector expression constructs and transduction of VSV-G pseudotyped viral particles. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2012(62):e3171.
221. Gentner B, Schira G, Giustacchini A, Amendola M, Brown BD, Ponzoni M, et al. Stable knockdown of microRNA in vivo by lentiviral vectors. *Nature methods*. 2008;6:63.
222. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical chemistry*. 1996;68(5):850-8.
223. Betel D, Wilson M, Gabow A, Marks DS, Sander C. The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic acids research*. 2008;36(Database issue):D149-53.
224. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic acids research*. 2008;36(Database issue):D154-8.
225. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic acids research*. 2006;34(Database issue):D140-4.
226. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic acids research*. 2011;39(Database issue):D152-7.
227. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic acids research*. 2014;42(Database issue):D68-73.
228. Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N. miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. *Journal of biomedical informatics*. 2011;44(5):839-47.

229. Dweep H, Gretz N. miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nature methods*. 2015;12(8):697.
230. Hulsen T, de Vlieg J, Alkema W. BioVenn - a web application for the comparison and visualization of biological lists using area-proportional Venn diagrams. *BMC genomics*. 2008;9:488.
231. Liu Z, Gan L, Zhou Z, Jin W, Sun C. SOCS3 promotes inflammation and apoptosis via inhibiting JAK2/STAT3 signaling pathway in 3T3-L1 adipocyte. *Immunobiology*. 2015;220(8):947-53.
232. Harris RB. Direct and indirect effects of leptin on adipocyte metabolism. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1842(3):414-23.
233. 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.
234. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes & development*. 2000;14(11):1293-307.
235. Choi SS, Cha BY, Iida K, Lee YS, Yonezawa T, Teruya T, et al. Arterpillin C, as a PPARgamma ligand, enhances adipocyte differentiation and glucose uptake in 3T3-L1 cells. *Biochemical pharmacology*. 2011;81(7):925-33.
236. 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.
237. 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.
238. 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.
239. 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.

240. Chen X, Zhao W, Yuan Y, Bai Y, Sun Y, Zhu W, et al. MicroRNAs tend to synergistically control expression of genes encoding extensively-expressed proteins in humans. *PeerJ*. 2017;5:e3682.
241. Chen HY, Liu Q, Salter AM, Lomax MA. Synergism between cAMP and PPARgamma Signalling in the Initiation of UCP1 Gene Expression in HIB1B Brown Adipocytes. *PPAR research*. 2013;2013:476049.
242. Kim EJ, Yoon YS, Hong S, Son HY, Na TY, Lee MH, et al. Retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha-induced activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase results in attenuation of hepatic steatosis. *Hepatology*. 2012;55(5):1379-88.
243. Raichur S, Fitzsimmons RL, Myers SA, Pearen MA, Lau P, Eriksson N, et al. Identification and validation of the pathways and functions regulated by the orphan nuclear receptor, ROR alpha1, in skeletal muscle. *Nucleic acids research*. 2010;38(13):4296-312.
244. Lv YC, Tang YY, Peng J, Zhao GJ, Yang J, Yao F, et al. MicroRNA-19b promotes macrophage cholesterol accumulation and aortic atherosclerosis by targeting ATP-binding cassette transporter A1. *Atherosclerosis*. 2014;236(1):215-26.
245. de Haan W, Bhattacharjee A, Ruddle P, Kang MH, Hayden MR. ABCA1 in adipocytes regulates adipose tissue lipid content, glucose tolerance, and insulin sensitivity. *Journal of lipid research*. 2014;55(3):516-23.
246. Le Lay S, Robichon C, Le Liepvre X, Dagher G, Ferre P, Dugail I. Regulation of ABCA1 expression and cholesterol efflux during adipose differentiation of 3T3-L1 cells. *Journal of lipid research*. 2003;44(8):1499-507.
247. Ralston JC, Mutch DM. SCD1 inhibition during 3T3-L1 adipocyte differentiation remodels triacylglycerol, diacylglycerol and phospholipid fatty acid composition. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*. 2015;98:29-37.
248. Cruz-Gil S, Sanchez-Martinez R, Gomez de Cedron M, Martin-Hernandez R, Vargas T, Molina S, et al. Targeting the lipid metabolic axis ACSL/SCD in colorectal cancer progression by therapeutic miRNAs: miR-19b-1 role. *Journal of lipid research*. 2018;59(1):14-24.
249. Ikeda D, Sakaue S, Kamigaki M, Ohira H, Itoh N, Ohtsuka Y, et al. Knockdown of macrophage migration inhibitory factor disrupts adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Endocrinology*. 2008;149(12):6037-42.

250. Chen H, Li X, Liu S, Gu L, Zhou X. MicroRNA-19a promotes vascular inflammation and foam cell formation by targeting HBP-1 in atherogenesis. *Scientific reports*. 2017;7(1):12089.
251. Yin R, Bao W, Xing Y, Xi T, Gou S. MiR-19b-1 inhibits angiogenesis by blocking cell cycle progression of endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012;417(2):771-6.
252. Fan Y, Yin S, Hao Y, Yang J, Zhang H, Sun C, et al. miR-19b promotes tumor growth and metastasis via targeting TP53. *Rna*. 2014;20(6):765-72.
253. Romao JM, Jin W, He M, McAllister T, Guan LL. Altered microRNA expression in bovine subcutaneous and visceral adipose tissues from cattle under different diet. *PloS one*. 2012;7(7):e40605.
254. Shen L, Gan M, Li Q, Wang J, Li X, Zhang S, et al. MicroRNA-200b regulates preadipocyte proliferation and differentiation by targeting KLF4. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2018;103:1538-44.
255. Kennell JA, Gerin I, MacDougald OA, Cadigan KM. The microRNA miR-8 is a conserved negative regulator of Wnt signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(40):15417-22.
256. Buchwald H, Estok R, Fahrbach K, Banel D, Jensen MD, Pories WJ, et al. Weight and type 2 diabetes after bariatric surgery: systematic review and meta-analysis. *The American journal of medicine*. 2009;122(3):248-56 e5.
257. Catalano KJ, Stefanovski D, Bergman RN. Critical role of the mesenteric depot versus other intra-abdominal adipose depots in the development of insulin resistance in young rats. *Diabetes*. 2010;59(6):1416-23.
258. Bandiera S, Pfeffer S, Baumert TF, Zeisel MB. miR-122--a key factor and therapeutic target in liver disease. *Journal of hepatology*. 2015;62(2):448-57.
259. Ng R, Wu H, Xiao H, Chen X, Willenbring H, Steer CJ, et al. Inhibition of microRNA-24 expression in liver prevents hepatic lipid accumulation and hyperlipidemia. *Hepatology*. 2014;60(2):554-64.
260. Xiang Y, Cheng J, Wang D, Hu X, Xie Y, Stitham J, et al. Hyperglycemia repression of miR-24 coordinately upregulates endothelial cell expression and secretion of von Willebrand factor. *Blood*. 2015;125(22):3377-87.

261. Cheung O, Puri P, Eicken C, Contos MJ, Mirshahi F, Maher JW, et al. Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic MicroRNA expression. *Hepatology*. 2008;48(6):1810-20.
262. Mao L, Liu S, Hu L, Jia L, Wang H, Guo M, et al. miR-30 Family: A Promising Regulator in Development and Disease. *BioMed research international*. 2018;2018:9623412.
263. Shi C, Zhang M, Tong M, Yang L, Pang L, Chen L, et al. miR-148a is Associated with Obesity and Modulates Adipocyte Differentiation of Mesenchymal Stem Cells through Wnt Signaling. *Scientific reports*. 2015;5:9930.
264. Hu F, Wang M, Xiao T, Yin B, He L, Meng W, et al. miR-30 promotes thermogenesis and the development of beige fat by targeting RIP140. *Diabetes*. 2015;64(6):2056-68.
265. Kloting N, Berthold S, Kovacs P, Schon MR, Fasshauer M, Ruschke K, et al. MicroRNA expression in human omental and subcutaneous adipose tissue. *PloS one*. 2009;4(3):e4699.
266. Ding J, Li M, Wan X, Jin X, Chen S, Yu C, et al. Effect of miR-34a in regulating steatosis by targeting PPARalpha expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Scientific reports*. 2015;5:13729.
267. Liu XL, Pan Q, Zhang RN, Shen F, Yan SY, Sun C, et al. Disease-specific miR-34a as diagnostic marker of non-alcoholic steatohepatitis in a Chinese population. *World journal of gastroenterology*. 2016;22(44):9844-52.
268. Zarfeshani A, Ngo S, Sheppard AM. MicroRNA Expression Relating to Dietary-Induced Liver Steatosis and NASH. *Journal of clinical medicine*. 2015;4(11):1938-50.
269. Fu T, Choi SE, Kim DH, Seok S, Suino-Powell KM, Xu HE, et al. Aberrantly elevated microRNA-34a in obesity attenuates hepatic responses to FGF19 by targeting a membrane coreceptor beta-Klotho. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(40):16137-42.
270. Yuzbashian E, Asghari G, Zarkesh M, Zadeh-Vakili A, Mirmiran P, Hedayati M, et al. Dietary intake of fat and oil are associated with expression of miR-143 and miR-34a in visceral and subcutaneous adipose tissues of adults: a nutriepigenetic study. *20th European Congress of Endocrinology; Barcelona: Endocrine Abstracts; 2018*.
271. Fu T, Seok S, Choi S, Huang Z, Suino-Powell K, Xu HE, et al. MicroRNA 34a inhibits beige and brown fat formation in obesity in part by suppressing adipocyte fibroblast growth factor 21 signaling and SIRT1 function. *Molecular and cellular biology*. 2014;34(22):4130-42.

272. Girard M, Jacquemin E, Munnich A, Lyonnet S, Henrion-Caude A. miR-122, a paradigm for the role of microRNAs in the liver. *Journal of hepatology*. 2008;48(4):648-56.
273. Becker PP, Rau M, Schmitt J, Malsch C, Hammer C, Bantel H, et al. Performance of Serum microRNAs -122, -192 and -21 as Biomarkers in Patients with Non-Alcoholic Steatohepatitis. *PloS one*. 2015;10(11):e0142661.
274. Roos J, Enlund E, Funcke JB, Tews D, Holzmann K, Debatin KM, et al. miR-146a-mediated suppression of the inflammatory response in human adipocytes. *Scientific reports*. 2016;6:38339.
275. Huang ZH, Gu D, Mazzone T. Role of adipocyte-derived apoE in modulating adipocyte size, lipid metabolism, and gene expression in vivo. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2009;296(5):E1110-9.
276. Chartoumpakis DV, Zaravinos A, Ziros PG, Iskrenova RP, Psyrogiannis AI, Kyriazopoulou VE, et al. Differential expression of microRNAs in adipose tissue after long-term high-fat diet-induced obesity in mice. *PloS one*. 2012;7(4):e34872.
277. He Y, Huang C, Sun X, Long XR, Lv XW, Li J. MicroRNA-146a modulates TGF-beta1-induced hepatic stellate cell proliferation by targeting SMAD4. *Cellular signalling*. 2012;24(10):1923-30.
278. Nagpal N, Kulshreshtha R. miR-191: an emerging player in disease biology. *Frontiers in genetics*. 2014;5:99.
279. Monteiro R, Azevedo I. Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediators of inflammation*. 2010;2010.
280. Cortes-Garcia JD, Briones-Espinoza MJ, Vega-Cardenas M, Ruiz-Rodriguez VM, Mendez-Mancilla A, Gomez-Otero AE, et al. The inflammatory state of adipose tissue is not affected by the anti-inflammatory response of the A2a-adenosine system and miR-221/PTEN. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2018;100:42-8.
281. Hancock CR, Han DH, Higashida K, Kim SH, Holloszy JO. Does calorie restriction induce mitochondrial biogenesis? A reevaluation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2011;25(2):785-91.
282. Kirchner H, Hofmann SM, Fischer-Rosinsky A, Hembree J, Abplanalp W, Ottaway N, et al. Caloric restriction chronically impairs metabolic programming in mice. *Diabetes*. 2012;61(11):2734-42.

283. Kakimoto PA, Kowaltowski AJ. Effects of high fat diets on rodent liver bioenergetics and oxidative imbalance. *Redox biology*. 2016;8:216-25.
284. Kn BP, Gopalan V, Lee SS, Velan SS. Quantification of abdominal fat depots in rats and mice during obesity and weight loss interventions. *PloS one*. 2014;9(10):e108979.
285. Patel P, Abate N. Role of subcutaneous adipose tissue in the pathogenesis of insulin resistance. *Journal of obesity*. 2013;2013:489187.
286. Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, Pou KM, Maurovich-Horvat P, Liu CY, et al. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2007;116(1):39-48.
287. Jagannadham J, Jaiswal HK, Agrawal S, Rawal K. Comprehensive Map of Molecules Implicated in Obesity. *PloS one*. 2016;11(2):e0146759.
288. Fang L, Kojima K, Zhou L, Crossman DK, Mobley JA, Grams J. Analysis of the Human Proteome in Subcutaneous and Visceral Fat Depots in Diabetic and Non-diabetic Patients with Morbid Obesity. *Journal of proteomics & bioinformatics*. 2015;8(6):133-41.
289. Wu CY, Wu YY, Liu CD, Wang YX, Na W, Wang N, et al. Comparative proteome analysis of abdominal adipose tissues between fat and lean broilers. *Proteome science*. 2016;14(1):9.
290. Geyer PE, Wewer Albrechtsen NJ, Tyanova S, Grassl N, Iepsen EW, Lundgren J, et al. Proteomics reveals the effects of sustained weight loss on the human plasma proteome. *Molecular systems biology*. 2016;12(12):901.
291. Mardinoglu A, Kampf C, Asplund A, Fagerberg L, Hallstrom BM, Edlund K, et al. Defining the human adipose tissue proteome to reveal metabolic alterations in obesity. *Journal of proteome research*. 2014;13(11):5106-19.
292. Abu-Farha M, Tiss A, Abubaker J, Khadir A, Al-Ghimlas F, Al-Khairi I, et al. Proteomics analysis of human obesity reveals the epigenetic factor HDAC4 as a potential target for obesity. *PloS one*. 2013;8(9):e75342.
293. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic acids research*. 2015;43(Database issue):D447-52.
294. de Heredia FP, Gomez-Martinez S, Marcos A. Obesity, inflammation and the immune system. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2012;71(2):332-8.

295. Cnop M, Foufelle F, Velloso LA. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends in molecular medicine*. 2012;18(1):59-68.
296. Harris RB. Chronic and acute effects of stress on energy balance: are there appropriate animal models? *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2015;308(4):R250-65.
297. Plubell DL, Fenton AM, Wilmarth PA, Bergstrom P, Zhao Y, Minnier J, et al. GM-CSF driven myeloid cells in adipose tissue link weight gain and insulin resistance via formation of 2-aminoadipate. *Scientific reports*. 2018;8(1):11485.
298. Santilli F, Vazzana N, Liani R, Guagnano MT, Davi G. Platelet activation in obesity and metabolic syndrome. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2012;13(1):27-42.
299. Samocha-Bonet D, Justo D, Rogowski O, Saar N, Abu-Abeid S, Shenkerman G, et al. Platelet counts and platelet activation markers in obese subjects. *Mediators of inflammation*. 2008;2008:834153.
300. Sekimoto R, Kishida K, Nakatsuji H, Nakagawa T, Funahashi T, Shimomura I. High circulating levels of S100A8/A9 complex (calprotectin) in male Japanese with abdominal adiposity and dysregulated expression of S100A8 and S100A9 in adipose tissues of obese mice. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012;419(4):782-9.
301. Wang S, Song R, Wang Z, Jing Z, Wang S, Ma J. S100A8/A9 in Inflammation. *Frontiers in immunology*. 2018;9:1298.
302. Ryckman C, Vandal K, Rouleau P, Talbot M, Tessier PA. Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *Journal of immunology*. 2003;170(6):3233-42.
303. Berisha SZ, Serre D, Schauer P, Kashyap SR, Smith JD. Changes in whole blood gene expression in obese subjects with type 2 diabetes following bariatric surgery: a pilot study. *PloS one*. 2011;6(3):e16729.
304. Manco M, Fernandez-Real JM, Equitani F, Vendrell J, Valera Mora ME, Nanni G, et al. Effect of massive weight loss on inflammatory adipocytokines and the innate immune system in morbidly obese women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007;92(2):483-90.
305. Yin J, Gao Z, He Q, Zhou D, Guo Z, Ye J. Role of hypoxia in obesity-induced disorders of glucose and lipid metabolism in adipose tissue. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2009;296(2):E333-42.



306. Freemerman AJ, Johnson AR, Sacks GN, Milner JJ, Kirk EL, Troester MA, et al. Metabolic reprogramming of macrophages: glucose transporter 1 (GLUT1)-mediated glucose metabolism drives a proinflammatory phenotype. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(11):7884-96.
307. Moreno-Indias I, Tinahones FJ. Impaired adipose tissue expandability and lipogenic capacities as ones of the main causes of metabolic disorders. *Journal of diabetes research*. 2015;2015:970375.
308. Heffron SP, Parikh A, Volodarskiy A, Ren-Fielding C, Schwartzbard A, Nicholson J, et al. Changes in Lipid Profile of Obese Patients Following Contemporary Bariatric Surgery: A Meta-Analysis. *The American journal of medicine*. 2016;129(9):952-9.
309. Holst JJ, Madsbad S, Bojsen-Moller KN, Svane MS, Jorgensen NB, Dirksen C, et al. Mechanisms in bariatric surgery: Gut hormones, diabetes resolution, and weight loss. *Surgery for obesity and related diseases : official journal of the American Society for Bariatric Surgery*. 2018;14(5):708-14.
310. Bojsen-Moller KN, Dirksen C, Jorgensen NB, Jacobsen SH, Serup AK, Albers PH, et al. Early enhancements of hepatic and later of peripheral insulin sensitivity combined with increased postprandial insulin secretion contribute to improved glycemic control after Roux-en-Y gastric bypass. *Diabetes*. 2014;63(5):1725-37.
311. Horn RC, Gelatti GT, Mori NC, Tissiani AC, Mayer MS, Pereira EA, et al. Obesity, bariatric surgery and oxidative stress. *Revista da Associacao Medica Brasileira*. 2017;63(3):229-35.
312. Auguet T, Guiu-Jurado E, Berlanga A, Terra X, Martinez S, Porrás JA, et al. Downregulation of lipogenesis and fatty acid oxidation in the subcutaneous adipose tissue of morbidly obese women. *Obesity*. 2014;22(9):2032-8.
313. Winnier DA, Fourcaudot M, Norton L, Abdul-Ghani MA, Hu SL, Farook VS, et al. Transcriptomic identification of ADH1B as a novel candidate gene for obesity and insulin resistance in human adipose tissue in Mexican Americans from the Veterans Administration Genetic Epidemiology Study (VAGES). *PloS one*. 2015;10(4):e0119941.
314. Benabdelkamel H, Masood A, Almidani GM, Alsadhan AA, Bassas AF, Duncan MW, et al. Mature adipocyte proteome reveals differentially altered protein abundances between lean, overweight and morbidly obese human subjects. *Molecular and cellular endocrinology*. 2015;401:142-54.

315. Gomez-Serrano M, Camafeita E, Garcia-Santos E, Lopez JA, Rubio MA, Sanchez-Pernaute A, et al. Proteome-wide alterations on adipose tissue from obese patients as age-, diabetes- and gender-specific hallmarks. *Scientific reports*. 2016;6:25756.
316. Schiller HB, Fernandez IE, Burgstaller G, Schaab C, Scheltema RA, Schwarzmayr T, et al. Time- and compartment-resolved proteome profiling of the extracellular niche in lung injury and repair. *Molecular systems biology*. 2015;11(7):819.
317. Zhang Q, Fillmore TL, Schepmoes AA, Clauss TR, Gritsenko MA, Mueller PW, et al. Serum proteomics reveals systemic dysregulation of innate immunity in type 1 diabetes. *The Journal of experimental medicine*. 2013;210(1):191-203.
318. Kim SJ, Chae S, Kim H, Mun DG, Back S, Choi HY, et al. A protein profile of visceral adipose tissues linked to early pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2014;13(3):811-22.
319. Smith U, Kahn BB. Adipose tissue regulates insulin sensitivity: role of adipogenesis, de novo lipogenesis and novel lipids. *Journal of internal medicine*. 2016;280(5):465-75.
320. Bjorndal B, Burri L, Staalesen V, Skorve J, Berge RK. Different adipose depots: their role in the development of metabolic syndrome and mitochondrial response to hypolipidemic agents. *Journal of obesity*. 2011;2011:490650.
321. Mackenzie RW, Elliott BT. Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy*. 2014;7:55-64.
322. Guiu-Jurado E, Auguet T, Berlanga A, Aragonés G, Aguilar C, Sabench F, et al. Downregulation of de Novo Fatty Acid Synthesis in Subcutaneous Adipose Tissue of Moderately Obese Women. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(12):29911-22.
323. Klip A, Tsakiridis T, Marette A, Ortiz PA. Regulation of expression of glucose transporters by glucose: a review of studies in vivo and in cell cultures. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1994;8(1):43-53.
324. Bryant NJ, Govers R, James DE. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2002;3(4):267-77.
325. Kouidhi S, Berrhouma R, Rouissi K, Jarboui S, Clerget-Froidevaux MS, Seugnet I, et al. Human subcutaneous adipose tissue Glut 4 mRNA expression in obesity and type 2 diabetes. *Acta diabetologica*. 2013;50(2):227-32.

326. Atkinson BJ, Griesel BA, King CD, Josey MA, Olson AL. Moderate GLUT4 overexpression improves insulin sensitivity and fasting triglyceridemia in high-fat diet-fed transgenic mice. *Diabetes*. 2013;62(7):2249-58.
327. Eissing L, Scherer T, Todter K, Knippschild U, Greve JW, Buurman WA, et al. De novo lipogenesis in human fat and liver is linked to ChREBP-beta and metabolic health. *Nature communications*. 2013;4:1528.
328. Minokoshi Y, Kahn CR, Kahn BB. Tissue-specific ablation of the GLUT4 glucose transporter or the insulin receptor challenges assumptions about insulin action and glucose homeostasis. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(36):33609-12.
329. Claussnitzer M, Dankel SN, Kim KH, Quon G, Meuleman W, Haugen C, et al. FTO Obesity Variant Circuitry and Adipocyte Browning in Humans. *The New England journal of medicine*. 2015;373(10):895-907.
330. Cohen P, Levy JD, Zhang Y, Frontini A, Kolodin DP, Svensson KJ, et al. Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch. *Cell*. 2014;156(1-2):304-16.
331. Seale P, Conroe HM, Estall J, Kajimura S, Frontini A, Ishibashi J, et al. Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(1):96-105.
332. Xiong XQ, Chen D, Sun HJ, Ding L, Wang JJ, Chen Q, et al. FNDC5 overexpression and irisin ameliorate glucose/lipid metabolic derangements and enhance lipolysis in obesity. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1852(9):1867-75.
333. Moreno M, Moreno-Navarrete JM, Serrano M, Ortega F, Delgado E, Sanchez-Ragnarsson C, et al. Circulating irisin levels are positively associated with metabolic risk factors in sedentary subjects. *PloS one*. 2015;10(4):e0124100.
334. Liu TY, Shi CX, Gao R, Sun HJ, Xiong XQ, Ding L, et al. Irisin inhibits hepatic gluconeogenesis and increases glycogen synthesis via the PI3K/Akt pathway in type 2 diabetic mice and hepatocytes. *Clinical science*. 2015;129(10):839-50.
335. Choi YK, Kim MK, Bae KH, Seo HA, Jeong JY, Lee WK, et al. Serum irisin levels in new-onset type 2 diabetes. *Diabetes research and clinical practice*. 2013;100(1):96-101.
336. Sanchis-Gomar F, Alis R, Pareja-Galeano H, Sola E, Victor VM, Rocha M, et al. Circulating irisin levels are not correlated with BMI, age, and other biological parameters in obese and diabetic patients. *Endocrine*. 2014;46(3):674-7.

337. Timmons JA, Baar K, Davidsen PK, Atherton PJ. Is irisin a human exercise gene? *Nature*. 2012;488(7413):E9-10; discussion E-1.
338. Quinones M, Folgueira C, Sanchez-Rebordelo E, Al-Massadi O. Circulating Irisin Levels Are Not Regulated by Nutritional Status, Obesity, or Leptin Levels in Rodents. *Mediators of inflammation*. 2015;2015:620919.
339. Xiong XQ, Geng Z, Zhou B, Zhang F, Han Y, Zhou YB, et al. FNDC5 attenuates adipose tissue inflammation and insulin resistance via AMPK-mediated macrophage polarization in obesity. *Metabolism: clinical and experimental*. 2018;83:31-41.
340. Perez-Sotelo D, Roca-Rivada A, Baamonde I, Baltar J, Castro AI, Dominguez E, et al. Lack of Adipocyte-FnDC5/Irisin Expression and Secretion Reduces Thermogenesis and Enhances Adipogenesis. *Scientific reports*. 2017;7(1):16289.
341. Feldmann HM, Golozoubova V, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell metabolism*. 2009;9(2):203-9.
342. Lee P, Linderman JD, Smith S, Brychta RJ, Wang J, Idelson C, et al. Irisin and FGF21 are cold-induced endocrine activators of brown fat function in humans. *Cell metabolism*. 2014;19(2):302-9.
343. Fromme T, Klingenspor M. Uncoupling protein 1 expression and high-fat diets. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2011;300(1):R1-8.
344. de Macedo SM, Lelis DF, Mendes KL, Fraga CAC, Brandi IV, Feltenberger JD, et al. Effects of Dietary Macronutrient Composition on FNDC5 and Irisin in Mice Skeletal Muscle. *Metabolic syndrome and related disorders*. 2017;15(4):161-9.
345. Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell*. 2007;131(2):242-56.
346. Tran TT, Yamamoto Y, Gesta S, Kahn CR. Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism. *Cell metabolism*. 2008;7(5):410-20.
347. Stanford KI, Middelbeek RJ, Townsend KL, Lee MY, Takahashi H, So K, et al. A novel role for subcutaneous adipose tissue in exercise-induced improvements in glucose homeostasis. *Diabetes*. 2015;64(6):2002-14.
348. Yang Z, Chen X, Chen Y, Zhao Q. Decreased irisin secretion contributes to muscle insulin resistance in high-fat diet mice. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015;8(6):6490-7.

349. Sharma N, Castorena CM, Cartee GD. Greater insulin sensitivity in calorie restricted rats occurs with unaltered circulating levels of several important myokines and cytokines. *Nutrition & metabolism*. 2012;9(1):90.
350. Kazeminasab F, Marandi SM, Ghaedi K, Safaeinejad Z, Esfarjani F, Nasr-Esfahani MH. A comparative study on the effects of high-fat diet and endurance training on the PGC-1 $\alpha$ -FNDC5/irisin pathway in obese and nonobese male C57BL/6 mice. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme*. 2018;43(7):651-62.
351. Li L, Rampersad S, Wang X, Cheng X, Qu S. Serum irisin concentrations were increased after transient continuous subcutaneous insulin infusion in type 2 diabetes mellitus patients. *Diabetes research and clinical practice*. 2016;113:44-7.
352. Olofsson LE, Unger EK, Cheung CC, Xu AW. Modulation of AgRP-neuronal function by SOCS3 as an initiating event in diet-induced hypothalamic leptin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(8):E697-706.
353. Matarazzo V, Schaller F, Nedelec E, Benani A, Penicaud L, Muscatelli F, et al. Inactivation of Socs3 in the hypothalamus enhances the hindbrain response to endogenous satiety signals via oxytocin signaling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2012;32(48):17097-107.
354. Rodriguez A, Becerril S, Mendez-Gimenez L, Ramirez B, Sainz N, Catalan V, et al. Leptin administration activates irisin-induced myogenesis via nitric oxide-dependent mechanisms, but reduces its effect on subcutaneous fat browning in mice. *International journal of obesity*. 2015;39(3):397-407.
355. Gutierrez-Repiso C, Garcia-Serrano S, Rodriguez-Pacheco F, Garcia-Escobar E, Haro-Mora JJ, Garcia-Arnes J, et al. FNDC5 could be regulated by leptin in adipose tissue. *European journal of clinical investigation*. 2014;44(10):918-25.
356. Sivitz WI, Fink BD, Donohoue PA. Fasting and leptin modulate adipose and muscle uncoupling protein: divergent effects between messenger ribonucleic acid and protein expression. *Endocrinology*. 1999;140(4):1511-9.
357. Yang Z, Chen X, Chen Y, Zhao Q. PGC-1 mediates the regulation of metformin in muscle irisin expression and function. *American journal of translational research*. 2015;7(10):1850-9.

358. Li DJ, Huang F, Lu WJ, Jiang GJ, Deng YP, Shen FM. Metformin promotes irisin release from murine skeletal muscle independently of AMP-activated protein kinase activation. *Acta physiologica*. 2015;213(3):711-21.
359. Li M, Yang M, Zhou X, Fang X, Hu W, Zhu W, et al. Elevated circulating levels of irisin and the effect of metformin treatment in women with polycystic ovary syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2015;100(4):1485-93.
360. Li Z, Wang G, Zhu YJ, Li CG, Tang YZ, Jiang ZH, et al. The relationship between circulating irisin levels and tissues AGE accumulation in type 2 diabetes patients. *Bioscience reports*. 2017;37(3).
361. Stengel A, Hofmann T, Goebel-Stengel M, Elbelt U, Kobelt P, Klapp BF. Circulating levels of irisin in patients with anorexia nervosa and different stages of obesity--correlation with body mass index. *Peptides*. 2013;39:125-30.
362. Tekin S, Erden Y, Ozyalin F, Cigremis Y, Colak C, Sandal S. The effects of intracerebroventricular infusion of irisin on feeding behaviour in rats. *Neuroscience letters*. 2017;645:25-32.
363. Shibata H, Perusse F, Bukowiecki LJ. The role of insulin in nonshivering thermogenesis. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 1987;65(2):152-8.
364. Rothwell NJ, Stock MJ. A role for insulin in the diet-induced thermogenesis of cafeteria-fed rats. *Metabolism: clinical and experimental*. 1981;30(7):673-8.
365. Eden E, Navon R, Steinfeld I, Lipson D, Yakhini Z. GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC bioinformatics*. 2009;10:48.
366. Datta R, Podolsky MJ, Atabai K. Fat fibrosis: friend or foe? *JCI insight*. 2018;3(19).

## **8. Anexos**





## 8. Anexos

### Anexo 1: Consentimientos informados proporcionado a los pacientes.

Consentimiento 1: Proporcionado a los pacientes que se someten a cirugía bariátrica y cirugía plástica:



#### HOJA DE INFORMACIÓN PARA EL PARTICIPANTE

**TITULO PROYECTO:** *Evolución de las hormonas gastrointestinales y microARNs tras la disminución de la adiposidad y la modificación de los niveles GH. El eje cerebro-intestino*

**IDENTIDAD RESPONSABLE:** *Dr. Fernando Cordido Carballido*

**SERVICIO MÉDICO / GRUPO DE INVESTIGACIÓN:** *Servicio de Endocrinología. Hospital Universitario A Coruña. Xerencia Xestión Integrada A Coruña (XXIAC)*

D. \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ Dña.:  
 .....  
 .....

*(Espacio para colocar la etiqueta con los datos del donante muestra)*

#### INTRODUCCIÓN.-

Le proponemos participar en el proyecto de investigación titulado “*Evolución de las hormonas gastrointestinales tras la disminución de la adiposidad y la modificación de los niveles GH. El eje cerebro-intestino*”. Este proyecto tiene como finalidad aumentar el conocimiento de la enfermedad que usted padece y por la que va a ser tratado.

Toda investigación biomédica sobre enfermedades requiere recoger datos y muestras biológicas de personas afectadas por la patología a estudiar y de personas no afectadas por dicha enfermedad para analizarlas y obtener conclusiones para conocer mejor y avanzar en el diagnóstico y/o tratamiento de las enfermedades que se van a investigar. Las muestras obtenidas para el diagnóstico o control de las enfermedades, una vez utilizadas con esta finalidad, resultan también útiles y necesarias para la investigación.

Siguiendo lo establecido por la Ley 14/2007, de Investigación Biomédica, la Ley Orgánica 15/1999, de Protección de Datos Personales, y sus normas de desarrollo, le solicitamos que lea detenidamente este documento de información y el consentimiento informado que se le adjunta al final para su firma.

Este documento se le proporciona con el fin de darle información suficiente para que pueda entender los posibles riesgos y beneficios derivados de su participación en esta línea de investigación, decidiendo si desea ser incluido o no en la misma. Antes de tomar su decisión, lea atentamente este documento y haga tantas preguntas como desee hasta asegurarse de que lo ha entendido y desea participar.

***Su participación en este proyecto de investigación es totalmente voluntaria. Si firma el consentimiento informado, confirmará que desea participar. Puede negarse a participar o retirar su consentimiento en cualquier momento posterior a la firma sin tener que explicar los motivos. Su no-participación o retirada posterior del consentimiento no afectará en modo alguno a su atención sanitaria presente o futura.***

El objetivo de este proyecto de investigación es estudiar la evolución de una serie de hormonas en diferentes grupos de pacientes afectados de obesidad y pacientes no afectados de obesidad, observando igualmente su relación en cuanto a los niveles de glucosa. Por tanto, dichas muestras serán utilizadas en el proyecto de investigación antes mencionado cuyo investigador principal es el Dr. Fernando Cordido Carballido del grupo de investigación del Servicio de Endocrinología y serán recogidas bajo su supervisión.

***Debe saber que la realización de este proyecto de investigación en el que se utilice estas muestras, será previamente autorizada por el Comité de Ética competente.***

La finalidad principal de este proyecto, es progresar en el conocimiento de las hormonas relacionadas con el sobrepeso y en la obesidad y en su prevención, diagnóstico, pronóstico y tratamiento médico. Para ello y, dentro de la propia labor asistencial que realizamos con pacientes como usted, obtendremos diferentes muestras biológicas para analizar y estudiar. Las muestras obtenidas para el diagnóstico o control de las enfermedades, una vez utilizadas con esta finalidad, resultan también útiles y necesarias para la investigación. De hecho, muchos de los avances científicos obtenidos en los últimos años en medicina son fruto de este tipo de estudios. Sin embargo, hay ocasiones en que estas muestras sobrantes son insuficientes y es necesario obtener alguna pequeña muestra adicional.

El tiempo aproximado de duración total de este estudio de investigación es de tres años, a lo largo de los cuales seleccionaremos a los candidatos idóneos para el desarrollo de la investigación, obtendremos las muestras biológicas y los datos necesarios y realizaremos los análisis de los resultados para obtener conclusiones referentes al objeto del estudio.

Lo que le solicitamos es AUTORIZACIÓN para obtener, dentro del proyecto de investigación que le hemos descrito:

- **UNA MUESTRA DE SANGRE ADICIONAL** a la que se le deba extraer en las analíticas de rutina que se le deban realizar en este servicio de endocrinología, como parte de la atención sanitaria de seguimiento y control de la enfermedad que padece.
- **Si por la patología concreta que usted padece, va a ser sometido a una intervención quirúrgica abdominal**, necesitaríamos que nos autorice a derivar a investigación **PARTE DEL TEJIDO ADIPOSO (GRASA) Y ESTÓMAGO QUE SE LE VA A EXTRAER** como parte de la cirugía que es necesario realizarle.
- **INFORMACIÓN CLÍNICA** que nos permita analizar conjuntamente los resultados clínicos y los resultados derivados de las técnicas con las que se analicen las muestras.  
Para el buen desarrollo de los estudios de investigación, es necesario obtener datos clínicos relativos al donante de las muestras, por lo que necesitaremos acceder a su historia clínica para recabar la información que será conservada junto a la muestra.  
Las condiciones de conservación y uso de dicha información serán las indicadas en el apartado de Confidencialidad de este documento.

Las muestras y la información asociada a las mismas se almacenarán en las áreas establecidas para tal fin, dentro de las instalaciones de la XXIAC, bajo la responsabilidad del **Dr. Fernando Cordido Carballido**.

Es muy importante subrayar que, **para la obtención de las muestras, no se le someterá a ninguna prueba ni riesgo adicional al inherente al proceso asistencial al que va a ser sometido.**

***La donación de estas muestras no impedirá que usted o su familia puedan usarlas cuando sea necesario por motivos de salud, siempre que estén disponibles.***

#### **RIESGOS.-**

La obtención de las muestras antes descritas se realizará durante el proceso asistencial que se le proporciona en este centro. Usted no sufrirá ningún riesgo adicional por donar estas muestras a investigación.

**COMPENSACIÓN Y BENEFICIOS.-**

Usted no obtendrá ningún beneficio económico directo por su participación en los estudios de investigación que se lleven a cabo con sus muestras, ni tendrá derechos sobre posibles beneficios comerciales de los descubrimientos que puedan conseguirse como resultado de la investigación biomédica.

La posibilidad de estudiar sus muestras, puede beneficiar en el futuro a pacientes con la misma enfermedad que usted padece o enfermedades relacionadas con la misma. No obstante, dado que las investigaciones pueden durar años, es posible que usted no obtenga un beneficio directo de los resultados.

**CONFIDENCIALIDAD.-**

Toda la información que se obtenga de analizar sus muestras, así como toda la información clínica referente a usted utilizada en esta línea de investigación, será considerada confidencial y tratada en consecuencia, de acuerdo con lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de Diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal (LOPD), la Ley 14/2007, de 3 de Julio de Investigación Biomédica (LIBM) y las normas de desarrollo de ambas leyes.

Para garantizar la confidencialidad de su identidad (asegurar que la información de su muestra no se relaciona con su identidad), su muestra sólo irá identificada desde su entrada en el proyecto de investigación, con un código. Sólo este código, y nunca su identidad aparecerá en el material con el que se trabaje. La relación entre su código y su identidad, quedará custodiada por el personal autorizado del Grupo de Investigación del Servicio de Endocrinología de la XXIAC, INIBIC, en una base de datos de gestión de información que cumple todos los requisitos legales exigidos, tanto por la LOPD como por la LIBM y las normativas que las desarrollan. En base a todo ello, le informamos que se adoptarán todas las medidas necesarias para que tal información, no esté disponible salvo para el personal autorizado, el cual tiene el **deber legal de guardar secreto**. De esta manera podemos asegurar que cualquier información que se obtenga a partir de sus muestras, permanezca confidencial pero pueda ser asociada a sus datos, por si fuera información de interés clínico.

Es importante que entienda, que es posible que sus muestras y los datos asociados a las mismas sean cedidas a otros investigadores, nacionales o internacionales, que colaboren en nuestras investigaciones; o que algunas de las técnicas necesarias para el análisis de sus muestras se realicen en otros centros colaboradores, ubicados en ocasiones en territorio nacional y en otras en el extranjero. En todo caso, le informamos que dichas cesiones siempre se efectuarán de un modo no identificable, es decir, sólo se cederá la muestra asociada a datos genéricos (sexo, patología, peso, edad,...) y codificados, que evitarán que el receptor de la muestra pueda conocer su identidad. A todos ellos se les exigirá que nos garanticen que trabajarán con el mismo nivel de protección de datos exigido por la normativa española de protección de datos de carácter personal, y que, nos proporcionen información referente a la trazabilidad de la muestra y, nos notifiquen la destrucción o devolución de la muestra sobrante, una vez finalizados los estudios que a ellos les correspondan hacer. Usted puede autorizarnos o no a realizar las cesiones aquí indicadas, indicando su decisión en el apartado correspondiente de la hoja de firma del consentimiento informado.

Por otro lado, es posible que los resultados de las investigaciones sean publicados en la literatura científica, pero entendiendo estos resultados como los obtenidos de la totalidad de las muestras, no los resultados individuales. Si este fuera el caso, su identidad permanecerá completamente confidencial y nunca formará parte de ninguna publicación.

Con su aceptación a participar en este estudio de investigación, usted accede a que esta información pueda ser transferida en las mencionadas condiciones.

Puede ejercitar los **DERECHOS ACCESO, RECTIFICACIÓN, CANCELACIÓN Y/O OPOSICIÓN (DERECHOS ARCO)** que le reconoce la normativa española de protección de datos, dirigiendo su solicitud por escrito

junto a una copia de su DNI (con el fin de garantizar que el ejercicio de estos derechos es realizado por la persona autorizada para ello) a:

- **ENTREGA EN PERSONA**, en la Secretaría del Servicio de Endocrinología de la XXIAC, a la atención de **Dr. Fernando Cordido Carballido**
- **CORREO POSTAL:**  
**Dr. Fernando Cordido Carballido**  
Servicio de Endocrinología.  
Planta tercera, Hospital A Coruña  
Xerencia Xestión Integrada A Coruña  
As Xubias, 84. A Coruña. 15006

Si usted decide **REVOCAR SU CONSENTIMIENTO**, deberá hacernos llegar a la *Secretaría del Servicio Endocrinología de la XXIAC*, a la atención del **Dr. Fernando Cordido Carballido** la hoja de revocación totalmente cubierta y firmada que aparece al final de este documento.

Una vez cubiertos todos los campos nos la puede hacer llegar de cualquiera de las maneras descritas anteriormente.

**INFORMACIÓN ADICIONAL.**- Usted puede contactar con el médico responsable de este estudio, si le surge cualquier duda sobre su participación en esta línea de investigación o sobre sus derechos como paciente, en el **Teléfono: 981 17 81 27**. En todo momento se pondrán los medios necesarios para facilitarle la información más adecuada.

#### **NUEVOS HALLAZGOS Y RESULTADOS.-**

La evaluación de los resultados se hará sólo por grupos (por ejemplo, hombres / mujeres, grupos de edad, diagnósticos, etc.) y no de forma individual. Debe comprender que los resultados de valor que se pudieran obtener provendrían del estudio de múltiples muestras, y en ningún caso de la suya exclusivamente.

Las implicaciones médicas de los resultados de las distintas pruebas, si es que los hay, sólo serán conocidas cuando se haya completado la investigación.

***Usted debe saber que, en cumplimiento de la LIBM, tiene derecho a conocer o no, la información obtenida con el análisis de sus muestras.***

***En el caso de que usted decida no ser informado, la ley establece que cuando la información obtenida sea necesaria para evitar un grave perjuicio para la salud de sus familiares biológicos, un Comité de expertos estudiará el caso y deberá decidir entre la conveniencia o no de informar a los afectados o a sus representantes legales.***

#### **DESTINO DE LA MUESTRA UNA VEZ FINALIZADO EL PROYECTO DE INVESTIGACION.-**

El remanente de su muestra y de las muestras derivadas del estudio de la misma será almacenado en la ***Colección de muestras para la investigación de enfermedades endocrinas, metabólicas y nutricionales creada por el Dr. Fernando Cordido Carballido*** en el Servicio de Endocrinología de la XXIAC y cuya finalidad es utilizar, las muestras almacenadas, en las distintas investigaciones que este grupo de investigación realice en referencia al estudio de distintas enfermedades endocrinas, metabólicas y nutricionales tales como la obesidad, la diabetes, etc. Por tanto, dichas muestras serán utilizadas en los distintos proyectos de investigación en los que participe la responsable de la colección, el **Dr. Fernando Cordido Carballido** y el Grupo de Investigación del Servicio de Endocrinología de la XXIAC. Debe saber que la realización de todos estos proyectos de investigación en los que se utilicen estas muestras, será previamente autorizada por el Comité de Ética competente.

En una segunda fase, cuando así lo estime conveniente el investigador responsable de la custodia de su muestra, el **Dr. Fernando Cordido Carballido**, y siempre en el supuesto de que las muestras no se hubiesen agotado, el remanente será almacenado en el **Biobanco A Coruña (XXIAC)**.

El Biobanco es un banco de almacenamiento de muestras de origen humano bajo criterios de calidad, para su utilización en investigaciones nacionales o internacionales dentro del campo de la biomedicina. Su funcionamiento se centra en gestionar, bajo criterios de seguridad, calidad y eficiencia; la recepción, procesamiento, almacenamiento y posterior cesión de muestras a los investigadores solicitantes, para que utilicen las mismas en sus proyectos de investigación; siempre y cuando, éstos cumplan todos los requisitos éticos y legales exigibles para este tipo de prácticas, tal y como establece la LIBM y la normativa que la complementa.

El remanente de sus muestras será enviado al Biobanco A Coruña, para ser almacenadas en las instalaciones de dicho Banco de Muestras y, posteriormente, ser cedidas a los investigadores que hayan pasado la aprobación del Comité de Ética y del Comité Científico del Biobanco. A los estudios de investigación para los que se quieran utilizar las muestras almacenadas en el Biobanco A Coruña, se les exigirá tener la aceptación del Comité de Ética correspondiente, tal y como se establece en la normativa aplicable. Las cesiones de muestras para su utilización en un proyecto de investigación internacional se realizarán siguiendo las pautas establecidas para estos supuestos en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal y en el Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de desarrollo de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal.

Para garantizar la confidencialidad de su identidad, su muestra sólo irá identificada desde su entrada en el Biobanco con un código. Sólo este código, y nunca su identidad aparecerá en el material con el que se trabaje. La relación entre su código y su identidad quedará custodiada por el personal autorizado del Biobanco en una base de datos de gestión de información que cumple todos los requisitos legales exigidos tanto por la LOPD como por la LIBM y las normativas que las desarrollan, en base a todo ello le informamos que se adoptarán todas las medidas necesarias para que tal información no esté disponible salvo para el personal autorizado, el cual tiene el deber legal de guardar secreto. De esta manera podemos asegurar que cualquier información que se obtenga a partir de sus muestras permanezca confidencial pero pueda ser asociada a sus datos por si fuera información de interés clínico.

Es importante que entienda que la cesión de las muestras a los investigadores que nos las soliciten, siempre se efectuará de un modo no identificable, es decir, sólo se cederá la muestra asociada a datos genéricos (sexo, patología, peso, edad,...) y codificados que evitarán que el investigador receptor de la muestra pueda conocer su identidad. A todos ellos se les exigirá que nos garanticen que trabajarán con el mismo nivel de protección de datos exigido por la normativa española de protección de datos de carácter personal, y que, nos proporcionen información referente a la trazabilidad de la muestra y, nos notifiquen la destrucción o devolución de la muestra sobrante, una vez finalizada la investigación para la que se le autorizó a usar la muestra. Usted puede autorizarnos o no a realizar las cesiones aquí indicadas, indicando su decisión en el apartado correspondiente de la hoja de firma del consentimiento informado.

**La donación de estas muestras no impedirá que usted o su familia puedan usarlas cuando sea necesario por motivos de salud, siempre que estén disponibles.**

#### **RESTRICCIONES DE USO.-**

Usted puede indicarnos si quiere establecer algún tipo de restricción sobre sus muestras y datos, en relación a su posible uso en determinados proyectos de investigación o en cuanto a determinadas cesiones. Para ello dispone de un apartado específico en la hoja de firma del consentimiento informado.

#### **INFORMACIÓN DISPONIBLE PARA EL PARTICIPANTE.-**

El Biobanco y/o la persona responsable del proyecto de investigación tendrán a disposición de los participantes la información sobre los proyectos de investigación en los que se utilicen las muestras y datos.

En determinadas circunstancias el Comité de Ética competente podrá decidir si es necesario contactar con el participante para facilitarle información de manera individualizada.

De producirse un eventual cierre del biobanco o revocación de la autorización para su constitución y funcionamiento, la información sobre el destino de las muestras estará a su disposición en la página web de la XXIAC y del INIBIC, [www.hospitalcoruna.es](http://www.hospitalcoruna.es), [www.inibic.es](http://www.inibic.es) y en el Registro Nacional de Biobancos para Investigación Biomédica del Instituto de Salud Carlos III (ISC III), con página web [www.isciii.es](http://www.isciii.es), con el fin de que pueda manifestar su conformidad o disconformidad con el destino previsto para las muestras.



## CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PARTICIPANTE MAYOR DE EDAD

Nombre y apellidos del

participante:.....

(Espacio para colocar la etiqueta con los datos del donante muestra)

Si ha comprendido la información que se le ha proporcionado, ha resuelto cualquier duda que pudiese tener y decide colaborar con el Proyecto de Investigación titulado: *Evolución de las hormonas gastrointestinales tras la disminución de la adiposidad y la modificación de los niveles GH. El eje cerebro-intestino*, en los términos indicados en el documento informativo que se le entrega junto con este consentimiento, por favor, lea y firme a continuación esta hoja.

Si no está de acuerdo con alguno de los apartados nos lo puede indicar marcando la casilla NO correspondiente.

Si firma esta hoja sin marcar ningún NO, entenderemos que acepta todo lo aquí indicado.

Presto libremente mi conformidad para participar el Proyecto de Investigación titulado: *Evolución de las hormonas gastrointestinales tras la disminución de la adiposidad y la modificación de los niveles GH. El eje cerebro-intestino*.

- Autorizo a que obtengan las muestras antes indicadas en la Hoja de Información que me han facilitado:  NO
- Autorizo a que consulten y obtengan información de mis datos clínicos:  NO
- Acepto que contacten conmigo cuando sea necesario:  NO
- Quiero ser informado de los resultados de las investigaciones que sean de interés para mi salud:  NO

Teléfono / E-mail de contacto:

.....

**CESIONES:** Autorizo a que mis muestras y datos sean cedidas, en las condiciones indicadas, para la realización de este proyecto de investigación: COMUNITARIAS  NO

EXTRACOMUNITARIAS  NO

Autorizo a que mis muestras y datos sean depositados en *Colección de muestras para la investigación de enfermedades endocrinas, metabólicas y nutricionales*, en las condiciones indicadas.  NO

Autorizo a que mis muestras y datos sean cedidos al *Biobanco A Coruña*, en las condiciones indicadas, para su utilización en cualquier investigación biomédica.  NO

Firma del participante

Identidad del participante: .....

Firma del profesional responsable

Identidad del responsable: .....

**Firma del testigo**

**Da fe del consentimiento verbal del participante, el cual lo autoriza a firmar en su nombre**

**Identidad del testigo:** ..... **DNI:** .....

*Solo se firmará en aquellos casos en los que el participante no pueda leer y/o escribir y delegue la firma en el testigo.*

**Firma del representante legal**

**Identidad representante legal:** ..... **DNI:** .....

*Solo se firmará en aquellos casos en los que el participante esté incapacitado legalmente.*

En ....., a ..... de ..... de .....

***Le agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y la medicina.***





XUNTA DE GALICIA  
CONSELLERÍA DE SANIDADE



SERVIZO  
GALEGO  
de SAÚDE | Xerencia Xestión Integrada  
A Coruña

## REVOCAÇÃO DEL CONSENTIMIENTO

Yo, D./Dña.....con DNI .....revoco el consentimiento prestado en fecha.....de.....de 20..... Y no deseo proseguir la donación voluntaria, que doy con esta fecha por finalizada.

- SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LAS MUESTRAS.  
 SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE MIS DATOS PERSONALES.  
 La muestra quedará anonimizada irreversiblemente y podrá ser utilizada en proyectos de investigación.  
 SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE MIS DATOS Y MUESTRAS.

Fdo.:

En.....a.....de.....de 20.....

Yo, D./Dña.....con DNI.....

Como representante legal de D/Dña....., con DNI.....,

Revoco el consentimiento prestado en fecha.....de.....de 20.....y no deseo proseguir la donación voluntaria, que doy con esta fecha por finalizada.

- SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LAS MUESTRAS.  
 SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE SUS DATOS PERSONALES.  
 La muestra quedará anonimizada irreversiblemente y podrá ser utilizada en proyectos de investigación.  
 SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE SUS DATOS Y MUESTRAS.

Fdo.:

En.....a.....de.....de 20.....

Consentimiento 2: Proporcionado a los pacientes que se someten a cirugías generales y que hemos utilizado como controles.



**BIOBANCO A CORUÑA**

## DOCUMENTO DE INFORMACIÓN

### PARTICIPANTE EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

**BIOBANCO A CORUÑA. TITULAR DIRECCIÓN CIENTÍFICA: Ángel Concha López.**

#### **FINALIDAD DE LA PARTICIPACIÓN.-**

**Le solicitamos su consentimiento para almacenar en el Biobanco A Coruña muestras biológicas obtenidas durante su atención médica en este centro sanitario o en el curso de un estudio de investigación al que accedió a participar, con el fin de que puedan ser utilizadas en investigación biomédica.**

Las muestras obtenidas para el diagnóstico o control de las enfermedades, o para el desarrollo de un estudio de investigación concreto, una vez empleadas con esta finalidad, resultan también útiles y necesarias para otras investigaciones. De hecho, muchos de los avances científicos obtenidos en los últimos años en medicina son fruto de este tipo de estudios. Toda investigación biomédica requiere recoger datos y muestras biológicas de personas afectadas por la patología a estudiar y de personas no afectadas por dicha enfermedad, para analizarlas y obtener conclusiones para conocer mejor y avanzar en el diagnóstico y/o tratamiento de las enfermedades que se van a investigar. Los Biobancos son bancos de almacenamiento de muestras de origen humano para su utilización en investigaciones nacionales o internacionales dentro del campo de la biomedicina, sin ánimo de lucro. Su funcionamiento se centra en gestionar, bajo criterios de seguridad, calidad y eficiencia; la recepción, procesamiento, almacenamiento y posterior cesión de muestras a los investigadores solicitantes, para que utilicen las mismas en sus proyectos de investigación; siempre y cuando, éstos cumplan todos los requisitos éticos y legales exigibles para este tipo de prácticas. Toda la información que le facilitamos en este documento y la actividad del Biobanco están reguladas por la *Ley Orgánica 15/1999, de 13 de Diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal (LOPD)*, la *Ley 14/2007, de 3 de Julio de Investigación Biomédica (LIBM)* y el *Real Decreto 1716/2011, de 11 de noviembre*.

**Su participación es totalmente voluntaria.** Si firma el consentimiento informado, confirmará que desea participar. Puede negarse a participar o retirar su consentimiento en cualquier momento posterior a la firma sin tener que explicar los motivos. **Su no-participación o retirada posterior del consentimiento no**

**afectará en modo alguno a su atención sanitaria presente o futura. Antes de firmar el consentimiento puede preguntarnos cualquier duda que le surja o consultar con terceras personas.**

#### **MUESTRAS BIOLÓGICAS E INFORMACIÓN ASOCIADA.**

##### **POSIBLES INCONVENIENTES.-**

MUESTRAS BIOLÓGICAS (Sangre, Líquidos Biológicos, Tejidos) que se le han obtenido durante su atención sanitaria en este centro hospitalario o durante el desarrollo de un estudio de investigación en el que accedió a participar, y que ya no es necesario utilizar para la finalidad por la que se obtuvieron.

El Biobanco guardará y dispondrá de estas muestras sobrantes para realizar los estudios de investigación biomédica. Las muestras y la información asociada a las mismas se almacenarán en las áreas establecidas para tal fin, dentro de las instalaciones de la Xerencia Xestión Integrada A Coruña, bajo la responsabilidad de la Dirección del Biobanco A Coruña.

**Es muy importante subrayar que, para la obtención de las muestras, no se le someterá a ninguna prueba ni riesgo adicional a los que deriven de su adecuada atención médica. La donación de estas muestras no impedirá que usted o su familia puedan usarlas, cuando sea necesario por motivos de salud, siempre que estén disponibles y no hayan sido anonimizadas.**

INFORMACIÓN CLÍNICA que, junto con los resultados de los estudios realizados en las muestras, nos permita extraer conclusiones útiles para el manejo de las enfermedades. Para el buen desarrollo de los estudios de investigación, es necesario obtener datos clínicos relativos al donante de las muestras, por lo que necesitaremos acceder a su historia clínica para recabar la información que será conservada junto a la muestra. *(Más información en el apartado de Confidencialidad.)*

**En caso de ser necesaria alguna información o muestra adicional, y siempre que usted nos lo autorice en la hoja de consentimiento, la institución sanitaria se podría poner en contacto con usted para solicitarle nuevamente su colaboración.**

##### **CONDICIONES DE LA DONACIÓN.-**

La donación y utilización de muestras biológicas humanas será gratuita, por lo que usted no obtendrá ni ahora ni en el futuro ningún beneficio económico por la misma. Usted renuncia a cualquier derecho de naturaleza económica, patrimonial o potestativa sobre los resultados o potenciales beneficios económicos que puedan derivarse de las investigaciones que se realicen con la muestra que cede al Biobanco. Tampoco obtendrá ningún otro beneficio directo para su salud como resultado de su donación. Sin embargo, los conocimientos obtenidos gracias a los estudios llevados a cabo a partir de su muestra y de muchas otras, pueden ayudar al avance médico y, por ello, a otras personas.

El biobanco podrá repercutir únicamente los costes de obtención, procesado y envío de las muestras a los investigadores/instituciones que las solicitaron. La titularidad de los resultados de la investigación corresponderá al investigador y a la Institución donde se realice la investigación. Las muestras podrán ser

cedidas a grupos de investigación bajo acuerdos de colaboración y siempre para investigación biomédica supervisada por Comités Científicos y de Ética acreditados.

#### **CONFIDENCIALIDAD.-**

Toda la información referida a usted será considerada confidencial y tratada en base a las indicaciones establecidas en la normativa indicada al inicio de este documento. Tal información sólo estará disponible para el personal autorizado, el cual tiene el **deber legal de guardar secreto**. Sus muestras y sus datos clínicos asociados a las mismas, pasarán a formar parte del fichero de datos del Biobanco.

**Para garantizar la confidencialidad de su identidad (asegurar que la información de su muestra no se relaciona con su identidad), su muestra sólo irá identificada, desde su entrada en el Biobanco, con un código.** Sólo este código, y nunca su identidad aparecerá en el material con el que se trabaje. La relación entre su código y su identidad quedará custodiada por el personal autorizado, en una base de datos que cumple todos los requisitos legales exigidos. De esta manera podemos asegurar que cualquier información que se obtenga a partir de sus muestras, permanezca confidencial pero pueda ser asociada a sus datos, por si fuera información de interés clínico.

La cesión a los investigadores, comunitarios (países miembros de la Unión Europea) o extracomunitarios (no miembros), de las muestras y los datos asociados a las mismas, se efectuará con carácter general de manera anónima o disociada, es decir, sólo se cederá la muestra asociada a datos genéricos, sin que se pueda identificar por medios razonables su identidad. En las investigaciones en las que se considere necesario para el desarrollo de las mismas, a propuesta del biobanco y previo informe favorable de los comités externos del biobanco, podrán enviarse sus muestras codificadas (se mantendrá en el biobanco el vínculo que relaciona su identidad con la muestra cedida). A todos ellos se les exigirá que nos garanticen que trabajarán con el mismo nivel de protección de datos exigido por la normativa española.

Todo proyecto en el que se use muestras del Biobanco deberá estar previamente autorizado por el Comité de Ética competente; y las cesiones de muestras por el Biobanco deberán estar evaluadas favorablemente por el Comité de Ética y el Comité Científico del Biobanco.

Por otro lado, es posible que los resultados de las investigaciones sean publicados en la literatura científica, pero entendiendo estos resultados como los obtenidos de la totalidad de las muestras, no los resultados individuales. Si este fuera el caso, su identidad permanecerá completamente confidencial y nunca formará parte de ninguna publicación. Con su aceptación a participar con este Biobanco, usted accede a que esta información pueda ser transferida en las mencionadas condiciones. Usted puede no autorizarnos a realizar las cesiones aquí indicadas, indicando su decisión en el apartado correspondiente de la hoja del consentimiento informado.

Puede ejercitar los **DERECHOS ACCESO, RECTIFICACIÓN, CANCELACIÓN Y/O OPOSICIÓN (DERECHOS ARCO)** que le reconoce la normativa española, dirigiendo su solicitud por escrito junto a una copia de su DNI (con el fin de garantizar que el ejercicio de estos derechos es realizado por la persona autorizada para ello) a:

- **ENTREGA EN PERSONA**, en el Biobanco A Coruña, de la Xerencia Xestión Integrada A Coruña, a la atención de la Dirección Científica del Biobanco.

- **CORREO POSTAL:** Dirección Científica Biobanco. Biobanco A Coruña. Planta Sótano. Hospital Teresa Herrera. Xerencia Xestión Integrada A Coruña. As Xubias, 84. 15006. A Coruña.
- **FAX:** 981176441 **CORREO ELECTRÓNICO:** BioBanco.CHUAC@sergas.es

Usted puede contactar con los responsables del Biobanco, si le surge cualquier duda sobre su participación con el Biobanco, en el **Teléfono: 981176437**. En todo momento se pondrán los medios necesarios para facilitarle la información más adecuada.

Si usted decide **REVOCAR SU CONSENTIMIENTO**, deberá hacernos llegar, de cualquiera de las maneras descritas anteriormente, al Biobanco A Coruña, a la atención de la Dirección Científica del Biobanco, la hoja de revocación totalmente cubierta y firmada, que aparece al final de este documento. Usted debe saber que la revocación tendrá efectos a partir del momento en que se formalice y no afectará a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hayan llevado a cabo hasta ese momento.

#### **RESTRICCIONES DE USO DE LA MUESTRA.-**

Usted puede indicarnos si quiere establecer algún tipo de restricción sobre sus muestras y datos, en relación a su posible uso en determinados proyectos de investigación o en cuanto a determinadas cesiones. Para ello dispone de un apartado específico en la hoja de firma del consentimiento informado.

#### **INFORMACIÓN SOBRE RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN.-**

La evaluación de los resultados se hará sólo por grupos (por ejemplo, hombres / mujeres, grupos de edad, diagnósticos, etc.) y no de forma individual. Debe comprender que los resultados de valor que se pudieran obtener provendrían del estudio de múltiples muestras, y en ningún caso de la suya exclusivamente. Las implicaciones médicas de los resultados de las distintas pruebas, si es que los hay, sólo serán conocidas cuando se haya completado la investigación.

El Biobanco tendrá a disposición de los participantes la información sobre los proyectos de investigación en los que se utilicen las muestras y datos. En determinadas circunstancias el Comité de Ética competente podrá decidir si es necesario contactar con el participante para facilitarle información de manera individualizada. Las diferentes investigaciones en las que se utilicen sus muestras y datos pueden requerir la realización de **estudios de biología celular y genéticos**, y a partir de ellos se puede obtener información que puede ser relevante para su salud o la de su familia. En los **estudios genéticos** se puede descubrir información no buscada, lo que se denominan hallazgos inesperados. Cuando esto se produzca, los resultados obtenidos serán validados y analizados por profesionales para determinar si son fiables en un porcentaje óptimo que aconseje su comunicación a las personas afectadas.

**Usted debe saber que tiene derecho a conocer, o no, la información obtenida con el análisis de sus muestras. En el caso de que usted decida no ser informado, la ley establece que cuando la información obtenida sea necesaria para evitar un grave perjuicio para la salud de sus familiares, un Comité de expertos estudiará el caso y deberá decidir entre la conveniencia o no de informar a los afectados o a sus representantes legales.**

#### **CIERRE DEL BIOBANCO.-**

De producirse un eventual cierre del biobanco o revocación de la autorización para su constitución y funcionamiento, la información sobre el destino de las muestras estará a su disposición en la página web del Biobanco [http://www.inibic.es/inv\\_apoyo\\_biobanco.html](http://www.inibic.es/inv_apoyo_biobanco.html) y en el Registro Nacional de Biobancos para Investigación Biomédica del Instituto de Salud Carlos III (ISC III), con página web [www.isciii.es](http://www.isciii.es), con el fin de que pueda manifestar su conformidad o disconformidad con el destino previsto para las muestras.

**Muchas gracias por su colaboración. Biobanco A Coruña**

## BIOBANCO A CORUÑA

### CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PARTICIPANTE MAYOR DE EDAD

*(Espacio para colocar la etiqueta con los datos del donante muestra)*

Yo,..... *(Nombre y apellidos del participante manuscritos)* he leído la hoja de información y pude hacer todas las preguntas que consideré necesarias, y acepto donar al Biobanco mis muestras para que se utilicen en las condiciones que me han informado. **RESTRICCIONES DE USO** (puede indicarnos cruzando la correspondiente casilla las restricciones de uso que considere. En caso de no marcar ninguna casilla entenderemos que **NO** manifiesta ninguna condición de uso).

- NO** autorizo a utilizar mis muestras y datos en investigaciones que .....
- NO** autorizo a que consulten y obtengan información de mi historia clínica.
- NO** acepto que contacten conmigo cuando sea necesario.
- NO** quiero ser informado de los resultados de las investigaciones que sean de interés para mi salud.
- NO** autorizo la cesión de mis muestras y datos de manera codificada (disociada).
- NO** autorizo la cesión de mis muestras y datos fuera de la Unión Europea.

**Si acepta que se contacte con usted cuando sea necesario, por favor indique su Teléfono / E-mail de contacto:**

.....

**Firma del participante**

**Firma de la persona que informa**

**Identidad del participante:** .....

**Identidad de la persona que informa:** .....

**Firma del testigo Confirmo el consentimiento verbal del participante, el cual me autoriza a firmar en su nombre Identidad del testigo:**

..... **DNI:** .....

*Solo se firmará en aquellos casos en los que el participante no pueda leer y/o escribir y delegue la firma en el testigo. Firma del representante legal Identidad representante legal:*

..... DNI: ..... *Solo se firmará en aquellos casos en los que el participante esté incapacitado legalmente.*

En ....., a ..... de ..... de ..... *Le agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y la medicina.*



## BIOBANCO A CORUÑA

### REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Yo, D./Dña: ..... con DNI ..... Revoco / anulo el consentimiento prestado en fecha: ..... Y no deseo proseguir la donación voluntaria realizada al .....(nombre del Centro Sanitario), que doy con esta fecha por finalizada.

- SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LAS MUESTRAS.
- SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE MIS DATOS PERSONALES. La muestra quedará anonimizada irreversiblemente y podrá ser utilizada en proyectos de investigación.
- SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE MIS DATOS Y MUESTRAS.

Fdo.:

En.....a.....de.....de 20.....

Yo, D./Dña: ..... con DNI ..... En calidad de: *(señale la opción aplicable a su caso)*

- Testigo que firma en lugar
- Representante legal

de D./Dña: ..... con DNI ....., Revoco / anulo el consentimiento prestado en fecha: ..... Y no deseo proseguir la donación voluntaria realizada al .....(nombre del Centro Sanitario), que doy con esta fecha por finalizada.

- SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LAS MUESTRAS.
- SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE MIS DATOS PERSONALES. La muestra quedará anonimizada irreversiblemente y podrá ser utilizada en proyectos de investigación.
- SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE MIS DATOS Y MUESTRAS.

Fdo.:

En.....a.....de.....de 20.....



## Anexo 2: Mapas de restricción de los plásmidos empleados

a. Plásmido *pCMV-VSV-G*, en la *Figura 99* se representa su mapa de restricción correspondiente.

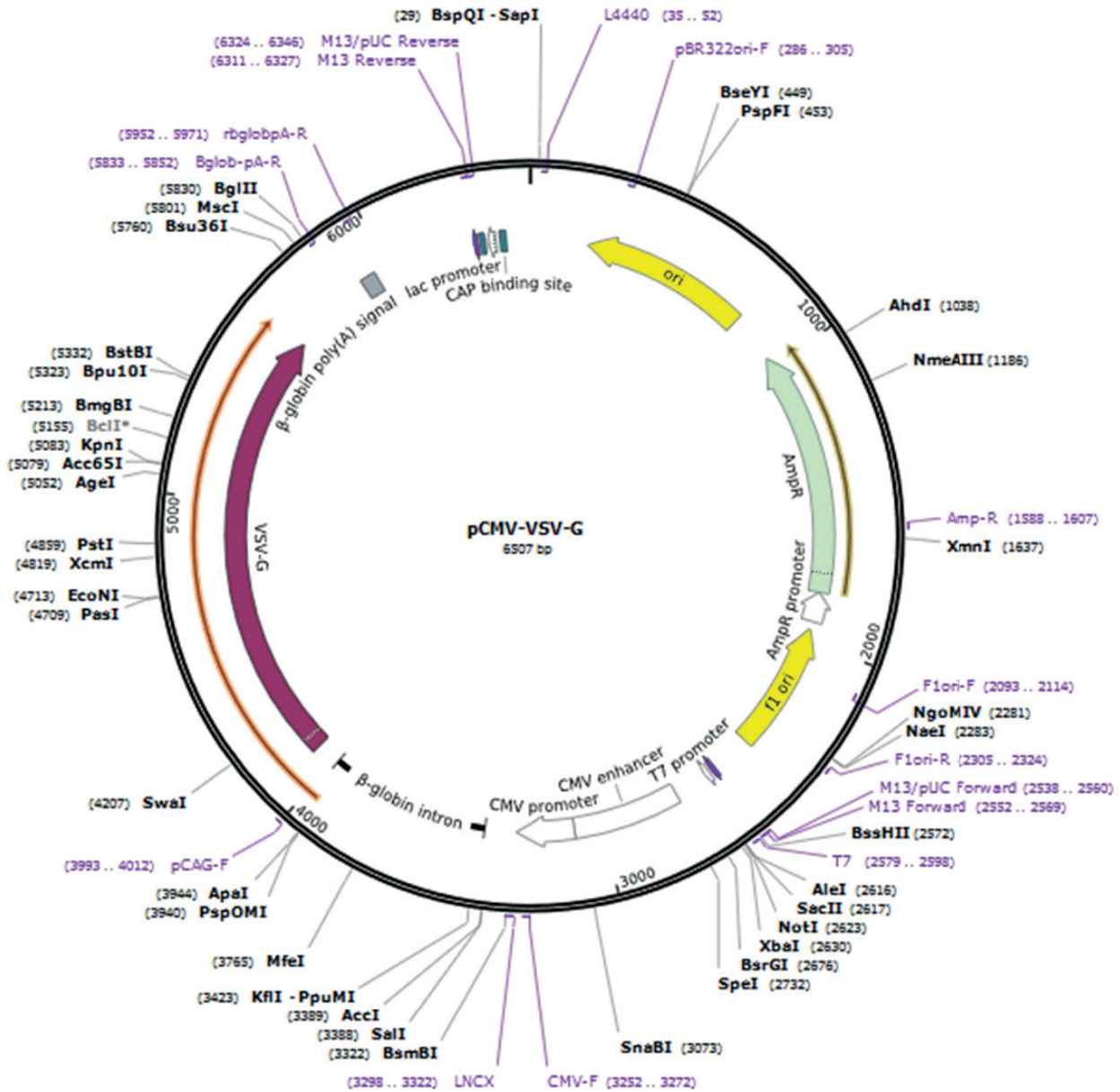
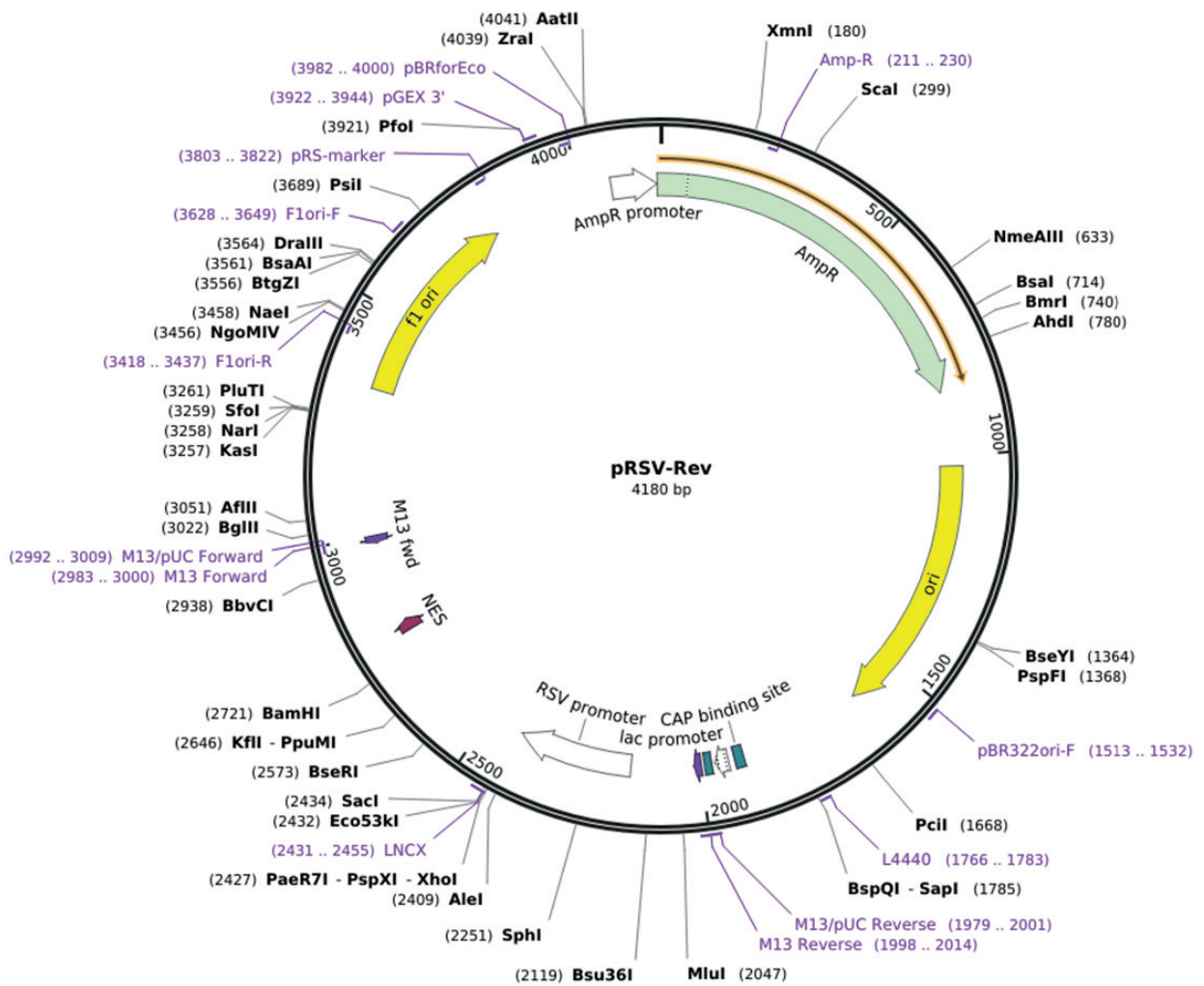


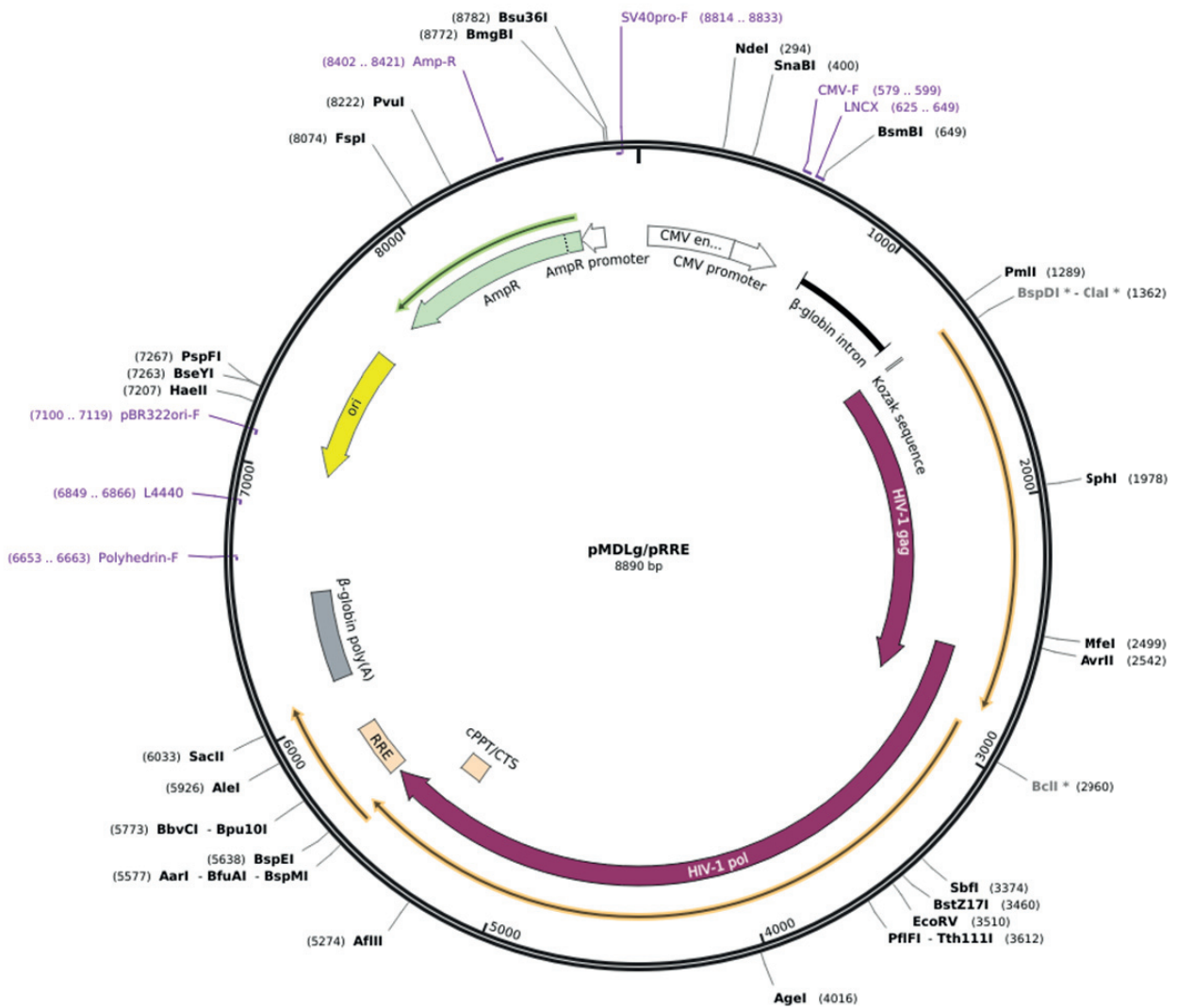
Figura 99. Mapa de restricción del plásmido *pCMV-VSV-G*.

b. Plásmido *pRSV-Rev*, en la *Figura 100* se representa su mapa de restricción correspondiente.



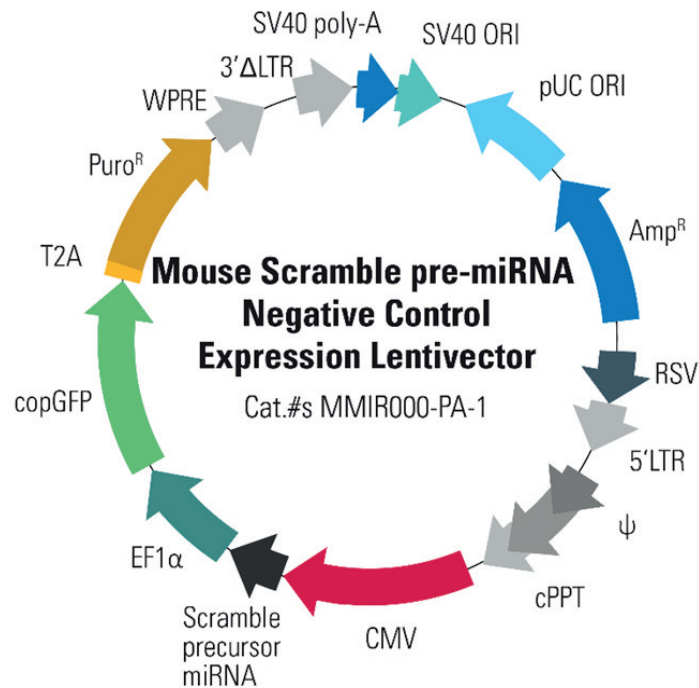
**Figura 100.** Mapa de restricción del plásmido *pRSV-Rev*.

c. Plásmido *pMDLg/pRRE*, en la *Figura 101* se representa su mapa de restricción correspondiente.



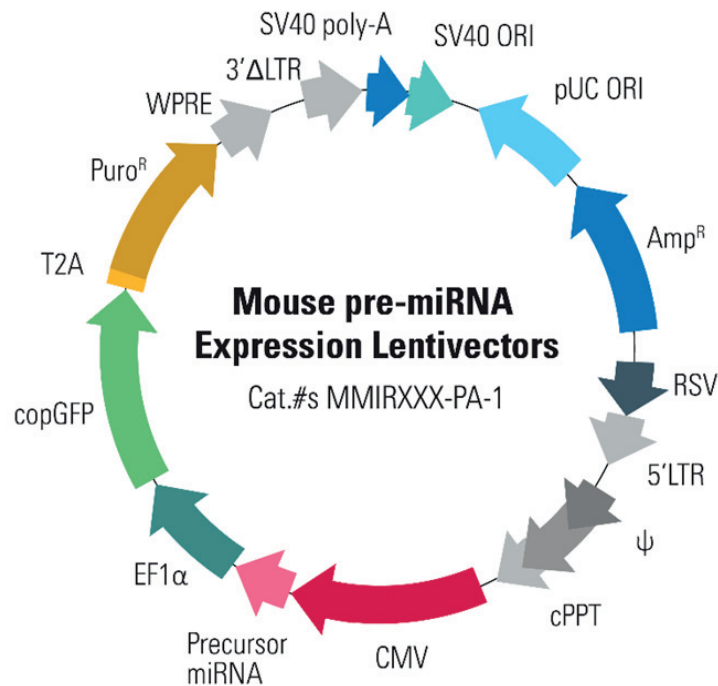
**Figura 101.** Mapa de restricción del plásmido *pMDLg/pRRE*.

d. En la *Figura 102* se representa el mapa del plásmido empleado como control negativo.



**Figura 102.** Mapa del plásmido empleado como control negativo.

e. En la *Figura 103* se representa el mapa general de los vectores lentivirales de expresión de pre-miRs de ratón (sobreeexpresantes).



**Figura 103.** Mapa general de los vectores lentivirales de expresión de pre-miARNs de ratón.

### Anexo 3: Cebadores

En la *Tabla 47* se detallan los cebadores no comerciales y sin sonda empleados a lo largo de esta tesis; en sombreado se indica el gen de referencia para cada especie, salvo para humanos que se empleó la media geométrica de ambos genes de los dos indicados:

Gen y especie	Secuencia cebador (5'-3')	Número acceso
<b>Ratón</b>		
<i>ADIPOQ (Ratón)</i>	<i>Fw</i> - TCCCAATGTACCCATTTCGCT <i>Rv</i> - AACGGCCTTGTCTTCTTGA	NM_009605.4
<i>C/EBPα (Ratón)</i>	<i>Fw</i> - ACTCGCTCCTTTTCTACCG <i>Rv</i> - CCCAACACCTAAGTCCCTC	NM_001287514.1
<i>FAS (Ratón)</i>	<i>Fw</i> - GCCACCTCAGTCCTGCTATC <i>Rv</i> - GGTATAGACGACGGGCACAG	NM_007988.3
<i>PPARγ (Ratón)</i>	<i>Fw</i> - GGTGTGATCTTAACTGCCGGA <i>Rv</i> - ACCTGATGGCATTGTGAGACA	NM_001127330.2
<i>RORα (Ratón)</i>	<i>Fw</i> - AGCGAACATATTCCCCACAG <i>Rv</i> - GTCTCCCTCCCTTTCATCC	NM_013646.2
<i>S11 (Ratón)</i>	<i>Fw</i> - CATTTCAGACGGAGCGTGCTTAC <i>Rv</i> - TGCATCTTCATCTTCGTCAC	U93864.1
<i>UCP1 (Ratón)</i>	<i>Fw</i> - CTTTGCCTCACTCAGGATTGG <i>Rv</i> - ACTGCCACACCTCCAGTCATT	NM_009463.3
<b>Rata</b>		
<i>FNDC5 (Rata)</i>	<i>Fw</i> - GAGGTGCTGATCATCGTCGT <i>Rv</i> - GAGCAAGCACTGAAAGGGTTT	NM_001270981.1
<i>HPRT (Rata)</i>	<i>Fw</i> - AGCCGACCGGTTCTGTCA T <i>Rv</i> - GGTCAATAACCTGGTTCATCATCAC	NM_012583.2
<i>SOCS3 (Rata)</i>	<i>Fw</i> - ACCACTACATGCCGCCCCCA <i>Rv</i> - TCGGCTCAGTACCAGCGGGA	NM_053565.1
<b>Humano</b>		
<i>ADH1B(Humano)</i>	<i>Fw</i> - AAGGGGGCTGTTTATGGTGG <i>Rv</i> - ACGTCAGGACGGTACGGATA	NM_001286650.1
<i>FAS (Humano)</i>	<i>Fw</i> - CTGCACTTCCATAGCCCCAA <i>Rv</i> - AAGGAGTTGATGCCACGTT	AY451392.1
<i>FBLX10 (Humano)</i>	<i>Fw</i> - TACGACGAGAACGAGGACTT <i>Rv</i> - AGGCATCTTAATTCAGTCCA	NM_032590.4

Gen y especie	Secuencia cebador (5'-3')	Número acceso
<i>GLUT1 (Humano)</i>	Fw- TGGCATCAACGCTGTCTTCT Rv- AGCCAATGGTGGCATAACA	NM_006516.3
<i>GLUT4 (Humano)</i>	Fw- CGTCGGGCTTCCAACAGATA Rv- CACCTTCTGAGGGGCATTGA	M20747.1
<i>IPO8 (Humano)</i>	Fw- ACAATGTGTCTCCGTGCCAT Rv- AGCTTGCACTGCTCTGTGAT	NM_006390.3

**Tabla 47. Cebadores empleados.**

A continuación, en la *Tabla 48* se detallan los cebadores comerciales con sonda empleados, indicándose en sombreado el gen control:

<i>miR/ARN nuclear pequeño no codificante</i>	Referencia (ID)- <i>Taqman</i>
<i>U6 snRNA</i>	001973
<i>hsa-miR-16-5p</i>	000391
<i>hsa-miR-19-3p</i>	000395
<i>hsa-miR-19b-3p</i>	000396
<i>hsa-miR-24-3p</i>	000402
<i>hsa-miR-30a-5p</i>	000417
<i>hsa-miR-30b-5p</i>	000602
<i>hsa-miR-30d-5p</i>	000420
<i>hsa-miR-34a-5p</i>	000426
<i>hsa-miR-200c</i>	002300
<i>hsa-miR-218</i>	000521
<i>hsa-miR-122-5p</i>	002245
<i>hsa-miR-146a-5p</i>	000468
<i>hsa-miR-191-5p</i>	002299
<i>hsa-miR-221-3p</i>	000524

**Tabla 48. Cebadores comerciales empleados en la línea celular 3T3-L1 y humanos.**



## Anexo 4: Anticuerpos

En la *Tabla 49* se detallan los anticuerpos con su casa comercial, referencia y dilución empleados en la técnica de *Western blot*:

Anticuerpo	Casa Comercial	Referencia	Dilución
Anti-FAS	<i>Santa Cruz</i>	SC-20140	1/500
Anti-pAMPK $\alpha$ (Thr 172)	<i>Cell Signaling</i>	2535S	1/1000
Anti-AMPK $\alpha$	<i>Cell Signaling</i>	2603	1/1000
Anti-pACC $\alpha$ (Thr 172)	<i>Millipore</i>	07-303	1/1000
Anti-ACC $\alpha$	<i>Millipore</i>	04-322	1/2000
Anti-pAKT (Ser473)	<i>Cell Signaling</i>	9271	1/1000
Anti-AKT	<i>Cell Signaling</i>	9272	1/1000
Anti-GAPDH	<i>Thermo Fisher Scientific</i>	AM4300	1/8000
<i>Rabbit Anti-Mouse</i>	<i>Dako</i>	P0260	1/5000
<i>Goat Anti-Rabbit</i>	<i>Dako</i>	P0448	1/2500

**Tabla 49.** Anticuerpos empleados.



## Anexo 5: Proteómica cualitativa

A continuación se detallan las proteínas que se identificaron mediante análisis proteómicos cualitativos que se expresaron tanto en el estadio de obesidad como tras la pérdida de peso (*Tabla 50*), solo en el estadio de obesidad (*Tabla 51*) así como solo tras la pérdida de peso (*Tabla 52*) en las muestras de grasa analizadas:

Proteínas que se expresan tanto en el estadio de obesidad como tras la pérdida de peso			
41	CLH1	HVD82	PSA5
1433B	CLIC1	HYEP	PSA6
1433E	CLUS	IC1	PSA7
1433F	CO3	IDHC	PSB1
1433G	CO4A	IDHP	PSB2
1433T	CO4B	IF5A1	PSB3
1433Z	CO5	IGHA1	PSB5
1C05	CO6	IGHA2	PSB6
2AAA	CO6A1	IGHD	PSD13
6PGD	CO6A2	IGHG1	PSMD1
6PGL	CO6A3	IGHG2	PSMD2
A16A1	CO7	IGHG3	PSMD9
A1AG1	CO8B	IGHG4	PSME1
A1AG2	CO9	IGHM	PSMF1
A1AT	COF1	IGJ	PTPA
A1BG	COIA1	IGKC	PUR8
A2AP	COTL1	IGLC3	PUR9
A2GL	COX2	IGLL1	PYGB
A2MG	COX41	IGLL5	PYGL
AACT	COX6C	ILEU	PZP
AATC	CPN2	IMB1	QCR1
ABHEB	CPNE3	IPYR	RAB1B
ABLM2	CPNS1	IQGA1	RAB21
ACADV	CRYAB	ITA1	RAB2A
ACLY	CSRP1	ITB1	RAB5C
ACOC	CX7A2	ITIH1	RAB6B
ACON	CYB5	ITIH2	RAB7A
ACOT1	CYC	ITIH4	RAC1
ACPH	CYTB	JAM1	RAN
ACSL1	DCUP	K1C10	RAP1A
ACTA	DCXR	K1C9	RAP1B

## Proteínas que se expresan tanto en el estadio de obesidad como tras la pérdida de peso

ACTB	DDAH2	K22E	RB11B
ACTBL	DECR	K2C1	RET4
ACTC	DEF3	K2C6B	RETST
ACTG	DEST	KAD1	RHAG
ACTN1	DHB4	KAIN	RHG01
ACTN4	DHE3	KAP3	RHG27
ACTS	DHPR	KAPCA	RHOA
ACTZ	DLDH	KCD12	RINI
ADDA	DOPD	KLKB1	RL40
ADH1B	DPYL2	KNG1	RL8
ADIPO	DYL2	KPYM	RLA0L
ADT1	ECH1	KV105	ROA2
ADT3	ECHA	KV113	RPN1
AFAM	ECHB	KV127	RRAS
AHNK	ECHD1	KV133	RS16
AK1C1	ECHM	KV224	RS3
AK1C2	EF1A3	KV229	RSSA
AK1C3	EF2	KV311	RSU1
AL1A1	EHD1	KV315	RTN3
AL4A1	EHD2	KV320	RTN4
AL9A1	ELNE	KV401	S10A4
ALBU	EM55	KVD20	S10A6
ALDH2	ENOA	KVD28	S10A8
ALDOA	ENPL	LAMA4	S10A9
ALDOB	EPB42	LAMB1	S10AA
ALDOC	EPHA2	LAMB2	S10AB
AMBP	ERAP1	LAMC1	S29A1
AMPL	EST1	LASP1	SAA1
ANGT	ESTD	LDHA	SAA4
ANK1	ESYT1	LDHB	SAHH
ANT3	ETFA	LEG1	SAMP
ANX11	F13A	LEG3	SAP
ANXA1	F213A	LG3BP	SAR1A
ANXA2	FA12	LGUL	SAR1B
ANXA3	FAAA	LIPS	SBP1
ANXA4	FABP4	LIS1	SEPT2
ANXA5	FABP5	LKHA4	SEPT7
ANXA6	FAS	LMNA	SERA

**Proteínas que se expresan tanto en el estadio de obesidad como tras la pérdida de peso**

ANXA7	FBN1	LUM	SH3L1
AOC3	FBX7	LV147	SH3L3
AOFA	FERM2	LV319	SNAA
APMAP	FETUA	LV321	SODC
APOA1	FHL1	LV743	SODE
APOA2	FHR1	LV861	SODM
APOA4	FIBA	LYSC	SORCN
APOB	FIBB	MAP4	SPTA1
APOC3	FIBG	MDHC	SPTB1
APOD	FIS1	MDHM	SPTB2
APOE	FKB1A	MET7A	SPTN1
APOH	FLNA	MFAP4	SRBS1
ARF1	FRIL	MGLL	ST134
ARF5	FRPD3	MGST1	ST1A1
ARK74	FSCN1	MGST3	ST1A2
ARP2	FUMH	MIF	STOM
ARP3	G3P	MIME	STX7
ARPC2	G6PD	MOES	SURF4
ARPC4	G6PI	MPCP	SYUA
ARPC5	GANAB	MUC18	SYUG
ASAH1	GAPR1	MYH9	SYWC
ASNA	GBB1	MYL6	TAGL
ASPH	GBB2	MYL9	TAGL2
ASPN	GDIB	MYO1C	TALDO
ASSY	GDIR1	NB5R3	TBA1A
AT2A2	GDIR2	NDKB	TBA1B
AT5G2	GELS	NID1	TBB2A
ATLA3	GLGB	NID2	TBB4B
ATPA	GLO2	NQO1	TBB5
ATPB	GLOD4	NUCL	TBB6
ATPG	GLPA	PA1B2	TBCA
ATPO	GNAI1	PA1B3	TCPA
B2MG	GNAI2	PA2G4	TCPB
B3AT	GPDA	PARK7	TCPD
BCAM	GPX1	PCYOX	TCPE
BIEA	GPX3	PDC6I	TCPG
BIP	GPX4	PDIA1	TCPH
BLVRB	GRP75	PDIA3	TCPQ

## Proteínas que se expresan tanto en el estadio de obesidad como tras la pérdida de peso

C1QC	GSH1	PDIA6	TCPZ
C1S	GSHB	PDXK	TERA
C1TC	GSTM3	PEBP1	TETN
C4BPA	GSTO1	PEDF	THBG
CAH1	GSTP1	PEPC	THIL
CAH2	GSTT1	PFKAL	THIM
CAH3	GTR1	PGAM1	THIO
CALB2	H2AJ	PGK1	THRB
CALM3	H2B2E	PGM1	THTM
CALR	HBA	PGRC2	THTR
CALX	HBAT	PGRP2	TKT
CAN1	HBB	PGS2	TLN1
CAND1	HBD	PHB	TM14C
CAP1	HBG1	PIMT	TM198
CAP7	HCDH	PITH1	TPIS
CAPG	HEBP1	PLEC	TPM1
CAPZB	HEM2	PLIN1	TPM2
CATA	HEMO	PLIN4	TPM3
CATD	HEP2	PLMN	TPM4
CATG	HINT1	PLP2	TRFE
CAV1	HMGB1	PLSL	TRFL
CAVN1	HNRPD	PMGE	TRYB1
CAVN2	HNRPK	PNCB	TSP1
CAVN3	HNRPQ	PNPH	TTHY
CAZA1	HPRT	PON1	TUSC5
CAZA2	HPT	POSTN	TXND5
CBG	HPTR	PPIA	TYPH
CBPA3	HRG	PPIB	UB2L3
CBR1	HS71B	PRDX1	UBA1
CD151	HS90A	PRDX2	UBE2N
CD36	HS90B	PRDX3	UBP14
CD59	HSP7C	PRDX5	UBP5
CD5L	HSPB1	PRDX6	UCHL1
CD81	HSPB6	PRELP	UGPA
CD9	HV102	PROF1	VASP
CDC42	HV307	PRPS1	VAT1
CERU	HV323	PRS6A	VATA
CFAB	HV335	PRTN3	VDAC1

Proteínas que se expresan tanto en el estadio de obesidad como tras la pérdida de peso			
CFAH	HV349	PSA	VDAC2
CFAI	HV372	PSA1	VDAC3
CH10	HV374	PSA2	
CH60	HV551	PSA3	
CISY	HV601	PSA4	

**Tabla 50. Proteínas identificadas en ambos estadios.**

Proteínas que se expresan exclusivamente durante el estadio de obesidad			
41	CO8G	IDHP	PRTN3
1433B	CO9	IF4A2	PSA
1433E	COF1	IF5A1	PSA1
1433F	COIA1	IF5A2	PSA2
1433G	COR1A	IGHA1	PSA3
1433T	COR1C	IGHA2	PSA4
1433Z	COTL1	IGHD	PSA5
1A23	COX2	IGHG1	PSA6
1C05	COX41	IGHG2	PSA7
2AAA	COX6C	IGHG3	PSB1
6PGD	CPN2	IGHG4	PSB2
6PGL	CPNE3	IGHM	PSB3
A16A1	CPNS1	IGJ	PSB5
A1AG1	CPSM	IGKC	PSB6
A1AG2	CRP	IGLC2	PSD13
A1AT	CRYAB	IGLC3	PSMD1
A1BG	CSRP1	IGLL1	PSMD2
A2AP	CX7A2	IGLL5	PSMD9
A2GL	CXCL7	ILEU	PSME1
A2MG	CYB5	IMB1	PSMF1
AACT	CYC	IPYR	PTPA
AATC	CYTB	IQGA1	PUR8
ABHEB	DCUP	ITA1	PUR9
ABLM2	DCXR	ITA2B	PYGB
ACADV	DDAH2	ITB1	PYGL
ACLY	DDI2	ITB3	PYGM
ACOC	DECR	ITIH1	PZP
ACON	DEF3	ITIH2	QCR1

## Proteínas que se expresan exclusivamente durante el estadio de obesidad

ACOT1	DEST	ITIH3	RAB10
ACPH	DHB4	ITIH4	RAB1B
ACSL1	DHE3	JAM1	RAB21
ACTA	DHPR	K1C10	RAB2A
ACTB	DLDH	K1C16	RAB2B
ACTBL	DOPD	K1C9	RAB5C
ACTC	DPP3	K22E	RAB6B
ACTG	DPYL2	K2C1	RAB7A
ACTN1	DYL2	K2C5	RAC1
ACTN4	ECH1	K2C6B	RAN
ACTS	ECHA	K2C6C	RAP1A
ACTZ	ECHB	K2C8	RAP1B
ADDA	ECHD1	KAD1	RB11B
ADDB	ECHM	KAIN	RBBP6
ADH1B	ECP	KAP3	RET4
ADIPO	EF1A3	KAPCA	RETST
ADT1	EF2	KCD12	RHAG
ADT3	EHD1	KCRM	RHD
AFAM	EHD2	KDM4C	RHG01
AHNK	ELNE	KLKB1	RHG27
AK1C1	EM55	KMT2A	RHOA
AK1C2	ENOA	KNG1	RINI
AK1C3	ENPL	KPYM	RL40
AL1A1	EPB42	KV105	RL8
AL4A1	EPHA2	KV113	RLA0L
AL9A1	ERAP1	KV117	ROA2
ALBU	EST1	KV127	RPIA
ALDH2	ESTD	KV133	RPN1
ALDOA	ESYT1	KV224	RRAS
ALDOB	ETFA	KV229	RS16
ALDOC	F10A5	KV311	RS3
AMBP	F13A	KV315	RSSA
AMPL	F213A	KV320	RSU1
ANGT	FA12	KV401	RTN3
ANK1	FAAA	KVD08	RTN4
ANT3	FABP4	KVD20	S10A4
ANX11	FABP5	KVD28	S10A6
ANXA1	FAS	LAMA4	S10A8



**Proteínas que se expresan exclusivamente durante el estadio de obesidad**

ANXA2	FBN1	LAMC1	S10A9
ANXA3	FBX7	LASP1	S10AA
ANXA4	FCL	LDHA	S10AB
ANXA5	FERM2	LDHB	S10AC
ANXA6	FETUA	LEG1	S29A1
ANXA7	FHL1	LEG3	SAA1
AOC3	FHR1	LG3BP	SAA4
AOFA	FIBA	LGUL	SAHH
AP4A	FIBB	LIPG	SAMP
APMAP	FIBG	LIPS	SAP
APOA1	FINC	LIS1	SAR1A
APOA2	FIS1	LKHA4	SAR1B
APOA4	FKB1A	LMNA	SBP1
APOB	FLNA	LUM	SEPT2
APOC2	FLOT1	LV147	SEPT7
APOC3	FRIL	LV319	SERA
APOD	FRPD3	LV321	SH3G3
APOE	FSCN1	LV743	SH3L1
APOH	FUMH	LV861	SH3L3
ARF1	G3P	LXN	SNAA
ARF5	G6PD	LYSC	SODC
ARK74	G6PI	MAP4	SODE
ARP2	GANAB	MDHC	SODM
ARP3	GAPR1	MDHM	SORCN
ARP3B	GBB1	MET7A	SPTA1
ARPC2	GBB2	MFAP4	SPTB1
ARPC4	GDIB	MGLL	SPTB2
ARPC5	GDIR1	MGST1	SPTN1
ASAH1	GDIR2	MGST3	SRBS1
ASNA	GELS	MIF	ST134
ASPH	GLGB	MIME	ST1A2
ASPN	GLO2	MLRS	STOM
ASSY	GLOD4	MLRV	STX7
AT2A1	GLPA	MOES	SURF4
AT2A2	GMPR1	MPCP	SYUA
AT5G2	GNAI1	MUC18	SYUG
ATLA3	GNAI2	MYG	SYWC
ATPA	GP1BA	MYH2	TAGL

## Proteínas que se expresan exclusivamente durante el estadio de obesidad

ATPB	GP1BB	MYH3	TAGL2
ATPG	GPDA	MYH7	TALDO
ATPO	GPIX	MYH9	TBA1A
B2MG	GPX1	MYL1	TBA1B
B3A3	GPX3	MYL3	TBB1
B3AT	GPX4	MYL6	TBB2A
BCAM	GRP75	MYL9	TBB4B
BIEA	GSH0	MYO1C	TBB5
BIP	GSH1	MYPC1	TBB6
BLMH	GSHB	NB5R3	TBCA
BLVRB	GSTA3	NDKB	TCPA
C1QC	GSTM3	NGAL	TCPB
C1S	GSTO1	NID1	TCPD
C1TC	GSTP1	NQO1	TCPE
C4BPA	GSTT1	NTF2	TCPG
CAH1	GTR1	NUCL	TCPH
CAH2	GTR14	OTU1	TCPQ
CAH3	H2A2A	PA1B2	TCPZ
CALB2	H2AJ	PA1B3	TERA
CALM3	H2B1L	PA2G4	TETN
CALR	H2B2E	PARK7	THBG
CALX	H33	PARVB	THIL
CAMP	H4	PC11Y	THIM
CAN1	HBA	PCYOX	THIO
CAND1	HBAT	PDC6I	THRB
CAP1	HBAZ	PDIA1	THTM
CAP7	HBB	PDIA3	TKT
CAPZB	HBD	PDIA6	TLN1
CATA	HBG1	PDXK	TM14C
CATD	HBG2	PEBP1	TM198
CATG	HBM	PECA1	TMOD1
CAV1	HCDH	PEDF	TPIS
CAVN1	HEBP1	PEPC	TPM1
CAVN2	HEM2	PERE	TPM2
CAVN3	HEM3	PERM	TPM3
CAZA1	HEMO	PFKAL	TPM4
CAZA2	HEP2	PGAM1	TRFE
CB071	HINT1	PGK1	TRFL

Proteínas que se expresan exclusivamente durante el estadio de obesidad			
CBG	HMGB1	PGM1	TRYB1
CBPA3	HNRPD	PGRC2	TSP1
CBR1	HNRPK	PGRP2	TTHY
CC112	HNRPQ	PGS2	TUSC5
CCD51	HPRT	PHB	TXND5
CCS	HPT	PIBF1	TXNL1
CD151	HPTR	PIMT	TYPH
CD36	HRG	PITH1	UB2L3
CD47	HS71B	PLEC	UB2V1
CD59	HS90A	PLEK	UBA1
CD5L	HS90B	PLF4	UBE2N
CD81	HSP7C	PLIN1	UBP14
CD9	HSPB1	PLIN4	UBP5
CDC42	HSPB6	PLMN	UCHL1
CERU	HV102	PLP2	UGPA
CFAB	HV108	PLSL	URP2
CFAH	HV118	PMGE	VASP
CFAI	HV205	PNCB	VAT1
CH10	HV307	PNPH	VATA
CH60	HV323	PON1	VATB2
CISY	HV335	POSTN	VDAC1
CLH1	HV349	PPAC	VDAC2
CLIC1	HV372	PPIA	VDAC3
CLUS	HV374	PPIB	VIME
CO3	HV434	PRDX1	VINC
CO4A	HV439	PRDX2	VKORL
CO4B	HV43D	PRDX3	VPS35
CO5	HV551	PRDX5	VTDB
CO6	HV601	PRDX6	VTNC
CO6A1	HV64D	PRELP	WBP2
CO6A2	HVD82	PROF1	WDR1
CO6A3	HYEP	PROS	WNT16
CO7	IC1	PRPS1	ZA2G
CO8B	IDHC	PRS6A	

**Tabla 51. Proteínas identificadas únicamente en el estadio de obesidad.**

## Proteínas que se expresan exclusivamente tras la pérdida de peso

41	CX6B1	KR87P	RAB10
1433B	CX7A1	KRT36	RAB14
1433E	CX7A2	KRT82	RAB18
1433F	CY1	KRT85	RAB1A
1433G	CYB5	KRT86	RAB1B
1433T	CYB5B	KT33A	RAB21
1433Z	CYBP	KV105	RAB2A
1B40	CYBR1	KV113	RAB5B
1B42	CYC	KV127	RAB5C
1B59	CYGB	KV133	RAB6B
1C05	CYTB	KV224	RAB7A
1C15	DCLK1	KV229	RAB8A
2AAA	DCPS	KV230	RAC1
2ABD	DCTN1	KV311	RACK1
2B11	DCTN2	KV315	RALA
3HIDH	DCUP	KV320	RALB
4F2	DCXR	KV401	RAN
5NTD	DDAH2	KVD20	RAP1A
6PGD	DECR	KVD28	RAP1B
6PGL	DEF3	LA	RAP2B
A16A1	DEST	LAMA4	RASH
A1AG1	DHB12	LAMB1	RASK
A1AG2	DHB4	LAMB2	RB11B
A1AT	DHE3	LAMC1	RD23A
A1BG	DHPR	LAMP1	RD23B
A2AP	DHRS4	LANC1	REEP6
A2GL	DHRS7	LASP1	RET4
A2MG	DIC	LBP	RET7
AACS	DLDH	LCAP	RETST
AACT	DNPH1	LCP2	RFA3
AAMDC	DOPD	LDHA	RFTN1
AATC	DPP2	LDHB	RHAG
ABCF1	DPP4	LDHD	RHG01
ABHD5	DPYL2	LEG1	RHG27
ABHDA	DPYL3	LEG3	RHOA
ABHEB	DRA	LETM1	RHOG
ABLM2	DX39B	LG3BP	RIDA
ACACA	DYHC1	LGMN	RINI

### Proteínas que se expresan exclusivamente tras la pérdida de peso

ACACB	DYL2	LGUL	RL10A
ACAD9	DYN1	LIMS1	RL11
ACADM	E41L2	LIMS2	RL12
ACADS	ECH1	LIPS	RL14
ACADV	ECHA	LIS1	RL15
ACBP	ECHB	LKHA4	RL18
ACDSB	ECHD1	LMAN1	RL22
ACLY	ECHD3	LMCD1	RL23A
ACO13	ECHM	LMNA	RL27
ACOC	ECI1	LMOD1	RL27A
ACOD	ECI2	LMTK3	RL30
ACON	EF1A1	LONM	RL35
ACOT1	EF1A3	LPP	RL4
ACPH	EF1B	LPPRC	RL40
ACSA	EF1D	LRP1	RL5
ACSF2	EF1G	LSMD1	RL6
ACSL1	EF2	LTOR3	RL7
ACSL4	EFTU	LUM	RL8
ACSS3	EHD1	LV140	RLA0
ACTA	EHD2	LV147	RLA0L
ACTB	EHD4	LV319	RLA1
ACTBL	EIF3F	LV321	ROA2
ACTC	EIF3L	LV325	ROA3
ACTG	ELNE	LV743	ROAA
ACTN1	ELOA1	LV861	RPN1
ACTN3	EM55	LYPA1	RPN2
ACTN4	EMIL1	LYPL1	RRAS
ACTS	ENOA	LYSC	RS10
ACTZ	ENPL	M2OM	RS12
ADDA	EPB42	MAOX	RS13
ADDG	EPCR	MAP4	RS14
ADH1B	EPHA2	MARC1	RS15A
ADH7	ERAP1	MARC2	RS16
ADHX	ERGI1	MCAT	RS18
ADIPO	ERLN1	MCCA	RS19
ADK	ERP44	MCCB	RS2
ADT1	ES1	MDHC	RS20
ADT2	EST1	MDHM	RS24

## Proteínas que se expresan exclusivamente tras la pérdida de peso

ADT3	ESTD	MET7A	RS25
AFAM	ESYT1	MFAP2	RS28
AGM1	ESYT2	MFAP4	RS3
AHNK	ETFA	MFAP5	RS3A
AIFM1	ETFB	MGLL	RS4X
AK1A1	ETFD	MGST1	RS5
AK1C1	F13A	MGST3	RS7
AK1C2	F16P1	MIC19	RS8
AK1C3	F213A	MIC60	RS9
AKA12	FA12	MIF	RSMN
AKT2	FA49B	MIME	RSSA
AL1A1	FAAA	MK	RSU1
AL1B1	FABP4	MK01	RT05
AL1L1	FABP5	MK10	RT36
AL3A2	FABPH	ML12A	RTCA
AL4A1	FAS	MLEC	RTN1
AL7A1	FBLN1	MMSA	RTN3
AL9A1	FBLN2	MOES	RTN4
ALBU	FBLN3	MOGS	S100B
ALDH2	FBLN5	MOT2	S10A4
ALDOA	FBN1	MPC1	S10A6
ALDOB	FBX7	MPCP	S10A8
ALDOC	FBXL7	MPPA	S10A9
ALDR	FCGRN	MPU1	S10AA
AMBP	FERM2	MRC1	S10AB
AMPB	FETUA	MRC2	S10AD
AMPL	FGD6	MTCH2	S10AG
AMPN	FHL1	MTPN	S29A1
AN32A	FHR1	MUC18	S61A1
ANGI	FIBA	MVP	SAA1
ANGT	FIBB	MYADM	SAA4
ANK1	FIBG	MYDGF	SAHH
ANT3	FIS1	MYG1	SAHH2
ANX11	FKB1A	MYH10	SAM50
ANXA1	FLNA	MYH11	SAMH1
ANXA2	FLNB	MYH9	SAMP
ANXA3	FMOD	MYL6	SAP
ANXA4	FPPS	MYL9	SAR1A

### Proteínas que se expresan exclusivamente tras la pérdida de peso

ANXA5	FRIH	MYO1C	SAR1B
ANXA6	FRIL	MYOF	SBDS
ANXA7	FRPD1	NACA	SBP1
AOC3	FRPD3	NACAM	SC22B
AOFA	FSCN1	NAGAB	SC23A
AOFB	FUMH	NAGK	SCOT1
AP1B1	FUND2	NAMPT	SCPDL
AP2A2	G3P	NB5R1	SCRB2
AP2B1	G6PD	NB5R3	SCRN2
APEX1	G6PE	NCPR	SDHA
APMAP	G6PI	NDKB	SDHB
APOA	GALM	NDRG2	SEPT11
APOA1	GANAB	NDUA4	SEPT2
APOA2	GAPR1	NDUA5	SEPT7
APOA4	GARS	NDUA6	SERA
APOB	GBB1	NDUA8	SERPH
APOC1	GBB2	NDUA9	SFPQ
APOC3	GBG12	NDUAA	SFXN3
APOD	GCDH	NDUAD	SH3L1
APOE	GDIB	NDUBA	SH3L3
APOH	GDIR1	NDUBB	SHBG
APOM	GDIR2	NDUS1	SHLB1
APT	GELS	NDUS2	SIAS
AR6P1	GFPT1	NDUS3	SMD3
ARC1B	GGT5	NDUS7	SNAA
ARF1	GIMA1	NDUS8	SNTB2
ARF3	GLGB	NDUV1	SNX2
ARF4	GLNA	NDUV2	SNX3
ARF5	GLO2	NEDD8	SNX5
ARK72	GLOD4	NIBAN	SODC
ARK74	GLPA	NID1	SODE
ARP2	GLU2B	NID2	SODM
ARP3	GLYAT	NIF3L	SORCN
ARPC2	GLYC	NIPS2	SPB6
ARPC4	GLYG2	NIT2	SPEE
ARPC5	GNA11	NLTP	SPRC
ASAH1	GNAI1	NNMT	SPRE
ASC	GNAI2	NNRE	SPTA1

## Proteínas que se expresan exclusivamente tras la pérdida de peso

ASNA	GNAI3	NNTM	SPTB1
ASPH	GNAQ	NPM	SPTB2
ASPN	GNAS1	NPS3A	SPTN1
ASSY	GNPI2	NQO1	SRBS1
AT2A2	GPAT1	NQO2	SRSF3
AT2B4	GPD1L	NSDHL	SSBP
AT5F1	GPDA	NSF1C	SSDH
AT5G2	GPDM	NUCL	ST134
ATLA3	GPI8	NUDT5	ST1A1
ATP5H	GPX1	ODO1	ST1A2
ATP5I	GPX3	ODO2	ST1A4
ATP5L	GPX4	ODP2	STA5A
ATP6	GRHPR	ODPA	STAT1
ATPA	GRP75	ODPB	STAT3
ATPB	GSH1	OLA1	STBD1
ATPG	GSHB	OLFL1	STEA4
ATPK	GSHR	OST48	STOM
ATPO	GSTM1	OTUB1	STX7
B2L13	GSTM2	OXSRI	SUCA
B2MG	GSTM3	PA1B2	SUCB1
B3AT	GSTO1	PA1B3	SUCB2
BAF	GSTP1	PA2G4	SUMF2
BAP31	GSTT1	PABP1	SUMO4
BASI	GTR1	PALM	SUOX
BCAM	GTR4	PARK7	SURF4
BCAT2	GYS1	PARVA	SYAC
BDH2	GYS2	PCBP1	SYEP
BGH3	H2AJ	PCBP2	SYIM
BGLR	H2B2E	PCCA	SYK
BHE41	HBA	PCCB	SYNC
BIEA	HBAT	PCKGC	SYPL1
BIN1	HBB	PCKGM	SYQ
BIP	HBD	PCOC1	SYRC
BLVRB	HBG1	PCYOX	SYSC
BPHL	HCD2	PDC6I	SYUA
BPL1	HCDH	PDCD6	SYUG
BST2	HDGF	PDIA1	SYVC
C1QA	HEBP1	PDIA3	SYWC



### Proteínas que se expresan exclusivamente tras la pérdida de peso

C1QB	HEBP2	PDIA4	TAGL
C1QC	HEM2	PDIA6	TAGL2
C1R	HEMO	PDK1	TALDO
C1S	HEP2	PDXK	TARSH
C1TC	HEXA	PEBP1	TBA1A
C4BPA	HIBCH	PEDF	TBA1B
C560	HIG1A	PEPD	TBA4A
CA2D1	HINT1	PEPL	TBB2A
CAB39	HINT2	PFKAL	TBB4A
CAH1	HMGB1	PFKAP	TBB4B
CAH2	HNMT	PGAM1	TBB5
CAH3	HNRDL	PGBM	TBB6
CAH4	HNRH1	PGK1	TBCA
CALB2	HNRH3	PGM1	TCPA
CALD1	HNRPC	PGM2	TCPB
CALM3	HNRPD	PGM5	TCPD
CALR	HNRPF	PGRC1	TCPE
CALX	HNRPK	PGRC2	TCPG
CAN1	HNR. P. M.	PGS1	TCPH
CAN2	HNRPQ	PGS2	TCPQ
CAND1	HNRPU	PHB	TCPZ
CAP1	HPRT	PHB2	TCTP
CAPG	HPT	PHF20	TEBP
CAPZB	HPTR	PHS	TECR
CATA	HRG	PICAL	TENS1
CATB	HS12A	PIMT	TENX
CATD	HS71B	PIPNA	TERA
CATG	HS90A	PITH1	TETN
CATZ	HS90B	PLCB	TEX10
CAV1	HSDL2	PLCD1	TFR1
CAV2	HSP72	PLEC	THBG
CAVN1	HSP7C	PLIN1	THIC
CAVN2	HSPB1	PLIN4	THIL
CAVN3	HSPB6	PLMN	THIM
CAZA1	HV102	PLP2	THIO
CAZA2	HV124	PLSL	THRB
CBG	HV169	PLST	THTM
CBPA3	HV307	PLTP	THTR

**Proteínas que se expresan exclusivamente tras la pérdida de peso**

CBPM	HV315	PLVAP	THY1
CBR1	HV321	PMGE	TKFC
CCG6	HV323	PNCB	TKT
CD14	HV335	PNPH	TLN1
CD151	HV349	PODN	TLN2
CD248	HV372	PON1	TM109
CD276	HV374	POSTN	TM14C
CD34	HV551	PP1B	TM198
CD36	HV5X1	PP1R7	TM256
CD44	HV601	PP2AA	TMED7
CD59	HV70D	PPCE	TMED9
CD5L	HVD82	PPIA	TMEDA
CD81	HXK1	PPIB	TMM43
CD9	HXK2	PPT1	TOLIP
CDC42	HYEP	PRAF3	TOM40
CERU	IAH1	PRDX1	TOM70
CFAB	IC1	PRDX2	TPD54
CFAD	ICAL	PRDX3	TPIS
CFAH	IDH3A	PRDX5	TPM1
CFAI	IDHC	PRDX6	TPM2
CH10	IDHP	PRELP	TPM3
CH60	IF4A1	PROF1	TPM4
CHMP6	IF4E	PROF2	TPP1
CHTOP	IF5	PRPS1	TPPP3
CILP1	IF5A1	PRS10	TRFE
CISY	IGHA1	PRS4	TRFL
CK054	IGHA2	PRS6A	TRYB1
CKAP4	IGHD	PRS6B	TSN
CLASR	IGHG1	PRS7	TSNAX
CLH1	IGHG2	PRS8	TSP1
CLIC1	IGHG3	PRTN3	TSPO
CLIC4	IGHG4	PSA	TTC25
CLUS	IGHM	PSA1	TTHY
CMA1	IGJ	PSA2	TUSC5
CMBL	IGKC	PSA3	TWF2
CN37	IGLC3	PSA4	TXD17
CNDP2	IGLL1	PSA5	TXND5
CNN1	IGLL5	PSA6	TXTP

### Proteínas que se expresan exclusivamente tras la pérdida de peso

CNN2	ILEU	PSA7	TYPH
CNN3	ILF2	PSB1	UAP1
CNRP1	ILK	PSB2	UB2L3
CO1A1	IMB1	PSB3	UB2V2
CO1A2	INO1	PSB4	UBA1
CO3	IPO5	PSB5	UBE2N
CO3A1	IPYR	PSB6	UBP14
CO4A	IPYR2	PSB8	UBP5
CO4A2	IQGA1	PSD11	UCHL1
CO4B	ISOC1	PSD12	UE2NL
CO5	ISOC2	PSD13	UGDH
CO6	IST1	PSMA8	UGPA
CO6A1	ITA1	PSMD1	USMG5
CO6A2	ITA6	PSMD2	VAMP3
CO6A3	ITA7	PSMD5	VASP
CO7	ITB1	PSMD6	VAT1
CO8A	ITIH1	PSMD7	VATA
CO8B	ITIH2	PSMD8	VDAC1
CO9	ITIH4	PSMD9	VDAC2
COAS1	IVD	PSME1	VDAC3
COEA1	JAM1	PSME2	VIME
COF1	JIP4	PSMF1	VINC
COF2	K1C10	PTBP1	VKORL
COFA1	K1C14	PTER	VP26A
COIA1	K1C9	PTGIS	VPS29
COMP	K1H1	PTGR1	VPS35
COMT	K22E	PTGR2	VPS4A
COPD	K2C1	PTMS	VPS4B
COPG1	K2C6B	PTN11	VTDB
COR1B	KAD1	PTPA	VTNC
COTL1	KAD2	PUR2	VWF
COX2	KAD3	PUR6	WDR1
COX41	KAD4	PUR8	WIZ
COX5B	KAIN	PUR9	XPO1
COX6C	KANK2	PURA	XPO2
CPN2	KAP2	PURA1	XPP1
CPNE3	KAP3	PURG	XRCC6
CPNS1	KAPCA	PYC	ZA2G

Proteínas que se expresan exclusivamente tras la pérdida de peso			
CPT2	KAPCB	PYGB	ZBTB9
CREG1	KAPCG	PYGL	ZRAB3
CRIP2	KCC1A	PZP	
CRK	KCD12	QCR1	
CRYAB	KCRB	QCR10	
CSN3	KCY	QCR2	
CSPG2	KLKB1	QCR7	
CSRP1	KNG1	QCR9	
CTNB1	KPYM	QOR	

**Tabla 52.** Proteínas identificadas únicamente tras la pérdida de peso.

### Anexo 6: Mapas de componentes y de funciones

A continuación se presenta el mapa de componentes de todas las proteínas que se expresan tras la pérdida significativa de peso (Figura 104):

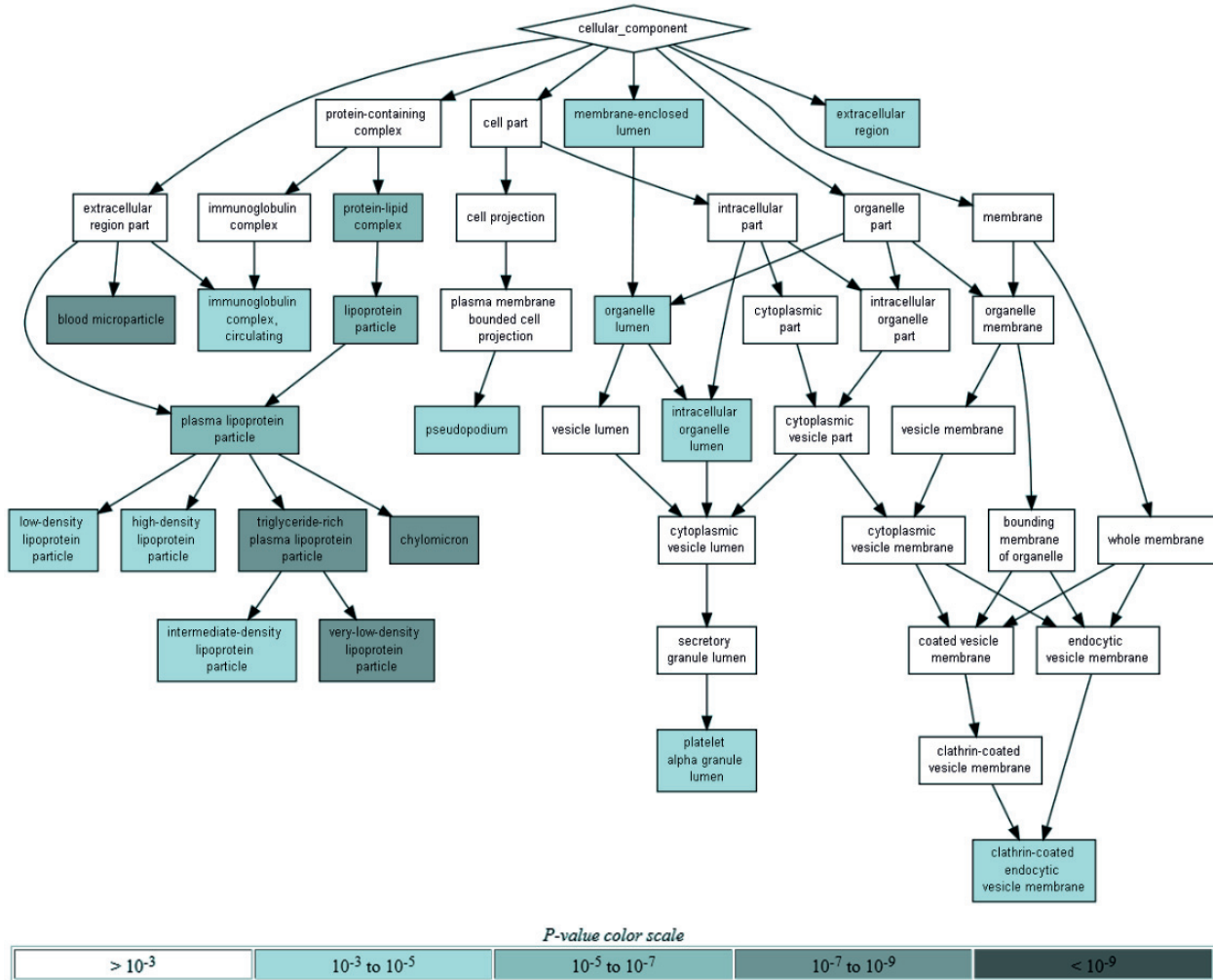


Figura 104. Mapa de componentes: Tras la pérdida de peso. Realizado con la herramienta GOrilla (365).

A continuación se presenta el mapa de componentes de todas las proteínas que se expresan durante el estadio de obesidad (Figura 105):

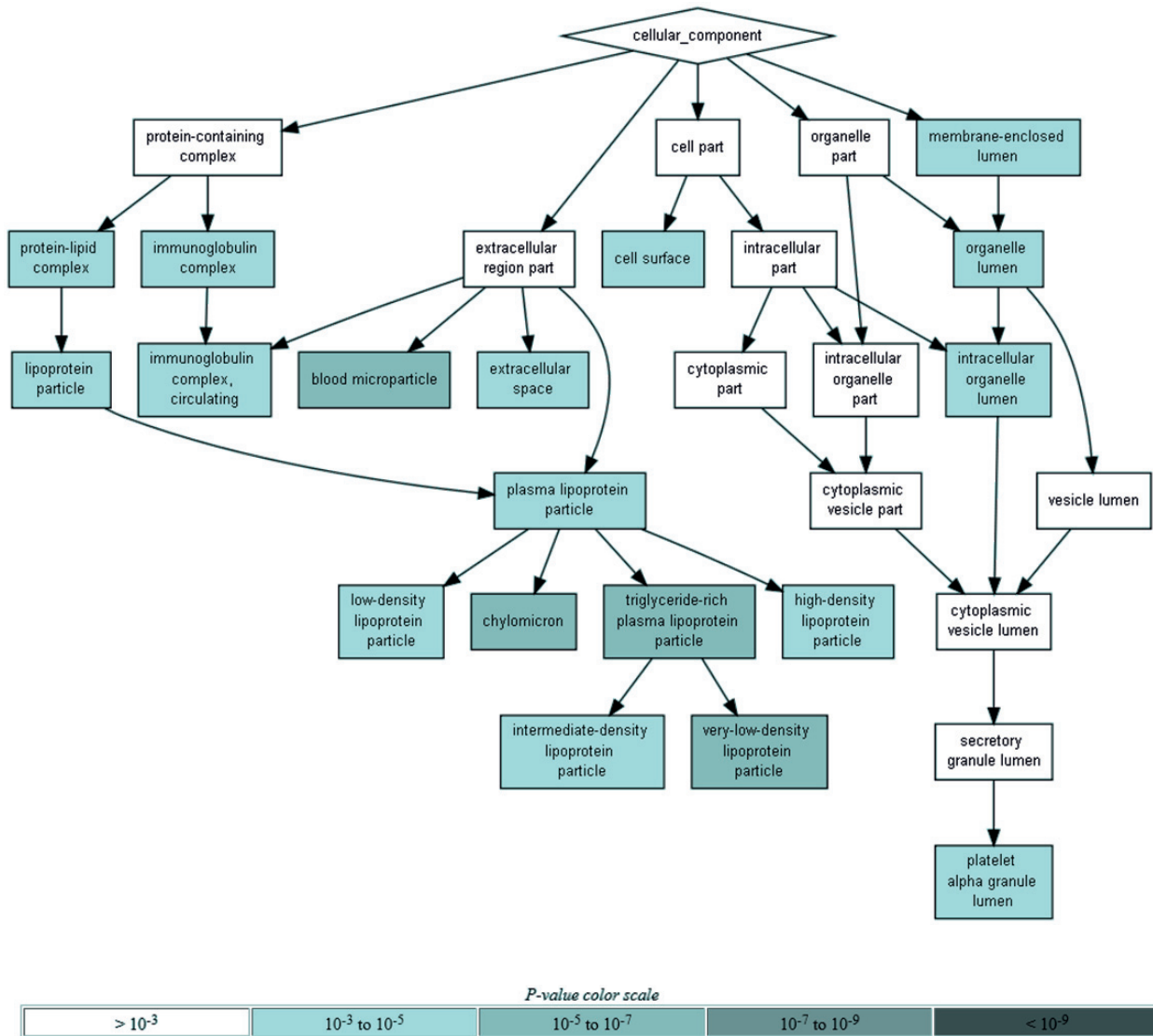


Figura 105. Mapa de componentes: Estadio de obesidad. Realizado con la herramienta *GORilla* (365).

A continuación se presenta el mapa de funciones de todas las proteínas que se expresan tras la pérdida significativa de peso (*Figura 106*):

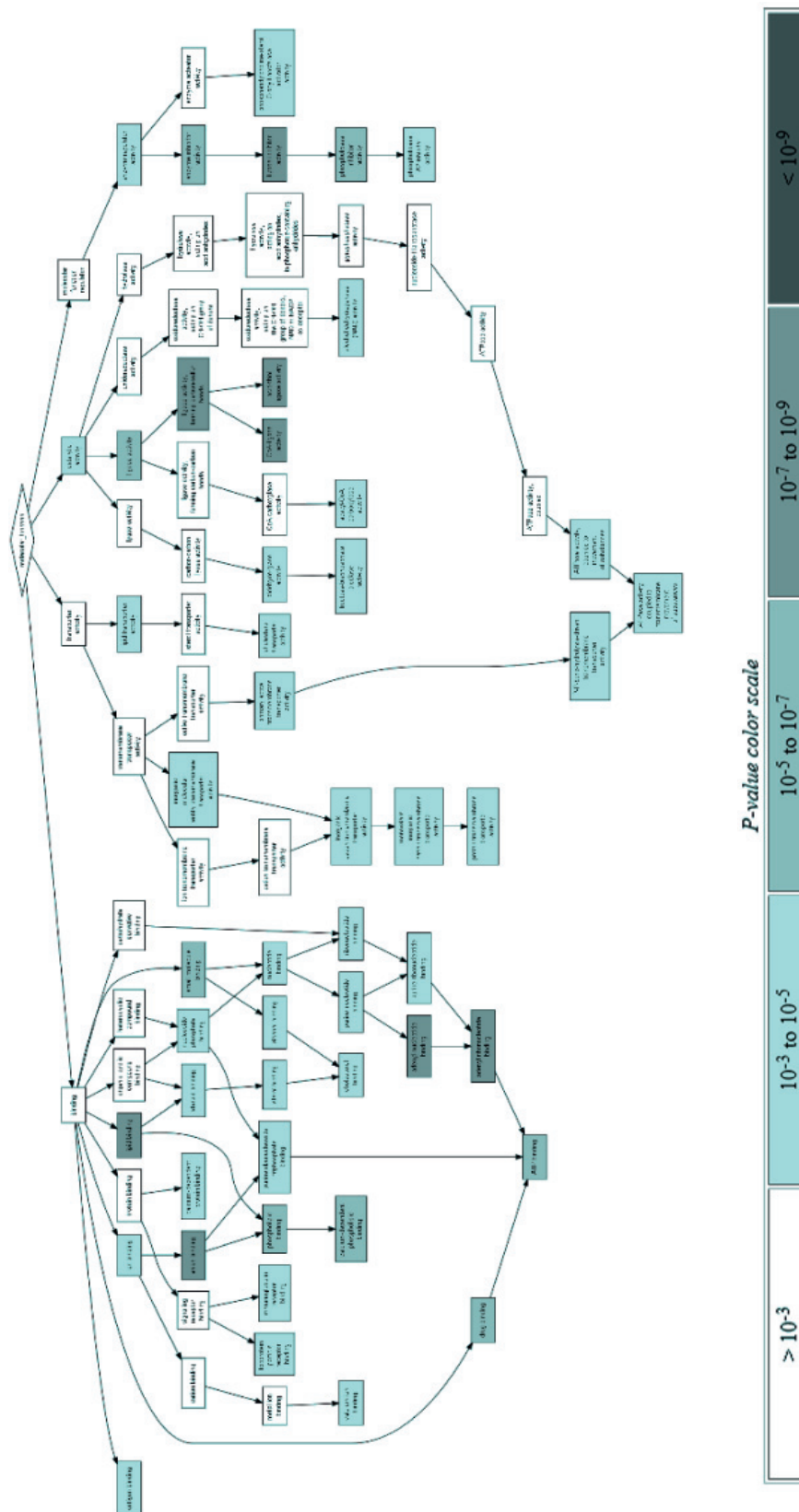
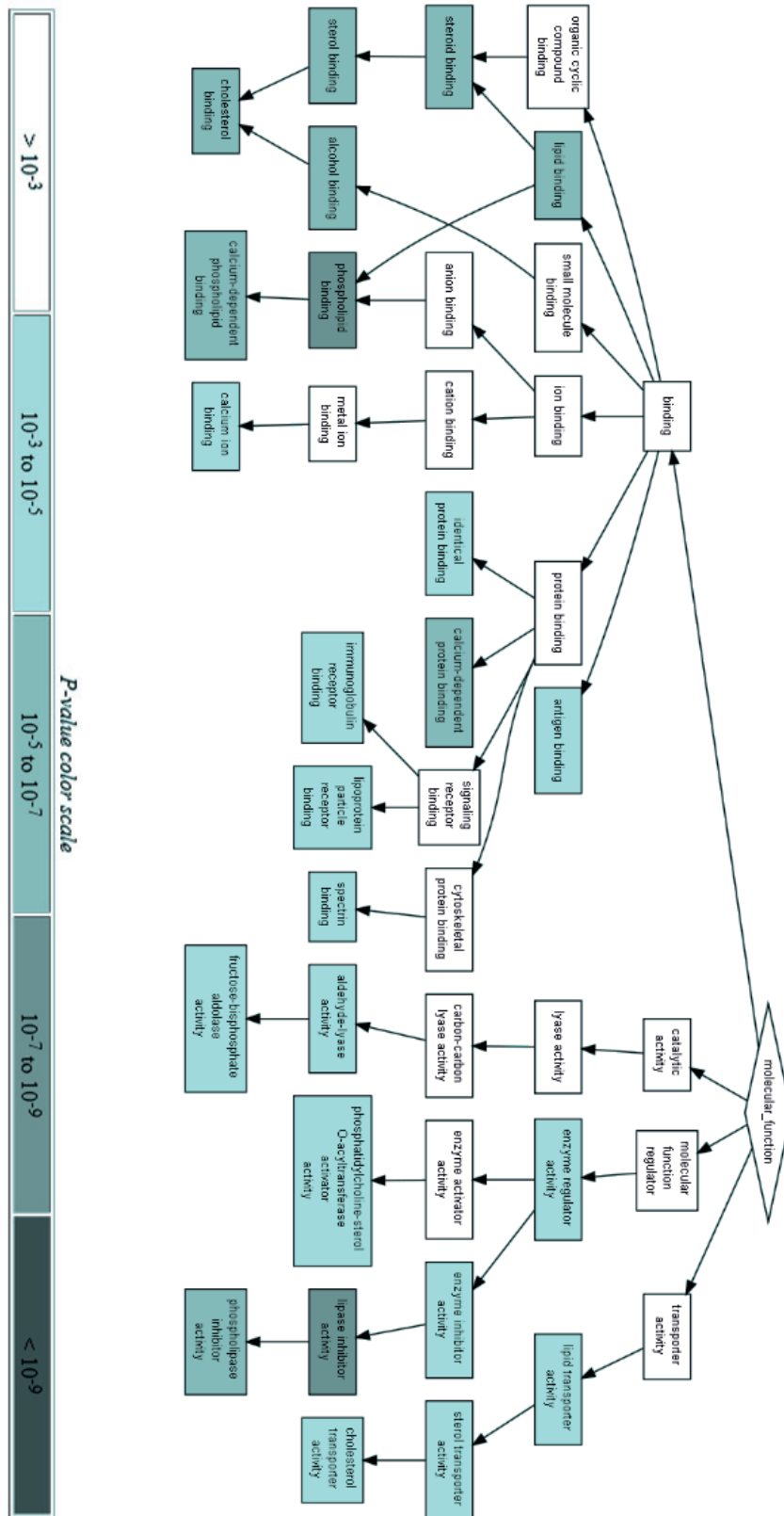


Figura 106. Mapa de funciones: Tras la pérdida de peso. Realizado con la herramienta *GORILLA* (365).

A continuación se presenta el mapa de funciones de todas las proteínas que se expresan durante el estadio de obesidad (*Figura 107*):



**Figura 107. Mapa de funciones: Estadio de obesidad.** Realizado con la herramienta *GORILLA* (365).



## Anexo 7: Proteómica cuantitativa

A continuación, en la *Tabla 53* se detallan las proteínas cuya expresión aumentó de forma estadísticamente significativa tras la pérdida de peso en las muestras de grasa subcutánea analizadas ordenadas en función del p-valor (se consideraron diferencias estadísticamente significativas  $p < 0.04$ ):

Proteína	Identificación	p-valor	% expresión durante el estadio de obesidad	% expresión tras la pérdida de peso
ADH1B	P00325	1,20E-09	100	448,3
PHGDH	O43175	2,98E-09	100	268,1
APOA4	P06727	6,93E-09	100	209,1
CLEC3B	P05452	1,41E-08	100	226,2
PRDX3	P30048	1,98E-08	100	232,5
ACSL1	P33121	2,19E-08	100	345,9
DLAT	P10515	2,25E-08	100	286,8
AZGP1	P25311	2,65E-08	100	296,8
CYB5A	P00167	4,65E-08	100	316,1
DPYSL2	Q16555	6,92E-08	100	210,4
APOE	P02649	8,17E-08	100	186,1
ALB	P02768	9,58E-08	100	163,5
UQCRC1	P31930	1,38E-07	100	227,2
TF	P02787	1,39E-07	100	154,9
RPS18	P62269	2,79E-07	100	236,1
PCBP1	Q15365	2,94E-07	100	208,5
GSTP1	P09211	3,00E-07	100	157,7
AKR7A2	O43488	3,46E-07	100	182,5
ECI1	P42126	3,74E-07	100	422,3
HMGB1	P09429	3,75E-07	100	299,5
RPS10	P46783	3,81E-07	100	241,2
HSPB1	P04792	5,13E-07	100	251,2
RPS4X	P62701	8,06E-07	100	235,3
NID1	P14543	8,45E-07	100	176,4
GNG12	Q9UBI6	8,48E-07	100	294,9
TALDO1	P37837	8,57E-07	100	177,7
GPD1	P21695	8,60E-07	100	224,0
EEF1G	P26641	1,08E-06	100	185,5
ALDH9A1	P49189	1,10E-06	100	191,3
COX4I1	P13073	1,50E-06	100	239,0
EEF1A1	P68104	1,54E-06	100	244,2

Proteína	Identificación	p-valor	% expresión durante el estadio de obesidad	% expresión tras la pérdida de peso
HSD17B12	Q53GQ0	2,03E-06	100	228,6
RPS16	P62249	2,03E-06	100	254,0
HNRNPD	Q14103	2,18E-06	100	175,0
ILK	Q13418	2,53E-06	100	281,0
FABP5	Q01469	2,53E-06	100	262,2
VPS35	Q96QK1	2,55E-06	100	210,3
ATP5F1A	P25705	2,90E-06	100	263,9
RPS20	P60866	3,83E-06	100	193,4
FAS	P49327	4,44E-06	100	934,1
HSPD1	P10809	4,75E-06	100	221,3
TUBA1A	Q71U36	5,33E-06	100	212,1
GSN	P06396	5,49E-06	100	180,9
CS	O75390	5,90E-06	100	218,6
DPYSL3	Q14195	8,28E-06	100	230,2
SERPINB6	P35237	9,33E-06	100	331,2
APOA1	P02647	9,41E-06	100	205,8
VDAC2	P45880	9,72E-06	100	270,5
NIT2	Q9NQR4	1,08E-05	100	276,7
ACSS3	Q9H6R3	1,09E-05	100	333,3
MDH2	P40926	1,12E-05	100	206,9
GBE1	Q04446	1,23E-05	100	213,6
ATP5H	O75947	1,30E-05	100	186,3
ATP5F1B	P06576	1,31E-05	100	197,1
SEPT7	Q16181	1,48E-05	100	176,3
VPS29	Q9UBQ0	1,53E-05	100	234,8
CAVIN1	Q6NZI2	1,58E-05	100	167,5
VAMP3	Q15836	1,65E-05	100	232,0
ACO2	Q99798	1,67E-05	100	216,7
COX2	P00403	1,71E-05	100	204,1
GPX3	P22352	1,72E-05	100	278,7
CD81	P60033	1,81E-05	100	175,4
CKB	P12277	1,99E-05	100	302,5
HSPE1	P61604	2,02E-05	100	216,7
TUBB	P07437	2,06E-05	100	169,5
GNAI1	P63096	2,47E-05	100	227,1
ATP5F1	P24539	2,64E-05	100	270,5
SLC25A1	P53007	2,96E-05	100	232,6

Proteína	Identificación	p-valor	% expresión durante el estadio de obesidad	% expresión tras la pérdida de peso
MFAP4	P55083	3,07E-05	100	339,4
GPD2	P43304	3,12E-05	100	191,9
HSPA1B	P0DMV9	3,81E-05	100	142,6
SOD3	P08294	3,89E-05	100	158,9
SLC25A6	P12236	4,23E-05	100	240,4
ACAA2	P42765	4,60E-05	100	215,8
CFD	P00746	5,20E-05	100	178,2
FBN1	P35555	5,31E-05	100	304,6
HSP90AB1	P08238	5,40E-05	100	235,0
GNB2	P62879	5,47E-05	100	210,0
RHOA	P61586	5,97E-05	100	184,2
TKT	P29401	6,40E-05	100	196,8
HADHA	P40939	7,51E-05	100	246,0
ACSS2	Q9NR19	8,65E-05	100	255,8
ABHD5	Q8WTS1	8,86E-05	100	224,1
ALDH2	P05091	9,55E-05	100	189,6
SUCLA2	Q9P2R7	9,81E-05	100	210,9
GC	P02774	0,0001	100	141,0
EFEMP1	Q12805	0,0001	100	198,3
NARS	O43776	0,0001	100	198,2
SLC25A5	P05141	0,00011	100	224,4
NDUFA4	O00483	0,00013	100	244,9
FMOD	Q06828	0,00013	100	210,9
TPD52L2	O43399	0,00014	100	401,2
APOD	P05090	0,00016	100	175,4
METTL7A	Q9H8H3	0,00016	100	176,9
PGLS	O95336	0,00018	100	147,5
CTSD	P07339	0,00021	100	154,0
COX5B	P10606	0,00021	100	202,5
VAT1	Q99536	0,00023	100	142,2
RPSA	P08865	0,00023	100	174,0
SLC25A11	Q02978	0,00025	100	213,5
TUFM	P49411	0,00026	100	283,0
FSCN1	Q16658	0,00027	100	178,0
DLST	P36957	0,0003	100	217,9
ANXA6	P08133	0,00032	100	169,5
SERPINA1	P01009	0,00034	100	137,0

Proteína	Identificación	p-valor	% expresión durante el estadio de obesidad	% expresión tras la pérdida de peso
PDHA1	P08559	0,00034	100	185,9
AKR1C2	P52895	0,00035	100	177,3
PLS3	P13797	0,00039	100	162,4
CAPG	P40121	0,0004	100	174,3
SLC25A3	Q00325	0,00041	100	187,6
LUM	P51884	0,00042	100	212,3
ATP5F1C	P36542	0,00043	100	190,3
LGALS3BP	Q08380	0,00046	100	177,2
ASPN	Q9BXN1	0,00047	100	326,3
HEBP2	Q9Y5Z4	0,00047	100	171,1
SORBS1	Q9BX66	0,00049	100	206,1
QDPR	P09417	0,00052	100	139,8
TUBA4A	P68366	0,00054	100	168,5
FERMT2	Q96AC1	0,00055	100	154,0
GNAI2	P04899	0,00058	100	147,9
ETFB	P38117	0,0006	100	204,7
MYH9	P35579	0,00061	100	169,7
SERPINC1	P01008	0,00061	100	130,2
NPEPPS	P55786	0,00066	100	183,2
CALB2	P22676	0,00067	100	211,7
PRELP	P51888	0,0007	100	237,4
ARHGDI	P52565	0,0007	100	159,5
MGST3	O14880	0,00077	100	216,1
SERPINF1	P36955	0,0008	100	139,9
FABP4	P15090	0,00082	100	203,8
IDH1	O75874	0,00086	100	166,6
RPN1	P04843	0,00088	100	170,7
CAVIN2	O95810	0,00123	100	168,9
FAM114A1	Q8IWE2	0,00124	100	199,1
DDAH2	O95865	0,00129	100	157,4
C1QC	P02747	0,0013	100	151,3
PGM1	P36871	0,00136	100	172,0
ECHS1	P30084	0,00145	100	166,3
HSP90AA1	P07900	0,00148	100	141,1
PGAM1	P18669	0,00155	100	141,1
ENO1	P06733	0,00158	100	137,3
ABHD14B	Q96IU4	0,00164	100	153,7

Proteína	Identificación	p-valor	% expresión durante el estadio de obesidad	% expresión tras la pérdida de peso
FAH	P16930	0,00168	100	163,9
ATP6	P00846	0,00172	100	185,0
EEF1D	P29692	0,0018	100	149,3
FBLN1	P23142	0,00218	100	134,2
GANAB	Q14697	0,00223	100	140,4
AIFM1	O95831	0,00249	100	195,5
PRKACA	P17612	0,00273	100	163,3
SERPINH	P50454	0,00283	100	181,0
YWHAQ	P27348	0,00284	100	154,0
FH	P07954	0,00285	100	157,1
MYO1C	O00159	0,00294	100	214,2
GPX4	P36969	0,00303	100	152,1
RPS3	P23396	0,00334	100	233,5
ESYT1	Q9BSJ8	0,00342	100	161,1
LIMS1	P48059	0,00343	100	160,5
CLTC	Q00610	0,00352	100	130,0
HNRNPK	P61978	0,00382	100	142,5
PPIB	P23284	0,00386	100	145,0
PDIA6	Q15084	0,00388	100	158,3
MAOB	P27338	0,00396	100	169,0
FAM213A	Q9BRX8	0,00417	100	148,2
PEBP1	P30086	0,00443	100	135,8
AKR1C3	P42330	0,00453	100	140,7
TUBB4B	P68371	0,00461	100	204,2
OGN	P20774	0,00462	100	201,3
EEF2	P13639	0,00485	100	153,8
MAOA	P21397	0,00533	100	178,8
TTR	P02766	0,00625	100	130,5
PRKAR2B	P31323	0,00628	100	148,3
PCBP2	Q15366	0,00639	100	157,8
LIPE	Q05469	0,00774	100	147,6
RAB5C	P51148	0,00783	100	129,1
BGN	P21810	0,00801	100	221,2
MGST1	P10620	0,00807	100	157,0
HPX	P02790	0,00814	100	115,4
ATP5L	O75964	0,0085	100	151,4
TAGLN2	P37802	0,00888	100	149,2

Proteína	Identificación	p-valor	% expresión durante el estadio de obesidad	% expresión tras la pérdida de peso
IQGAP1	P46940	0,0089	100	157,6
COL1A1	P02452	0,00914	100	151,1
ATL3	Q6DD88	0,00941	100	151,7
SEC22B	O75396	0,0095	100	165,7
ASPH	Q12797	0,00976	100	164,1
CALR	P27797	0,0106	100	131,4
RRAS	P10301	0,01088	100	136,5
RAC1	P63000	0,01321	100	127,9
ANXA2	P07355	0,01373	100	130,2
ALDH4A1	P30038	0,01444	100	182,2
ACTR2	P61160	0,01494	100	134,4
LRG1	P02750	0,01533	100	133,2
PSME1	Q06323	0,01571	100	145,0
CA4	P22748	0,016	100	165,9
EHD2	Q9NZN4	0,01625	100	142,3
CSTB	P04080	0,01674	100	147,8
PLIN1	O60240	0,01821	100	215,3
ACACB	O00763	0,01964	100	166,5
ANXA4	P09525	0,02041	100	141,5
C1S	P09871	0,02045	100	120,0
VCAN	P13611	0,02059	100	196,9
TPI1	P60174	0,02108	100	121,7
PDHB	P11177	0,02138	100	169,3
PLIN4	Q96Q06	0,02272	100	156,2
ATP5J2	P56134	0,0232	100	133,9
HSPA5	P11021	0,02401	100	132,6
RAB7A	P51149	0,02475	100	134,8
CFL1	P23528	0,02505	100	127,8
BCAP31	P51572	0,02529	100	173,6
BSG	P35613	0,02546	100	133,0
SYNCRIP	O60506	0,02584	100	148,5
SYNCRIP	Q99685	0,02787	100	149,9
PYGL	P06737	0,02964	100	152,2
YWHAB	P31946	0,03034	100	134,5
POSTN	Q15063	0,03037	100	175,1
CAV1	Q03135	0,03282	100	125,4
PC	P11498	0,03301	100	138,1

Proteína	Identificación	p-valor	% expresión durante el estadio de obesidad	% expresión tras la pérdida de peso
ACAT1	P24752	0,0335	100	146,9
FHL1	Q13642	0,0338	100	154,2
SERPINA7	P05543	0,03403	100	120,9
MSN	P26038	0,03507	100	122,2
S100A10	P60903	0,0351	100	128,4
TAGLN	Q01995	0,0358	100	149,7
MYL6	P60660	0,03844	100	131,8
TXNDC5	Q8NBS9	0,03895	100	147,1

**Tabla 53. Proteínas cuyos niveles de expresión aumentaron de forma estadísticamente significativa tras la pérdida de peso.** Los valores se expresan como unidades relativas, considerando 100 % los niveles de expresión de cada proteína durante el estadio de obesidad (se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando  $p < 0.04$ ).

A continuación en la *Tabla 54* se detallan las proteínas cuya expresión disminuyó de forma estadísticamente significativa tras la pérdida de peso en las muestras de grasa subcutánea analizadas ordenadas en función del p-valor (se consideraron diferencias estadísticamente significativas  $p < 0.04$ ):

Proteína	Identificación	p-valor	% de expresión durante el estadio de obesidad	% expresión tras la pérdida de peso
HBD	P02042	5,25E-12	100	25,6
HBA	P69905	9,16E-11	100	25,1
PRDX2	P32119	1,46E-10	100	30,6
CAT	P04040	3,92E-10	100	50,4
PNP	P00491	4,33E-10	100	36,6
CA1	P00915	1,32E-09	100	28,0
HBB	P68871	1,64E-09	100	32,2
ADK	P55263	3,13E-09	100	30,2
GDI2	P50395	5,35E-09	100	48,2
HEM2	P13716	5,77E-09	100	40,1
PRPS1	P60891	6,86E-09	100	55,6
CA2	P00918	6,71E-08	100	29,5
BPGM	P07738	7,68E-08	100	30,3
CFH	P08603	8,59E-08	100	59,4
LTF	P02788	9,06E-08	100	25,3
USP14	P54578	9,35E-08	100	43,3
SERPINF2	P08697	1,25E-07	100	20,4

Proteína	Identificación	p-valor	% de expresión durante el estadio de obesidad	% expresión tras la pérdida de peso
IDH3A	P50213	1,97E-07	100	31,9
BLVRB	P30043	3,30E-07	100	35,9
S100A8	P05109	4,88E-07	100	17,7
SURF4	O15260	5,71E-07	100	23,3
PSMF1	Q92530	7,34E-07	100	46,2
APEH	P13798	1,06E-06	100	52,1
LXN	Q9BS40	1,66E-06	100	57,0
LAMA4	Q16363	2,05E-06	100	42,9
AGT	P01019	2,06E-06	100	45,3
IGLV3-25	P01717	3,62E-06	100	52,3
KRT2	P35908	5,19E-06	100	69,2
C4BPA	P04003	5,28E-06	100	41,6
GSTO1	P78417	5,41E-06	100	59,2
GYPA	P02724	6,98E-06	100	37,0
VTN	P04004	7,01E-06	100	55,7
GCLC	P48506	9,44E-06	100	54,0
DEFA3	P59666	1,01E-05	100	14,2
RAN	P62826	1,11E-05	100	71,0
ELANE	P08246	1,46E-05	100	29,2
CFB	P00751	2,31E-05	100	60,8
KRT9	P35527	2,41E-05	100	45,2
KRT1	P04264	2,52E-05	100	56,0
TKFC	Q3LXA3	3,57E-05	100	52,4
S100A9	P06702	5,41E-05	100	28,9
C3	P01024	6,20E-05	100	58,4
UBA52	P62987	6,98E-05	100	69,6
COL14A1	Q05707	7,76E-05	100	34,9
AHCY	P23526	9,76E-05	100	69,9
MYH7	P12883	0,00011	100	19,1
IDH2	P48735	0,00011	100	46,7
PPA2	Q9H2U2	0,00019	100	40,1
GLUT1	P11166	0,00021	100	19,4
CRYAB	P02511	0,00022	100	53,7
AK1	P00568	0,00023	100	49,7
AK3	Q9UIJ7	0,00026	100	31,2
SPTB	P11277	0,00032	100	21,4
PPBP	P02775	0,00033	100	14,9



Proteína	Identificación	p-valor	% de expresión durante el estadio de obesidad	% expresión tras la pérdida de peso
TGFB1	Q15582	0,00036	100	22,8
AK2	P54819	0,00038	100	35,5
APOB	P04114	0,00039	100	46,3
RHAG	Q02094	0,00047	100	20,4
TMED10	P49755	0,00053	100	20,8
STOM	P27105	0,00057	100	44,8
TLN1	Q9Y490	0,00057	100	57,1
SLC4A1	P02730	0,00069	100	18,1
NAPA	P54920	0,00074	100	16,6
EPB41	P11171	0,00075	100	39,2
ANK1	P16157	0,00083	100	24,1
TLN2	Q9Y4G6	0,00084	100	11,7
PGLYRP2	Q96PD5	0,00088	100	51,2
TSTA3	Q13630	0,00091	100	37,6
EPB42	P16452	0,00095	100	24,4
CP	P00450	0,00096	100	74,5
CES1	P23141	0,00104	100	50,8
ITIH4	Q14624	0,00105	100	62,6
CAPN1	P07384	0,00109	100	67,8
PSMA7	O14818	0,00109	100	67,5
AZU1	P20160	0,00136	100	41,9
SPTA1	P02549	0,00136	100	19,7
RPLP0P6	Q8NHW5	0,00136	100	23,4
SOD1	P00441	0,0014	100	71,5
DDT	P30046	0,00184	100	71,9
PTBP1	P26599	0,00186	100	18,9
THBS1	P07996	0,0019	100	17,7
OGDH	Q02218	0,00191	100	27,8
PSMA6	P60900	0,00234	100	74,8
FGB	P02675	0,00246	100	24,5
NQO1	P15559	0,00263	100	55,5
EHD1	Q9H4M9	0,00277	100	40,9
PSMB6	P28072	0,00281	100	67,0
KRT10	P13645	0,00282	100	73,7
FGG	P02679	0,00326	100	30,5
FERMT3	Q86UX7	0,00418	100	28,6
TPM3	P06753	0,0042	100	54,5

Proteína	Identificación	p-valor	% de expresión durante el estadio de obesidad	% expresión tras la pérdida de peso
HP	P00738	0,00444	100	57,8
SRI	P30626	0,00449	100	50,6
MPO	P05164	0,00451	100	20,9
PSMA2	P25787	0,00479	100	73,6
NME1	P15531	0,00496	100	54,1
MYH11	P35749	0,00581	100	36,3
CBR1	P16152	0,00583	100	73,6
CKM	P06732	0,00616	100	43,3
MYL1	P05976	0,00639	100	14,1
CD34	P28906	0,00755	100	65,0
RETSAT	Q6NUM9	0,00835	100	39,4
ARF1	P84077	0,00837	100	75,2
FN1	P02751	0,00869	100	48,3
FGA	P02671	0,00878	100	49,8
IGHA1	P01876	0,00923	100	62,0
TPM1	P09493	0,01001	100	55,7
ITGA2B	P08514	0,0102	100	16,9
ALDH16A1	Q8IZ83	0,0111	100	35,3
CCT6A	P40227	0,01263	100	50,1
S100A4	P26447	0,01475	100	66,9
PARK7	Q99497	0,01635	100	65,5
ECHDC1	Q9NTX5	0,01672	100	64,9
TXN	P10599	0,01764	100	70,4
ACADS	P16219	0,02217	100	44,3
BLVRA	P53004	0,02271	100	77,2
CLU	P10909	0,02271	100	84,2
AFM	P43652	0,02455	100	76,5
HIST2H3A	Q71DI3	0,02532	100	42,4
LASP1	Q14847	0,02537	100	62,1
GLIPR2	Q9H4G4	0,02734	100	61,8
PDXK	O00764	0,02862	100	46,8
RNH1	P13489	0,02911	100	82,0
ITIH2	P19823	0,02995	100	74,9
FLNA	P21333	0,03255	100	65,4
PSMB5	P28074	0,03504	100	71,1
TPP1	O14773	0,03559	100	58,5
LONP1	P36776	0,03685	100	41,7

Proteína	Identificación	p-valor	% de expresión durante el estadio de obesidad	% expresión tras la pérdida de peso
<b>PSMB2</b>	P49721	0,03687	100	83,4
<b>ITIH1</b>	P19827	0,03829	100	77,2
<b>UBE2L3</b>	P68036	0,03841	100	70,0

**Tabla 54. Proteínas cuyos niveles de expresión disminuyeron de forma estadísticamente significativa tras la pérdida de peso.** Los valores se expresan como unidades relativas, considerando 100 % los niveles de expresión de cada proteína durante el estadio de obesidad (se consideraron diferencias estadísticamente significativas si  $p < 0.04$ ).



## **9. Publicaciones**



## 9. Publicaciones

En este apartado se detallan los artículos científicos publicados durante el período de realización de esta tesis:

1. Varela-Rodríguez BM, Pena-Bello L, Juiz-Valiña P, Vidal-Bretal B, Cordido F, Sangiao-Alvarellos S. FNDC5 expression and circulating irisin levels are modified by diet and hormonal conditions in hypothalamus, adipose tissue and muscle. *Scientific reports*. 2016;6:29898.
2. Pena-Bello L, Pertega-Diaz S, Sangiao-Alvarellos S, Outeirino-Blanco E, Eiras-Leal R, Varela-Rodríguez B, et al. Circulating Levels of Irisin in Hypopituitary and Normal Subjects. *PloS one*. 2016;11(7):e0160364.
3. Pena-Bello L, Seoane-Pillado T, Sangiao-Alvarellos S, Outeirino-Blanco E, Varela-Rodríguez B, Juiz-Valina P, et al. Oral glucose-stimulated growth hormone (GH) test in adult GH deficiency patients and controls: Potential utility of a novel test. *European journal of internal medicine*. 2017;44:55-61.
4. Burgeiro A, Cerqueira MG, Varela-Rodríguez BM, Nunes S, Neto P, Pereira FC, et al. Glucose and Lipid Dysmetabolism in a Rat Model of Prediabetes Induced by a High-Sucrose Diet. *Nutrients*. 2017;9(6).





# **10. Curriculum Vitae**





**Bárbara María Varela  
Rodríguez**

Generado desde: Editor CVN de FECYT

Fecha del documento: 14/11/2018

**v 1.4.0**

482c03c1579326c923f8084c0efc8eb0

Este fichero electrónico (PDF) contiene incrustada la tecnología CVN (CVN-XML). La tecnología CVN de este fichero permite exportar e importar los datos curriculares desde y hacia cualquier base de datos compatible. Listado de Bases de Datos adaptadas disponible en <http://cvn.fecyt.es/>



---

## Bárbara María Varela Rodríguez

---

Apellidos: **Varela Rodríguez**  
Nombre: **Bárbara María**  
DNI: **71524461G**  
Fecha de nacimiento: **04/12/1988**  
Sexo: **Mujer**  
Teléfono fijo: **(0034) 676919868**  
Correo electrónico: **barbara.varela.rodriguez@gmail.com**

### Situación profesional actual

**Entidad empleadora:** FUNDACION PROFESOR NOVOA SANTOS  
**Departamento:** Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña  
**Categoría profesional:** Investigadora Licenciada  
**Fecha de inicio:** 01/04/2016  
**Modalidad de contrato:** Contrato laboral      **Régimen de dedicación:** Tiempo completo temporal  
**Primaria (Cód. Unesco):** 240000 - Ciencias de la Vida

### Cargos y actividades desempeñados con anterioridad

	Entidad empleadora	Categoría profesional	Fecha de inicio
	Serviguide	Becaria	12/02/2012

**Entidad empleadora:** Serviguide      **Tipo de entidad:** Consultoría  
**Categoría profesional:** Becaria  
**Fecha de inicio-fin:** 12/02/2012 - 21/06/2013      **Duración:** 4 meses - 9 días

## Formación académica recibida

### Titulación universitaria

Estudios de 1º y 2º ciclo, y antiguos ciclos (Licenciados, Diplomados, Ingenieros Superiores, Ingenieros Técnicos, Arquitectos)

- 1 Titulación universitaria:** Titulado Superior  
**Nombre del título:** Máster en Biología Molecular, Celular y Genética  
**Entidad de titulación:** Universidade da Coruña (Facultad de Ciencias)  
**Fecha de titulación:** 11/07/2014
- 2 Titulación universitaria:** Titulado Medio  
**Nombre del título:** Tesis de Licenciatura  
**Entidad de titulación:** Universidade da Coruña (Facultad de Ciencias) **Tipo de entidad:** Universidad  
**Fecha de titulación:** 21/11/2013
- 3 Titulación universitaria:** Titulado Superior  
**Nombre del título:** Licenciado en Biología Opción Biología Celular y Molecular  
**Entidad de titulación:** Universidade da Coruña (Facultad de Ciencias) **Tipo de entidad:** Universidad  
**Fecha de titulación:** 11/03/2013

### Doctorados

**Programa de doctorado:** Doctorado Oficial en Ciencias de la Salud (En curso)  
**Entidad de titulación:** Universidad da Coruña (Facultad de Oza) **Tipo de entidad:** Universidad

### Cursos y seminarios recibidos de perfeccionamiento, innovación y mejora docente, nuevas tecnologías, etc., cuyo objetivo sea la mejora de la docencia

- 1 Título del curso/seminario:** AI\_5 Avances en endocrinología e nutrición 2018: Avances no tratamiento, diabetes, obesidade e endocrinología.  
**Entidad organizadora:** FUNDACION UNIVERSIDADE DA CORUÑA  
**Duración en horas:** 4 horas  
**Fecha de inicio-fin:** 04/05/2018 - 04/05/2018
- 2 Título del curso/seminario:** Cómo buscar y usar la información para elaborar la tesis de doctorado.  
**Entidad organizadora:** FUNDACION UNIVERSIDADE DA CORUÑA  
**Duración en horas:** 12 horas  
**Fecha de inicio-fin:** 03/04/2018 - 20/04/2018

- 3** **Título del curso/seminario:** AL-3 International Young Investigator Meeting  
**Entidad organizadora:** FUNDACION UNIVERSIDADE DA CORUÑA  
**Duración en horas:** 8 horas  
**Fecha de inicio-fin:** 28/12/2017 - 28/12/2017
- 4** **Título del curso/seminario:** Obesidad epidemia del siglo XXI  
**Entidad organizadora:** Universidad Internacional **Tipo de entidad:** Universidad Menéndez Pelayo  
**Duración en horas:** 12 horas  
**Fecha de inicio-fin:** 27/11/2017 - 28/11/2017
- 5** **Título del curso/seminario:** Science Xpression 2017  
**Entidad organizadora:** Universidade da Coruña y Fundación Barrié  
**Duración en horas:** 15 horas  
**Fecha de inicio-fin:** 25/09/2017 - 29/09/2017
- 6** **Título del curso/seminario:** Curso de Avances en Endocrinología y nutrición 2017  
**Entidad organizadora:** Universidad de La Coruña **Tipo de entidad:** Universidad  
**Duración en horas:** 3 horas  
**Fecha de inicio-fin:** 30/06/2017 - 30/06/2017
- 7** **Título del curso/seminario:** Prevención de Riesgos Laborales  
**Entidad organizadora:** Universidade da Coruña **Tipo de entidad:** Universidad  
**Duración en horas:** 20 horas  
**Fecha de inicio-fin:** 02/05/2017 - 18/05/2017
- 8** **Título del curso/seminario:** De la tesis a la empresa (propia). Experiencias de una "spin-off"; iniciativas empresariales de base tecnológica (IEBT); proceso de cualificación  
**Entidad organizadora:** Universidad de La Coruña **Tipo de entidad:** Universidad  
**Duración en horas:** 3 horas  
**Fecha de inicio-fin:** 06/04/2017 - 06/04/2017
- 9** **Título del curso/seminario:** Estrategias para incrementar la visibilidad y el impacto de los resultados de la investigación  
**Entidad organizadora:** Universidade Da Coruña **Tipo de entidad:** Universidad  
**Duración en horas:** 12 horas  
**Fecha de inicio-fin:** 01/02/2017 - 31/03/2017
- 10** **Título del curso/seminario:** Doctores al margen de hospitales, universidades y centros de investigación  
**Entidad organizadora:** Universidad de La Coruña **Tipo de entidad:** Universidad  
**Duración en horas:** 3 horas  
**Fecha de inicio-fin:** 16/03/2017 - 16/03/2017
- 11** **Título del curso/seminario:** Jornadas Nacionales Salud, Ejercicio Físico y Nutrición  
**Entidad organizadora:** Universidad de La Coruña **Tipo de entidad:** Universidad  
**Duración en horas:** 24 horas  
**Fecha de inicio-fin:** 03/02/2017 - 04/02/2017
- 12** **Título del curso/seminario:** Encuentro de Xóvenes Investigadores No Extranxeiro  
**Entidad organizadora:** Universidade Da Coruña **Tipo de entidad:** Universidad  
**Duración en horas:** 8 horas

**Fecha de inicio-fin:** 29/12/2016 - 29/12/2016

- 13** **Título del curso/seminario:** VII Encontro de Xóvenes Investigadores no Extranxeiro  
**Entidad organizadora:** Universidad de La Coruña **Tipo de entidad:** Universidad  
**Duración en horas:** 8 horas  
**Fecha de inicio-fin:** 29/12/2016 - 29/12/2016
- 14** **Título del curso/seminario:** Curso Investigación Biomédica: Aspectos Técnicos y Jurídicos  
**Entidad organizadora:** FUNDACION PROFESOR NOVOA SANTOS  
**Facultad, instituto, centro:** Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña  
**Duración en horas:** 6 horas  
**Fecha de inicio-fin:** 12/12/2016 - 13/12/2016
- 15** **Título del curso/seminario:** IV Xornada de Benvida a Estudantes de Doutoramento  
**Entidad organizadora:** Universidad de La Coruña **Tipo de entidad:** Universidad  
**Duración en horas:** 4 horas  
**Fecha de inicio-fin:** 28/10/2016 - 28/10/2016
- 16** **Título del curso/seminario:** GradSchool: Curso de competencias profesionales para investigadores 2016  
**Entidad organizadora:** FUNDACION PEDRO BARRIE DE LA MAZA  
**Duración en horas:** 32 horas  
**Fecha de inicio-fin:** 18/10/2016 - 21/10/2016
- 17** **Título del curso/seminario:** Science Xpression, connexins and pannexins based-channels: Therapeutic Applications"  
**Entidad organizadora:** Universidad de La Coruña **Tipo de entidad:** Universidad  
**Duración en horas:** 15 horas  
**Fecha de inicio-fin:** 26/09/2016 - 30/09/2016
- 18** **Título del curso/seminario:** III Edición Jornada de Investigación Biomédica del Cáncer en Galicia  
**Entidad organizadora:** Xerencia de Xestión Integrada A Coruña **Tipo de entidad:** Entidad Gestora del Sistema Nacional de Salud  
**Duración en horas:** 5 horas  
**Fecha de inicio-fin:** 08/07/2016 - 08/07/2016
- 19** **Título del curso/seminario:** Avances en Endocrinología y Nutrición  
**Entidad organizadora:** Universidade Da Coruña  
**Duración en horas:** 3 horas  
**Fecha de inicio-fin:** 25/05/2016 - 25/05/2016
- 20** **Título del curso/seminario:** Software Avanzado de Microscopía NIS AR de Nikon  
**Entidad organizadora:** Izasa, S.A. **Tipo de entidad:** Entidad Empresarial  
**Duración en horas:** 2 horas  
**Fecha de inicio-fin:** 27/04/2016 - 27/04/2016
- 21** **Título del curso/seminario:** Avances en Endocrinología y Nutrición: Avances en patología hipofisaria  
**Entidad organizadora:** Universidad de La Coruña **Tipo de entidad:** Universidad  
**Duración en horas:** 4 horas  
**Fecha de inicio-fin:** 02/12/2015 - 02/12/2015

- 22** **Título del curso/seminario:** Course of Sciences in Laboratory Animals, Category C  
**Entidad organizadora:** Center for neurosciences and cell biology  
**Facultad, instituto, centro:** Universidad de Coimbra  
**Duración en horas:** 80 horas  
**Fecha de inicio-fin:** 01/09/2015 - 12/09/2015
- 23** **Título del curso/seminario:** VIII Jornada Científica de Terapia Celular y Medicina Regenerativa  
**Entidad organizadora:** INIBIC **Tipo de entidad:** Instituto Universitario de Investigación  
**Fecha de inicio-fin:** 18/06/2015 - 18/06/2015
- 24** **Título del curso/seminario:** Ética de la Investigación en Ciencias Biológicas, Biomédicas, Sociales y de la Conducta  
**Entidad organizadora:** Universidad de A Coruña **Tipo de entidad:** Universidad  
**Duración en horas:** 12 horas  
**Fecha de inicio-fin:** 09/03/2015 - 10/03/2015
- 25** **Título del curso/seminario:** Metodología de Investigación Básica y Aplicada  
**Entidad organizadora:** Universidad de A Coruña **Tipo de entidad:** Universidad  
**Duración en horas:** 12 horas  
**Fecha de inicio-fin:** 19/02/2015 - 20/02/2015
- 26** **Título del curso/seminario:** XIX congreso de la Sociedad Española de Mutagénesis Ambiental  
**Entidad organizadora:** SEMA  
**Fecha de inicio-fin:** 20/10/2010 - 22/10/2010
- 27** **Título del curso/seminario:** Técnicas de manejo de la ansiedad y el estrés ante los exámenes  
**Entidad organizadora:** Universidad de A Coruña **Tipo de entidad:** Universidad  
**Duración en horas:** 10 horas  
**Fecha de inicio-fin:** 27/10/2009 - 29/10/2009
- 28** **Título del curso/seminario:** Técnicas de Estudio  
**Entidad organizadora:** Universidad de A Coruña **Tipo de entidad:** Universidad  
**Duración en horas:** 10 horas  
**Fecha de inicio-fin:** 20/10/2009 - 22/10/2009
- 29** **Título del curso/seminario:** III curso de formación en actualidad científica: Neurociencia  
**Entidad organizadora:** Museos Científicos Coruñeses y NEUROcom (Unidad de Neurociencia y Control Motor de la Universidade da Coruña)  
**Duración en horas:** 15 horas  
**Fecha de inicio-fin:** 03/12/2007 - 17/12/2007
- 30** **Título del curso/seminario:** Comunicar ciencia na radio. Obradoiro para investigadores na Radio Galega  
**Entidad organizadora:** Enmarcado dentro del proyecto Efervescencia 13-14 concedido a Radio Galega por la FECYT con referencia FCT-13-6848  
**Facultad, instituto, centro:** Radio Galega  
**Duración en horas:** 3 horas  
**Fecha de inicio:** 12/07/2014
- 31** **Título del curso/seminario:** Como se hace una tesis y otros escritos académicos  
**Entidad organizadora:** Universidad de A Coruña **Tipo de entidad:** Universidad  
**Duración en horas:** 10 horas



Fecha de inicio: 29/04/2013

- 32** **Título del curso/seminario:** VI Jornada científica: Terapia Celular y Medicina Regenerativa  
**Entidad organizadora:** Universidad de A Coruña e INIBIC  
**Duración en horas:** 8 horas  
**Fecha de inicio:** 05/10/2012

### Conocimiento de idiomas

Idioma	Comprensión auditiva	Comprensión de lectura	Interacción oral	Expresión oral	Expresión escrita
Inglés		C1	B1	B1	C1
Español		C1	C1	C1	C1

## Experiencia científica y tecnológica

### Resultados

#### Propiedad industrial e intelectual

**Título propiedad industrial registrada:** PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA IN VIVO ANALIZANDO FORMAS DE GFP RECOMBINANTES

**Inventores/autores/obtenedores:** Bárbara María Varela Rodríguez; María de los Ángeles Freire Picos; Ana María Rodríguez Torres; Tania Álvarez Felgar

**Entidad titular de derechos:** Universidad de La Coruña

**Nº de solicitud:** P201500093

**País de inscripción:** España, Galicia

**Fecha de registro:** 29/10/2015

**Fecha de concesión:** 13/09/2017

## Actividades científicas y tecnológicas

### Producción científica

#### Publicaciones, documentos científicos y técnicos

- 1 Ana Burgueiro; Manuela G. Cerqueira; Bárbara M Varela Rodríguez; Sara Nunes; Paula Neto; Frederico C. Pereira; Flávio Reis; Eugénia Carvalho. Glucose and Lipid Dysmetabolism in a Rat Model of Prediabetes Induced by a High-Sucrose Diet. *Nutrients*. 9 - 6, pp. 1 - 17. 21/06/2017.  
**Tipo de producción:** Artículo científico **Tipo de soporte:** Revista  
**Autor de correspondencia:** No
- 2 Lara Pena Bello; Teresa Seoane Pillado; Susana Sangiao Alvarellos; Elena Outeriño Blanco; Bárbara Varela Rodríguez; Paula Juiz Valiña; María Cordido; Fernando Cordido. Oral glucose-stimulated growth hormone (GH) test in adult GH deficiency patients and controls: Potential utility of a novel test. *Eur J Intern Med*.44, pp. 55 - 61. 09/06/2017.  
**Tipo de producción:** Artículo científico **Tipo de soporte:** Revista  
**Autor de correspondencia:** No
- 3 Pena-Bello L; Pértega-Díaz S; Sangiao-Alvarellos S; Outeriño-Blanco E; Eiras-Leal R; Varela-Rodríguez B; Juiz-Valiña P; Pérez-Fontán M; Cordido M; Cordido F. Circulating Levels of Irisin in Hypopituitary and Normal Subjects. *PLoS One*. 11 - 7, pp. 1 - 12. 29/07/2016.  
**Tipo de producción:** Artículo científico  
**Autor de correspondencia:** No
- 4 Bárbara Mª Varela Rodríguez; Lara Pena Bello; Paula Juiz Valiña; Beatriz Vidal Bretal; Fernando Cordido Carballido; Susana Sangio Alvarellos. FNDC5 expression and circulating irisin levels are modified by diet and hormonal conditions in hypothalamus, adipose tissue and muscle. *Scientific Reports*. 6 - 29898 (2016), pp. 1 - 13. Nature, 19/07/2016.  
**Tipo de producción:** Artículo científico **Tipo de soporte:** Revista

#### Trabajos presentados en congresos nacionales o internacionales

- 1 **Título del trabajo:** A role of miR-19a and miR-19b in the regulation of adipogenesis  
**Nombre del congreso:** Segundo Simposio Internacional Julio Palacios  
**Ciudad de celebración:** A Coruña, Galicia, España  
**Fecha de celebración:** 11/07/2018  
**Fecha de finalización:** 12/07/2018  
**Entidad organizadora:** Fundación Ramón Areces, UDC y CSIC
- 2 **Título del trabajo:** Differential expression of SORLa and Rb1 in metabolic stress in different models of metabolic stress  
**Nombre del congreso:** Segundo Simposio Internacional Julio Palacios  
**Ciudad de celebración:** A Coruña, Galicia, España  
**Fecha de celebración:** 11/07/2018  
**Fecha de finalización:** 12/11/2018  
**Entidad organizadora:** Fundación Ramón Areces, UDC y CSIC

- 3** **Título del trabajo:** Impact of gastrectomy and gastric bypass on the type 2 diabetes mellitus  
**Nombre del congreso:** Segundo Simposio Internacional Julio Palacios  
**Ciudad de celebración:** A Coruña, Galicia, España  
**Fecha de celebración:** 11/07/2018  
**Fecha de finalización:** 12/07/2018  
**Entidad organizadora:** Fundación Ramón Areces, UDC y CSIC
- 4** **Título del trabajo:** Alteración de la adipogénesis por miR-19a y miR-19b  
**Nombre del congreso:** BiointegraSaúde 2018  
**Autor de correspondencia:** Si  
**Ciudad de celebración:** Vigo, Galicia, España  
**Fecha de celebración:** 29/05/2018  
**Fecha de finalización:** 29/05/2018  
**Entidad organizadora:** Fundación Biomédica Galicia Sur, Fundación Profesor Novoa Santos y Fundación Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela  
Bárbara María Varela Rodríguez; Paula Juiz Valiña; Yocastia De Jesús; Lara Pena Bello; Fernando Cordido Carballido; Susana Sangiao Alvarellos.
- 5** **Título del trabajo:** Impacto del bypass gástrico y de la gastrectomía vertical en la remisión de la diabetes mellitus tipo 2  
**Nombre del congreso:** BiointegraSaúde 2018  
**Autor de correspondencia:** No  
**Ciudad de celebración:** Vigo, Galicia, España  
**Fecha de celebración:** 29/05/2018  
**Fecha de finalización:** 29/05/2018  
**Entidad organizadora:** Fundación Biomédica Galicia Sur, Fundación Profesor Novoa Santos y Fundación Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela  
**Título del trabajo:** Alteración de la adipogénesis por miR-  
Paula Juiz Valiña; Bárbara María Varela Rodríguez; Elena Outerío Blanco; Olga Fidalgo Baamil; Lara Pena Bello; María J. García Brao; Enrique Mena; Susana Sangiao Alvarellos; Fernando Cordido.
- 6** **Título del trabajo:** Implicación del estrés metabólico en la expresión diferencial de Sorl1 y Rb1 en tejido adiposo visceral de rata  
**Nombre del congreso:** BiointegraSaúde 2018  
**Autor de correspondencia:** No  
**Ciudad de celebración:** Vigo, Galicia, España  
**Fecha de celebración:** 29/05/2018  
**Fecha de finalización:** 29/05/2018  
**Entidad organizadora:** Fundación Biomédica Galicia Sur, Fundación Profesor Novoa Santos y Fundación Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela  
Paula Juiz Valiña; Bárbara María Varela Rodríguez; Lorena Sampedro Ares; Lara Pena Bello; Fernando Cordido; Susana Sangiao Alvarellos.
- 7** **Título del trabajo:** Alteración de la expresión génica de SORL1 y RB1 en distintos modelos de estrés metabólico.ICO  
**Nombre del congreso:** XIV Congreso de la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad  
**Ciudad de celebración:** Lleida, Cataluña, España  
**Fecha de celebración:** 14/03/2018  
**Fecha de finalización:** 16/03/2018  
**Entidad organizadora:** Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad **Tipo de entidad:** Asociaciones y Agrupaciones

- 8** **Título del trabajo:** Efecto de los diferentes tipos de cirugía bariátrica sobre la Diabetes Mellitus tipo 2  
**Nombre del congreso:** XIV Congreso de la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad  
**Autor de correspondencia:** No  
**Ciudad de celebración:** Lleida, Cataluña, España  
**Fecha de celebración:** 14/03/2018  
**Fecha de finalización:** 16/03/2018  
**Entidad organizadora:** Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad **Tipo de entidad:** Asociaciones y Agrupaciones  
Fernando Cordido; Paula Juiz Valiña; Bárbara M Varela Rodríguez; Elena Outeriño Blanco; Lara Pena Bello; M. Jesús García Brao; Enrique Mena Del Río; Susana Sangiao Alvarellos.
- 9** **Título del trabajo:** Hypothalamic FNDC5 expression is altered under some drug treatments in Wistar rats  
**Nombre del congreso:** Biointegrasaúde 2017  
**Autor de correspondencia:** Si  
**Ciudad de celebración:** A Coruña, Galicia, España  
**Fecha de celebración:** 30/05/2017  
**Fecha de finalización:** 30/05/2017  
**Entidad organizadora:** FUNDACION PROFESOR NOVOA SANTOS, Fundación Biomédica Galicia Sur y Fundación Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela  
Bárbara M Varela Rodríguez; Paula Juiz Valiña; Fernando Cordido; Susana Sangiao Alvarellos.
- 10** **Título del trabajo:** Circulating levels of irisin in hypopituitary and normal subjects.  
**Nombre del congreso:** Biointegrasaúde 2017  
**Autor de correspondencia:** No  
**Ciudad de celebración:** A Coruña, Galicia, España  
**Fecha de celebración:** 30/05/2017  
**Fecha de finalización:** 30/05/2017  
**Entidad organizadora:** FUNDACION PROFESOR NOVOA SANTOS, Fundación Biomédica Galicia Sur y Fundación Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela  
Lara Pena Bello; Sonia Pérttega Díaz; Susana Sangiao Alvarellos; Elena Outeriño Blanco; Raquel Eiras Leal; Bárbara Varela Rodríguez; Paula Juiz Valiña; Miguel Pérez Fontán; María Cordido; Fernando Cordido.
- 11** **Título del trabajo:** La expresión génica de FNDC5 en distintos tejidos, y los niveles circulantes de irisina, están modificados por la dieta y las condiciones hormonales  
**Nombre del congreso:** 58 Congreso Nacional de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición  
**Ciudad de celebración:** Málaga, Andalucía, España  
**Fecha de celebración:** 19/10/2016  
**Fecha de finalización:** 21/10/2016  
**Entidad organizadora:** Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición (SEEN) **Tipo de entidad:** Instituciones Sanitarias  
Fernando Cordido; Bárbara M Varela Rodríguez; Paula Juiz Valiña; Lara Pena Bello; Susana Sangiao Alvarellos.
- 12** **Título del trabajo:** Diet and hormones alter FNDC5 expression in different tissues and irisin serum levels  
**Nombre del congreso:** I "Julio Palacios International Symposium"  
**Autor de correspondencia:** Si  
**Ciudad de celebración:** A Coruña, Galicia, España  
**Fecha de celebración:** 20/07/2016  
**Fecha de finalización:** 22/07/2016  
**Entidad organizadora:** Universidad de A Coruña y Centro Superior de Investigaciones Científicas

**Ciudad entidad organizadora:** España

Bárbara María Varela Rodríguez; Lara Pena Bello; Paula Juiz Valiña; Fernando Cordido Carballido; Susana Sangiao Alvarellos.

- 13 Título del trabajo:** Diet and hormones alter FNDC5 expression in different tissues and irisin serum levels  
**Nombre del congreso:** BiointegraSaúde 2016  
**Autor de correspondencia:** No  
**Ciudad de celebración:** Santiago de Compostela, Galicia, España  
**Fecha de celebración:** 12/05/2016  
**Entidad organizadora:** Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela  
**Ciudad entidad organizadora:** Santiago de Compostela, Galicia, España  
Bárbara María Varela Rodríguez; Lara Pena Bello; Paula Juiz Valiña; Fernando Cordido Carballido; Susana Sangiao Alvarellos.
- 14 Título del trabajo:** High sucrose diet enhances liver lipid biosynthesis in a prediabetic rat model, without inducing changes in adipose tissue lipolysis  
**Nombre del congreso:** XLVI Annual Meeting of Portuguese Pharmacology Society  
**Autor de correspondencia:** No  
**Ciudad de celebración:** Porto, Norte, Portugal  
**Fecha de celebración:** 04/02/2016  
**Fecha de finalización:** 06/02/2016  
**Entidad organizadora:** Portuguese Pharmacology Society  
**Ciudad entidad organizadora:** Portugal  
Ana Caldeira Burgeiro; Manuela Cerqueira; Bárbara María Varela Rodríguez; S Nunes; Eugenia Carvalho; FC Pereira; F Reis.
- 15 Título del trabajo:** Hypertriglyceridemia induced by high sucrose diet is due to an increased liver lipid biosynthesis, in a prediabetic rat model  
**Nombre del congreso:** VI REUNIÓN DE JÓVENES INVESTIGADORES EN EL EXTRANJERO 2015  
**Autor de correspondencia:** No  
**Ciudad de celebración:** A Coruña, Galicia, España  
**Fecha de celebración:** 29/12/2015  
**Fecha de finalización:** 29/03/2016  
**Entidad organizadora:** Fundación Barrié **Tipo de entidad:** Fundación  
**Ciudad entidad organizadora:** A Coruña, Galicia, España  
Ana Caldeira Burgeiro; Manuela Cerqueira; Bárbara María Varela Rodríguez; S Nunes; FC Pereira; F Reis.
- 16 Título del trabajo:** Prediabetes induces hypertriglyceridemia by enhancing liver lipid biosynthesis in a rat model  
**Nombre del congreso:** XIII CNC Annual Meeting  
**Autor de correspondencia:** No  
**Ciudad de celebración:** Coimbra, Centro (P), Portugal  
**Fecha de celebración:** 17/12/2015  
**Fecha de finalización:** 18/12/2015  
**Entidad organizadora:** Center for Neurosciences and Cell Biology **Tipo de entidad:** Instituto Universitario de Investigación  
**Ciudad entidad organizadora:** Coimbra, Centro (P), Portugal  
Burgeiro A; Cerqueira M; Bárbara María Varela Rodríguez; Nunes S; Pereira FC; Reis F; Carvalho E.
- 17 Título del trabajo:** High sucrose diet increases liver lipid biosynthesis in the rat, without inducing changes in adipose tissue lipolysis, triggering hypertriglyceridemia  
**Nombre del congreso:** VII Annual Meeting of IBILI

**Autor de correspondencia:** No  
**Ciudad de celebración:** Coimbra, Centro (P), Portugal  
**Fecha de celebración:** 02/12/2015  
**Fecha de finalización:** 04/12/2015  
**Entidad organizadora:** Instituto Biomédico de Investigación de Luz e Imagem  
**Tipo de entidad:** Instituto Universitario de Investigación  
**Ciudad entidad organizadora:** Coimbra, Centro (P), Portugal  
Burgeiro A; Cerqueira M; Bárbara María Varela Rodríguez; Nunes S; Pereira FC; Reis F; Carvalho E.

- 18** **Título del trabajo:** Efectos de la Dieta y Hormonas en la Expresión de TLR2 y TLR4  
**Nombre del congreso:** III Jornadas de Investigación: BiointegraSaúde 2015  
**Autor de correspondencia:** Si  
**Ciudad de celebración:** Vigo, Galicia, España  
**Fecha de celebración:** 16/06/2015  
**Fecha de finalización:** 16/06/2015  
**Entidad organizadora:** FUNDACION BIOMEDICA DEL COMPLEJO HOSPITALARIO UNIVERSITARIO DE VIGO  
**Ciudad entidad organizadora:** Vigo, Galicia, España  
Bárbara María Varela Rodríguez; Esperanza Fonseca Luciano; Fernando Cordido; Susana Sangiao Alvarellos. "Efectos de la Dieta y Hormonas en la Expresión de TLR2 y TLR4".
- 19** **Título del trabajo:** Análisis de la expresión de GFP con diferentes 3'-UTR en un mutante nup84 del NPC  
**Nombre del congreso:** XXXVII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular  
**Ciudad de celebración:** Granada, Andalucía, España  
**Fecha de celebración:** 09/09/2014  
**Fecha de finalización:** 12/09/2014  
**Entidad organizadora:** Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular  
**Tipo de entidad:** Asociaciones y Agrupaciones  
**Ciudad entidad organizadora:** Madrid, Comunidad de Madrid, España  
Bárbara María Varela Rodríguez; Tania Álvarez Felgar; M<sup>a</sup> de los Ángeles Freire Picos; Ana María Rodríguez Torres.
- 20** **Título del trabajo:** Expresión de genes recombinantes con procesamiento alternativo en mutantes del complejo Nup84 de levaduras  
**Nombre del congreso:** XXXVI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular  
**Ciudad de celebración:** Madrid, Comunidad de Madrid, España  
**Fecha de celebración:** 03/09/2013  
**Fecha de finalización:** 06/09/2013  
**Entidad organizadora:** Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular  
**Tipo de entidad:** Asociaciones y Agrupaciones  
**Ciudad entidad organizadora:** Madrid, Comunidad de Madrid, España  
Bárbara M<sup>a</sup> Varela Rodríguez; M<sup>a</sup> de los Ángeles Freire Picos; Ana María Rodríguez Torres; Tania Álvarez Felgar; Rosa García Díaz.
- 21** **Título del trabajo:** Variaciones en la expresión de genes con procesamiento alternativo en mutantes del poro nuclear  
**Nombre del congreso:** XXXVI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular  
**Ciudad de celebración:** Madrid, Comunidad de Madrid, España  
**Fecha de celebración:** 03/09/2013  
**Fecha de finalización:** 06/09/2013  
**Entidad organizadora:** Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular  
**Tipo de entidad:** Asociaciones y Agrupaciones

**Ciudad entidad organizadora:** Madrid, Comunidad de Madrid, España  
Tania Álvarez Felgar; Bárbara Mª Varela Rodríguez; Ana María Rodríguez Torres; Mª de los Ángeles Freire Picos.

### Otras actividades de divulgación

**Título del trabajo:** Participación en el programa Somos Científicos Sácanos de aquí  
**Nombre del evento:** Somos Científicos Sácanos de Aquí  
**Tipo de evento:** Programa de divulgación de ciencia a alumnos de secundaria y bachillerato  
**Autor de correspondencia:** Si  
**Ciudad de celebración:** España  
**Fecha de celebración:** 11/04/2016  
**Entidad organizadora:** SEBBM con la Colaboración de A Caixa  
**Ciudad entidad organizadora:** España  
Bárbara María Varela Rodríguez.

### Otros méritos

#### Estancias en centros de I+D+i públicos o privados

**Entidad de realización:** CNC (Center for Neurosciences and Cell Biology)      **Tipo de entidad:** Centros y Estructuras Universitarias y Asimilados  
**Facultad, instituto, centro:** University of Coimbra  
**Ciudad entidad realización:** Coimbra, Centro (P), Portugal  
**Fecha de inicio-fin:** 01/09/2015 - 31/12/2015      **Duración:** 4 meses  
**Objetivos de la estancia:** Doctorado/a

#### Ayudas y becas obtenidas

**Nombre de la ayuda:** Albert Renold Fellowship  
**Finalidad:** Predoctoral  
**Entidad concesionaria:** EASD  
**Fecha de concesión:** 02/06/2015  
**Fecha de finalización:** 31/12/2015  
**Entidad de realización:** CNC (Center for Neuroscience and Cell Biology)

