



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

INVESTIGACIÓN CLÍNICA EXPERIMENTAL EN SALUD – BIOQUÍMICA CLÍNICA

PERFIL DE microRNAs CIRCULANTES EN INDIVIDUOS CON
SÍNDROME METABÓLICO.

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

MARISOL ADELINA RAMÍREZ SOLANO

TUTOR PRINCIPAL

MARÍA ELIZABETH TEJERO BARRERA

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

CIUDAD DE MÉXICO. SEPTIEMBRE DEL 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Armando Roberto Tovar Palacio

Secretario: Dra. Lorena Sofía Orozco Orozco

Vocal: Dra. María Elizabeth Tejero Barrera

1er. Suplente: Dr. Joselín Hernández Ruíz

2do. Suplente: Dr. Fausto Sánchez Muñoz

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

TUTOR DE TESIS

María Elizabeth Tejero Barrera

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis va dedicada a mis padres, Alfonso Ramírez y María Guadalupe Solano. Así mismo agradezco a todas las personas que contribuyeron a la realización de esta tesis, particularmente a la Dra. Elizabeth Tejero por su apoyo durante estos años.

ABREVIATURAS

3' UTR	<i>3' untranslated region</i>
AACE	<i>American Association of Clinical Endocrinology</i>
AdipoR	Receptor de adiponectina
AGO2	Argonauta 2
Akt	<i>Protein kinase B alpha</i>
AGL	Ácidos grasos libres
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
ATP III	<i>Adult Treatment Panel III</i>
cDNA	DNA complementario
EC	Enfermedad cardiovascular
EGIR	<i>European Group for the Study of Insulin Resistance</i>
ENSANUT	Encuesta nacional de salud y nutrición
DAG	Diacylglicerol
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region gene</i>
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FOXO	<i>Forkhead box</i>
GLUT4	Transportador de glucosa 4
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HTA	Hipertensión arterial
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IL-12	Interleucina 12
IL-18	Interleucina 18
INMEGEN	Instituto Nacional de Medicina Genómica
IRS	<i>Insulin receptor substrate</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
IMC	Índice de masa corporal
LDL	Lipoproteína de alta densidad
LPL	Lipoprotein lipasa
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCP1	<i>Macrophages and monocyte chemoattractant protein 1</i>
miR	microRNA

miRISC	<i>miRNA-induced silencing complex</i>
miRNA	microRNA
mRNA	RNA mensajero
mTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin</i>
NCEP	<i>National Cholesterol Education Program</i>
NF κ B	<i>Nuclear factor κB</i>
NLPR3	<i>NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3</i>
NOS	Óxido nítrico sintasa
OMS	Organización mundial de la salud
ON	Óxido nítrico
PAI-1	<i>Plasmonogen activator inhibitor 1</i>
PI3-K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PCR	Proteína C reactiva
PLIN	Perilipina
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
Pre-miRNA	Precursor de microRNA
Pri-miRNA	microRNA primario
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RE	Retículo endoplásmico
RI	Resistencia a la insulina
RLC	<i>RISC loading complex</i>
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT	Transcripción reversa
SM	Síndrome metabólico
SOCS	<i>Supresor of cytokine sigaling</i>
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
TA	Tejido adiposo
TG	Triglicéridos
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF α	Factor de necrosis tumoral α
UPR	Respuesta a proteínas desplegadas
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios diagnósticos de acuerdo a la OMS	1
Tabla 2. Criterios diagnósticos de acuerdo a EGIR	2
Tabla 3. Criterios diagnósticos de acuerdo a NCEP-ATP III	2
Tabla 4. Criterios diagnósticos de acuerdo a AACE	3
Tabla 5. Criterios diagnósticos de acuerdo a IDF	3
Tabla 6. Criterio diagnóstico de obesidad abdominal según grupo étnico de acuerdo a la IDF	4
Tabla 7. Prevalencia del SM alrededor del mundo	19
Tabla 8. Algunos estudios del perfil de expresión de miRNAs extracelulares en enfermedades metabólicas	28
Tabla 9. Reactivos para poliadenilación de miRNAs	40
Tabla 10. Reactivos para hibridación	41
Tabla 11. Protocolo de Fluidics Station 450	42
Tabla 12. Reactivos para transcripción reversa	43
Tabla 13. Programa de transcripción reversa	43
Tabla 14. Reactivos para qPCR de miRNAs	43
Tabla 15. Programa para qPCR	43
Tabla 16. Características de la población. Grupo de descubrimiento	47
Tabla 17. Características de la población. Grupo de validación	48
Tabla 18. miRNAs diferencialmente expresados	53
Tabla 19. Genes blanco validados experimentalmente	54
Tabla 20. Genes blanco predichos	55
Tabla 21. Análisis de enriquecimiento de vías metabólicas	56
Tabla 22. Correlación de Spearman entre expresión de miRNAs y fenotipos del SM	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etiología del SM	5
Figura 2. El tejido adiposo como órgano endócrino	10
Figura 3. Formación de miRISC en células animales	23
Figura 4. Biogénesis y mecanismo de acción de los miRNAs	24
Figura 5. Los miRNAs circulantes	27
Figura 6. Comparación de métodos comunes para cuantificación de expresión de miRNAs	30
Figura 7. Procesamiento de microarreglos GeneChip miRNA 3.0	32
Figura 8. Transcripción reversa de miRNAs utilizando Taqman	33
Figura 9. qPCR de miRNAs utilizando Taqman	33
Figura 10. Transcripción reversa de miRNAs utilizando SYBR Green	34
Figura 11. Transcripción reversa y qPCR utilizando el sistema SYBR Green y LNAs	35
Figura 12. Histograma de datos crudos	49
Figura 13. Gráfico de cajas y bigotes de datos crudos	49
Figura 14. Histograma de datos procesados con el algoritmo RMA	50
Figura 15. Gráfico de cajas y bigotes de datos procesados con el algoritmo RMA	50
Figura 16. Gráfico de pastel de RNAs diferencialmente expresados	51
Figura 17. Mapa de calor de los RNAs diferencialmente expresados	52
Figura 18. Expresión relativa de miRNAs por qPCR	58
Figura 19. Gráficos de dispersión de correlación de Spearman	60
Figura 20. Mapa de rutas metabólicas	69

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN

1.1	Síndrome metabólico	1
1.1.1	Definición del SM	1
1.1.2	Fisiopatología del SM	4
1.1.2.1	Obesidad y el desarrollo de resistencia a la insulina	5
1.1.2.2	El estrés en el retículo endoplásmico	6
1.1.2.3	El estrés oxidativo mitocondrial	7
1.1.2.4	Los ácidos grasos libres, la resistencia a la insulina y la inflamación	7
1.1.2.5	El tejido adiposo como órgano endocrino	9
1.1.2.6	Otros factores que contribuyen al desarrollo del SM	17
1.1.3	El SM como pandemia mundial	19
1.2	microRNAs	20
1.2.1	Organización genómica	21
1.2.2	Biogénesis de miRNAs	21
1.2.3	Vía no canónica: mirtrons	23
1.2.4	Mecanismo de acción	25
1.2.5	miRNAs extracelulares	26
1.2.6	miRNAs extracelulares en enfermedades metabólicas	27
1.2.7	Tecnologías para el estudio de miRNAs	29
1.2.7.1	Microarreglos de expresión	30
1.2.7.2	qPCR	32
2.	JUSTIFICACIÓN	36
3.	HIPOTESIS	36
4.	OBJETIVOS	37
4.1	General	37
4.2	Específicos	37
5.	METODOLOGÍA	37
5.1	Características del estudio	38
5.2	Criterios de selección	38
5.2.1	Criterios de inclusión	38
5.2.2	Criterios de exclusión	38
5.2.3	Criterios de eliminación	38
5.3	Variables analizadas	39
5.4	Obtención del perfil de expresión diferencial de miRNAs circulantes en SM	39
5.4.1	Separación de plasma	39
5.4.2	Extracción de RNA total	39
5.4.3	Protocolo para microarreglos de expresión	40
5.4.4	Transcripción reversa	42
5.4.5	qPCR	43
5.5	Plan de análisis	44
5.5.1	Análisis estadístico de las variables bioquímicas	44
5.5.2	Análisis de microarreglos de expresión	44
5.5.3	Búsqueda de genes blanco	45

5.6	Análisis de enriquecimiento de miRNAs asociados a rutas Metabólicas	45
5.7	Análisis de expresión de miRNAs por qPCR	46
6.	RESULTADOS	47
6.1	Muestras de estudio	47
6.1.1	Grupo de descubrimiento	47
6.1.2	Grupo de validación	47
6.2	Análisis d microarreglos de expresión	48
6.2.1	Control de calidad y pre-procesamiento de los datos de los microarreglos	48
6.2.2	Análisis de expresión diferencial	51
6.3	Genes blanco validados	53
6.4	Genes blanco predichos	54
6.5	Análisis de enriquecimiento de vías metabólicas	56
6.6	miRNAs elegidos para validación	56
6.7	Resultados de validación por qPCR	57
6.8	Asociación de la expresión de miRNAs y fenotipos del SM	59
7.	DISCUSIÓN	62
7.1	Expresión diferencial evaluada por microarreglos	62
7.2	Validación de miRNAs por qPCR	64
7.3	Genes blanco validados	64
7.4	Genes blanco predichos	66
7.5	Rutas metabólicas	68
7.6	Asociación de miRNAs con parámetros del SM	69
8.	CONCLUSIONES	70
9.	PERSPECTIVAS	71
	BIBLIOGRAFÍA	72
	APÉNDICE I	92
	APÉNDICE II	94

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Síndrome metabólico

El síndrome metabólico (SM) es una condición compleja con etiología multifactorial, se define como el agrupamiento de alteraciones metabólicas que confieren al individuo aumento de riesgo de enfermedad cardiovascular y/o diabetes mellitus tipo 2 (DM2)¹.

Hace casi un siglo diversos autores ya habían descrito la agrupación de diferentes enfermedades metabólicas. Sin embargo, fue hasta 1988 cuando este agrupamiento fue llamado por primera vez “síndrome X” por Gerald Reaven. Sus componentes originales eran resistencia a la captación de glucosa mediada por la insulina, intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia, aumento de triglicéridos (TG) y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), disminución de lipoproteínas de alta densidad (HDL) e hipertensión arterial (HTA)^{2,3}.

1.1.1 Definición del SM

La Organización Mundial de la Salud (OMS) fue la primera organización que propuso una definición y criterios para el diagnóstico del SM⁴ (Tabla 1).

Tabla 1. Criterios diagnósticos de acuerdo a la OMS

Resistencia a la insulina o glucemia basal alterada, intolerancia a la glucosa o DM2 mas dos de los siguientes criterios	
Obesidad	IMC \geq 30kg/m ² Índice cintura cadera en hombres $>$ 0.9 Índice cintura cadera en mujeres $>$ 0.8
Dislipidemia	TG \geq 150 mg/dl y/o HDL $<$ 35 mg/dl
HTA	\geq 140/90 mmHg o tratamiento farmacológico
Microalbuminuria	Excreción \geq 20 ug/min o Relación albúmina/creatinina $>$ 30mg/g

Posteriormente, el *European Group for the Study of Insulin Resistance* (EGIR) modificó los criterios de la OMS y sustituyó la microalbuminuria por la determinación de glucosa en ayuno (Tabla 2)⁵.

Tabla 2. Criterios diagnósticos del SM de acuerdo a EGIR

Resistencia a la insulina* más dos de los siguientes criterios	
Obesidad central	Hombres \geq 94 cm Mujeres \geq 80 cm
Dislipidemia	TG $>$ 180 mg/dl y/o HDL $<$ 40 mg/dl o tratamiento por dislipidemia
HTA	Presión arterial \geq 140/90 mmHg o tratamiento farmacológico
Glucosa en ayuno	\geq 110 mg/dl

* Insulina basal $>$ percentil 75 de la población no diabética

En el año 2002 el *National Cholesterol Education Program* (NCEP) presentó el *Adult Treatment Panel* (ATPIII) con criterios nuevos para el diagnóstico del SM. Este panel es parte de un programa educativo para la prevención de enfermedades coronarias y a diferencia de los criterios de la OMS, no considera la alteración de metabolismo de glucosa como un criterio indispensable. A esta definición se agregó el estado proinflamatorio, caracterizado por elevación de proteína C reactiva (PCR) y estado protrombótico, caracterizado por incremento de niveles de inhibidor del activador de plasminógeno 1 (PAI-1) y fibrinógeno⁶ (Tabla 3).

Tabla 3. Criterios diagnósticos de SM propuestos por NCEP-ATPIII

Factor de riesgo	Valor Límite
Obesidad abdominal	Circunferencia de cintura
Hombres	$>$ 102 cm
Mujeres	$>$ 88 cm
TG	\geq 150 mg/dl
HDL	
Hombres	$<$ 40 mg/dl
Mujeres	$<$ 50mg/dl
Presión arterial	\geq 130/85 mmHg
Glucosa en ayuno	\geq 110 mg/dl

Más tarde, en el año 2003 la *American Association of Clinical Endocrinology* (AACE) publicó sus criterios diagnósticos del SM, en esta publicación se proponen también algunas modificaciones a los criterios NCEP-ATPIII⁷ (Tabla 4).

Tabla 4. Criterios diagnósticos del SM propuestos por la AACE

Presencia de al menos uno de los siguientes factores de riesgo	
Diagnóstico de EC, HTA, síndrome de ovario poliquístico, esteatosis hepática no alcohólica o acantosis nigricans	
Historia familiar de DM2, HTA o EC	
Historia de diabetes gestacional o intolerancia a la glucosa	
Raza no caucásica	
Estilo de vida sedentario	
IMC > 25 kg/m ²	
Edad > 40 años	
Mas dos o más de los siguientes criterios	
TG > 150 mg/dl	
HDL < 40 mg/dl (hombres) o < 50 mg/dl (mujeres)	
Presión arterial > 130/85 mmHg o tratamiento farmacológico	
Glucosa en ayuno 110-125 mg/dl o glucosa 2 horas después de sobrecarga oral 140-200 mg/dl	

Con el fin de realizar comparaciones entre diferentes poblaciones, la *International Diabetes Federation* (IDF) publicó un conjunto de criterios para el diagnóstico de SM, haciendo énfasis en la circunferencia de cintura según el grupo étnico⁸ (Tabla 5 y 6).

Tabla 5. Criterios diagnósticos del SM propuestos por la IDF

Obesidad central: incremento de circunferencia de cintura según grupo étnico más dos de los siguientes criterios o IMC > 30 kg/m ²	
Hipertrigliceridemia	Triglicéridos > 150 mg/dl o tratamiento
HDL	Hombres < 40 mg/dl o bajo tratamiento Mujeres < 50 mg/dl o bajo tratamiento
HTA	Presión arterial sistólica ≥ 130 mHg y/o presión arterial diastólica ≥ 85mmHg o tratamiento farmacológico
Alteración del metabolismo de glucosa	Glucosa en ayuno ≥ 100 mg/dl o DM2 previamente diagnosticada

Tabla 6. Criterio diagnóstico de obesidad abdominal según grupo étnico de acuerdo a la IDF.

Grupo étnico	Circunferencia de cintura
Europeos	Hombres \geq 94 cm Mujeres \geq 80 cm
Sur de Asia	Hombres \geq 90 cm Mujeres \geq 80 cm
China	Hombres \geq 90 cm Mujeres \geq 80 cm
Japón	Hombres \geq 85 cm Mujeres \geq 90 cm
Sudamerica y centroamerica	Criterios para el sur de Asia
África	Criterios para Europeos
Europa central y mediterraneo	Criterios para Europeos

1.1.2 Fisiopatología del SM

El SM parece tener tres potenciales etiologías: obesidad y desordenes en el tejido adiposo (TA), resistencia a la insulina (RI) y diversos factores independientes, como factores vasculares, hepáticos o inmunológicos. Otros factores como la edad, el estado proinflamatorio o cambios hormonales también han sido implicados⁹ (Figura 1).

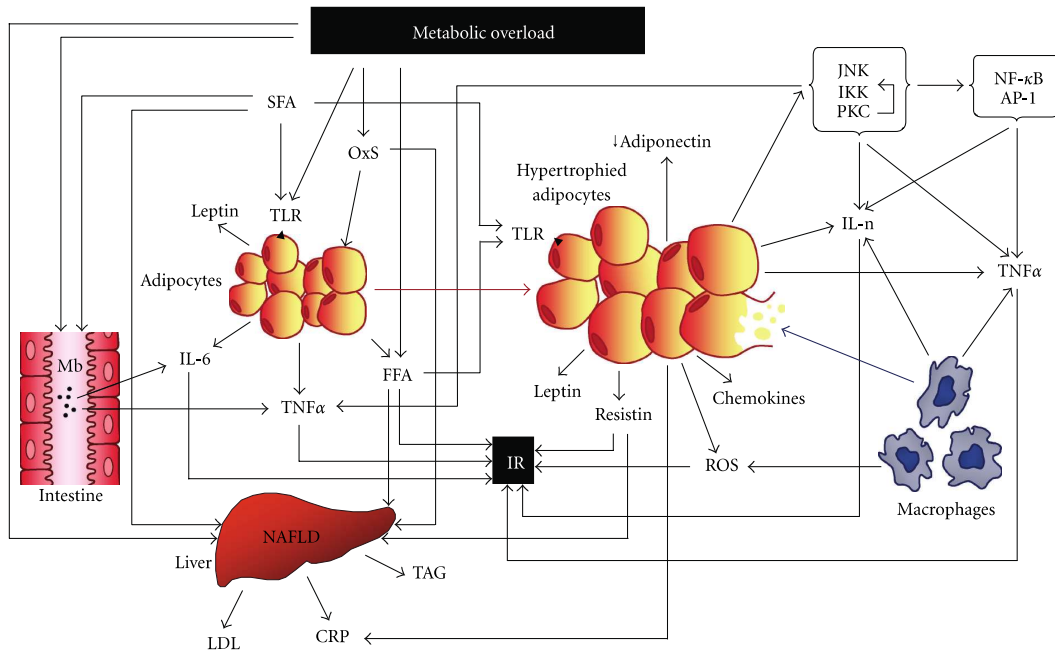


Figura 1. Etiología del SM. La sobrecarga de nutrientes afecta al TA causando estrés en los organelos y aumento de la producción de ROS y adipocinas, así como la activación de la transcripción de genes proinflamatorios que interfieren con la vía de señalización de insulina y disminuye la producción de moléculas antiinflamatorias como adiponectina. La hipertrofia del adipocito facilita la ruptura de este, que conlleva a la activación de macrófagos, los cuales exacerbaban la producción de ROS y citocinas proinflamatorias. El exceso de AGL provenientes de la alimentación y del TA se acumulan en órganos como el hígado, provocando el aumento de la producción de VLDL/LDL, IL-6 y PCR. Los ácidos grasos saturados activan a los TLRs en los adipocitos promoviendo la respuesta inflamatoria¹⁰.

1.1.2.1 Obesidad y el desarrollo de resistencia a la insulina

La etiología de la obesidad es multifactorial e incluye desde factores genéticos a factores ambientales. Sin embargo, la principal causa de obesidad es el desequilibrio entre la ingestión de alimento y el gasto energético. Este desequilibrio provoca un aumento en el almacenamiento de energía en forma de TG en el TA, que se manifiesta con un aumento en el tamaño del adipocito (hipertrofia) y aumento en el número de estos (hiperplasia). El hígado aumenta la producción de lipoproteínas que contienen partículas de apo-B (VLDL y LDL) que transportan TG al TA, éste mantiene la

conversión de estas partículas a unas de más alta densidad, extrayendo los TG por medio de la enzima lipoprotein lipasa (LPL).

Cuando la capacidad de almacenaje del adipocito es sobrepasada, la conversión de VLDLs y partículas similares es retardada y se manifiesta como el aumento de partículas cargadas de TG en la circulación típico del SM¹¹. El exceso de almacenamiento de lípidos provoca disfunción celular en el adipocito, principalmente en el retículo endoplásmico (RE) y la mitocondria, y la liberación de productos como ácidos grasos libres (AGL), citocinas, PAI-1 y hormonas como adiponectina y leptina, los cuales participan en el desarrollo de resistencia a la insulina (RI).

La resistencia a la insulina es una condición donde la captación de glucosa mediada por la insulina se ve deteriorada en los tejidos sensibles a esta, conduce al desarrollo de hiperinsulinemia cuando las células β pancreáticas producen grandes cantidades de insulina para controlar los niveles de glucosa sanguínea¹². En condiciones fisiológicas, la insulina activa la captación de glucosa estimulando a la vía IRS/PI3-K/Akt y promoviendo la traslocación del transportador de glucosa 4 (GLUT 4) a la membrana plasmática, facilitando la recepción de glucosa por la célula.

Otros órganos como corazón, músculo, páncreas, e hígado son utilizados para el almacenaje del exceso de lípidos. Como estos órganos no son capaces de almacenar lípidos sin dañar sus funciones se provoca lipotoxicidad y se presentan alteraciones como resistencia a la insulina en músculo, disfunción de células β pancreáticas y esteatohepatitis¹⁰.

1.1.2.2 *El estrés del retículo endoplásmico*

El retículo endoplásmico (RE) es responsable de la síntesis y plegamiento de proteínas, almacenamiento de calcio, formación de gotas lipídicas y es sensor y regulador del colesterol, todas estas funciones son dependientes del suministro de nutrientes en coordinación con el estado fisiológico de la célula. Cuando la homeostasis del RE se ve afectada debido al desbalance energético, la capacidad del RE de plegamiento de proteínas falla, así como la formación de gotas lipídicas. Esta condición se conoce como estrés del RE. Ante la aparición de estrés del RE, el mecanismo de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) es activado para restablecer el correcto funcionamiento del RE^{13,14}. El mecanismo UPR funciona por medio de proteínas sensoras a estrés que se encuentran en la membrana del RE, estas son *PKR-like eukaryotic initiation factor 2a kinase* (PERK), *inositol-requiring enzyme-1* (IRE-1) y *activating transcription factor-6*

(ATF-6). La activación de estas proteínas atenúa la carga de trabajo celular e induce la reparación y biogénesis del RE. Sin embargo, cuando la homeostasis no es restablecida después de un periodo de tiempo largo, el mecanismo UPR promueve el inicio de la vía de muerte celular. IRE-1 juega un papel importante en estos mecanismos, activando a *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) y a la vía IKK-NF- κ B, lo que induce a la producción elevada de factor de necrosis tumoral α (TNF α), e interleucina 6 (IL-6)^{15,16}.

1.1.2.3 *El estrés oxidativo mitocondrial*

En condiciones fisiológicas, los AGL son rápidamente oxidados por la mitocondria con baja producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), baja acumulación de lípidos intracelulares y preservación de la sensibilidad a la insulina¹⁷. El exceso de acumulación de lípidos esta asociado a estrés oxidativo, que puede ser definido como el desbalance de la producción de ROS y la reducción de las sustancias protectoras ante el daño causado por radicales libres y peróxidos. El procesamiento del exceso de lípidos por la mitocondria causa el desacoplamiento de esta y liberación de ROS. Cuando el metabolismo de glucosa esta comprometido por la RI, la hiperglucemia aumenta la producción mitocondrial de ROS, exacerbando el estrés oxidativo¹⁸. Este activa quinasas como JNK, *p38 mitogen-activated protein kinases* (p38/MAPK) e *inhibitor of κ B kinase* (IKK) que pueden interferir directamente con la vía de señalización de insulina o de manera indirecta, por medio de la activación de *nuclear factor κ B* (NF- κ B) y la producción de citocinas proinflamatorias^{10,19}.

1.1.2.4 *Los ácidos grasos libres, la resistencia a la insulina y la inflamación*

El aumento de AGL circulantes refleja la incapacidad del TA de responder al sobrecargo de nutrientes y está relacionado con el estado dislipidémico típico del SM. Los adipocitos hipertrofiados liberan más AGL y su aclaramiento se ve reducido. Más aún, la elevación de AGL en el plasma, especialmente ácidos grasos saturados de cadena larga, como los ácidos palmítico y esteárico causan inhibición de la acción antilipolítica de la insulina, lo cual aumenta aún más la liberación de AGL a la circulación. Los AGL plasmáticos pueden entrar fácilmente a las células donde pueden ser oxidados para la producción de ATP, o pueden ser reesterificados para su almacenaje como TG. El exceso de AGL conlleva a acumulación de TG y aumento de metabolitos que participan

en su reesterificación, incluyendo acil-coenzima A de cadena larga, ácido fosfatídico, monoacilglicerol, ceramidas y diacilglicerol (DAG) en tejidos como hígado, músculo y páncreas. De estos derivados de ácidos grasos, niveles altos de DAG, TG y ceramidas están directamente asociados al desarrollo de resistencia a la insulina²⁰.

La elevación de AGL y DAG puede interrumpir la captación de glucosa mediada por *insulin receptor substrate 1* (IRS-1) asociado a *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3-K). Cuando aumentan los niveles de DAG, la *protein kinase C* (PKC) θ aumenta la fosforilación en la Serina 307 de IRS-1, que a su vez causa una disminución en la fosforilación de los residuos de Tirosina de este y reducción en la activación de IRS-1 asociado a PI3-K, resultando en el descenso del transporte de glucosa y contribuyendo a la resistencia a la insulina^{21,22}.

Uno de los metabolitos principales de PI3-K es *phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate* (PIP3), que estimula la activación de otras cinasas de unión a lípidos, entre ellas *protein kinase B alpha* (Akt/PKB-2), *protein kinase C* (PKC) α y *3-phosphoinositide-dependent protein kinase* (PDK). Akt/PKB-2 y PKC α han sido relacionadas con el transportador de ácidos grasos CD36, que es activado y traslocado permanentemente a la membrana plasmática, promoviendo la captación de AGL por la célula²³.

Debido a que la vía IRS-1/PI3-K se encuentra afectada, la vía MAP cinasa es excesivamente estimulada causando proliferación de músculo liso vascular, aumento de la formación de colágeno y producción de factores de crecimiento y citocinas inflamatorias. Aunado a esto, la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), que es también activada por la vía IRS-1/PI3-K y la producción de óxido nítrico (ON) también se ven comprometidas. La falla de ambos mecanismos resulta en disfunción endotelial y favorece el proceso aterosclerótico²⁴. El ON es un gas relativamente estable que tiene funciones reguladoras en diversas funciones fisiológicas. Es sintetizado por las células vasculares endoteliales, es responsable de la vasodilatación y en varios procesos de los sistemas nervioso, reproductivo e inmune²⁵. Además de disminuir el tono vascular, reduce la expresión de moléculas de adhesión vascular, inhibe la proliferación de células vasculares endoteliales, atenúa la producción de citocinas proinflamatorias, combate la apoptosis, evita la agregación de plaquetas y reduce la adhesión de monocitos y neutrófilos a la pared vascular²⁶.

Recientemente se ha identificado a los *Toll-like receptors* (TLRs) como moléculas importantes en el desarrollo de la resistencia a la insulina. Los TLRs son una familia de receptores transmembranales que conforma una de las barreras de protección ante

agentes microbianos del sistema inmune innato. Se ha demostrado que los AGL, específicamente los saturados pueden activar a estos receptores, en especial a TLR-4 y TLR-2 en células musculares, adipocitos y macrófagos. TLR4 activa a *myeloid differentiation primary response gene 88* (MyD88), que a su vez activa a *mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 7* (MAP3K7) resultando en el aumento de la actividad de IKK y JNK. IKK degrada a inhibidor of κ B ($I\kappa B\alpha$), liberando a NF κ B que migra al núcleo donde promueve la transcripción de genes proinflamatorios como interleucina 1 β (IL-1 β), IL-6 y TNF α . JNK activa la familia *signal transducers and activators of transcription* (STAT), que están involucrados en diversos procesos biológicos como expresión de genes relacionados a inflamación, apoptosis, diferenciación, crecimiento, morfogénesis, migración y proliferación celular. La activación de NF κ B por los TLRs también puede activar a *NADPH Oxidase 1* (NOX1), produciendo la activación de la vía de señalización de ROS^{27,28}.

La principal fuente de citocinas inflamatorias en la obesidad es el tejido adiposo, que son producidas principalmente por infiltración de macrófagos y otras células inmunológicas que rodean a los adipocitos en vías de muerte celular. Específicamente, los macrófagos M1 secretan citocinas proinflamatorias como TNF α , IL-1 β e IL-6, que juegan un papel clave en la apoptosis, el desarrollo del sistema inmune, metabolismo de lípidos y la transición de la inflamación aguda a la inflamación crónica características de las enfermedades metabólicas²⁹.

1.1.2.5 El tejido adiposo como órgano endocrino

El TA es el órgano endocrino más grande y está compuesto por diversos tipos celulares, como adipocitos, células endoteliales, células nerviosas, células inmunológicas especialmente macrófagos, linfocitos T y B, células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos, fibroblastos, precursores de adipocitos no diferenciados, etc. Produce una gran variedad de compuestos pro y antiinflamatorios, llamados adipocinas, que incluyen a la leptina, resistina, adiponectina, adipolina, omentina, visfatina, TNF α , IL-6, *pigment epithelium-derived factor* (PEDF), progranulina, entre otros³⁰.

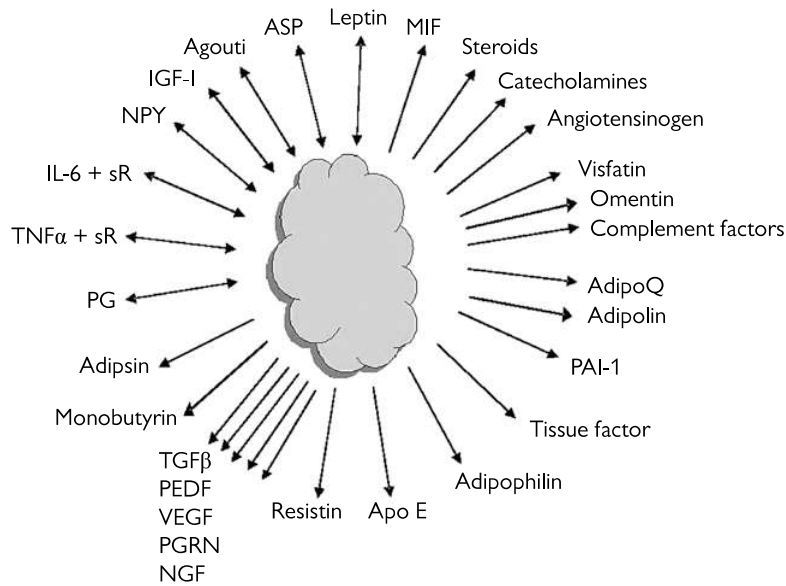


Figura 2. El tejido adiposo es un órgano endócrino que participa en la regulación del metabolismo de glucosa y lípidos, homeostasis energética, respuesta pro y antiinflamatoria y permite al organismo adaptarse a cambios metabólicos como inanición, estrés, infección y periodos de exceso de energía³⁰.

El TA visceral está fuertemente asociado a enfermedades metabólicas. Tiene un perfil de expresión y secreción de adipocinas particular, produce una mayor cantidad de citocinas proinflamatorias como IL-6, PAI-1 y angiotensinogeno, mientras que el TA subcutáneo secreta una mayor cantidad de leptina y adiponectina. El TA visceral está compuesto por adipocitos de gran tamaño, tiene un gran suministro de sangre y es más sensible a lipólisis y a una mayor infiltración de células inmunológicas como macrófagos, células T y células *natural killer*. Por el contrario, el TA subcutáneo está caracterizado por la presencia de adipocitos más pequeños con menos vascularización e infiltración celular³¹.

A continuación, se realizará una breve descripción de las adipocinas más importantes en las enfermedades metabólicas.

Leptina

La leptina tiene un papel importante como regulador de homeostasis energética participando en la comunicación hipotalámica de la saciedad. Los niveles plasmáticos de leptina reflejan el grado de adiposidad y da la señal al cerebro para suprimir el consumo de alimento y estimular el gasto energético. La leptina también promueve la

proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas, altera la producción de citocinas por las células inmunes, estimula el crecimiento de células endoteliales y angiogénesis, participa en la maduración sexual y reproducción y en los ejes hipotalámico, pituitario, adrenal, tiroideo y de crecimiento^{32,33}.

La leptina es producida principalmente por los adipocitos, sus niveles plasmáticos en humanos están fuertemente correlacionados con el IMC y la masa grasa³⁴. En experimentos con animales, la deficiencia de leptina ocasiona hiperfagia severa y obesidad. Al administrar leptina recombinante, este fenotipo se ve completamente revertido. No obstante, la administración de leptina en humanos no produce pérdida de peso significativa, probablemente debido a la resistencia a la leptina. Uno de los mecanismos de la resistencia a la leptina es el daño en el transporte de leptina a través de la barrera cerebral³². En efecto, en humanos se ha demostrado que en obesidad los niveles de leptina en fluido cerebroespinal en comparación con los niveles séricos se encuentran disminuidos³⁵.

En el sistema inmune innato la leptina participa en la activación de monocitos y macrófagos, promoviendo la fagocitosis y la producción de leucotrienos, NO, interleucina-18 (IL-18) y citocinas proinflamatorias como TNF α e IL-1 β . También estimula la activación y proliferación de monocitos circulantes. Más aún, los niveles elevados de leptina en la obesidad actúan sobre macrófagos del TA, incrementando los niveles de macrófagos proinflamatorios M1^{29,36}.

Adiponectina

La adiponectina es producida principalmente por el TA. Se produce en menor cantidad por el hígado, cardiomiocitos, músculo esquelético, colon, glándulas salivales y placenta. Existen dos receptores de adiponectina, AdipoR1 y Adipo R2. Adipo R1 se expresa principalmente en el músculo, en células endoteliales, cardiomiocitos y células β pancreáticas se expresa en menor cantidad. AdipoR2 se expresa mayoritariamente en el hígado y parcialmente en cardiomiocitos. Ambos receptores actúan por medio de una proteína adaptadora APPL³⁷. La adiponectina ejerce su actividad principalmente por medio de la activación de las vías de señalización *AMP-activated protein kinase* (AMPK), *peroxisome proliferator-activated receptor α* (PPAR- α) y p38/MAPK en el hígado y en el músculo esquelético, por lo tanto disminuye los niveles de glucosa y lípidos³⁸.

Se han descrito diversas funciones de la adiponectina en el metabolismo. En el hígado la adiponectina mejora la sensibilidad a la insulina, disminuye la liberación de AGL, aumenta la oxidación de estos y reduce la liberación de glucosa. En el músculo estimula la utilización de glucosa y oxidación de ácidos grasos. En la pared vascular, inhibe la adhesión de monocitos disminuyendo la expresión de moléculas de adhesión, impide la transformación de macrófagos a células espumosas por medio de la disminución de *scavenger receptors* y disminuye la proliferación y migración de células musculares en respuesta a factores de crecimiento. También incrementa la producción de ON en las células endoteliales y estimula la angiogénesis. Estos efectos están mediados por el aumento de la fosforilación del receptor de insulina, activación de AMPK y modulación de la vía de NF κ B^{39,40}.

En estudios en humanos y animales, se ha visto que los niveles plasmáticos de adiponectina tienen una correlación negativa con el IMC y la masa grasa. Interesantemente, al contrario de la leptina, los niveles de adiponectina están elevados en sujetos delgados, mientras que en la obesidad y DM2 se encuentran reducidos⁴¹ y algunos estudios indican que la hipoadiponectinemia esta asociada al daño de la vasodilatación endotelial, hipertensión, infarto al miocardio y EC⁴².

Resistina

Cuando fue descubierta, la resistina se consideró como el enlace entre obesidad, resistencia a la insulina y DM2. En ratones, la administración de resistina afecta la tolerancia a la glucosa, mientras que la inmunoneutralización de esta en ratones obesos mejoró la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa⁴³. Además, los ratones con delección del gen resistina tienen peso y masa grasa similar a ratones *wild type*. Sin embargo, estos ratones presentan mejoría niveles de glucosa y mejor tolerancia a la glucosa, aún siendo alimentados con una dieta alta en grasa. Estos efectos se deben a la disminución de gluconeogénesis hepática⁴⁴.

No obstante, en humanos la evidencia no es consistente. Algunos autores han reportado niveles elevados de resistina plasmática en sujetos obesos, mientras que otros no reportan diferencias entre obesidad y peso normal³³. También se ha descrito que la resistina promueve la resistencia a la insulina regulando la expresión de citocinas proinflamatorias, incluyendo TNF α e interleucina-12 (IL-12) en macrófagos por medio de la vía NF κ B⁴⁵.

Visfatina

La visfatina también conocida como *Pre-B cell colony-enhancing factor* (PBEF) ha sido identificada en el hígado, músculo esquelético, médula ósea, células inmunológicas y TA. Es más abundante en el TA visceral que en el TA subcutáneo, y sus niveles circulantes reflejan la masa del TA y aumentan durante la diferenciación de adipocitos⁴⁶.

La visfatina tiene actividad similar a la insulina, aumenta la captación de glucosa por los adipocitos y monocitos, estimula la diferenciación de adipocitos, inhibe la liberación de glucosa hepática y puede promover la fosforilación de IRS-1 e IRS-2. Interesantemente, la visfatina y la insulina tienen la misma afinidad por el receptor de insulina, pero interactúa con sitios diferentes de este⁴⁷.

Algunos estudios han demostrado que la producción de visfatina es estimulada por glucocorticoides, TNF α , IL-6 y factores de crecimiento indicando que su producción depende de la presencia de citocinas proinflamatorias y bajo condiciones de inflamación⁴⁸. Así mismo, la visfatina aumenta la liberación de caspasa-1 (CASP-1) e IL-1 β en endotelio, y la formación de *NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3* (NLRP3), componente importante del inflamasoma⁴⁹. La visfatina también contribuye a la diferenciación de macrófagos y liberación de citocinas e induce la expresión de CD36 en un mecanismo dependiente de JNK y NF κ B⁵⁰.

En humanos obesos algunos estudios han confirmado niveles elevados de visfatina en plasma⁵¹, mientras que otros estudios son contradictorios indicando que los niveles de visfatina en plasma están disminuidos en obesidad y no están relacionados con la resistencia a la insulina⁵².

Omentina

La omentina es producida principalmente por el TA visceral. Se ha documentado que en los adipocitos la omentina estimula la captación de glucosa mediada por la insulina a través de la vía de señalización AKT⁵³. Además, el tratamiento con omentina en células endoteliales disminuye la expresión de TNF α y *cyclooxygenase 2* (COX-2) por medio de la inhibición de la fosforilación de JNK y probablemente por medio de la activación de la vía AMPK/NOS/ON⁵⁴.

Existen dos isoformas de omentina, 1 y 2. La omentina 1 es la forma más abundante en la circulación y sus niveles plasmáticos y de expresión en el TA están disminuidos en

obesidad. Los niveles de omentina tienen correlación positiva con adiponectina plasmática y con HDL y tienen correlación negativa con obesidad y con el índice HOMA⁵⁵.

Niveles bajos de omentina circulante han sido reportados en DM2, EC y obesidad mórbida⁵⁶⁻⁵⁸. Interesantemente, los niveles de omentina aumentan tan rápido como 24 horas después de cirugía bariátrica en pacientes con obesidad mórbida, este aumento se mantiene hasta después de un año y puede ser un marcador útil de riesgo cardiovascular⁵⁹.

Perilipina

Las perilipinas (PLIN) son una familia de proteínas que cubren y protegen las gotas de lípidos almacenados. Consta de 5 miembros, PLIN 1 se expresa en el TA blanco, TA marrón y tejido esteroideogénico, PLIN2 y PLIN3 se expresan ampliamente, PLIN4 es altamente expresada en adipocitos y PLIN5 que se expresa en corazón, hígado, TA marrón y músculo esquelético. Esta familia de proteínas juega un papel importante en el mantenimiento y utilización de gotas lipídicas citosólicas⁶⁰.

PLIN1 esta asociada a un aumento en la lipólisis y puede promover el desarrollo de resistencia a la insulina. En el hígado, la inhibición de PLIN2 promueve la reducción de esteatosis hepática y mejora la sensibilidad a la insulina. Sin embargo, la inhibición de PLIN2 y PLIN3 ocasiona resistencia a la insulina⁶¹.

En ratones *knock out* para PLIN5 no se observó la formación o presencia de gotas lipídicas y estos ratones tenían una reducción significativa en el contenido de TG, lipólisis elevada, y activación de genes dependiente de PPAR α . También se observó oxidación de AGL incrementada, así como niveles elevados de ROS, por lo que se sugirió que el exceso de lipólisis y daño en el almacenamiento de TG afecta la función cardíaca por medio de actividad excesiva de la mitocondria⁶².

Adipolina

Es también conocida como *C1q/TNF-related protein-12* (CTRP12) y se expresa altamente en el TA subcutáneo comparando con el TA visceral. Actúa suprimiendo la gluconeogénesis hepática y promoviendo la captación de glucosa en hepatocitos y adipocitos por medio de la activación directa de la vía PI3-K/AKT, MAPK y fosforilación de IRS-1 y IRS-2⁶³.

Los niveles plasmáticos de adipolína se encuentran disminuidos en ratones obesos y se ha visto una correlación negativa entre los niveles de adipolína y resistina. Wei y colaboradores reportaron que al administrar adipolína a ratones obesos mejora la sensibilidad a la insulina y tolerancia a la glucosa⁶³. También se han reportado efectos antiinflamatorios de la adipolína. Por ejemplo, en TA de ratones obesos la adipolína reduce la acumulación de macrófagos y la expresión de genes proinflamatorios⁶⁴.

TNF α

El TNF α es una citocina maestra que media múltiples respuestas inflamatorias y está implicada en enfermedades como cáncer, sepsis, artritis reumatoide, diabetes, etc. En el TA, es producida principalmente por monocitos y macrófagos, también es secretada por otras células inmunológicas como linfocitos CD4 y células *natural killer*.

En 1993, se reportó por primera vez que el TNF α es producido por adipocitos en ratones obesos⁶⁵. Posteriormente, se confirmó también la elevación de la producción de TNF α en adipocitos de humanos y está correlacionado positivamente con el grado de obesidad, niveles de insulina y RI, esto se debe a la infiltración aumentada de macrófagos M1 en el TA⁶⁶.

Se han descrito numerosos mecanismos de TNF α en el metabolismo. TNF α influye en la expresión de un gran número de genes en tejidos como el hígado y TA. Por ejemplo, en el TA, TNF α reprime la expresión de genes involucrados en la captación y almacenamiento de glucosa y AGL, disminuye la adipogénesis y la lipogénesis y altera la expresión de adipocinas como IL-6 y adiponectina. En el hígado TNF α también suprime la expresión de genes implicados en la captación de glucosa y oxidación de ácidos grasos y aumenta la expresión de genes que participan en la síntesis *de novo* de colesterol y ácidos grasos⁶⁷.

TNF α también aumenta niveles de AGL circulantes y perjudica la vía de señalización de insulina mediante la fosforilación de los residuos de Serina en el receptor de insulina IRS-1 y -2, disminuyendo su actividad y aumentando su degradación^{68,69}.

IL-6

Aproximadamente un tercio de IL-6 es producido por el TA, siendo de 2 a 3 veces mayor en el TA visceral que en el TA subcutáneo. En ambos tejidos es producida principalmente por células endoteliales, monocitos, macrófagos y fibroblastos⁷⁰.

Los niveles de IL-6 en plasma se encuentran elevados en pacientes con obesidad y están relacionados con el desarrollo de resistencia a la insulina y DM2⁷¹. Además, la expresión de IL-6 en el TA y en circulación está correlacionada positivamente con obesidad, intolerancia a la glucosa y la RI. Interesantemente, al disminuir el peso también disminuye la expresión de IL-6⁷².

IL-6 actúa inhibiendo la expresión de GLUT4 e IRS-1 por medio de la activación de la vía JAK/STAT y del *supresor of cytokine signaling 3* (SOCS3)⁷³. IL-6 también puede bloquear la vía PI3-K e interrumpir la síntesis de glucógeno por medio de la disminución de la expresión de miR-200⁷⁴. Asimismo, se ha sugerido que la estimulación en células musculares con IL-6 induce la expresión de TLR-4 por medio de la activación de STAT3⁷⁵.

MCP-1

La obesidad esta asociada con el aumento de la infiltración de macrófagos en el TA⁷⁶, estos secretan factores inflamatorios que contribuyen al desarrollo de resistencia a la insulina. *Macrophages and monocyte chemoattractant protein 1* (MCP1), también conocida como *chemokine (C-C motif) ligand 2* (CCL2) es expresada y secretada por el TA. Actúa reclutando monocitos al sitio de inflamación y estimula su diferenciación a macrófagos y contribuye al desarrollo de resistencia a la insulina y esteatosis hepática. En ratones obesos se ha visto que la expresión de MCP1 está incrementada tanto en TA como en circulación^{77,78}. Más aún, en los adipocitos MCP1 disminuye la captación de glucosa mediada por la insulina y la expresión de genes adipogénicos como GLUT4, aP2, receptor adrenérgico β 3 y PPAR γ ⁷⁷.

En un estudio realizado en pacientes con sobrepeso y obesidad a los que se les administraron bebidas azucaradas con fructosa o glucosa por 10 semanas, conformando el 25% de sus requerimientos energéticos, se observó un aumento significativo de los niveles plasmáticos de MCP-1 en los sujetos que consumieron fructosa mas no glucosa⁷⁹.

Además, se ha visto que los niveles séricos de MCP-1 están incrementados en sujetos obesos resistentes a la insulina. Al realizar una infusión de insulina, los niveles incrementados se mantuvieron en los sujetos obesos, mientras en que en sujetos sanos los niveles de MCP-1 disminuyeron significativamente. Este comportamiento fue observado también en el TA de los mismos sujetos, indicando que la regulación de este esta mediada por la insulina⁸⁰.

PAI-1

El *plasminogen activator inhibitor 1* (PAI-1) es secretado por los adipocitos, plaquetas y endotelio. Actúa suprimiendo la fibrinólisis a través de la inhibición de la activación de plasminógeno y se ha implicado en la aterogénesis debido a que estimula la formación de trombos⁸¹.

Los niveles circulantes de PAI-1 se encuentran aumentados en sujetos obesos con SM y en pacientes con DM2. Entre mas severo sea el SM, más elevados están los niveles de PAI-1⁸². Por otra parte, se ha visto que la disminución de peso mediante una dieta hipocalórica disminuye los niveles de PAI-1 y este efecto fue asociado a la reducción de la masa grasa⁸³. Además, el tratamiento con fármacos sensibilizadores a la insulina, como metformina o troglitazona disminuyen los niveles plasmáticos de PAI-1 en sujetos diabéticos y en menor grado en sujetos obesos⁸⁴.

1.1.2.6 Otros factores que contribuyen al desarrollo del SM

Envejecimiento

La RI tiene una gran prevalencia en personas de edad mayor y esta relacionada a la prevalencia de obesidad, el desbalance hormonal y la falta de actividad física en esta población⁸⁵. Otros factores que influyen en la RI durante el envejecimiento incluyen la producción de radicales libres que resulta en el estrés oxidativo y disfunción mitocondrial⁸⁶. El proceso de envejecimiento se encuentra alterado o acelerado cuando las enfermedades metabólicas y cardiovasculares están presentes y el riesgo de presentar estas enfermedades aumenta con la edad. En el caso del SM, se sabe que induce envejecimiento precóz aunque los mecanismos no se conocen totalmente. Existe evidencia indicando que la sobreactivación o interrupción de vías determinantes del proceso de envejecimiento como *mechanistic target of rapamycin* (mTOR), p66Shc y *sirtuin 1* (SIRT1) resultan en el desarrollo de SM en ratones⁸⁷. Otras vías relacionadas están involucradas en la relación de la disposición de nutrientes y longevidad incluyen a la vía de señalización de insulina, *insulin-like growth factor 1* (IGF-1) y *forkhead box* (FOXO)⁸⁸.

Microbiota intestinal

Recientemente se ha sugerido la participación de la microbiota intestinal en el desarrollo de enfermedades metabólicas y particularmente la obesidad. Bäckhed y colaboradores demostraron que ratones criados libres de microorganismos tienen menor masa grasa a pesar de que consumían una mayor cantidad de calorías que los ratones convencionales. La colonización intestinal de los ratones libres de microorganismos con microbiota de los ratones convencionales resultó en el aumento de la masa grasa sin ningún aumento en el consumo de alimento. Después de dos semanas de la colonización, estos ratones alimentados con dieta alta en grasa mostraron intolerancia a la glucosa, niveles elevados de glucosa y leptina circulantes, e hipertrofia de adipocitos⁸⁹.

Posteriormente, este mismo grupo demostró que los ratones libres de microorganismos tuvieron significativamente menor peso que los ratones convencionales. Este fenotipo está asociado a mayor masa muscular y mayores niveles de AMPK y otras proteínas que participan en la oxidación de ácidos grasos⁹⁰.

Algunos estudios han reportado diferencias en la composición en la microbiota intestinal de ratones genéticamente obesos, existe una reducción del 50% en la abundancia de *Bacteroidetes* y un aumento proporcional de *Firminutes*⁹¹. Estos cambios pueden contribuir al aumento de la producción de ácidos grasos de cadena corta⁹²

Por otro lado, los estudios en humanos tienen resultados contradictorios en la composición de la microbiota intestinal en sujetos obesos. Algunos estudios confirman la reducción en los *Bacteroidetes* y aumento en los *Firmicutes*⁹³, mientras que otros estudios no han encontrado cambios en la relación *Bacteroidetes/Firmicutes* en obesidad, ni cambios en esta relación después de la pérdida de peso⁹⁴. Algunos otros estudios reportan un aumento significativo de *Bacteroidetes* en sujetos con sobrepeso y obesos⁹⁵.

1.1.3 El SM como pandemia mundial

La prevalencia alta del SM es un fenómeno alrededor del mundo. Esta prevalencia parece ir en incremento paralelo a la prevalencia creciente de obesidad. Aunque debe mencionarse que la prevalencia en diferentes regiones del mundo depende de los criterios diagnósticos utilizados⁹⁶ (Tabla 7).

En los últimos 20 años, las tasas de obesidad se han triplicado en países en vías de desarrollo que han adoptado un estilo de vida occidentalizado, disminuyendo la actividad física y aumentando el consumo de alimentos con alta densidad energética. Con el aumento de la obesidad, el SM se ha convertido en una pandemia mundial. Se estima que más de 1.1 billones de adultos tienen sobrepeso y 312 millones tienen obesidad⁹⁷. Un estudio estima que para el año 2030, 2.16 billones de adultos tendrán sobrepeso y 1.12 billones serán obesos⁹⁸.

Más aún, el estado socioeconómico, estilo de vida sedentario e IMC elevado se han relacionado con la incidencia de SM⁹⁹. Los datos en países desarrollados indican que hay mayores tasas de obesidad y enfermedades metabólicas en áreas rurales y en estrato socioeconómico bajo, al contrario de lo que se observaba en países en vías de desarrollo. Sin embargo, estudios nuevos sugieren que este patrón está cambiando, las tasas de obesidad en estratos socioeconómicos bajos en países de vías de desarrollo están en rápido aumento y tienen importantes implicaciones en la salud pública¹⁰⁰.

Tabla 7. Prevalencia de SM alrededor del mundo

País	Criterios diagnósticos	Prevalencia de SM		Referencia
		Hombres (%)	Mujeres (%)	
Francia	NCEP ATP III	23	16.9	101
	NCEP ATP III	23.5	17.6	
Alemania	IDF	31.6	22.6	102
	NCEP	19	32	
Holanda	WHO	26	26	103
	NCEP ATP III	24.1	23.1	
Italia	NCEP ATP III	22.3	30.7	104
	IDF	27.7	33.6	
España	NCEP ATP III	25.16	12.6	105
India	IDF	35.1	32.5	106
China	NCEP ATP III	19	7	107
Japón	NCEP ATP III	24.4	19.9	108
Australia	IDF	34.4	27.4	
	NCEP ATP III	18.6	14.3	109
Dinamarca	IDF	23.8	17.5	

Ecuador	IDF	19	81	111
Puerto Rico	NCEP ATPIII	45.3	42.2	112
Brasil	NCEP ATPIII	33	32.7	113
Estados Unidos	NCEP ATPIII	33.7	35.4	
	IDF	39.9	38.1	114
	NCEP ATPIII	30.3	42.2	
	AHA	34.7	47.4	
México	IDF	46.4	52.7	115

1.2 MicroRNAs

Los microRNAs (miRNAs) comprenden aproximadamente 1-3% del genoma, son moléculas de aproximadamente 22 nucleótidos (nt) que se encuentran altamente conservadas entre especies. Aunque no codifican proteínas, juegan un papel importante en la regulación de la expresión genética a nivel post transcripcional en plantas y animales, en el ser humano se ha visto que regulan hasta el 30% de la expresión genética ^{116,117}.

Fueron descubiertos en 1993 por Lee y colaboradores en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*). En este organismo modelo, la disminución de la expresión de la proteína LIN-14 es necesaria para la progresión del estado larvario L1 al estado L2. Los niveles de expresión de lin-14 son constantes a lo largo del desarrollo de *C. elegans*, mientras que los niveles de proteína son casi indetectables en el estado L2, indicando la participación de mecanismos de regulación post transcripcional. Esta disminución es dependiente del gen lin-4 que no es traducido a proteína. En cambio, su procesamiento genera dos secuencias de RNA de aproximadamente 22 y 61 nucleótidos respectivamente. Esta última secuencia forma una estructura de tallo y bucle, que a su vez es un precursor de la secuencia más corta la cual tiene complementariedad antisentido con múltiples sitios en la región 3'UTR del mRNA de lin-14. La interacción de las secuencias cortas de RNA provenientes de lin-4 con la región 3'UTR del mRNA de lin-14 causan represión post transcripcional de lin-14 y así permitiendo la progresión de L1 a L2 en el desarrollo de *C. elegans*.¹¹⁸

Posteriormente, múltiples laboratorios identificaron RNAs pequeños en organismos modelo, incluyendo el humano. Todos estos RNAs compartían características similares, como longitud de aproximadamente 22 nucleótidos, provienen de precursores con estructura de tallo y bucle y no codifican proteínas. Ahora conocemos a estas secuencias cortas de RNA como microRNAs.

Desde su descubrimiento ha habido un gran auge en la investigación de miRNAs y su papel en enfermedades incluyendo el SM. En la base de datos especializada en miRNAs, miRBase en su versión 21 se encuentran depositados los datos de 223 especies y cuenta con más de 30, 000 secuencias de miRNAs maduros, de los cuales 2, 558 corresponden a miRNAs en el humano^{119,120}.

1.2.1 Organización genómica

En células animales más de 70% de los miRNAs se encuentran en regiones intrónicas de genes codificantes. El resto se encuentran en unidades transcripcionales de RNAs no codificantes y algunos cuantos se encuentran dentro de los exones de genes huésped, mayormente en la región 3' UTR^{121,122}. En los mamíferos aproximadamente 50% de los loci correspondientes a miRNAs se encuentran en grupos de 2-7 miRNAs con intervalos de solo algunos nucleótidos. En algunos casos los perfiles de expresión de estos grupos son similares, lo cual sugiere que estos son transcritos a partir de una sola unidad de transcripción policistrónica. Sin embargo, aún no se conocen completamente los factores reguladores de la transcripción de estos grupos¹²³⁻¹²⁵.

1.2.2 Biogénesis de miRNAs

La vía canónica de la biogénesis de miRNAs inicia con la transcripción del miRNA primario (pri-miRNA) por la enzima RNA polimerasa II. El pri-miRNA tiene longitud variable, desde unos cientos hasta miles de nucleótidos, consiste en una o más estructuras de tallo y bucle que tienen un casquete en el extremo 5', son poli-adenilados en el extremo 3' y usualmente generan más de un miRNA funcional.¹²⁶ Cada pri-miRNA tiene una estructura de tallo y bucle característica que es reconocida y escindida dentro del núcleo por la endonucleasa III Drosha, esta actúa en conjunto con otra proteína llamada *DiGeorge syndrome critical region gene* (DGCR8). El complejo formado por ambas proteínas es conocido como Microprocesador. Drosha puede formar dos complejos diferentes, un complejo pequeño comprendido por Drosha y DGCR8, que es la forma catalíticamente activa mínima capaz de dirigir la producción de precursores de miRNAs (pre-miRNAs). El complejo más grande además comprende proteínas de unión a RNAs, como RNA helicasas p68 (DDX5) y p72 (DDX17), ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNPs) y otras proteínas asociadas. Todas estas proteínas auxilian promoviendo en la especificidad y/o actividad de la escisión por Drosha.

DGCR8 interactúa con el tallo del pri-miRNA e identifica la unión entre la región de una cadena (*single stranded*) con la región de doble cadena (*double stranded*) de este y dirige a Drosha para cortar a una distancia de 11 pares de bases de la unión^{127,128}. El producto de este proceso es un pre-miRNA con estructura de tallo y bucle de aproximadamente 70 nt que tiene un grupo fosfato en el extremo 5' y dos o tres nucleótidos sobresalientes en su extremo 3'^{129,130}. La especificidad del corte mediado por Drosha determina la correcta escisión del pre-miRNA y, por lo tanto contribuye a la definición de la cadena correspondiente al miRNA maduro y a la cadena complementaria. Los nucleótidos sobresalientes en el extremo 3' son reconocidos por la Exportina-5 (Exp-5) que transporta al pre-miRNA hacia el citoplasma en un mecanismo dependiente de Ran-GTP^{131,132}.

En el citoplasma el pre-miRNA es procesado por otra RNasa III llamada Dicer, produciendo un dúplex de aproximadamente 22 nt, una de estas cadenas corresponderá al miRNA maduro. En los mamíferos, la endonucleasa argonauta 2 (AGO2) puede cortar a algunos pre-miRNAs en el extremo 3' de la cadena complementaria, formando un intermediario llamado *AGO2-cleaved precursor miRNA* (ac-pre-miRNA)¹³³ conformado por una estructura de tallo y bucle acortada en su extremo 3' unida a un fragmento de aproximadamente 11 o 12 nt¹³³.

El complejo proteico Dicer/AGO2/miRNA actúa en conjunto con otras proteínas como *DEAD Box Protein 20* (DDX20, Gemin3), *gem-associated protein 4* (Gemin4), *moloney leukemia virus 10* (Mov10), *Importin 8* (Imp8) y GW182^{126,134}, y se ha sugerido que Dicer reconoce la doble cadena del pre-miRNA por afinidad con el grupo fosfato en el extremo 5' y los nucleótidos sobresalientes en el extremo 3'. Posteriormente, el bucle terminal es cortado en ambas cadenas del pre-miRNA, dejando el grupo fosfato y los nucleótidos sobresalientes característicos unidos al dúplex comprendido por el miRNA maduro y una cadena complementaria (miRNA/miRNA*) de longitud similar que será degradada posteriormente¹¹⁶.

Los miRNAs actúan en conjunto del complejo proteico *miRNA-induced-silencing complex* (miRISC). El principal componente de miRISC es nuevamente la proteína AGO2, la cual tiene 4 dominios: PAZ (se une al extremo 3' del duplo), Mid (se une al grupo fosfato en el extremo 5'), PIWI y el dominio N-terminal¹³⁵ (Figura 3).

La formación de miRISC se lleva a cabo en varios pasos, el primero es la transferencia del dúplex miRNA/miRNA* de Dicer a AGO2 por medio de *RISC loading complex* (RLC), este proceso requiere de ATP y del fosfato en el extremo 5' del dúplex, a este conjunto

se le denomina pre-miRISC. Los componentes principales de RLC son Dicer, AGO2, *TAR RNA Binding Protein 2* (TRBP) y *protein kinase, interferon-inducible double stranded rna dependent* (PACT). Todas estas proteínas contribuyen a la estabilidad del complejo y participan en la selección de la cadena que será el miRNA maduro. Se piensa que la selección depende de la termoestabilidad debido a que la cadena antisentido es menos estable en el extremo 5' y esta es generalmente seleccionada por miRISC^{136–138}. Además, los residuos de adenina o uracilo son preferidos ante los residuos de guanina o citosina. Una vez elegida la cadena que será el miRNA maduro, el proceso continúa con el acuñaamiento del dominio N terminal entre las cadenas del dúplex en su extremo 3' y la separación de este por el dominio PAZ de AGO2¹³⁹. Entonces, una de las cadenas es removida de pre-miRISC y será degradada por AGO2. El miRNA maduro permanece unido a miRISC y podrá ejercer su actividad de regulación post transcripcional.

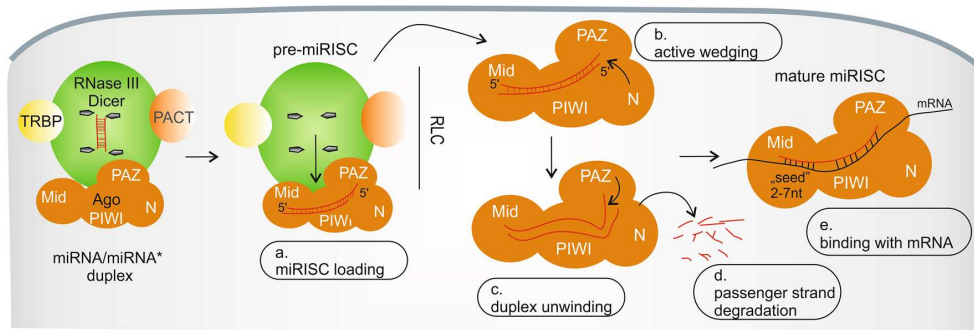


Figura 3. La formación de miRISC en células animales. *a.* El primer paso es la transferencia del dúplex miRNA/miRNA* de Dicer a AGO2. *b.* Después, el dominio N terminal de AGO2 se acuña entre las cadenas del dúplex. *c.* PAZ separa el dúplex. *d.* La cadena complementaria es eliminada de miRISC y degradada *e.* El miRNA maduro unido a miRISC se une al mRNA blanco¹³⁵.

1.2.3 Vía no canónica: mirtrons

La vía mirtron fue descrita primeramente en *Drosophila melanogaster* y *C. elegans*, aunque ya ha sido descrita también en mamíferos¹⁴⁰. Los miRNAs con origen mirtron están localizados en los intrones cortos de mRNA donde prácticamente todo el intron conforma el pre-miRNA¹⁴¹. Esta vía es independiente de la actividad de Dicer, el transcrito es escindido por la maquinaria de edición o splicing y posteriormente tomará forma de pre-miRNA, que será exportado al citoplasma por Exp-5 donde seguirá la vía

canónica de miRNAs^{142,143}. El complejo microprocesador se asocia con intermediarios del splicing como U2, U5 y U6, lo cual sugiere una correulación importante entre la maquinaria de splicing y la maquinaria de la vía canónica de miRNAs. Más aún, la maquinaria de splicing podría modificar la conformación del pre-miRNA para favorecer la unión con Exp-5 y la consecuente unión con la vía canónica¹⁴⁴.

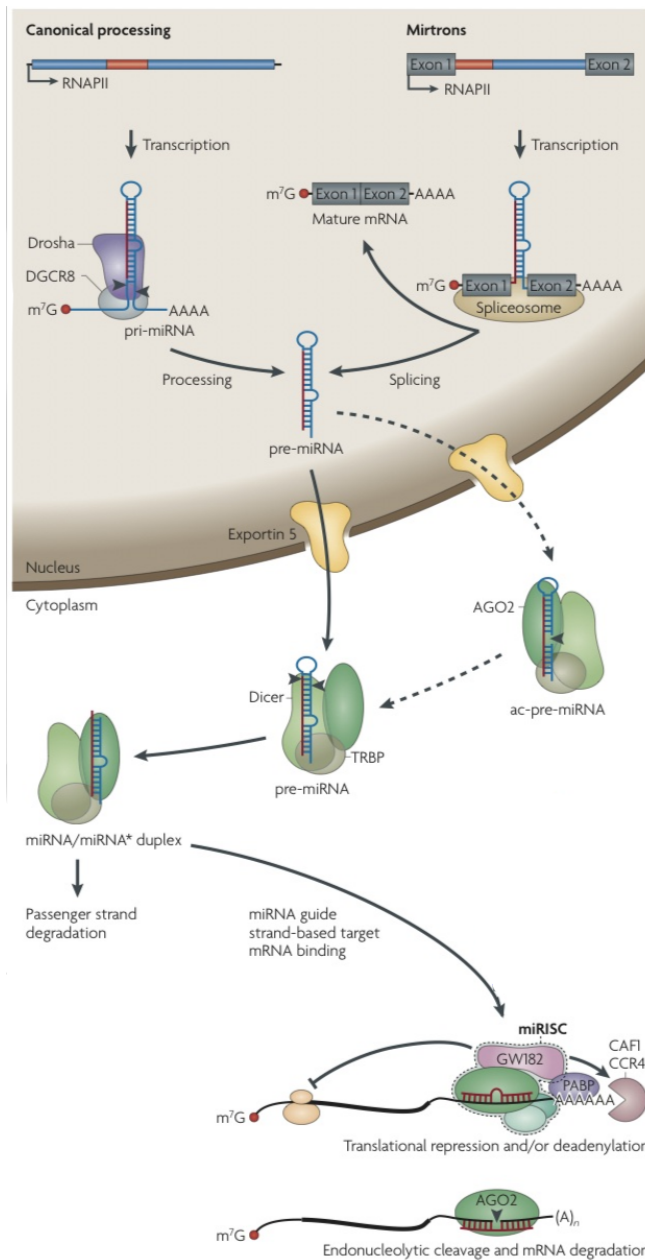


Figura 4. Biogénesis y mecanismo de acción de los miRNAs. Los pri-miRNAs son procesados por la RNA polimerasa II. El complejo microprocesador escinde al pri-miRNA formando el pre-miRNA, que será exportado al citoplasma por la Exportina 5. Algunos pre-miRNAs son transcritos por la vía mirtron y son también exportados por la Exportina 5. miRISC se une al pre-miRNA y escinde la cadena complementaria que será degradada. miRISC unido al miRNA maduro puede reprimir la traducción del mRNA blanco o escindirlo por medio de AGO2¹⁴⁵.

1.2.4 Mecanismo de acción

En células animales los miRNAs actúan inhibiendo la traducción y/o desestabilizando al mRNA blanco¹⁴⁶. Hasta hace poco se pensaba que los sitios de unión de miRNAs eran limitados a la región 3'UTR, pero también pueden estar presentes en la secuencia codificadora y la región 5'UTR. Estudios realizados indican que una cantidad importante de miRNAs interactúan con la secuencia codificadora del mRNA blanco, aunque este tipo de uniones son menos comunes que las presentes en la región 3'UTR^{147,148}. La complementariedad del nucleótido 2-8 en el extremo 5' del miRNA (secuencia semilla) con el sitio de unión del mRNA blanco generalmente es suficiente para causar represión de la traducción, la región 3' no es crucial pero puede modular la actividad en ciertas circunstancias¹⁴⁹. Por lo tanto, pueden existir un gran número de genes blanco de un solo miRNA. Efectivamente, estudios realizados indican que los miRNAs pueden regular y reprimir la traducción de varios mRNAs que tienen complementariedad con la secuencia semilla del miRNA¹⁵⁰.

Generalmente, los miRNAs actúan por medio de tres mecanismos: la desadenilación del mRNA, la inhibición de la traducción o por escisión del mRNA mediada por AGO2. Se ha propuesto que varios sitios de unión de gran afinidad entre miRNA y el mRNA blanco son necesarios para la inhibición de la traducción. Es posible que miRISC identifique blancos con complementariedad imperfecta y/o con poca afinidad, por lo que varios complejos miRISC podrían unirse al mRNA blanco en modo compensatorio y de esta forma causar la inhibición de la traducción y degradación del blanco¹⁵¹.

La regulación traduccional y el decaimiento del mRNA seguido por la eliminación de la cola poliadenilada son mecanismos directamente conectados por medio de la interacción de GW182 con la *poly(A)-binding protein* (PABP) y algunas desadenilasas¹⁵². La eliminación de la cola poliadenilada del mRNA es uno de los mecanismos más comunes por el cual se lleva a cabo la degradación mediada por miRISC¹⁵³⁻¹⁵⁵. Aunadas al complejo miRISC, otras proteínas como PABP, complejos de desadenilación *poly(A)-nuclease* (PAN) 2 y 3 y *CCR4-NOT transcription complex, subunit 1* (CNOT1) son componentes cruciales de este mecanismo¹⁵⁶. Después, la degradación puede ser llevada a cabo por medio de *decapping mRNA* (DCP) 1b y 2 que remueven la caperuza del extremo 5' del mRNA, por la exonucleasa 5'-3' XRN1 o por las exonucleasas citoplasmáticas 3'-5'. Estas proteínas son reclutadas directamente por PAN2-PAN3 y CNOT1 y su actividad es facilitada por la alta concentración de estas proteínas en los cuerpos de procesamiento (P-bodies)¹⁵⁷, los cuales en conjunto con

los gránulos de estrés son los principales sitios celulares de degradación de mRNAs, pues contienen la maquinaria necesaria para su degradación^{158,159}. Posterior a la unión de miRISC con el mRNA blanco, ambos son localizados a los P-bodies y/o a los gránulos de estrés donde serán degradados y/o almacenados¹⁶⁰⁻¹⁶².

1.2.5 miRNAs extracelulares

Los miRNAs extracelulares son una nueva clase de mensajeros celulares que están presentes la mayoría de los fluidos corporales incluyendo sangre, orina, saliva, semen y leche materna¹⁶³⁻¹⁶⁶. Estos son exportados selectivamente y pueden regular post transcripcionalmente la expresión de genes blanco en células receptoras^{167,168}.

Los miRNAs extracelulares son estables aún después de haber sido expuestos a condiciones severas como altas temperaturas, pH extremo y almacenamiento prolongado¹⁶⁹. Son protegidos por diversos mecanismos, entre ellos el empacamiento en vesículas membranales (microvesículas, exosomas y cuerpos apoptóticos), unión a proteínas transportadoras y unión a lipoproteínas¹⁷⁰⁻¹⁷². Interesantemente, se han identificado proteínas del complejo miRISC (Dicer, AGO y TRBP) en exosomas y en suero de pacientes con cáncer de mama¹⁷³.

La comunicación intercelular mediada por miRNAs tiene tres procesos críticos. Primero, los miRNAs deben ser empacados y selectivamente secretados por las células. Segundo, deben estar protegidos de RNasas y ser transferidos a las células receptoras. Y tercero, los miRNAs deben de mantener la capacidad de reconocimiento y regulación del mRNA blanco dentro de la célula receptora¹⁷⁴. Aún no se conoce en su totalidad como los miRNAs son selectivamente secretados. No obstante, algunos estudios han identificado mecanismos dependientes de ceramidas y algunas proteínas como *neutral sphingomyelinase 2* (nSMase2) y *nucleophosmin* (*nucleolar phosphoprotein B23, numatrin*) (NPM1) que juegan un papel importante en la secreción de microvesículas transportadoras de miRNAs^{170,175,176}. Además, Vickers y colaboradores identificaron a *scavenger receptor class B type I* (SRBI) como una proteína clave en la internalización de miRNAs y otros RNAs pequeños transportados por HDL a las células receptoras¹⁷¹ (Figura 5).

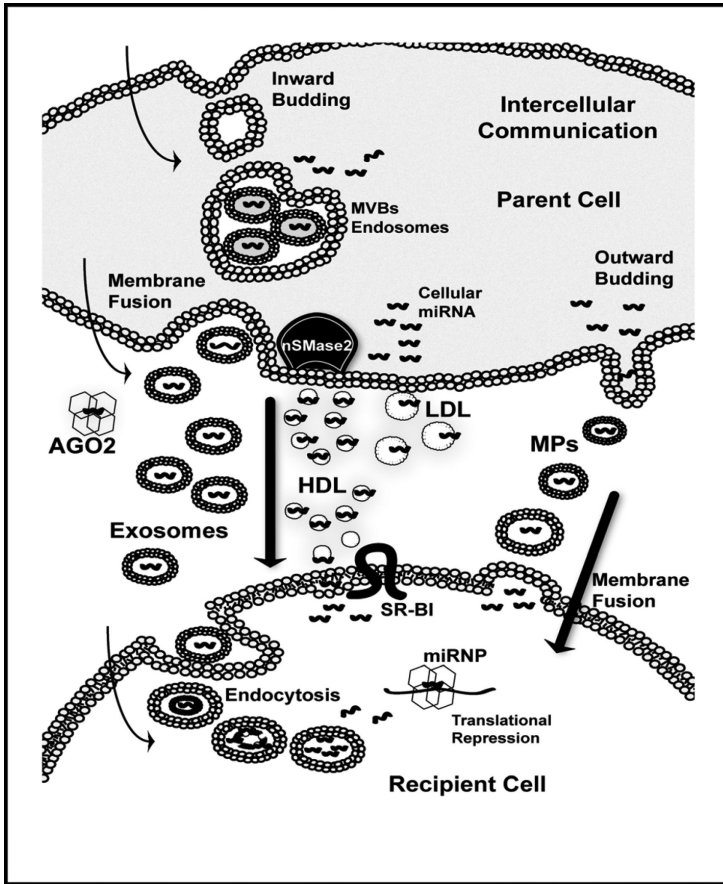


Figura 5. miRNAs circulantes son secretados y transferidos a células receptoras por medio de exosomas y micropartículas, donde nSMase2 juega un papel crucial. La transferencia de miRNAs mediada por HDL es dependiente de SRBI¹⁷⁴.

1.2.6 miRNAs extracelulares en enfermedades metabólicas

Recientemente se han identificado diferentes perfiles de expresión de miRNAs extracelulares en diversas enfermedades. En el caso de las enfermedades metabólicas, se han realizado un gran número de estudios de perfiles de expresión de miRNAs circulantes relacionados con diferentes fenotipos del SM, algunos de estos realizados en humanos se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Algunos estudios del perfil de expresión de miRNAs extracelulares en enfermedades metabólicas

Fenotipo	Tipo de muestra	Principales hallazgos	Referencia
Hipertensión	Plasma	miR-296-5p y let-7e ↑. No hay diferencia entre pacientes con tratamiento antihipertensivo	177
Hipertensión	Plasma	miR-505 ↑. Gen blanco validado FGF18, un factor proangiogénico	178
Hipertensión	Sangre total	miR-21, miR-23b, miR-130a, miR-491, miR-1246, miR-133b, miR-204 miR-208b ↑ de acuerdo a la severidad de la enfermedad	179
Hipertensión	Plasma	miR-150 ↓, posible predictor de supervivencia	180
Diabetes tipo 2	Plasma	miR-126 ↓, predictor de riesgo a 2 años	181
Diabetes tipo 2	Suero	miR-101, miR-375, miR-802 ↑	
Diabetes tipo 2	Exosomas de plasma y PBMC	miR-326 ↑, let-7a y let-7f ↓. ADIPOR-2 es gen blanco validado de miR-326	182
Diabetes tipo 2	Plasma	miR-20b, miR-21, miR-24, miR-15a, miR-126, miR-191, miR-197, miR-223, miR-320, y miR-486 ↓, miR-28-3p ↑. Desregulación de miR-15a, miR-29b, miR126, miR-223 y miR-28-3p previa al inicio de la enfermedad	183
Diabetes tipo 2/ Obesidad	Suero	miR-138, miR-15b, miR-376a como posibles marcadores para el diagnóstico de DM en comparación con obesidad	184
Hiperlipidemia/ hiperglicemia	Suero y lipoproteínas	miR-146a, miR-125a-5p, miR-10a, miR-21 ↑ en HL y /o HG, asociados específicamente a lipoproteínas α y β, correlación con lípidos aumentados, PCR e IL-1b	185
Hiperlipidemia / Enfermedad coronaria	Plasma	mir-122, mir-370 ↑, Correlación con TC, TG, LDL y con severidad de EC	186
Hipertrigliceridemia	Suero	miR-24- 3p, miR-361-5p, miR-1246 y miR-222-3p ↑, miR-181a-5p ↓, Correlación con TG, TC y glucosa en ayuno	187
Obesidad	Suero	miR-122 ↑ y factor de riesgo independiente de resistencia a la insulina	188

Obesidad	Plasma	miR-140-5p y miR-142-3p y miR-222 ↑ y miR-532-5p, miR-125b, miR-130b, miR-221, miR-15a, miR-423-5p, y miR-520c-3p ↓. Cirugía bariátrica ↓ miR-140-5p, miR-142-3p, miR-16-1 y miR-122 y ↑ -221 y miR-130b.	¹⁸⁹
Obesidad en niños	Plasma	miR-221 y miR-28-3p ↓. miR-486-5p, miR-486-3p, miR-142-3p, miR-130b, y miR-423-5p ↑. Correlación con IMC, porcentaje de grasa, cintura, adiponectina, PCR y lípidos plasmáticos.	¹⁹⁰
SM	Sangre total y exosomas	Identificación de firmas de expresión de miRNAs en cada fenotipo del SM: miR-197, miR-23a y miR-509-5p ↑ en dislipidemia. miR-130a y miR-195 ↑ en HTA. miR-27a y miR-320a ↑ en DM2.	¹⁹¹
SM	Sangre total	miR-144-5p, miR-1207-5p, miR-484, miR-625-3p, miR-1237-3p, miR-331-3p, miR-129-1-3p, -129-2-3p, miR-1288-3p correlacionan con diferentes parámetros metabólicos	¹⁹²
SM	Suero	let-7g y miR-221 ↑. Mayor correlación con parámetros de SM en mujeres	¹⁹³

1.2.7 Tecnologías para el estudio de miRNAs

Existen diversas tecnologías que pueden ser utilizadas para cuantificación de la expresión de miRNAs. Las más utilizadas son Northern blot, PCR cuantitativa (qPCR), microarreglos y secuenciación de nueva generación¹⁹⁴⁻¹⁹⁷. La elección de una depende de los objetivos y los alcances propuestos por cada estudio. En la figura 6 se muestran las características de algunos métodos utilizados para la cuantificación de miRNAs.

A continuación, se hará una breve descripción de los microarreglos de expresión y qPCR, los cuales fueron utilizados en este estudio.

Profiling method	Workflow	Sensitivity	Specificity	Throughput	Absolute quantification /accuracy	Flexibility	Can identify novel miRNAs	Data analysis	Other
qRT-PCR	Reverse transcription	+++	+++	+ / ++	+++	+++	N	E	Normalization
	Optional pre-amplification PCR								
GeneChip microarrays	Biotin labeling	+	+	+++	+	+/-	N	M	Various species on the same array
	Hybridization								
	Staining								
	Scanning								
Oligonucleotide microarrays	Cy3 labeling	+ / ++	+ / ++	+++	+	++	N	M	
	Hybridization								
	Scanning								
Exiqon miRCURY microarrays	Hy3/Hy5 labeling	++	++	+++	++	++	N	M	LNA-capture probes Allows for either mono- or dual-wavelength scanning
	Hybridization								
	Mono- or dual-wavelength scanning								
nCounter Analysis System	In-solution hybridization (biotinylated capture probe and a miRNA-specific fluorescent reporter probe)	++	++	++	++	++	N	M	Normalization
	Complexes immobilization and alignment								
	Scanning								
NextGen sequencing	3' Adaptor ligation	++	+++	+++	++	+++	Y	D	Highest cost
	5' RT primer annealing								
	5' adaptor ligation								
	Reverse transcription								
	PCR								

Figura 6. Comparación de métodos comunes para la cuantificación de la expresión de miRNAs. En especificidad, sensibilidad, throughput, cuantificación absoluta/exactitud y flexibilidad: +++ Muy alto, ++ Moderado, + / ++ Moderado a bajo, + Bajo, +/- Bajo o no aplica. En Identificación de miRNAs nuevos: N No, Y Si. En análisis de datos: E Fácil, M Moderado, D Difícil¹⁹⁸.

1.2.7.1 Microarreglos de expresión

Los microarreglos son soportes sólidos en los cuales se encuentran inmovilizados decenas de miles de genes de manera ordenada. Pueden ser laminillas de vidrio, cuarzo, o de polímeros como silicón y nylon. El DNA que es fijado en los microarreglos puede ser impreso, depositado o sintetizado directamente sobre la superficie sólida en lugares específicos llamados spots o celdas de sondeo y generalmente, son oligonucleótidos de 25 pares de bases por cada celda, que representan parte o todos los genes identificados en un organismo¹⁹⁹.

La tecnología de los microarreglos permite el monitoreo cuantitativo y simultaneo de la expresión de miles de genes. Se basan en la complementariedad de bases, adenina es complementaria de timina y citosina es complementaria de guanina. Utilizan oligonucleótidos que se hibridan con sus cadenas complementarias provenientes de las

muestras de estudio. La cantidad de hibridación es determinada debido a que cada copia de RNA es marcado con material fluorescente, cuanto mas intensa sea la señal, más copias del RNA han sido hibridadas a las sondas del microarreglo²⁰⁰.

Existen diversos tipos de microarreglos para cuantificar la expresión de miRNAs, cada uno tiene diferentes características y limitaciones que deben ser tomadas en cuenta para la elección de uno¹⁹⁸.

GeneChip miRNA 3.0

El microarreglo de expresión GeneChip miRNA 3.0 de la plataforma Affymetrix hace cobertura total de las bases de datos miRBase versión 17 y snoRNAbase versión 3. Este microarreglo evalúa:

- 153 organismos (19,724 sondas)
- De los cuales 5,639 son sondas para humano:
 - 1733 miRNA
 - 1658 pre-miRNA
 - 1674 *small nucleolar RNA* (snoRNA)
 - 347 C/D Box
 - 163 H/ACA Box
 - 32 *small cajal body-specific RNA* (scaRNA)
 - 10 *ribosomal RNA* (rRNA) 5.8s

Estos microarreglos de expresión, al igual que los demás, se basan en la hibridación del RNA proveniente de la muestra previamente marcado con el oligonucleótido de aproximadamente 25 nt fijo en la superficie del microarreglo. El proceso inicia con la poliadenilación de los miRNAs su el extremo 3', seguido de ligación de una molécula señal biotinilada (dendrímero 3DNA). Posteriormente, los miRNAs marcados con biotina son hibridados a la superficie de los microarreglos y la fluorescencia es detectada por medio de estreptavidina-ficoeritrina^{201,202} (Figura 7).

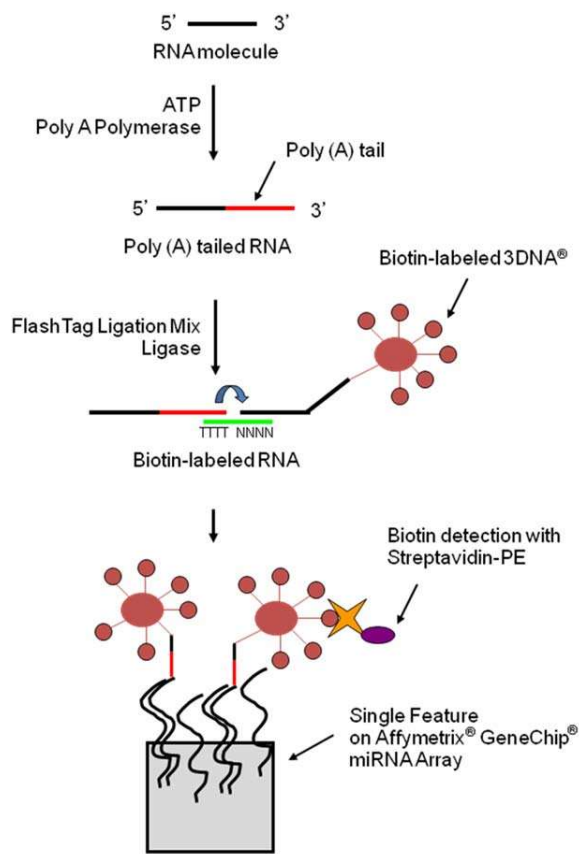


Figura 7. Procesamiento de GeneChip miRNA 3.0. Los miRNAs son poliadenilados y marcados con biotina. Después, son hibridados a la superficie del microarreglo y la detección se realiza por medio de estreptavidina-ficoeritina²⁰¹.

1.2.7.2 qPCR

El análisis de expresión de miRNAs por qPCR puede ser realizado con marcaje de Taqman o SYBR Green. En ambos casos, la reacción en tiempo real inicia con la transcripción reversa de RNA a DNA complementario (cDNA)^{203,204}.

La transcripción reversa del sistema de Taqman utiliza cebadores específicos con estructura de tallo y bucle complementarios a la secuencia del extremo 3' del miRNA, el bucle contiene una secuencia universal para unión al cebador. Este tipo de cebadores disminuyen la hibridación con los pri y pre-miRNAs, por lo tanto, incrementan la especificidad del ensayo.

Posteriormente, el cDNA formado servirá de templado para la cuantificación por qPCR en tiempo real que es llevada a cabo con una sonda Taqman específica^{205,206} (Figura 8).

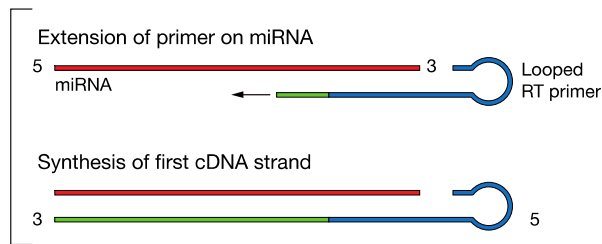


Figura 8. Transcripción reversa de miRNAs utilizado cebadores de tallo y horquilla de Taqman²⁰⁵.

Las sondas específicas tienen un reportero (FAM) unido al extremo 5', un ligando de unión al surco menor (MGB) y un inhibidor (quencher) no fluorescente unidos al extremo 3'. Durante la reacción, el MGB se alinea específicamente a la secuencia complementaria entre los cebadores sentido y antisentido. Cuando la sonda está intacta, la proximidad del reportero con el inhibidor suprime la fluorescencia. La actividad de la DNA polimerasa degrada la sonda entre el reportero y el inhibidor solo si la sonda ha hibridado con secuencia diana. De esta manera, la fluorescencia aumenta a medida que progresa la amplificación y la acumulación del producto de PCR se detecta monitorizando el incremento de la fluorescencia (Figura 9).

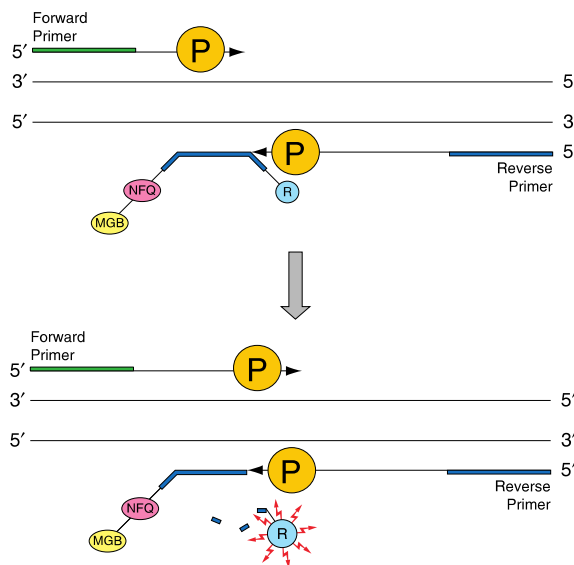


Figura 9. qPCR de miRNAs utilizando sondas específicas de Taqman²⁰⁵.

El sistema en SYBR Green utiliza un cebador universal y una poli(A) polimerasa que poliadenila en el extremo 3' a todos los RNAs presentes en la muestra. Después, el cebador que consiste de un oligo(dT) con una secuencia universal en su extremo 5' es utilizado para llevar a cabo la transcripción reversa. Este abordaje es muy útil y ampliamente utilizado cuando se quiere medir la expresión de numerosos miRNAs y la

muestra es limitada. Sin embargo, una de las desventajas de esta tecnología es la falta de especificidad para miRNAs maduros, ya que todas las especies de RNA (pre-miRNAs, ncRNAs, mRNAs y otros) presentes en la muestra son transcritas a cDNA²⁰⁷. Se debe utilizar un sistema de selección para transcribir solo los miRNAs y evitar la poliadenilación de las demás especies de RNA. Después, en la qPCR se utilizan cebadores específicos para la secuencia universal y el miRNA de interés²⁰⁸ (Figura 10).

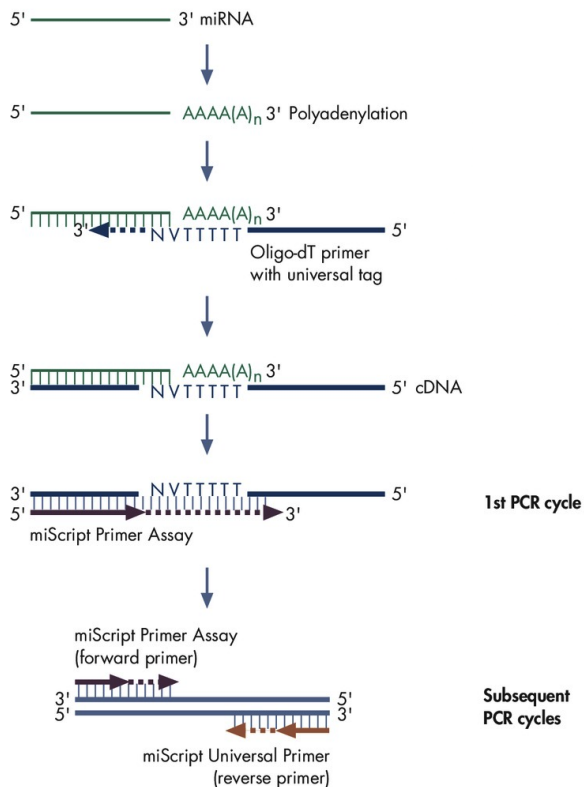


Figura 10. Transcripción reversa de miRNAs utilizando el sistema de SYBR Green. Los miRNAs son poliadenilados y unidos a un cebador universal. La qPCR es utiliza un cebador específico para el miRNA en dirección sentido y un cebador específico para el cebador universal para dirección antisentido.

Otra opción del sistema SYBR Green es el uso de cebadores específicos unidos a ácidos nucleicos bloqueados (LNA) para mejorar la especificidad del ensayo. Estos poseen un puente que conecta al 2'-O con el 4'-C de la ribosa del nucleótido que estabiliza la conformación de la ribosa y por lo tanto aumenta la afinidad de hibridación de los oligonucleótidos que contienen bases de LNA²⁰⁹ (Figura 11).

En ambos casos, la cuantificación es llevada a cabo en base a la fluorescencia dada por a asociación del SYBR Green con la doble cadena de RNA.

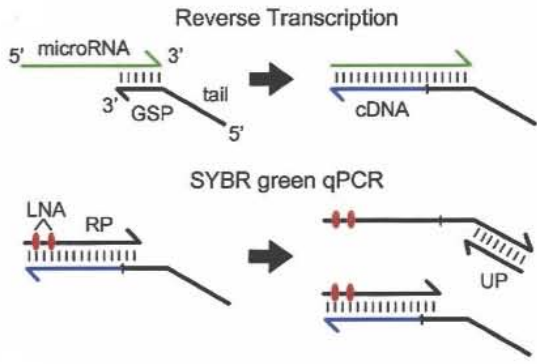


Figura 11. Transcripción reversa y qPCR utilizando el sistema SYBR Green y LNAs

2. JUSTIFICACIÓN

En 1993 la prevalencia de SM en adultos mexicanos era de 26.6%²¹⁰. La Encuesta nacional de salud y nutrición (ENSANUT) 2006 reportó un aumento en la prevalencia a 36.8%¹¹⁵ y la última ENSANUT 2012 reportó una prevalencia de 45%²¹¹. Mas aún, 11.2 millones de adultos presentan obesidad central, 9.1 millones tienen triglicéridos elevados y 25.8 millones presentan niveles disminuidos de HDL¹¹⁵. Aún en adultos jóvenes la prevalencia del SM alcanza el 13.4% y 71% presentan algún parámetro alterado.²¹² Además, se ha reportado que la incidencia de enfermedades metabólicas aumenta con la edad y es más prevalente en mujeres²¹³. Esto representa un gran problema de salud pública en nuestro país. El gran porcentaje de adultos afectados por dislipidemias y el SM se explica en parte a la interacción genética y ambiental²¹⁴. Entre los mecanismos que pueden estar involucrados se propone la posible actividad de los microRNAs en el desarrollo del SM. Debido a su fácil accesibilidad, los miRNAs circulantes tienen un amplio potencial para la identificación de biomarcadores, firmas de expresión y blancos terapéuticos para enfermedades metabólicas, entre ellas en SM. No obstante, la información existente es insuficiente. Los mecanismos de secreción, transporte y actividad de los miRNAs circulantes en SM no se conocen con claridad y existe gran variabilidad del perfil de los miRNAs circulantes de acuerdo a los fenotipos del SM y de acuerdo al tipo de muestra utilizada. Por lo tanto, es necesario caracterizar el perfil de expresión de miRNAs circulantes en el SM para esclarecer los mecanismos y funciones de estos, especialmente en nuestra población, ya que, a la fecha, no existe ningún estudio realizado.

3. HIPÓTESIS

El perfil de expresión de miRNAs plasmáticos se encuentra alterado en personas con SM comparados con personas sanas. Estos miRNAs diferencialmente expresados participan en la regulación del metabolismo de lípidos y glucosa.

4. OBJETIVOS

4.1 General

Evaluar el perfil de expresión de miRNAs circulantes de personas sanas en comparación con individuos con SM pareados por edad y sexo.

4.2 Específicos

- Analizar la expresión diferencial de miRNAs circulantes por medio de microarreglos de expresión entre personas afectadas y no afectadas.
- Validar los resultados de los microarreglos de expresión por medio de qPCR en una muestra independiente.
- Analizar los genes blanco predichos y validados experimentalmente de los miRNAs diferencialmente expresados.
- Analizar la asociación de miRNAs diferencialmente expresados con fenotipos del SM.

5. METODOLOGÍA

5.1 Características del estudio

Se llevó a cabo un estudio transversal, comparativo y anidado. La muestra se determinó por conveniencia y fue constituida por pacientes de dos estudios revisados y aprobados por el INMEGEN. Es importante mencionar que solo fueron seleccionadas mujeres debido a la mayor prevalencia de SM en esta población.

Este estudio fue dividido en dos grupos: el grupo de descubrimiento se refiere al análisis de expresión realizado con los microarreglos (n=20), y el grupo de validación se refiere al análisis de expresión de la validación de los resultados por qPCR (n=29). Las participantes del grupo de descubrimiento fueron pareadas por edad e IMC con la finalidad de disminuir la variabilidad de los datos. En ambas muestras se utilizaron los

mismos criterios de selección. Sin embargo, los rangos de edad son más amplios en la muestra de validación.

5.2 Criterios de selección

5.2.1 Criterios de inclusión

- Firma de consentimiento informado.
- Mujeres
- Al menos 3 criterios para SM de acuerdo a las guías ATP III:
- Circunferencia abdominal > 90cm.
- Triglicéridos \geq 150 mg/dL.
- Colesterol ligado a HDL < 40 mg/dL.
- Presión arterial.
 - Presión sistólica \geq 130 mmHg
 - Presión diastólica \geq 85 mmHg.
- Glucosa en ayuno \geq 110 mg/dL.

5.2.2 Criterios de exclusión

- Consumo de medicamentos o suplementos.
- Bajo tratamientos dietéticos.
- Cualquier otra comorbilidad que pueda afectar las mediciones.

5.2.3 Criterios de eliminación

- Datos incompletos.
- Muestra de RNA de baja calidad y concentración.

5.3 Variables analizadas

Se realizó una historia clínica completa y se tomaron las siguientes variables:

- Variables antropométricas:
 - Peso, talla, circunferencia de cintura, presión arterial.

Se tomó muestra sanguínea por punción venosa para las siguientes determinaciones:

- Variables bioquímicas:
 - Colesterol total, colesterol HDL, TG y glucosa en ayuno.
- Extracción de RNA total que fue utilizada para evaluar la expresión de miRNAs por medio de microarreglos de expresión GeneChip miRNA 3.0 array (Affimetryx) y qPCR de miRNAs específicos.

5.4 Obtención del perfil de expresión diferencial de miRNAs circulantes en SM

Para llevar a cabo el perfil de expresión de miRNAs se emplearon 49 muestras de plasma, de las cuales 20 muestras (10 casos y 10 controles) fueron utilizadas para realizar los microarreglos de expresión y 29 muestras (13 casos y 16 controles) fueron utilizadas para la validación de los resultados por qPCR.

5.4.1 Separación de plasma.

Se utilizaron tubos con anticoagulante EDTA para tomar la muestra sanguínea de sangre periférica por punción venosa. Los tubos fueron centrifugados a 3500rpm por 15 min a temperatura ambiente. Se separó el plasma y se hicieron alícuotas en tubos eppendorf de 1.5 ml o crioviales de 2ml, y fueron almacenados a -80°C hasta su procesamiento.

5.4.2 Extracción de RNA total

La extracción de RNA total se realizó a partir de 1ml de plasma. Se descongeló la muestra y se dividió en dos alícuotas de 500µl cada una. Se agregó 1.5ml de TRIzol Reagent. Se agregaron 50 fmol/5µl del miRNA sintético cel-miR-39 solo a las muestras que fueron utilizadas para la validación por qPCR. Se mezcló por vortex y se incubó 5 min sobre hielo. Se añadieron 250µl de cloroformo y se mezcló por vortex por 15 seg,

se incubó 5 min sobre hielo y se centrifugó por 15 min a 12,000 rpm y 4°C. Posteriormente, se transfirió la fase acuosa superior a un tubo eppendorf de 1.5ml nuevo y se añadió volumen proporcional de isopropanol frío. Se dejó precipitar a 4°C toda la noche. Se centrifugó a 12, 000 rpm y 4°C por 40 min, se decantó el sobrenadante y se agregaron 500 µl de etanol al 80% frío. Nuevamente se centrifugó a 12, 000 rpm por 20 min y 4°C, se decantó el sobrenadante y se agregaron 500 µl de etanol al 100% frío. Se retiró el sobrenadante con una pipeta y se dejó secar el tubo por no más de 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspendió el RNA en 10µl de agua libre de RNAsas. Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su utilización.

5.4.3 Protocolo para microarreglos de expresión

Los microarreglos de expresión fueron procesados en la Unidad de Genotipificación y Análisis de Expresión del INMEGEN.

Las muestras fueron procesadas con el kit FlashFatg Biotin HSR RNA labeling (Affymetrix) y el kit Hybridization, Wash and Stain (Affymetrix). La cantidad inicial de RNA total puede ser de 130ng a 400ng en un volumen máximo de 8µl.

Poliadenilación

Se ajustó el volumen a 8µl y se agregaron 2µl de RNA Spike Control Oligos, se diluyó el ATP mix 1:500 en 1mM de Tris-HCl pH 8.0. Se preparó la mezcla para la reacción de acuerdo a la tabla 9 para dar un volumen total de 5µl

Tabla 9. Reactivos para poliadenilación de miRNAs

Componente	Volumen
10x Buffer	1.5µl
25mM MnCl ₂	1.5 µl
Mix ATP diluido	1µl
Enzima PAP	1 µl

Posteriormente se añadieron 5µl de la mezcla al RNA/Spike Control Oligos para dar un volumen de 15µl, se mezcló brevemente y se incubó a 37°C por 15 min.

Ligación del FlashTag

Se agregaron 4 μ l del mix para ligación FlashTag Biotin HSR y 2 μ l de la ligasa T4 DNA, se mezcló brevemente, y se incubó a 25°C por 30 min. La reacción se detuvo por la adición de 2.5 μ l de la solución Stop, y se mezcló brevemente.

Hibridación de la muestra

La hibridación se realizó con el kit Hybridization, Wash and Stain (Affymetrix). Se preparó la mezcla para la hibridación de acuerdo a la tabla 10 para dar un volumen total de 132 μ l.

Tabla 10. Reactivos para la hibridación.

Componente	Volumen
Muestra biotinilada	21.5 μ l
2x Mix de hibridación	66 μ l
27.5% Formamida deionizada	19.2 μ l
DMSO	12.8 μ l
20x Controles Eukaryotic Hyb	6.6 μ l
Oligo B2	2.2 μ l
Agua libre de nucleasas	3.7 μ l

Se calentó la mezcla a 99°C por 5 min y se transfirió la mezcla al Horno de Hibridación 640 donde se incubó a 48°C por 5 min. Posteriormente, se transfirió la mezcla al arreglo, y se dejaron hibridando a 48°C por 16 horas a 60rpm.

Lavado y tinción

Después de las 16 horas de hibridación, los microarreglos se sacaron del horno, se llenaron con el buffer Array Holding, y se dejaron equilibrar a temperatura ambiente. Se hicieron alícuotas de los reactivos de lavado y tinción, y se colocaron en la estación Fluidics Station. El lavado y tinción se realizó de acuerdo al protocolo Fluidics Station 450 (Tabla 11).

Tabla 11. Protocolo Fluidics Station 450.

Proceso	Fluidics Station 450
Lavado Positivo #1	10 ciclos de 2 mezclas con buffer de lavado A a 30°C
Lavado Positivo #2	6 ciclos de 15 mezclas con buffer de lavado B a 50°C
Tinción 1	Tinción por 5 min con coctel de tinción 1 a 35°C
Lavado de tinción positiva	10 ciclos de 4 mezclas con buffer de lavado A a 30°C
Tinción 2	Tinción por 5 min con coctel de tinción 2 a 35°C
Tinción 3	Tinción por 5 min con coctel de tinción 1 a 35°C
Lavado final	15 ciclos de 4 mezclas con buffer de lavado A a 30°C
Buffer Array Holding	Llenar el microarreglo

Escaneo

El escaneo de los microarreglos se realizó con el instrumento Affymetrix GeneChip Command Console.

5.4.4 *Transcripción reversa*

La síntesis de cDNA se realizó con el kit Taqman microRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Este kit utiliza cebadores específicos para cada miRNA, por lo que se hicieron reacciones individuales para cada uno. Los componentes de kit fueron mezclados en un volumen de 10 μ l (Tabla 12), y se agregaron 5 μ l de RNA total diluidos en agua libre de RNasas, para dar un total de 15 μ l por reacción. Los tubos se centrifugaron brevemente, y se colocaron en el termociclador. El programa que se utilizó se muestra en la tabla 13. Posteriormente, los tubos fueron almacenados a -20°C.

Tabla 12. Reactivos para transcripción reversa

Componente	Volumen
100mM dNTPs (con ddTTP)	0.15µl
MultiScribe Reverse Transcriptase	1 µl
10 X Reverse Transcription Buffer	1.5 µl
Inhibidor de RNasa	0.2 µl
Agua libre de RNasa	4.15 µl
5X RT primer	3 µl

Tabla 13. Programa de transcripción reversa

Paso	Tiempo	Temperatura
Hold	30 min	16°C
Hold	30 min	42°C
Hold	5 min	85°C
Hold	∞	4°C

5.4.5 qPCR

La qPCR se realizó con Maxima Probe qPCR Master Mix (Thermo Fischer) y sondas Taqman específicas para cada miRNA, y se realizó en el instrumento QuantStudio 6 (Applied Biosystems). Se mezclaron los reactivos en un volumen total de 10µl por reacción (Tabla 14), y se utilizó el programa de acuerdo a la tabla 15.

Tabla 14. Reactivos para qPCR de miRNAs

Componente	Volumen
Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix	5µl
20x TaqMan Gene Expression Assay Mix	0.5 µl
cDNA	4.5µl

Tabla 15. Programa para qPCR

	Opcional	Activación de enzima	PCR	
Paso	HOLD	HOLD	40 ciclos	
Temperatura	50°C	95°C	95°C	60°C
Tiempo	2 min	10 min	15 seg	60 seg

5.5 Plan de análisis

5.5.1 Análisis estadístico de las variables bioquímicas

La normalidad de las variables bioquímicas fue evaluada por gráficos de normalidad, histogramas, gráficos de cajas y bigotes y por la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Las variables bioquímicas que no cumplieron con los criterios de normalidad fueron transformadas con logaritmo base 2 y la normalidad fue evaluada nuevamente. Si aún no se cumplían los criterios de normalidad, se utilizaron pruebas no paramétricas como Mann-Whiney-Wilcoxon y Spearman.

Cuando los criterios de normalidad fueron cumplidos, se utilizó la prueba t con ajuste de Welch para la diferencia estadística entre casos y controles de las variables bioquímicas y la expresión relativa de miRNAs por qPCR y la correlación de Pearson para evaluar la asociación entre los parámetros bioquímicos y la expresión relativa de miRNAs.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con los softwares GraphPad 6 Prism y R versión 3.3.1.

5.5.2 Análisis de datos de microarreglos de expresión

Los datos de los microarreglos fueron analizados en el ambiente R/Bioconductor con los paquetes *Affy*²¹⁵, *Oligo*²¹⁶, *pd.mirna.3.0*²¹⁷ y *LIMMA (Linear Models for Microarray Analysis)*^{216,218}.

Primeramente, se realizó una evaluación de calidad de los microarreglos por medio de gráficos de cajas y bigotes e histogramas. Después, se utilizó el algoritmo *Robust Multiarray Average (RMA)* para el pre procesamiento de los datos. RMA usa un modelo a nivel de sonda para realizar ajuste de ruido de fondo, normaliza los datos por medio de cuantiles e integra todas las sondas correspondientes a un gen en un solo valor^{219–221}. Posteriormente, el paquete *LIMMA* se utilizó para ajustar los datos a un modelo lineal generalizado, y para la comparación estadística entre los grupos por medio del método de Bayes²²². La comparación de los grupos se hizo tomando como referencia al grupo control.

5.5.3 Búsqueda de genes blanco

La búsqueda de los genes blanco validados experimentalmente y predichos se realizó sólo en los sitios de unión 3'UTR y se utilizaron dos bases de datos diferentes: TargetScan y miRWalk.

Genes blanco validados experimentalmente

El modulo de genes validados de miRWalk fue utilizado para esta búsqueda. Este modulo documenta las interacciones miRNA-gen blanco verificadas experimentalmente por medio de la búsqueda y minaje de datos automatizados en PubMed y búsqueda en las bases de datos miRTarBase, PhenomiR 2.0, miR2Disease y HMDD. Hasta ahora incluye 13, 650 publicaciones de interacciones miRNA-gen blanco validadas²²³.

Genes blanco predichos

TargetScan y TargetScan Custom predicen los blancos biológicos de miRNAs y otros RNAs pequeños por medio de la búsqueda de sitios 8mer (nucleótidos 2-8 seguido de un nucleótido de adenina), 7mer-m8 (nucleótidos 2-8), 7mer-A1 (nucleótidos 2-7, seguido de una adenina) y 6mer (nucleótidos 2-7) que coinciden con la secuencia semilla del miRNA^{224,225}.

Por otro lado, miRWalk conjunta y compara la información de los sitios de unión en genes blanco predichos de 12 diferentes bases de datos, DIANA-microT, DIANA-microT-CDS, miRanda, mirBridge, miRDB, miRmap, miRNAMap, doRiNA (PicTar2), PITA, RNA22, RNAhybrid y TargetScan. La elección de las bases de datos se puede personalizar y utilizar hasta 5 bases diferentes. En este estudio se seleccionaron las bases miRWalk, DIANA-microT-CDS, PicTar2, miRDB y TargetScan debido a que estas bases de datos son actualizadas constantemente y son ampliamente utilizadas²²³.

5.6 Análisis de enriquecimiento de miRNAs asociados a rutas metabólicas

El análisis de enriquecimiento de rutas metabólicas se realizó con las bases de datos DIANA-miRPath²²⁶ y *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID)²²⁷.

DIANA-miRPath utiliza blancos predichos por DIANAmicroT-CDS para construir rutas metabólicas tomando como referencia la base de datos *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Pathways* (KEGG Pathways). También puede hacer la búsqueda de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en sitios de unión de miRNAs^{226,228,229}.

La búsqueda de rutas metabólicas en DAVID se realizó con la lista de genes blanco predichos por al menos 4 bases de datos de miRWalk. Por medio de DAVID se eligieron 3 bases de datos para el análisis de enriquecimiento de rutas metabólicas, estas bases fueron KEGG, *Protein Analysis Through Evolutionary Relationships* (PANTHER) y REACTOME²³⁰⁻²³².

5.7 Análisis de expresión de miRNAs por qPCR

El método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ^{233,234} fue utilizado para el análisis de expresión relativa por qPCR de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \frac{SM(Ct \text{ miRNA} - Ct \text{ cel-miR-39})}{\text{Control}(Ct \text{ miRNA} - Ct \text{ cel-miR-39})}$$

Se utilizó como calibrador el miRNA sintético exógeno cel-miR-39 (Applied Biosystems), este fue agregado a las muestras después de paso de desnaturalización con el reactivo TRIzol durante la extracción de RNA. Se agregó un total de 50 fmol diluidos en 5ul.

La adición de un miRNA sintético exógeno a la muestra permite el monitoreo de la eficiencia tanto de la extracción de RNA como de la qPCR. Cel-miR-39 (5'-UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG-3') no tiene secuencias homólogas en el humano, por lo que es utilizado ampliamente en estudios de expresión de miRNAs como calibrador debido a que hasta ahora no se ha identificado un miRNA que pueda ser utilizado como calibrador, especialmente cuando se trata de muestras como plasma. También se ha demostrado que la adición de un miRNA sintético exógeno no se ve afectado por hemólisis de la muestra^{198,235}.

Posteriormente, se realizó la prueba T para la diferencia estadística utilizando los datos normalizados.

6. RESULTADOS

6.1 Muestras de estudio

6.1.1 Grupo de descubrimiento

Se seleccionaron 10 mujeres con diagnóstico de SM y 10 mujeres sin enfermedad diagnosticada pareadas por edad. Las muestras de plasma se utilizaron para la determinación de parámetros bioquímicos y extracción de RNA el cual fue usado para realizar los microarreglos de expresión. Dos casos con SM fueron eliminados debido a baja calidad en los microarreglos.

En la tabla 16 se muestran las características de la muestra y la diferencia estadística. Se encontraron diferencias significativas entre los casos y los controles en el peso, IMC, presión arterial sistólica y diastólica, circunferencia de cintura, HDL y TG por medio de la prueba T.

Tabla 16. Características de la población. Grupo de descubrimiento.

Parámetro	Media Control (D.E.) n=10	Media Caso (D.E.) n=8	p
Edad (años)	38.8 (2.09)	40.25 (3.01)	0.27
Presión arterial sistólica (mmHg)	106 (12.42)	124.5 (15.82)	0.017
Presión arterial diastólica (mmHg)	68 (6.28)	83.87 (10.34)	0.002
Peso (kg)	57.97 (7.49)	82.3 (10.71)	0.0001
IMC (kg/m ²)	25.14 (2.74)	35.25 (2.81)	1.51E-06
Circunferencia de cintura (cm)	81.7 (3.34)	102.37 (4.30)	4.93E-08
Colesterol HDL (mg/dL)	47.24 (8.60)	38.37 (5.97)	0.02
Triglicéridos (mg/dL)	93.16 (23.33)	217.75 (71.64)	0.001
Glucosa (mg/dL)	88.02 (11.7)	91 (10.5)	0.577

6.1.2 Grupo de validación

Para la validación de los resultados del grupo de descubrimiento se seleccionaron 13 mujeres con diagnóstico de SM y 16 mujeres sin diagnóstico de enfermedad. Al igual que en el grupo de validación, las muestras de plasma fueron utilizadas para la determinación de parámetros bioquímicos y extracción de RNA que en este caso fue utilizado para validación de resultados por qPCR.

Los pacientes y controles de esta muestra fueron elegidos con características similares a la muestra de descubrimiento y se encontraron diferencias significativas en todas las variables analizadas (Tabla 17).

Tabla 17. Características de la población. Grupo de validación.

Parámetro	Media Control (DE) n=16	Media Caso (DE) n=13	p
Edad (años)	26.81(9.95)	45.92(15.05)	1.27E-07
Presión arterial sistólica (mmHg)	106(13.03)	123.76(14.21)	6.86E-13
Presión arterial diastólica (mmHg)	69.68(10.51)	76.84(12.68)	4.95E-11
Peso (kg)	55.27(8.37)	67.95(11.73)	8.47E-11
IMC (kg/m)*	21.86(1.12)	30.72(1.16)	1.02E-17
Circunferencia de cintura (cm)*	73.71(1.08)	95.99(1.07)	7.00E-23
Colesterol HDL (mg/dL)	56.34(10.15)	33(4.7)	8.95E-12
Triglicéridos (mg/dL)**	65.38 (1.28)	257.06(1.36)	1.32E-16
Glucosa (mg/dL)	88.25 (8.84)	93.23(8.62)	5.24E-14
Colesterol Total (mg/dL)	88.22(8.84)	194.84(28.88)	1.40E-11

*Datos transformados con logaritmo base 2

**Prueba Mann-Whitney-Wilcoxon

6.2 Análisis de microarreglos de expresión

6.2.1 Control de calidad y pre-procesamiento de los datos de microarreglos

La calidad de los microarreglos se evaluó por medio de histogramas y gráficos de cajas y bigotes (Figura 12 y 13). Dos muestras fueron eliminadas debido a baja calidad en los datos de los microarreglos, por lo que en los gráficos se muestran 18 muestras totales, los cuales representan 8 casos y 10 controles.

Figura 12. Histograma de datos crudos

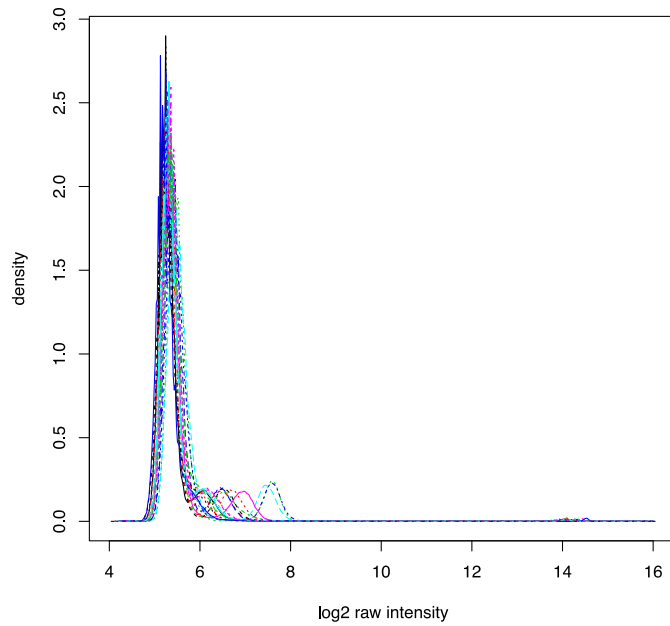
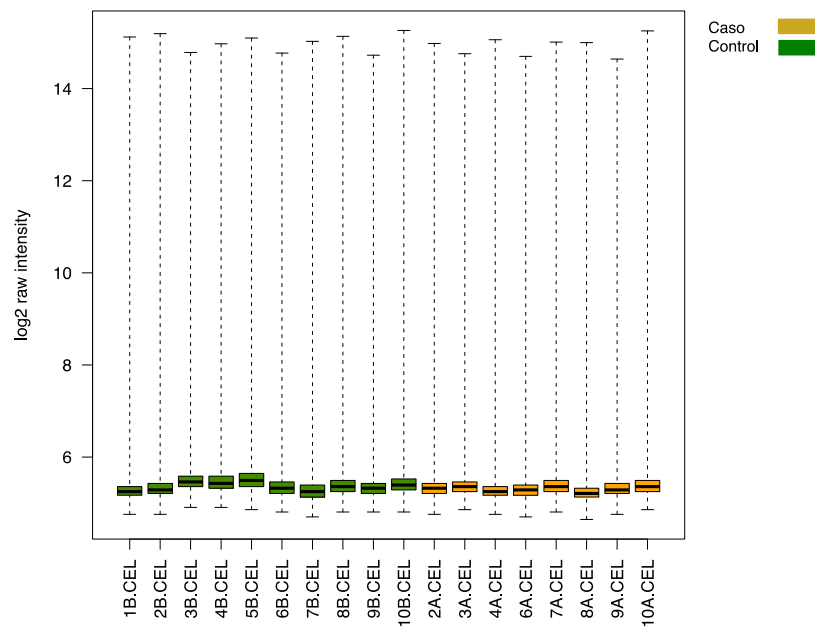


Figura 13. Gráfico de cajas y bigotes de datos crudos



Sin embargo, en este tipo de estudios es necesario realizar un pre procesamiento de los datos incluyendo normalización, corrección del ruido de fondo e integración de todas las sondas de un mismo gen a un solo valor de intensidad. Este pre procesamiento se realizó con el algoritmo RMA (Figura 14 y 15).

Figura 14. Histograma de datos procesados con el algoritmo RMA

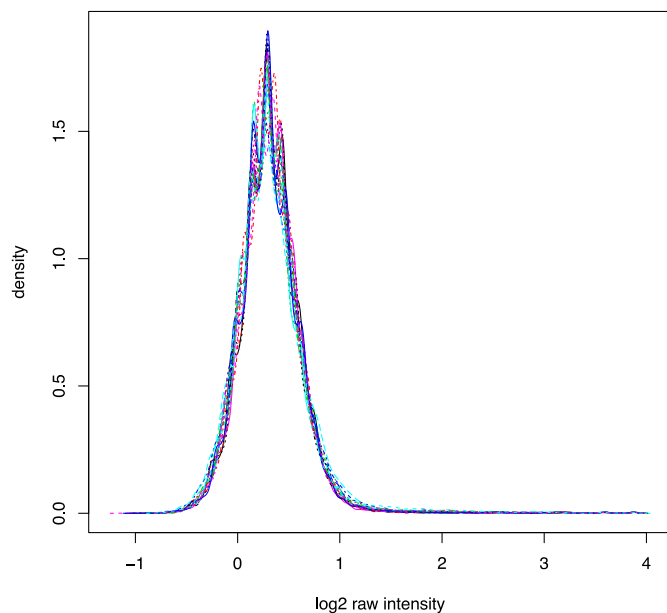
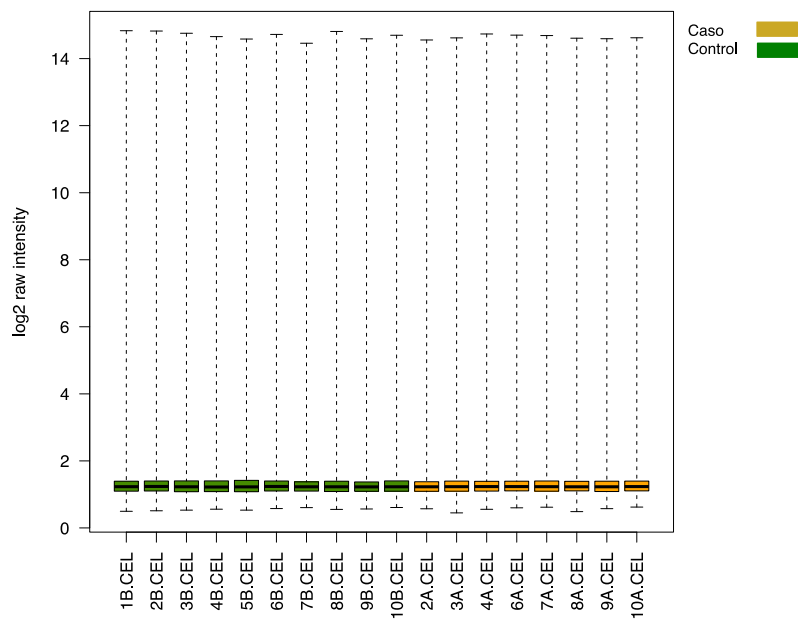


Figura 15. Gráfico de cajas y bigotes de datos procesados con el algoritmo RMA



6.2.2 Análisis de expresión diferencial

Una vez pre procesados los datos, se realizó el análisis de expresión diferencial utilizando el paquete LIMMA. Tomando como significativa $p < 0.01$, razón de cambio > 1.2 y estadístico $B > -2$ se encontraron 67 RNAs diferencialmente expresados de los cuales 28 son snoRNAs C/D Box (42%), 21 son miRNAs maduros (31%), 15 son pre-miRNAs (22%) y 3 son snoRNAs H/ACA Box (4%) (Figura 16 y 17, Apéndice I).

Figura 16. Gráfico de pastel representando distribución de los tipos de RNAs pequeños diferencialmente expresados

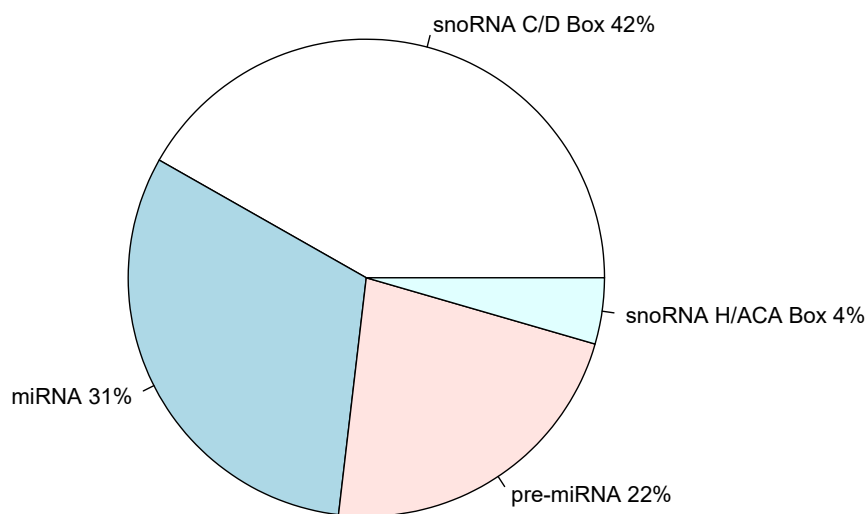
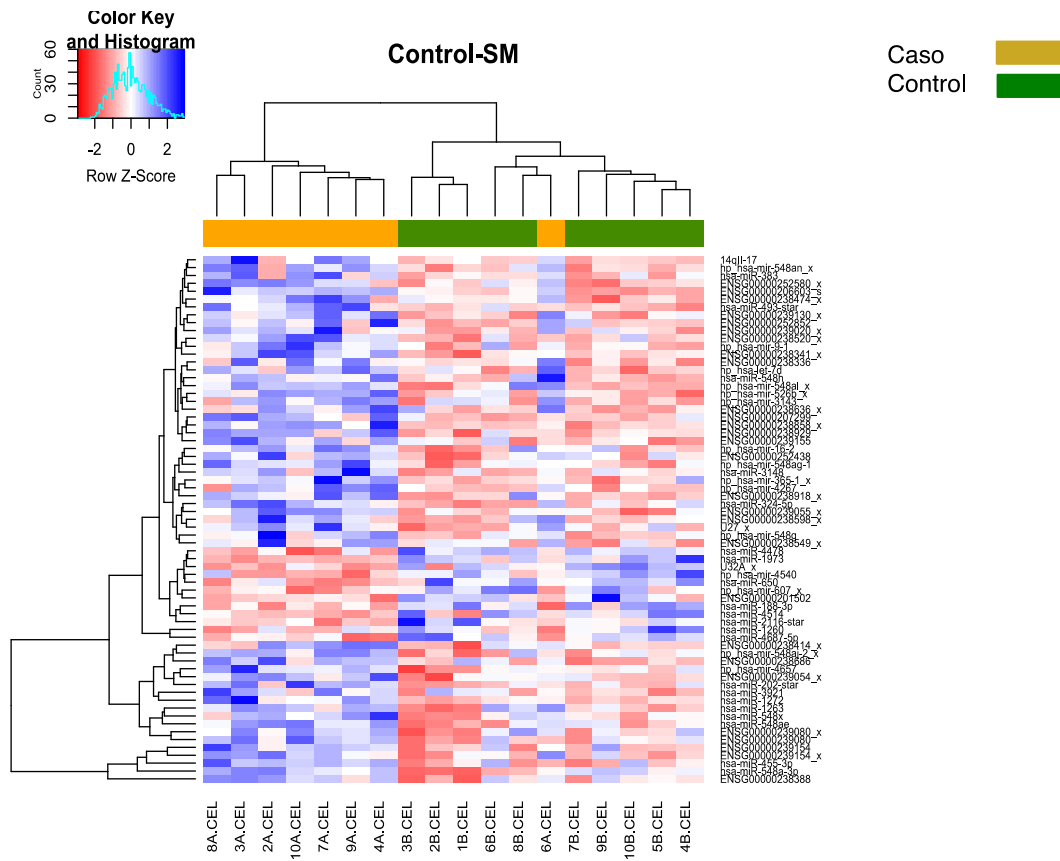




Figura 17. Mapa de calor de los RNAs diferencialmente expresados



Debido a que los objetivos de este estudio se refieren a la expresión de miRNAs, nos enfocaremos sólo en estos. En la tabla 18 se muestran los estadísticos de los miRNAs diferencialmente expresados.

Tabla 18. miRNAs diferencialmente expresados.

Regulación	miRNA	p	B	Razón de cambio
	hsa-miR-455-3p	0.0013	-0.9177	2.811
	hsa-miR-1263	0.0004	0.0694	1.8775
	hsa-miR-1272	0.0003	0.3427	2.3069
	hsa-miR-202-3p	0.0004	0.0707	1.6556
	hsa-miR-3148	0.0019	-1.2685	1.3883
	hsa-miR-324-5p	0.0001	1.0276	1.3753
	hsa-miR-383	0.0039	-1.8462	1.2237
	hsa-miR-3921	0.0037	-1.7927	1.6422
	hsa-miR-493-3p	0.0022	-1.3795	1.2178
	hsa-miR-548a-3p	0.0021	-1.3386	2.7863
	hsa-miR-548ae	4.01E-05	1.8744	2.5531
	hsa-miR-548h	0.0011	-0.7947	1.3524
	hsa-miR-548x	0.0009	-0.6573	2.0188
		hsa-miR-1260	0.0025	-1.4828
hsa-miR-188-3p		0.0002	0.4879	1.284
hsa-miR-1973		0.0006	-0.3356	1.2211
hsa-miR-2116		0.0044	-1.9306	1.3575
hsa-miR-4478		0.0006	-0.2905	1.2147
hsa-miR-4514		0.0028	-1.5549	1.3252
hsa-miR-4687-5p		0.0001	0.8506	1.5051
hsa-miR-650		0.0014	-1.0259	1.2254

6.3 Genes blanco validados

La búsqueda de genes blanco validados experimentalmente de los 21 miRNAs se realizó en miRWalk. Esta búsqueda dio como resultado 369 genes blanco validados, sin embargo, estos genes sólo corresponden a hsa-miR-1260, hsa-miR-188-3p, hsa-miR-324-5p, hsa-miR-383, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-548a, hsa-miR-548h y hsa-miR-650. En la tabla 19 se muestran los genes blanco validados relacionados con el metabolismo y el SM, cabe mencionar que aún no se han validados genes blanco de hsa-miR-1260, hsa-miR-548a y hsa-miR-548h que estén relacionados con el metabolismo y SM.

Tabla 19. Genes blanco validados experimentalmente

Regulación	miRNA	Gen blanco
↓	hsa-miR-324-5p	ALDOA, APOF, ARNT, SCARB1, CDS1, MYO1C, SCD, TCF7L2, DYRK1B, MAPKAPK2, COX5A, ELOVL5, STXBP4
	hsa-miR-383	IGF1R, IRF1, VEGFA, PRDX3
	hsa-miR-455-3p	SCD, ELOVL1, LRP11, RUNX1T1, NECDIN, HIF1AN

6.4 Genes blanco predichos

La búsqueda de los genes blanco de los miRNAs diferencialmente expresados se realizó por medio de los programas TargetScan, TargetScan Custom y miRWalk. Este análisis dio como resultado un gran número de genes blanco (>3,000), por lo que en la tabla 20 sólo se muestran los genes blanco predichos relevantes en las enfermedades metabólicas.

Tabla 20. Genes blanco predichos

Regulación	miRNA	Gen blanco
	hsa-miR-455-3p	ACAD8, ADIPOR1, ABCB1, GPAM, HIF1AN, FABP4, LRP6, PLCB2, SUCLA2, VEGFC
	hsa-miR-1263	ABCC1, EBF2, EFNA3, IL1A, KDR, LEPR, NFAT5, PIK3CB, RPS6KA3, RBL2
	hsa-miR-1272	LRAT
	hsa-miR-202-3p	ADIPOR2, ACSL3, CREB1, ESR1, FAR1, LOX, MARCH6, PANK3, WISP1
	hsa-miR-3148	ABCD3, ACADM, ACADSB, ACLY, ACOX1, ACSL1, ACSL4, ACSL6, ADIPOQ, AKT2, CAMKK2, CASP2, CREB1, CSRNP2, ELOVL7, FOXO1, G6PC2, GPD1, IL16, IL6ST, INSIG2, IRF4, JAK2, LOX, LPCAT1, LPCAT2, LRAT, MARCH6, NRROS, PANK1, PTPN11, PRKAB2, PPARGC1A, PPARGC1B, PCSK1, SPTLC2, STAT1, TGFB2
	hsa-miR-324-5p	FAXDC2, CPT1A, MGAT3
	hsa-miR-383	ADIPOR2, CLEC16A, GLS, IL17RD, IL1RL1, INSIG2, PANK1, PCSK2, SCD, WNT2
	hsa-miR-3921	ACACA, ADIPOQ, PIK3CB, G6PC2, PRKAB2, MAPK1, SLC2A2, CACNA1E, FIGF, RICTOR, HIF1A, EIF4E2, PRKAB2, CAMK2A, LBP, ABCD3, CCR5, DHCR24, LDLRAD4, MAPK1, MARCH6, NPR3, TXNIP, VCAM1
	hsa-miR-493-3p	ABCD2, CCR5, CREB1, DGKD, EBF2, FOXO1, HMGCR, HMGCS1, IL1A, IL8, LRP6, LRP12, LDLRAD4, LDLR, LRP12, LRP6, MAPK3K1, MAPK1, NPR3, PDPK1, TNFSF11, TNFAIP6, VAMP2, WNT5A
	hsa-miR-548a-3p	EBF2, FAR1, FTO, HMG20A, HMGCS1, IL2RA, ILDR1, LPPR1, MAFB, MAPK1, PCSK1, PNPLA4, PPARA, SQLE, VASP
	hsa-miR-548ae	ACACB, ACSL3, ACSL6, ACOT2, AKT3, CALM1, CBLB, CRKL, CREB1, CROT, DGKE, EIF4E, ELOVL4, FOXO1, G6PC, GSK3B, GRB2, IGF1BP3, IL22RA2, IL33, IL6R, INSR, IRS2, JAK2, KRAS, LRP6, LEPR, MAPK8, MKNK2, NRAS, NCOR1, PANK3, PANK1, PRKAA2, PIK3CA, PIK3CB, PRKCI, PPARG, PPP1CC, PRKAR2A, PRKAA1, PRKAR1A, PPARGC1A, PPARGC1B, PPP1R3A, PPP1R3B, PRKAR2B, PANFIRS2, TNFRSF1A, SOCS3, SOD2, SQLE, TXNIP, VASP
	hsa-miR-548h	ABCB11, ACADM, ACOX1, CREB1, FABP3, GPD2, IL6ST, IRF2BP2, JAZF1, L22RA2, LRP1B, MYLIP, NFKB1, PPARA, PPARG, STAT1, STEAP4, VLDLR
	hsa-miR-548x	ABCA5, ACADSB, ACSL3, ACVR1C, AGK, CARTPT, CREB1, CROT, EBF2, ELOVL4, ESR1, GLUL, IRS2, IL6R, IL8, IRF4, LRP6, IGF1BP1, IL22RA2, IL6R, IL8, IRF4, LDLRAD4, LPCAT2, LRP6, PPARGC1B, SCD, SOAT1, SPTLC3, SQLE, VASP
	hsa-miR-1260	ADIPOR2, CSRNP2, GLP1R, IL11, PGM5, SCD
	hsa-miR-188-3p	AADAC, ABCB1, ADIPOR2, ALG10, ANGPTL3, ABCG4, CREB1, DHCR24, ELOVL4, FABP4, GPX4, IL17RD, IRS2, IGF1BP4, LPPR4, MLXIP, PLCXD3, STAT1, SCD, VASP
	hsa-miR-1973	
	hsa-miR-2116	ABHD5, ACVR1C, ADIPOR2, EBF2, IGF1R, ILDR2, LPCAT2, LEPROT, PLD6, PPT1, SGPP1
	hsa-miR-4478	CCR5, GERS6, CTF1, DAGLA, GPI, IL13, LDLRAD1, LPIN2, LRP5L, PLA2G7, PDP2, PLIN3, UCP3
	hsa-miR-4514	ACSL3, ACSBG2, CREB1, HADHA, HMG20A, INSR, LANCL2, LRP4, MAP2K1, MAPK1, MCHR2, NPR3, PANK4, PRKACA, PTPN11, RXRB, MAPK1, SOCS2, SPTLC2, STAT3, VCAM
	hsa-miR-4687-5p	ABHD15, ACACA, CACNB4, PRKCB, SDHC
	hsa-miR-650	ACACA, ADIPOQ, ACBD7, ACP, AGPAT4, FA2H, GLP1R, LDLRAP1, LRP6, MAPK1, NOS1, SCD, USF2, WNT1



6.5 Análisis de enriquecimiento de vías metabólicas

El análisis de enriquecimiento de las vías de señalización en las cuales participan los miRNAs diferencialmente expresados se realizó por medio de los programas DIANA-mirPath y DAVID, en el cual se seleccionaron las bases KEGG, PANTHER y REACTOME.

DIANA-miRPath arrojó 93 vías significativas, DAVID-KEGG arrojó 46 vías, DAVID-PANTHER dio 26 vías y DAVID-REACTOME dio 17 vías significativas. Estos resultados se conjuntaron y las vías metabólicas relevantes para el SM que coincidieron en dos o más bases de datos se muestran en la tabla 21.

Tabla 21. Análisis de enriquecimiento de vías metabólicas en las que participan los miRNAs diferencialmente expresados

Vía de señalización	p	Número de genes	Número de miRNAs reguladores
PI3K-Akt	5.57E-17	143	18
Wnt	1.04E-12	74	19
Adipocitoquinas	1.80E-12	35	14
Insulina	4.46E-11	61	17
Receptor de células B	6.65E-10	36	14
Ritmo circadiano	7.11E-10	21	10
HIF-1	7.75E-08	49	15
Jak-STAT	7.94E-06	62	16
Biosíntesis de glicosaminoglicanos	0.0004	14	10
VEGF	0.0004	28	15
Sistema fosfatidilinositol	0.0007	40	17
Secreción pancreática	0.0008	39	15
mTOR	0.0015	27	13
Apoptosis	0.0024	39	13
Metabolismo de inositol fosfato	0.0076	26	13
Biosíntesis de esteroides	0.0201	10	9

6.6 miRNAs elegidos para validación

La elección de los miRNAs para validación por qPCR fue basada tomando en cuenta estadísticos significativos, genes blanco validados y predichos y el análisis de enriquecimiento de vías metabólicas.

De acuerdo a estos criterios, 10 miRNAs fueron elegidos para validación por qPCR. Estos son:

- hsa-miR-1260
- hsa-miR-1263
- hsa-miR-188-3p
- hsa-miR-3148
- hsa-miR-383
- hsa-miR-3921
- hsa-miR-4514
- hsa-miR-455-3p
- hsa-miR-4687-5p
- hsa-miR-548ae

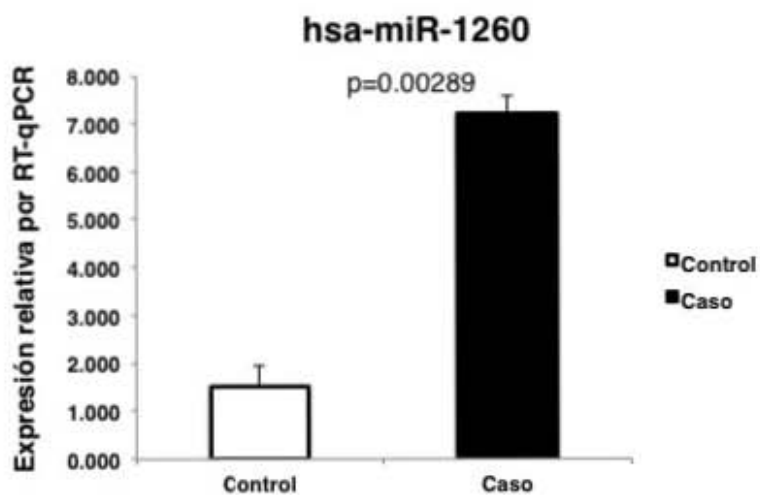
6.7 Resultados de validación por qPCR

Desafortunadamente miR-548ae, miR-188-3p, hsa-miR-3148, hsa-miR-3921, hsa-miR-383, hsa-miR-1263 y hsa-miR-455-3p no tuvieron amplificación en todas muestras, por lo tanto, fueron excluidos del análisis.

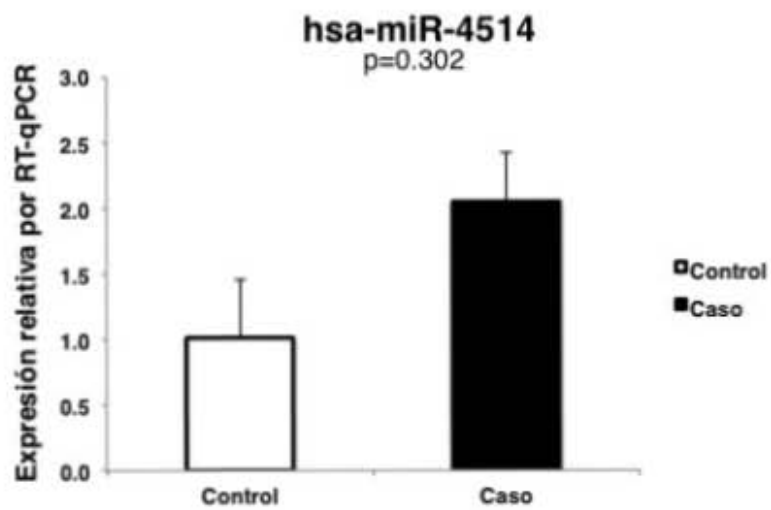
Hsa-miR-4514, hsa-miR-1260 y hsa-miR-4514 se encontraron elevados en el grupo de SM comparado con el grupo control, lo cual es consistente con los resultados de los microarreglos. Solo hsa-miR-1260 tuvo diferencia estadísticamente significativa ($p=0.00289$), hsa-miR-4514 y hsa-miR-4687-5p no alcanzaron significancia estadística, aunque los resultados muestran un claro incremento en el grupo de SM, posiblemente estos resultados sean contundentes al incrementar el número de participantes (Figura 18).

Figura 18. Expresión relativa de miRNAs por qPCR. Datos normalizados con cel-miR-39. a) hsa-miR-1260. b) hsa-miR-4514. c) hsa-miR-4687-5p

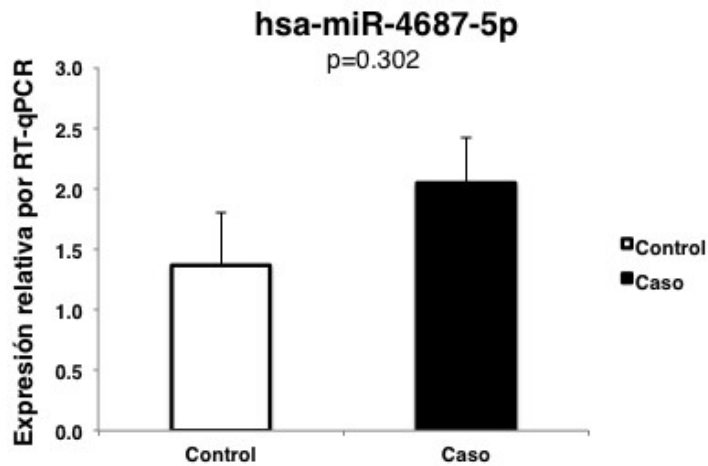
a)



b)



c)



6.8 Asociación de la expresión de miRNAs y fenotipos del SM

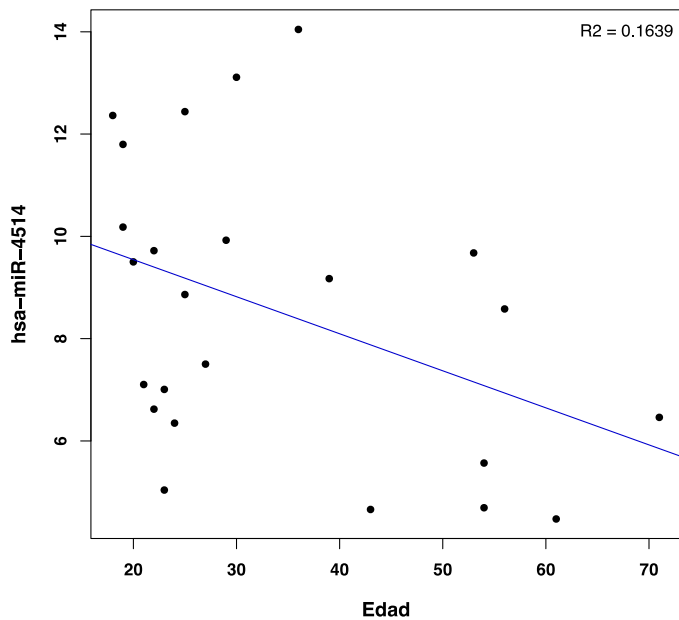
La asociación de la expresión relativa de miRNAs y los fenotipos del SM fue evaluada por la correlación de Spearman. Se encontraron asociaciones significativas con edad, colesterol total y TG (Tabla 22, Figura 19).

Tabla 22. Correlación de Spearman entre miRNAs y fenotipos del SM

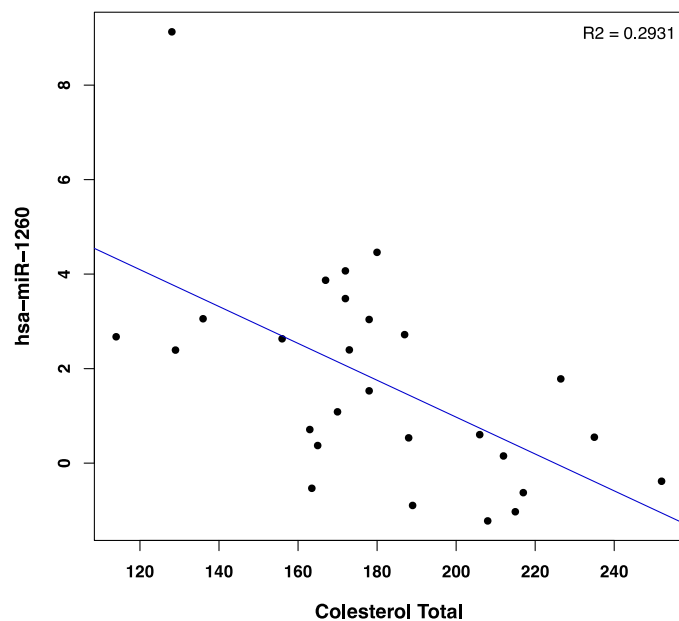
miRNA		Edad	Presión arterial sistólica	Presión arterial diastólica	Peso	Circunferencia de cintura	Colesterol total	C-HDL	Triglicéridos	Glucosa	IMC
hsa-miR-1260	R	-0.1537	-0.3109	-0.0367	-0.2210	-0.2209	-0.5414	0.2986	-0.5055	-0.1599	-0.2167
	p	0.4441	0.1145	0.8559	0.2680	0.2683	0.0035	0.1303	0.0072	0.4257	0.2776
hsa-miR-4687-5p	R	-0.1556	-0.1156	0.0129	-0.0744	0.0989	-0.1922	0.1211	-0.2581	-0.2510	-0.0131
	p	0.4292	0.5579	0.9481	0.7066	0.6167	0.3272	0.5393	0.1848	0.1976	0.9471
hsa-miR-4514	R	-0.4048	-0.2431	0.0814	-0.1287	-0.1531	0.0761	0.2032	-0.0104	0.0488	-0.2530
	p	0.0498	0.2524	0.7052	0.5490	0.4750	0.7237	0.3409	0.9614	0.8209	0.2329

Figura 19. Gráficos de dispersión correspondientes a la correlación de Spearman. a) Correlación entre hsa-miR-4514 y edad. b) Correlación entre colesterol total hsa-miR-1260 . c) Correlación entre TG y hsa-miR-1260

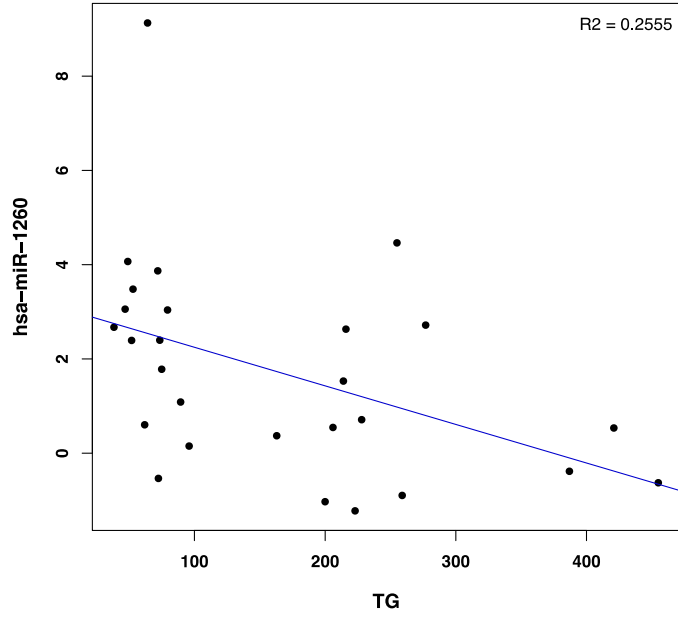
a)



b)



c)



DISCUSIÓN

El SM es un problema de salud pública a nivel mundial, su prevalencia ha ido en rápido aumento en los últimos 20 años y este va en conjunto con el aumento de la prevalencia de obesidad, que es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo del SM.

A pesar de la gran cantidad de investigación realizada, aún no se conocen por completo los factores implicados en el SM. Existe evidencia significativa indicando que los miRNAs juegan un papel importante en numerosos procesos celulares y en varias enfermedades, incluyendo las enfermedades metabólicas. Sin embargo, son pocos los estudios enfocados al perfil de expresión de miRNAs circulantes en el SM.

Por lo tanto, en este estudio nos hemos planteado como objetivo principal analizar el perfil de expresión diferencial de miRNAs plasmáticos en el SM. Se utilizaron 8 muestras de plasma de pacientes con SM y 10 muestras de mujeres sin enfermedad diagnosticada para la evaluación del perfil de expresión de miRNAs plasmáticos por medio microarreglos de expresión. El microarreglo utilizado no sólo evalúa la expresión de miRNAs, también incluye las secuencias de otros tipos de RNAs como pre-miRNAs, snoRNAs C/D Box, snoRNAs H/ACA Box, scaRNAs y rRNAs. En esta fase del estudio se identificaron 67 RNAs diferencialmente expresados, de los cuales 3 son snoRNA H/ACA Box, 21 son miRNAs maduros, 15 son pre-miRNAs y 28 son snoRNA CD Box. En base a estadísticos, a la predicción de los genes blanco y a el análisis de enriquecimiento de rutas metabólicas se eligieron 10 miRNAs para su validación por qPCR en una muestra independiente. Esta muestra consistió en 13 pacientes con SM y 16 personas sin enfermedad. Sin embargo, no todos los miRNAs elegidos pudieron ser validados. Los miRNAs que se validaron por qPCR son hsa-miR-1260, hsa-miR-4514 y hsa-miR-4687-5p.

7.1 Expresión diferencial evaluada por microarreglos

La expresión diferencial del grupo de descubrimiento fue evaluada por medio de microarreglos de expresión GeneChip miRNA 3.0 de la plataforma Affymetrix, el cual no sólo evalúa la expresión de miRNAs, también incluye las secuencias de otros tipos de RNAs como pre-miRNAs, snoRNAs C/D Box, snoRNAs H/ACA Box, scaRNAs y rRNAs. Los snoRNAs están divididos en dos grandes familias dependiendo de su estructura y función principal: C/D Box snoRNAs y H/ACA box snoRNAs. Los C/D Box snoRNAs participan en la metilación 2'-O y los H/ACA Box snoRNAs guían la pseudouridilación de

nucleótidos. Recientemente, se han identificado otras funciones de los snoRNAs, entre ellas la capacidad de regulación post transcripcional de genes y degradación de estos²³⁶. De igual manera, algunos snoRNAs se han relacionado con padecimientos como cáncer, desordenes neurodegenerativos, enfermedades virales²³⁷.

Se ha reportado que el C/D Box snoRNA U60 participa en la regulación del transporte intracelular del colesterol. La deficiencia de U60 resulta en disminución en el transporte del colesterol desde la membrana plasmática al retículo endoplásmico²³⁸.

Michel y colaboradores identificaron a los snoRNAs U32a, U33 y U35a como mediadores del estrés metabólico. Estos snoRNAs se encuentran en los intrones de *ribosomal protein L13a* (rpL13a). Es interesante mencionar que la pérdida de esta proteína en macrófagos de ratones apoE^{-/-} incrementa la susceptibilidad de aterosclerosis²³⁹. El estrés oxidativo y la lipotoxicidad inducen importantemente la expresión de U32a, U33 y U35a, sin afectar la expresión de rpL13a. Experimentos en animales indican que estos snoRNAs son clave en la respuesta al estrés oxidativo incluyendo la producción de superóxido, carbonilación de proteínas y oxisteroles²⁴⁰.

En este estudio los niveles plasmáticos de U32a se encontraron elevados en el grupo de SM (p=0.0021, razón de cambio=1.211, estadístico B= -1.3514, Apéndice I). Lo cual podría indicar que en este grupo los niveles de U32a son reflejo de lo que sucede dentro de la célula. Estos resultados y la evidencia existente confirman la importancia de validar los resultados de este snoRNA y otros tipos de RNAs por qPCR y estudiar el papel de estos en el SM y enfermedades metabólicas.

También se encontraron 15 pre-miRNAs diferencialmente expresados. Sin embargo, no existen muchos estudios que evalúen la expresión diferencial de pre-miRNAs y su relación con enfermedades. Lo cual representa una oportunidad para estudios futuros acerca de la desregulación de estos pre-miRNAs en el SM.

Algunos de los miRNAs que se hallaron diferencialmente expresados en este estudio ya han sido relacionados con las enfermedades metabólicas, entre ellos están hsa-miR-493-5p y hsa-miR-650.

Hsa-miR-493-3p que se encuentra enriquecido en islotes pancreáticos, sin embargo, no se han encontrado diferencias significativas en la expresión de este miRNA en muestras de islotes pancreáticos de sujetos intolerantes a la glucosa y sujetos normales²⁴¹. En esta tesis se encontró que los niveles plasmáticos de este miRNA están disminuidos en el SM, esta disminución podría estar implicada en el desarrollo del SM, debido a que los genes blanco de este miRNA incluyen citocinas y genes proinflamatorios como IL1A, WNT5A, NPR3, TNFSF11, TNFAIP6. Por lo que se puede pensar que la expresión de estos genes se encuentra aumentada debido a que la regulación post transcripcional de estos mediada por hsa-miR-493-3p se encuentra disminuida.

En este estudio encontramos a miR-650 incrementado en el SM, e interesantemente, se ha reportado que este miRNA se encuentra desregulado en algunos tipos de cáncer, úlcera, apoptosis, infección por virus de hepatitis C y la expresión de este se encuentra aumentada en tejido cardíaco de pacientes diabéticos con falla cardíaca isquémica en comparación con pacientes no diabéticos con este tipo de falla²⁴²⁻²⁴⁵.

7.2 Validación de miRNAs por qPCR

Dentro de los miRNAs diferencialmente expresados, hsa-miR-1260, hsa-miR-4514 y hsa-miR-4687-5p fueron validados por qPCR y es la primera vez que se ha demostrado la desregulación de estos en el SM.

La expresión de estos miRNAs esta incrementada en el SM, aunque solo hsa-miR-1260 tuvo diferencia estadísticamente significativa ($p=0.00289$), hsa-miR-4514 y hsa-miR-4687-5p muestran una clara tendencia al incremento en la expresión en el grupo de SM, probablemente al aumentar el número de individuos estas diferencias sean confirmadas.

Cabe mencionar que la validación se realizó en otro grupo de participantes, lo cual podría ser uno de los motivos por los que no todos los miRNAs tuvieron amplificación en todas las muestras debido a las diferencias fenotípicas entre ambos grupos. Otro motivo podría ser la baja expresión de estos miRNAs en el plasma, por lo que la sensibilidad del método de validación no es suficiente. Existen métodos de pre-amplificación previos al ensayo de qPCR que mejoran la sensibilidad y especificidad del método y tal vez sería la forma más indicada de validar estos resultados²⁴⁶. La cantidad inicial de RNA que se utilizó en la transcripción reversa probablemente también afectó la validación de los resultados. Esta cantidad inicial significativamente menor a la cantidad que se utilizó para la evaluación del perfil de expresión por medio de los microarreglos.

Para próximos estudios se deberá tomar en cuenta el número de individuos, aumento de la cantidad inicial de RNA en la transcripción reversa y los pasos de pre-amplificación para confirmar la veracidad de los resultados.

7.3 Genes blanco validados

Desafortunadamente, son pocos los genes blanco de miRNAs que han sido validados experimentalmente. Un gran número de los experimentos de validación han sido realizados en modelos de cáncer, lo cual limita los resultados de las búsquedas de

genes validados de este estudio, ya que la mayoría de estos no tienen relación con el SM. Cabe mencionar que la mayoría de estos genes blanco, han sido validados por técnicas de *Next Generation Sequencing*, específicamente por *Crosslinking, ligation, and sequencing of hybrids* (CLASH) que pueden tener un gran número de falsos positivos y por lo tanto estos resultados deben tomarse con precaución.

Hsa-miR-455-3p se expresa ampliamente en el músculo esquelético y TA, específicamente en el tejido adiposo marrón y su expresión se encuentra aumentada durante la diferenciación de este tipo de adipocitos tanto en ratones como en humanos²⁴⁷. *Runt-related transcription factor 1; translocated to, 1 (cyclin D-related)* (RUNX1T1), *Necdin, Melanoma Antigen (MAGE) Family Member* (NECDIN) e *hypoxia inducible factor 1, alpha subunit inhibitor* (HIF1AN) son genes blanco validados de hsa-miR-455-3p, estos genes blanco son conocidos por su actividad supresora de la adipogénesis. Durante la diferenciación de adipocitos el aumento DE la expresión de hsa-miR-455-3p disminuye significativamente la expresión de estos blancos. RUNX1T1 suprime la adipogénesis del TA blanco mediante la interacción con *CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta* (C/EBPb) e inhibiendo su actividad transcripcional. Adicionalmente, C/EBPb transactiva a los promotores de *CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha* (C/EBPa), PPARc, *fatty acid binding protein 4, adipocyte* (FABP4) y PGC1a, esta actividad es promovida significativamente por hsa-miR-455-3p. NECDIN bloquea la adipogénesis del TA marrón interactuando con factores de transcripción E2F e inhibiendo su capacidad de activar al promotor de PPARc1. La sobreexpresión de hsa-miR-455-3p disminuye la expresión de HIF1AN e induce la fosforilación de AMPKa. Se ha demostrado que la actividad de AMPKa1 esta aumentada durante la diferenciación de TA marrón e induce la B oxidación activando a la vía ACC/Malonyl-CoA/CPT1 en adipocitos. Esta evidencia indica que hsa-miR-455-3p desencadena las vías para iniciar la biogénesis mitocondrial, inducción de PGC1a y adipogénesis de TA marrón²⁴⁸.

En un estudio realizado en ratones ob/ob deficientes de leptina se encontró que los niveles de miR-383 estaban aumentados en el hipotálamo. Esta desregulación también se observó en ratones db/db con receptores de leptina no funcionales. Interesantemente, la inyección intraperitoneal de leptina en ratones ob/ob disminuyó los niveles de miR-383 en el hipotálamo, demostrando la participación de la leptina en la regulación de miR-383. Uno de los genes blanco de miR-383 es *pro-opiomelanocortin* (POMC) que tiene un papel clave en el balance energético. La disrupción de POMC causa hiperfagia y obesidad y su actividad en el hipotálamo esta regulada por la leptina. Sin embargo, la regulación leptina-miR-383-POMC no fue confirmada²⁴⁹. Además, uno

de los genes validados de miR-383 es IGF1R²⁵⁰, que activa directamente a IRS y la vía de señalización de insulina.

En concordancia con este estudio, Nesca y colaboradores encontraron niveles de miR-383 disminuidos en islotes pancreáticos de ratones db/db diabéticos, probablemente esta disminución resulta en disfunción y muerte de células B pancreáticas²⁵¹. Podría suponerse que los niveles disminuidos de miR-383 en plasma son reflejo de disfunción pancreática. Más estudios son necesarios para confirmarlo.

7.4 Genes blanco predichos

La búsqueda de los genes blanco predichos de los 21 miRNAs diferencialmente expresados arrojó una gran cantidad de genes blanco. Varios de estos genes son ampliamente conocidos y han sido estudiados en enfermedades metabólicas y SM, entre ellos se encuentran PPAR α y γ , ADIPOQ, ADIPOR2, MAPK1 y ELOVL4. Otros genes blanco predichos, a pesar de estar involucrados en el metabolismo, no han sido ampliamente estudiados y aún no se conoce como su desregulación puede afectar en el desarrollo de las enfermedades metabólicas. Por ejemplo, *Retinoid X Receptor, Beta* (RXRB) forma un heterodímero con PPAR γ y en conjunto promueven la transcripción de genes como *fatty acid binding protein 4*, *adipocyte* (FABP4), CD36, LPL, *solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 1* (SLC27A1), glicerol quinasa, *sterol regulatory element binding transcription factor 1* (SREBF1) y *stearoyl coA desaturase* (SCD)²⁵². RXRB es un gen blanco predicho de hsa-miR-4514, que se encuentra sobreexpresado en los pacientes con SM. Posiblemente la degradación del mRNA de RXRB mediada por hsa-miR-4514 puede afectar la formación del heterodímero con PPAR γ y la activación de las vías consecuentes, contribuyendo a la falla en la homeostasis del metabolismo de lípidos y promoviendo el desarrollo del SM.

Hsa-miR-1260 ha sido asociado a enfermedades como cáncer de mama, infección por virus de la influenza A, hepatocarcinoma y aneurisma aórtico²⁵³⁻²⁵⁵. Sin embargo, su papel en el SM aún no ha sido estudiado. ADIPOR2 es un blanco predicho de hsa-miR-1260 y existe evidencia de que los niveles de ADIPOR2 en leucocitos se encuentran significativamente disminuidos en sujetos obesos²⁵⁶. La regulación post transcripcional de este receptor mediada por hsa-miR-1260 podría impedir la vía de señalización de la adiponectina, inihbiendo la activación de AMPK y PPAR α y la oxidación de ácidos grasos²⁵⁷.

Stearyl coA desaturase (SCD) también es un gen blanco predicho de hsa-miR-1260. SCD codifica la enzima limitante en la síntesis de ácidos grasos monoinsaturados y cataliza la desaturación delta 9-cis de esteroil coA y palmitoil coA a oleoil coA y palmitoleoil coA, respectivamente. Posteriormente, estos son empleados en la síntesis de TG, ésteres de colesterol y fosfolípidos de membrana²⁵⁸. La deficiencia de SCD protege contra la obesidad, esteatosis hepática, hipertrigliceridemia y RI en ratones²⁵⁹⁻²⁶¹. En humanos los niveles de expresión de SCD han sido relacionados con riesgo de DM2, obesidad, resistencia a la insulina y esteatosis hepática²⁶²⁻²⁶⁴. Interesantemente, Matsui y colaboradores reportaron que en la expresión aumentada de SCD en cardiomiocitos incrementa la acumulación de lípidos, pero atenúa el exceso de oxidación de ácidos grasos y restaura la oxidación de glucosa. También se reportó que SCD inhibió la activación de CASP-3 mediada por los ácidos grasos saturados, síntesis de ceramidas y diacilglicerol, apoptosis y la generación de ROS por la mitocondria y concluyeron que la expresión de SCD está altamente regulada por el SM en el corazón y que la inducción de SCD alivia el catabolismo de ácidos grasos y eventualmente previene la apoptosis inducida por ácidos grasos saturados²⁶². Estos resultados parecen ser contradictorios y probablemente la regulación de SCD en el SM este mediada por la actividad de miRNAs como hsa-miR-1260. Es importante mencionar que SCD es un gen blanco validado de hsa-miR-324-5p por medio de CLASH. Más estudios son necesarios para verificar la interacción de SCD con hsa-miR-1260 y hsa-miR-324-5p, entre otros miRNAs y esclarecer el papel de SCD en el SM y su regulación post transcripcional.

Hsa-miR-4514 se encuentra sobreexpresado en el grupo de SM y uno de sus genes blanco predichos es INSR que media directamente la actividad de la insulina, como la fosforilación de IRS y la activación de la vía PI3-K/Akt. Por lo tanto, la degradación post traduccional de INSR mediada por hsa-miR-4514 podría contribuir al daño a importantes vías de señalización y promover la resistencia a la insulina y el desarrollo de SM.

Otro de los genes blanco predichos de hsa-miR-4514 es *cAMP responsive element binding protein* (CREB1) y *natriuretic peptide receptor 3* (NPR3), ambos activan a PGC1a^{265,266}. Interesantemente, en pacientes diabéticos los niveles de PGC1a se encuentran disminuidos²⁶⁷, probablemente esto sea consecuencia de la desregulación existente en sus activadores, CREB1 y NPR3 mediada por hsa-miR-4514.

Succinate dehydrogenase complex, subunit C, integral membrane protein 15 kDa (SDHC) es un blanco predicho de hsa-miR-4687-5p. Este gen codifica una de las subunidades que comprenden a la succinato deshidrogenasa, que es una enzima clave en el ciclo del ácido tricarbóxico y la cadena respiratoria de la mitocondria²⁶⁸. Se ha reportado que esta enzima se encuentra disminuida en el músculo esquelético de sujetos obesos²⁶⁹.

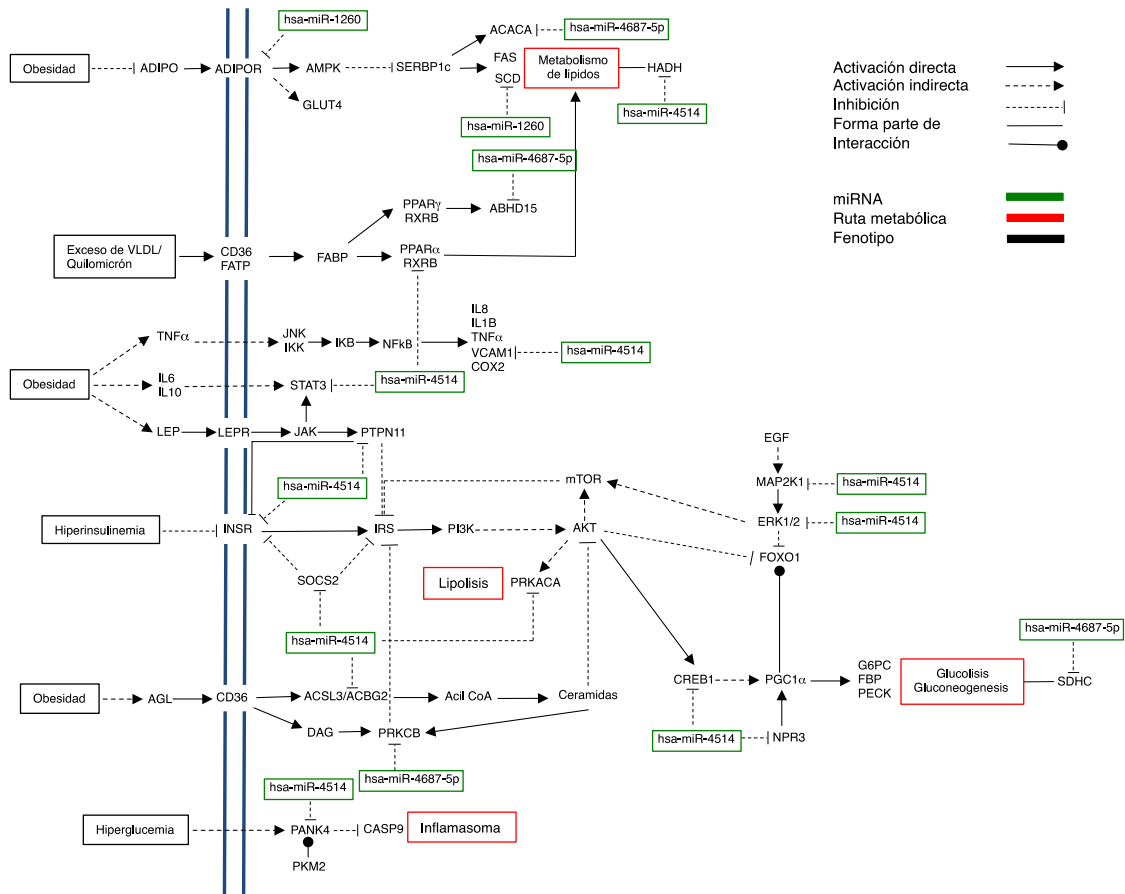
α/β-hydrolase domain containing protein 15 (ABDH15) es un blanco directo de PPAR γ . ABDH15 se expresa principalmente en el TA blanco y marrón y esta incrementado durante la adipogénesis de varias líneas celulares murinas y humanas. En adipocitos maduros, el ácido palmítico y los niveles elevados de ácidos grasos causan la disminución en la expresión de ABDH15. Interesantemente, en ratones ob/ob alimentados con dieta alta en grasa, la expresión de ABDH15 estuvo significativamente disminuida en TA blanco en comparación con ratones *wild type* alimentados con el mismo tipo de dieta, esta disminución fue evidente aún después de 15 semanas. Ratones de 23 semanas de edad también mostraron una disminución importante en la expresión de ABDH15, sugiriendo que su expresión es dependiente de la edad²⁷⁰. Hsa-miR-4687-5p podría estar sobreexpresado debido a los niveles elevados de ácidos grasos en el SM y por lo tanto regular post transcripcionalmente a ABDH15 causando su disminución.

7.5 Rutas metabólicas

Las rutas metabólicas en las que participan los miRNAs están fuertemente relacionadas con la fisiopatología del SM como la vía de las adipocitocinas, la vía de señalización de insulina y varias vías de la respuesta inflamatoria como WNT, JAK/STAT, mTOR, entre otras. En la figura 20 se resumen algunas de estas vías, los genes blanco de hsa-miR-1260, hsa-miR4514 y hsa-miR-4687-5p.

Es importante mencionar que los miRNAs y otros tipos de RNAs presentes en plasma son originados en células, sin embargo, aún no son claros los mecanismos de secreción selectiva, los mecanismos de regulación y su participación en la comunicación celular. Es posible también que la presencia de miRNAs y otros tipos de RNAs en el plasma y otros fluidos corporales sea producto del metabolismo celular y/o apoptosis. Es necesario realizar estudios funcionales que validen la regulación post transcripcional de los genes blanco mediada por miRNAs, así como los mecanismos de secreción, transporte e internalización por las células receptoras para confirmar la participación de estos en la comunicación intracelular y su papel en el SM.

Figura 20. Mapa de las rutas metabólicas relevantes en el SM en las que participan hsa-miR-1260, hsa-miR-4514, hsa-miR-4687-5p y los genes blanco a los que regulan



7.6 Asociación de miRNAs con parámetros del SM

De acuerdo a la correlación de Spearman se encontraron correlaciones significativas con la edad, TG y colesterol total. Estas correlaciones son negativas y aunque hay significancia estadística, deben realizarse más estudios con un mayor número de participantes para confirmar las asociaciones y poder plantear la posibilidad de utilizar estos miRNAs plasmáticos como biomarcadores del SM.

CONCLUSIONES

1. Este trabajo es el primero en reportar la desregulación de 67 H/ACA Box snoRNA C/D Box snoRNAs, miRNAs y pre-miRNAs plasmáticos en el SM por medio de la evaluación del perfil de expresión utilizando microarreglos GeneChip miRNA 3.0 de Affymetrix.
2. De los 67 RNAs desregulados, 21 se tratan de miRNAs. Hsa-miR-455-3p, hsa-miR-383 y hsa-miR-650 ya han sido reportados en enfermedades metabólicas.
3. Los genes blanco validados de algunos miRNAs participan en la adipogénesis y metabolismo de ácidos grasos.
4. La búsqueda de genes blanco predichos arrojó una gran cantidad de genes. Varios de estos son importantes reguladores del metabolismo de lípidos y representan buenos candidatos para validación experimental en estudios futuros.
5. El análisis de las rutas metabólicas de los miRNAs desregulados incluye a rutas importantes en la fisiopatología del SM, como la ruta de señalización de insulina, ruta de las adipocitocinas y varias rutas relacionadas con la inflamación.
6. Tres miRNAs fueron validados en una muestra independiente y se encontraron sobreexpresados tanto en la evaluación por medio de microarreglos como por qPCR, estos son hsa-miR-1260, hsa-miR-4514 y hsa-miR-4687-5p.
7. La asociación de hsa-miR-1260, hsa-miR-4514 y hsa-miR-4687-5p fue significativa con algunos parámetros del SM. En todos los casos estas asociaciones fueron negativas.

PERSPECTIVAS

1. Validación del resto de los miRNAs diferencialmente expresados en plasma por qPCR, en una muestra más grande realizando pre-amplificación previa al ensayo de qPCR y correlacionar los niveles de expresión de estos miRNAs con parámetros del SM.
2. Validar experimentalmente los genes blanco predichos de estos miRNAs y determinar las posibles células secretoras, los mecanismos de transporte y las posibles células receptoras, así como determinar si estos miRNAs participan en la comunicación celular y si conservan la capacidad de regulación de genes blanco en las células receptoras.
3. Validar la desregulación en el plasma de snoRNAs C/D Box, snoRNAs H/ACA Box y pre-miRNAs en el SM. De estos snoRNA U32a es un RNA pequeño prometedor debido a la evidencia que hay en la literatura de su participación en el estrés metabólico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cho LW. Metabolic Syndrome. *Singapore Med J*. 2011;52:779–785.
2. Ritz E. Metabolic Syndrome-What we know and what we don't know. *JASN*. 2007;1278–1282.
3. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988;37:1595–1607.
4. WHO. *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications.*; 1999.
5. Huang PL. A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Dis Model Mech*. 2009;2(5-6):231–7. doi:10.1242/dmm.001180.
6. *Executive summary of the Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) on Detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III).*; 2002:1071. doi:10.1001/archinte.1991.00400060019005.
7. Bloomgarden ZT. American Association of Clinical Endocrinologists (AACE) Consensus conference on the insulin resistance syndrome. *Diabetes Care*. 2003;26(3).
8. IDF. *The IDF consensus worldwide definition of the Metabolic Syndrome.*; 2006.
9. Grundy SM, Brewer HB, Cleeman JI, Smith SC, Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation*. 2004;109(3):433–8. doi:10.1161/01.CIR.0000111245.75752.C6.
10. Monteiro R, Azevedo I. Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediators Inflamm*. 2010;2010. doi:10.1155/2010/289645.
11. Laclaustra M, Corella D, Ordovas JM. Metabolic syndrome pathophysiology: the role of adipose tissue. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2007;17(2):125–39. doi:10.1016/j.numecd.2006.10.005.
12. Ye J. Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Front Med*. 2013;7(1):14–24. doi:10.1007/s11684-013-0262-6.Mechanisms.
13. De Ferranti S, Mozaffarian D. The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clin Chem*. 2008;54(6):945–55. doi:10.1373/clinchem.2007.100156.
14. Boden G, Cheung P, Salehi S, et al. Insulin regulates the unfolded protein response in human adipose tissue. *Diabetes*. 2014;63(3):912–22. doi:10.2337/db13-0906.
15. Lee J, Ozcan U. Unfolded protein response signaling and metabolic diseases. *J Biol Chem*. 2014;289(3):1203–11. doi:10.1074/jbc.R113.534743.

16. Qatanani M, Lazar MA. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance : many choices on the menu. 2007;(215):1443–1455. doi:10.1101/gad.1550907.Adipokines.
17. Martins AR, Nachbar RT, Gorjao R, et al. Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function. *Lipids Health Dis.* 2012;11(1):30. doi:10.1186/1476-511X-11-30.
18. Aon M a, Bhatt N, Cortassa SC. Mitochondrial and cellular mechanisms for managing lipid excess. *Front Physiol.* 2014;5(July):282. doi:10.3389/fphys.2014.00282.
19. Hutcheson R, Rocic P. The metabolic syndrome, oxidative stress, environment, and cardiovascular disease: the great exploration. *Exp Diabetes Res.* 2012;2012:271028. doi:10.1155/2012/271028.
20. Karpe F, Dickmann JR, Frayn KN. Fatty acids, obesity, and insulin resistance: time for a reevaluation. *Diabetes.* 2011;60(10):2441–9. doi:10.2337/db11-0425.
21. Dresner a, Laurent D, Marcucci M, et al. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest.* 1999;103(2):253–9. doi:10.1172/JCI5001.
22. Yu C, Chen Y, Cline GW, et al. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem.* 2002;277(52):50230–6. doi:10.1074/jbc.M200958200.
23. Steinbusch LKM, Schwenk RW, Ouwens DM, Diamant M, Glatz JFC, Luiken JJFP. Subcellular trafficking of the substrate transporters GLUT4 and CD36 in cardiomyocytes. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(15):2525–38. doi:10.1007/s00018-011-0690-x.
24. DeFronzo R a. Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernard Lecture 2009. *Diabetologia.* 2010;53(7):1270–87. doi:10.1007/s00125-010-1684-1.
25. Litvinova L, Atochin DN, Fattakhov N, Vasilenko M, Zatolokin P, Kirienkova E. Nitric oxide and mitochondria in metabolic syndrome. *Front Physiol.* 2015;6(February):20. doi:10.3389/fphys.2015.00020.
26. Muniyappa R, Sowers JR. Role of insulin resistance in endothelial dysfunction. *Rev Endor M Etab Disord.* 2013;14(1):5–12. doi:10.1007/s11154-012-9229-1.Role.
27. Eguchi K, Manabe I. Toll-Like Receptor, Lipotoxicity and Chronic inflammation: The Pathological Link Between Obesity and Cardiometabolic Disease. *J Atheroscler Thromb.* 2014;21(7):629–639. doi:10.5551/jat.22533.
28. Hirabara SM, Gorjão R, Vinolo M a, Rodrigues AC, Nachbar RT, Curi R. Molecular targets related to inflammation and insulin resistance and potential interventions. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012(Figure 1):379024. doi:10.1155/2012/379024.

29. Andrade-Oliveira V, Câmara NOS, Moraes-Vieira PM. Adipokines as drug targets in diabetes and underlying disturbances. *J Diabetes Res*. 2015;2015(Figure 1):681612. doi:10.1155/2015/681612.
30. Smitka K, Marešová D. Adipose Tissue as an Endocrine Organ : An Update on Pro-inflammatory and Anti-inflammatory Microenvironment. 11(2):87–111.
31. Jensen MD. Role of Body Fat Distribution and the Metabolic Complications of Obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(19):1–12. doi:10.1210/jc.2008.
32. Wauters M, Considine R, Van Gaal L. Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator. *Eur J Endocrinol*. 2000;143(3):293–311. doi:10.1530/eje.0.1430293.
33. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(6):2548–56. doi:10.1210/jc.2004-0395.
34. Considine R V, Sinha MK, Heiman ML, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*. 1996;334(5):292–5. doi:10.1056/NEJM199602013340503.
35. Nam S, Kratzsch J, Kim KW, et al. Cerebrospinal Fluid and Plasma Concentrations of Leptin , NPY , and α -MSH in Obese Women and Their Relationship to Negative Energy Balance. 2001;86(10):4849–4853.
36. Zarkesh-Esfahani H, Pockley G, Metcalfe R a., et al. High-Dose Leptin Activates Human Leukocytes Via Receptor Expression on Monocytes. *J Immunol*. 2001;167(8):4593–4599. doi:10.4049/jimmunol.167.8.4593.
37. Deepa SS, Dong LQ. APPL1: role in adiponectin signaling and beyond. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;296(1):E22–36. doi:10.1152/ajpendo.90731.2008.
38. Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev*. 2005;26(3):439–51. doi:10.1210/er.2005-0005.
39. Díez JJ, Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. 2003:293–300.
40. Chandran M, Phillips SA, Claraldi T, Henry RR. Adiponectin : More Than Just Another Fat Cell Hormone ? *Diabetes Care*. 2003;26(8).
41. Hotta K, Funahashi T, Arita Y, et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, Adiponectin , in type 2 diabetic patients. 2000.
42. Lee S, Kwak H-B. Role of adiponectin in metabolic and cardiovascular disease. *J Exerc Rehabil*. 2014;10(2):54–9. doi:10.12965/jer.140100.
43. Steppan CM, Lazar M a. Resistin and obesity-associated insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab*. 2002;13(1):18–23. doi:10.1016/S1043-2760(01)00522-7.

44. Rajala MW, Qi Y, Patel HR, et al. Regulation of Resistin Expression and Circulating Levels in Obesity, Diabetes, and Fasting. *Diabetes*. 2004;53(7):1671–1679. doi:10.2337/diabetes.53.7.1671.
45. Silswal N, Singh AK, Aruna B, Mukhopadhyay S, Ghosh S, Ehtesham NZ. Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-12 in macrophages by NF-kappaB-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;334(4):1092–101. doi:10.1016/j.bbrc.2005.06.202.
46. Al-Suhaimi E a, Shehzad A. Leptin, resistin and visfatin: the missing link between endocrine metabolic disorders and immunity. *Eur J Med Res*. 2013;18:12. doi:10.1186/2047-783X-18-12.
47. Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, et al. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science (80-)*. 2005;307(5708):426–30. doi:10.1126/science.1097243.
48. Jia SH, Li Y, Parodo J, et al. Pre – B cell colony – enhancing factor inhibits neutrophil apoptosis in experimental inflammation and clinical sepsis. 2004;113(9). doi:10.1172/JCI200419930.1318.
49. Xia M, Boini KM, Abais JM, Xu M, Zhang Y, Li P-L. Endothelial NLRP3 inflammasome activation and enhanced neointima formation in mice by adipokine visfatin. *Am J Pathol*. 2014;184(5):1617–28. doi:10.1016/j.ajpath.2014.01.032.
50. Yun MR, Seo JM, Park HY. Visfatin contributes to the differentiation of monocytes into macrophages through the differential regulation of inflammatory cytokines in THP-1 cells. *Cell Signal*. 2014;26(4):705–715. doi:10.1016/j.cellsig.2013.12.010.
51. Kaminska A, Kopczynska E, Bronisz A, et al. An evaluation of visfatin levels in obese subjects . An evaluation of visfatin levels in obese subjects Ocena stężenia wisfatyny u osób z otyłością. *Polish J Endocrinol*. 2010;61(2):169–173.
52. Pagano C, Pilon C, Olivieri M, et al. Reduced plasma visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in obesity is not related to insulin resistance in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(8):3165–70. doi:10.1210/jc.2006-0361.
53. Yang R-Z, Lee M-J, Hu H, et al. Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;290(6):E1253–61. doi:10.1152/ajpendo.00572.2004.
54. Yamawaki H, Kuramoto J, Kameshima S, Usui T, Okada M, Hara Y. Omentin, a novel adipocytokine inhibits TNF-induced vascular inflammation in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;408(2):339–43. doi:10.1016/j.bbrc.2011.04.039.
55. Batista CMDS, Yang R, Lee M, et al. Omentin Plasma Levels and Gene Expression Are Decreased in Obesity. 2007;56(June):1655–1661. doi:10.2337/db06-1506.AFDS.
56. Yoo H, Hwang S, Hong H, et al. Association of circulating omentin-1 level with arterial stiffness and carotid plaque in type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. 2011;10(1):103. doi:10.1186/1475-2840-10-103.

57. Zhong X, Zhang H, Tan H, et al. Association of serum omentin-1 levels with coronary artery disease. *Acta Pharmacol Sin.* 2011;32(7):873–8. doi:10.1038/aps.2011.26.
58. Auguet T, Quintero Y, Riesco D, et al. New adipokines vaspin and omentin. Circulating levels and gene expression in adipose tissue from morbidly obese women. *BMC Med Genet.* 2011;12(1):60. doi:10.1186/1471-2350-12-60.
59. Lapointe M, Poirier P, Martin J, Bastien M, Auclair A, Cianflone K. Omentin changes following bariatric surgery and predictive links with biomarkers for risk of cardiovascular disease. *Cardiovasc Diabetol.* 2014;13:124. doi:10.1186/s12933-014-0124-9.
60. Sztalryd C, Kimmel AR. Perilipins: lipid droplet coat proteins adapted for tissue-specific energy storage and utilization, and lipid cytoprotection. *Biochimie.* 2014;96:96–101. doi:10.1016/j.biochi.2013.08.026.Perilipins.
61. Greenberg AS, Coleman RA, Kraemer FB, et al. The role of lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans. 2011;121(6). doi:10.1172/JCI46069.2102.
62. Kuramoto K, Okamura T, Yamaguchi T, et al. Perilipin 5, a lipid droplet-binding protein, protects heart from oxidative burden by sequestering fatty acid from excessive oxidation. *J Biol Chem.* 2012;287(28):23852–63. doi:10.1074/jbc.M111.328708.
63. Wei Z, Peterson JM, Lei X, et al. C1q/TNF-related protein-12 (CTRP12), a novel adipokine that improves insulin sensitivity and glycemic control in mouse models of obesity and diabetes. *J Biol Chem.* 2012;287(13):10301–15. doi:10.1074/jbc.M111.303651.
64. Enomoto T, Ohashi K, Shibata R, et al. Adipolin/C1qdc2/CTRP12 protein functions as an adipokine that improves glucose metabolism. *J Biol Chem.* 2011;286(40):34552–8. doi:10.1074/jbc.M111.277319.
65. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 1995;95:2409–2415.
66. Kern PA, Ranganathan S, Li C, et al. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. 2001;72205:745–751.
67. Ruan H, Miles PDG, Ladd CM, et al. Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis α : Implications for insulin resistance. *Diabetes.* 2002;51(November).
68. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. 2006;116(7):1793–1801. doi:10.1172/JCI29069.and.
69. Kanety H, Feinstein R, Papa MZ, Hemi R, Karasik A. Tumor Necrosis Factor α -induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). *J Biol Chem.* 1995;270(40):23780–23784.

70. 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. doi:10.1210/en.2003-1336.
71. Pradhan AD, Manson JE, Buring JE, Ridker PM. C-Reactive Protein, Interleukin 6, and Risk of Developing Type 2 Diabetes Mellitus. *J Am Med Assoc*. 2001;286(3):327–334.
72. Bastard J, Jardel C, Bruckert E, et al. Elevated Levels of Interleukin 6 Are Reduced in Serum and Subcutaneous Adipose Tissue of Obese Women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(9):3338–3342.
73. Serrano-Marco L, Barroso E, El Kochairi I, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) β/δ agonist GW501516 inhibits IL-6-induced signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) activation and insulin resistance in human liver cells. *Diabetologia*. 2012;55(3):743–51. doi:10.1007/s00125-011-2401-4.
74. Dou L, Zhao T, Wang L, et al. miR-200s contribute to interleukin-6 (IL-6)-induced insulin resistance in hepatocytes. *J Biol Chem*. 2013;288(31):22596–606. doi:10.1074/jbc.M112.423145.
75. Kim TH, Choi SE, Ha ES, et al. IL-6 induction of TLR-4 gene expression via STAT3 has an effect on insulin resistance in human skeletal muscle. *Acta Diabetol*. 2013;50(2):189–200. doi:10.1007/s00592-011-0259-z.
76. Weisberg SP, Mccann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation. *J Clin Invest*. 2003;112(12). doi:10.1172/JCI200319246.Introduction.
77. Sartipy P, Loskutoff DJ. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(12):7265–70. doi:10.1073/pnas.1133870100.
78. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest*. 2006;116(6). doi:10.1172/JCI26498DS1.
79. Cox CL, Stanhope KL, Schwarz JM, Graham JL, Hatcher B, Griffen SC. Circulating Concentrations of Monocyte Chemoattractant Protein 1, Plasminogen Activator Inhibitor 1, and Soluble Leukocyte Adhesion Molecule 1 in Overweight / Obese Men and Women Consuming Fructose or Glucose Sweetened Beverages for 10 Weeks. 2011;96(12):1–8. doi:10.1210/jc.2011.
80. Westerbacka J, Cornér A, Kolak M, et al. Insulin regulation of MCP-1 in human adipose tissue of obese and lean women. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;294(5):E841–5. doi:10.1152/ajpendo.00653.2006.
81. Lau DCW, Dhillon B, Yan H, Szmítko PE, Verma S. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(5):H2031–41. doi:10.1152/ajpheart.01058.2004.

82. Juhan-Vague I, Alessi M-C, Mavri a., Morange PE. Plasminogen activator inhibitor-1, inflammation, obesity, insulin resistance and vascular risk. *J Thromb Haemost.* 2003;1(7):1575–1579. doi:10.1046/j.1538-7836.2003.00279.x.
83. Folsom AR, Qamhi HT, Wing RR, et al. Impact of weight loss on plasminogen activator inhibitor (PAI-1), factor VII, and other hemostatic factors in moderately overweight adults. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1993;13(2):162–169. doi:10.1161/01.ATV.13.2.162.
84. Kruszynska YT, Yu JG, Olefsky JM, Sobel BE. Effects of troglitazone on blood concentrations of plasminogen activator inhibitor 1 in patients with type 2 diabetes an in lean and obese normal subjects. *Diabetes.* 2000;(24):633–639.
85. Process AA, Gabriely I, Ma XH, et al. Removal of Visceral Fat Prevents Insulin Resistance and Glucose Intolerance of Aging. *Diabetes.* 2002;51(April).
86. Crescenzo R, Bianco F, Mazzoli A, Giacco A, Liverini G, Iossa S. Mitochondrial efficiency and insulin resistance. *Front Physiol.* 2014;5(January):512. doi:10.3389/fphys.2014.00512.
87. Fadini GP, Ceolotto G, Pagnin E, de Kreutzenberg S, Avogaro A. At the crossroads of longevity and metabolism: the metabolic syndrome and lifespan determinant pathways. *Aging Cell.* 2011;10(1):10–7. doi:10.1111/j.1474-9726.2010.00642.x.
88. Veronica G, Esther RM, Nacional I, Ignacio DC. Aging , Metabolic Syndrome and the Heart. *Aging Dis.* 2012;3(3):269–279.
89. Bäckhed F, Ding H, Wang T, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(44):15718–23. doi:10.1073/pnas.0407076101.
90. Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(3):979–84. doi:10.1073/pnas.0605374104.
91. Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI, Ley RE, Ba F. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;015671.
92. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald M a, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature.* 2006;444(7122):1027–31. doi:10.1038/nature05414.
93. Sanderson S, Boardman W, Ciofi C, Gibson R. Human gut microbes associated with obesity. *Nature.* 2006;444. doi:10.1038/nature4441021a.
94. Duncan SH, Lobleby GE, Holtrop G, et al. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int J Obes.* 2008;32(11):1720–4. doi:10.1038/ijo.2008.155.
95. Schwartz A, Taras D, Schäfer K, et al. Microbiota and SCFA in Lean and Overweight Healthy Subjects. *Obesity.* 2010;18(1):190–195. doi:10.1038/oby.2009.167.

96. Grundy SM. Metabolic syndrome pandemic. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(4):629–36. doi:10.1161/ATVBAHA.107.151092.
97. Hossain P, Kavar B, El Nahas M. Obesity and Diabetes in the Developing World — A Growing Challenge. *N Engl J Med.* 2007;356(9):973–973. doi:10.1056/NEJMx070009.
98. Popkin BM, Adair LS, Ng SW. Now and then: The global nutrition transition: the pandemic of obesity in developing countries. *Nutr Rev.* 2012;70(1):3–21. doi:10.1111/j.1753-4887.2011.00456.x.NOW.
99. Kaur J. A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. *Cardiol Res Pract.* 2014;2014:1–21. doi:10.1155/2014/943162.
100. Jones-Smith JC, Gordon-Larsen P, Siddiqi A, Popkin BM. Cross-national comparisons of time trends in overweight inequality by socioeconomic status among women using repeated cross-sectional surveys from 37 developing countries, 1989-2007. *Am J Epidemiol.* 2011;173(6):667–75. doi:10.1093/aje/kwq428.
101. Dallongeville J, Cottel D, Ferrières J, et al. Household income is associated with the risk of metabolic syndrome in a sex-specific manner. *Diabetes Care.* 2005;28(2).
102. Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International . *Circulation.* 2009;120(16):1640–5. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644.
103. Dekker JM, Girman C, Rhodes T, et al. Metabolic Syndrome and 10-Year Cardiovascular Disease Risk in the Hoorn Study. *Circulation.* 2005;112(5):666–673. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.516948.
104. Bo S, Gentile L, Ciccone G, et al. The metabolic syndrome and high C-reactive protein: prevalence and differences by sex in a southern-European population-based cohort. *Diabetes Metab Res Rev.* 2005;21(6):515–524. doi:10.1002/dmrr.561.
105. Lorenzo C, Serrano-Rios M, González-Sánchez MT, et al. Geographic Variations of the International Diabetes Federation and the National Cholesterol Education Program – Adult Treatment Panel III Definitions of the Metabolic Syndrome in Nondiabetic. *Diabetes Care.* 2006;29(3):685–691.
106. Sawant A, Mankeshwar R, Shah S, et al. Prevalence of metabolic syndrome in urban India. *Cholesterol.* 2011;2011:920983. doi:10.1155/2011/920983.
107. Wang G-R, Li L, Pan Y-H, et al. Prevalence of metabolic syndrome among urban community residents in China. *BMC Public Health.* 2013;13:599. doi:10.1186/1471-2458-13-599.
108. Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda E-I, Hashimoto H, Nagai R, Yamakado M. Hypertension is the most common component of metabolic syndrome and the

- greatest contributor to carotid arteriosclerosis in apparently healthy Japanese individuals. *Hypertens Res.* 2005;28(1):27–34. doi:10.1291/hypres.28.27.
109. Cameron AJ, Magliano DJ, Zimmet PZ, Welborn T, Shaw JE. The Metabolic Syndrome in Australia: Prevalence using four definitions. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007;77(3):471–478. doi:10.1016/j.diabres.2007.02.002.
 110. Jeppesen J, Hansen TW, Rasmussen S, Ibsen H, Torp-Pedersen C, Madsbad S. Insulin resistance, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular disease: a population-based study. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49(21):2112–9. doi:10.1016/j.jacc.2007.01.088.
 111. Sempértégui F, Estrella B, Tucker KL, et al. Metabolic syndrome in elderly living in marginal peri-urban communities in Quito, Ecuador. *Public Heal Nutr.* 2011;14(5):758–767. doi:10.1017/S1368980010002636.Metabolic.
 112. Pérez CM, Guzmán M, Ortiz AP, et al. Prevalence of the metabolic syndrome in Saun Juan, Puerto Rico. *Ethn Dis.* 2008;18(4):434–441.
 113. Rodrigues SL, Baldo MP, Mill JG. Association of Waist-Stature Ratio with Hypertension and Metabolic Syndrome : Population-Based Study. *Arq Bras Cardiol.* 2010;95(2):186–191.
 114. Ford ES. Prevalence of the metabolic syndrome defined by the International Diabetes Federation among adults in the U.S. *Diabetes Care.* 2005;28(11).
 115. Rojas R, Aguilar-Salinas C a, Jiménez-Corona A, et al. Metabolic syndrome in Mexican adults: results from the National Health and Nutrition Survey 2006. *Salud Publica Mex.* 2010;52 Suppl 1(2):S11–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20585723>.
 116. Bartel D. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanisms and function. *Cell.* 2004;116(281-297).
 117. Xie H, Lim B, Lodish HF. MicroRNAs Induced During Adipogenesis that Accelerate. 2009;58(May). doi:10.2337/db08-1299.
 118. Lee RC. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. 1993;75:843–854.
 119. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(Database issue):D152–7. doi:10.1093/nar/gkq1027.
 120. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(Database issue):D68–73. doi:10.1093/nar/gkt1181.
 121. Finnegan EF, Pasquinelli AE. MicroRNA biogenesis : Regulating the Regulators. 2014;48(1):51–68. doi:10.3109/10409238.2012.738643.MicroRNA.
 122. Sayed D, Abdellatif M. MicroRNAs in development and disease. *Physiol Rev.* 2011;91(3):827–87. doi:10.1152/physrev.00006.2010.

123. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(2):126–39. doi:10.1038/nrm2632.
124. Lee Y, Jeon K, Lee J, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation : stepwise processing and subcellular localization. 2002;21(17):4663–4670.
125. Zhang Y, Zhang R, Su B. Diversity and evolution of MicroRNA gene clusters. *Sci China C Life Sci.* 2009;52(3):261–6. doi:10.1007/s11427-009-0032-5.
126. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell.* 2009;136(4):642–655. doi:10.1016/j.cell.2009.01.035.Origins.
127. Macias S, Cordiner R a, Cáceres JF. Cellular functions of the microprocessor. *Biochem Soc Trans.* 2013;41(4):838–43. doi:10.1042/BST20130011.
128. Siomi H, Siomi MC. Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. *Mol Cell.* 2010;38(3):323–32. doi:10.1016/j.molcel.2010.03.013.
129. Du T. ZPD. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development.* 2005;132:4645–4652.
130. Feng Y, Zhang X, Graves P, Zeng YAN. A comprehensive analysis of precursor microRNA cleavage by human Dicer. 2012;(2005):2083–2092. doi:10.1261/rna.033688.112.5.
131. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. 2003:3011–3016. doi:10.1101/gad.1158803.miRNA.
132. Lund E, Gu S. Nuclear Export of MicroRNA Precursors. 2003;12167.
133. Diederichs S, Haber D a. Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell.* 2007;131(6):1097–108. doi:10.1016/j.cell.2007.10.032.
134. Mourelatos Z, Paushkin S, Sharma A, et al. miRNPs : a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. 2002:720–728. doi:10.1101/gad.974702.ways.
135. Stroynowska-Czerwinska A, Fiszer A, Krzyzosiak WJ. The panorama of miRNA-mediated mechanisms in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(12):2253–70. doi:10.1007/s00018-013-1551-6.
136. Kobayashi H, Tomari Y. RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech.* 2015. doi:10.1016/j.bbagr.2015.08.007.
137. Maniatakis E, Mourelatos Z. A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. 2005;2:2979–2990. doi:10.1101/gad.1384005.miRNPs.
138. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. 2005;436(7051):740–744. doi:10.1038/nature03868.TRBP.

139. Gu S, Jin L, Huang Y, Zhang F, Kay M a. Slicing-independent RISC activation requires the argonaute PAZ domain. *Curr Biol.* 2012;22(16):1536–42. doi:10.1016/j.cub.2012.06.040.
140. Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai EC. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. 2007;130(1):89–100. doi:10.1016/j.cell.2007.06.028.The.
141. Schamberger A, Orbán TI. Experimental Validation of Predicted Mammalian MicroRNAs of Mirtron Origin. In: *RNA mapping.*; 2014:244–263.
142. Shomron N, Levy C. MicroRNA-biogenesis and Pre-mRNA splicing crosstalk. *J Biomed Biotechnol.* 2009;2009:594678. doi:10.1155/2009/594678.
143. Kim Y-K, Kim VN. Processing of intronic microRNAs. *EMBO J.* 2007;26(3):775–83. doi:10.1038/sj.emboj.7601512.
144. Gromak N. Intronic microRNAs: a crossroad in gene regulation. *Biochem Soc Trans.* 2012;40(4):759–61. doi:10.1042/BST20120023.
145. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet.* 2010;11(9):597–610. doi:10.1038/nrg2843.
146. Hutvagner G. Small RNA asymmetry in RNAi: function in RISC assembly and gene regulation. *FEBS Lett.* 2005;579(26):5850–7. doi:10.1016/j.febslet.2005.08.071.
147. Duursma AM, Kedde M, Schrier M, Sage CLE, Agami R. miR-148 targets human DNMT3b protein coding region. 2008:872–877. doi:10.1261/rna.972008.2004.
148. Forman JJ, Legesse-Miller A, Collier H a. A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(39):14879–84. doi:10.1073/pnas.0803230105.
149. Doench JG, Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression. 2004:504–511. doi:10.1101/gad.1184404.species.
150. Lim LP, Lau NC, Garrett-engele P, Grimson A. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature.* 2005;292(1991):288–292.
151. Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, et al. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science (80-).* 2005;309(5740):1573–6. doi:10.1126/science.1115079.
152. Huntzinger E, Kuzuoglu-Öztürk D, Braun JE, Eulalio A, Wohlbold L, Izaurralde E. The interactions of GW182 proteins with PABP and deadenylases are required for both translational repression and degradation of miRNA targets. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(2):978–94. doi:10.1093/nar/gks1078.

153. Wu L, Fan J, Belasco JG. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(11):4034–9. doi:10.1073/pnas.0510928103.
154. Humphreys DT, Westman BJ, Martin DIK, Preiss T. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E⁻cap and poly (A) tail function. 2010;102(47).
155. Eulalio ANA, Huntzinger E, Nishihara T, Rehwinkel JAN, Fauser M, Izaurralde E. Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. 2009:21–32. doi:10.1261/rna.1399509.3.
156. Wahle E, Winkler GS. RNA decay machines: Deadenylation by the Ccr4–Not and Pan2–Pan3 complexes. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech*. 2013;1829(6-7):561–570. doi:10.1016/j.bbagr.2013.01.003.
157. Houseley J, Tollervey D. The many pathways of RNA degradation. *Cell*. 2009;136(4):763–76. doi:10.1016/j.cell.2009.01.019.
158. Beckham CJ, Parker R. P bodies, stress granules, and viral life cycles. *Cell Host Microbe*. 2008;3(4):206–12. doi:10.1016/j.chom.2008.03.004.
159. Decker CJ, Parker R. P-bodies and stress granules: possible roles in the control of translation and mRNA degradation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(9):a012286. doi:10.1101/cshperspect.a012286.
160. Liu J, Valencia-sanchez MA, Hannon GJ, Parker R. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. 2005;7(7):719–723.
161. Rnas T, The A. Function and Localization of MicroRNAs in Mammalian Cells. 2006;LXXI.
162. Eystathioy T, Jakymiw A, Chan EKL, Se B, Cougot N, Fritzler MJ. The GW182 protein colocalizes with mRNA degradation associated proteins hDcp1 and hLSm4 in cytoplasmic GW bodies. 2003:1171–1173. doi:10.1261/rna.5810203.plasmic.
163. Chen G-Q, Lian W-J, Wang G-M, Wang S, Yang Y-Q, Zhao Z-W. Altered microRNA expression in skeletal muscle results from high-fat diet-induced insulin resistance in mice. *Mol Med Rep*. 2012;5(5):1362–8. doi:10.3892/mmr.2012.824.
164. Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci*. 2010;101(10):2087–92. doi:10.1111/j.1349-7006.2010.01650.x.
165. Gallo A, Tandon M, Alevizos I, Illei GG. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLoS One*. 2012;7(3):e30679. doi:10.1371/journal.pone.0030679.
166. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(30):10513–8. doi:10.1073/pnas.0804549105.

167. Pegtel DM, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson D a, et al. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(14):6328–33. doi:10.1073/pnas.0914843107.
168. Montecalvo A, Larregina AT, Shufesky WJ, Stolz DB, Sullivan MLG. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. 2012;119(3):756–766. doi:10.1182/blood.
169. Tsui NBY, Ng EKO, Lo YMD. Stability of Endogenous and Added RNA in Blood Specimens , Serum , and Plasma. 2002;1653:1647–1653.
170. Wang K, Zhang S, Weber J, Baxter D, Galas DJ. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(20):7248–59. doi:10.1093/nar/gkq601.
171. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. 2011;13(4):423–433. doi:10.1038/ncb2210.MicroRNAs.
172. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One*. 2008;3(11):e3694. doi:10.1371/journal.pone.0003694.
173. Melo SA, Sugimoto H, O’Connell JT, et al. Cancer Exosomes Perform Cell-Independent MicroRNA Biogenesis and Promote Tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2014;26:1–15. doi:10.1016/j.ccell.2014.09.005.
174. Boon RA, Vickers KC. Intercellular transport of microRNAs. 2013;33(2):186–192. doi:10.1161/ATVBAHA.112.300139.Intercellular.
175. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem*. 2010;285(23):17442–52. doi:10.1074/jbc.M110.107821.
176. Fichtlscherer S, Zeiher AM, Dimmeler S. Circulating microRNAs: biomarkers or mediators of cardiovascular diseases? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(11):2383–90. doi:10.1161/ATVBAHA.111.226696.
177. Li S, Zhu J, Zhang W, et al. Signature microRNA expression profile of essential hypertension and its novel link to human cytomegalovirus infection. *Circulation*. 2011;124(2):175–84. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.012237.
178. Yang Q, Jia C, Wang P, et al. MicroRNA-505 identified from patients with essential hypertension impairs endothelial cell migration and tube formation. *Int J Cardiol*. 2014;177(3):925–34. doi:10.1016/j.ijcard.2014.09.204.
179. Wei C, Henderson H, Spradley C, et al. Circulating miRNAs as potential marker for pulmonary hypertension. *PLoS One*. 2013;8(5):e64396. doi:10.1371/journal.pone.0064396.
180. Rhodes CJ, Wharton J, Boon R a, et al. Reduced microRNA-150 is associated with poor survival in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187(3):294–302. doi:10.1164/rccm.201205-0839OC.

181. Sun X, Zhang M, Sanagawa A, et al. Circulating microRNA-126 in patients with coronary artery disease: correlation with LDL cholesterol. *Thromb J*. 2012;10(1):16. doi:10.1186/1477-9560-10-16.
182. Santovito D, De Nardis V, Marcantonio P, et al. Plasma exosome microRNA profiling unravels a new potential modulator of adiponectin pathway in diabetes: effect of glycemic control. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(9):E1681–5. doi:10.1210/jc.2013-3843.
183. Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, et al. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circ Res*. 2010;107(6):810–7. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.226357.
184. Pescador N, Pérez-Barba M, Ibarra JM, Corbatón A, Martínez-Larrad MT, Serrano-Ríos M. Serum circulating microRNA profiling for identification of potential type 2 diabetes and obesity biomarkers. *PLoS One*. 2013;8(10):e77251. doi:10.1371/journal.pone.0077251.
185. Simionescu N, Niculescu LS, Sanda GM, Margina D, Sima A V. Analysis of circulating microRNAs that are specifically increased in hyperlipidemic and/or hyperglycemic sera. *Mol Biol Rep*. 2014;41(9):5765–73. doi:10.1007/s11033-014-3449-2.
186. Gao W, He H-W, Wang Z-M, et al. Plasma levels of lipometabolism-related miR-122 and miR-370 are increased in patients with hyperlipidemia and associated with coronary artery disease. *Lipids Health Dis*. 2012;11:55. doi:10.1186/1476-511X-11-55.
187. An F, Zhan Q, Xia M, et al. From moderately severe to severe hypertriglyceridemia induced acute pancreatitis: circulating miRNAs play role as potential biomarkers. *PLoS One*. 2014;9(11):e111058. doi:10.1371/journal.pone.0111058.
188. Wang R, Cao Y, Hong J, et al. Elevated circulating microRNA-122 is associated with obesity and insulin resistance in young adults. *Eur J Endocrinol*. 2014;3:291–300.
189. Ortega FJ, Mercader JM, Catalán V, et al. Targeting the circulating microRNA signature of obesity. *Clin Chem*. 2013;59(5):781–92. doi:10.1373/clinchem.2012.195776.
190. Prats-Puig A, Ortega FJ, Mercader JM, et al. Changes in circulating microRNAs are associated with childhood obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(10):E1655–60. doi:10.1210/jc.2013-1496.
191. Karolina DS, Tavintharan S, Armugam A, et al. Circulating miRNA profiles in patients with metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(12):E2271–6. doi:10.1210/jc.2012-1996.
192. Raitoharju E, Seppälä I, Oksala N, et al. Blood microRNA profile associates with the levels of serum lipids and metabolites associated with glucose metabolism and insulin resistance and pinpoints pathways underlying metabolic syndrome: the cardiovascular risk in Young Finns Study. *Mol Cell Endocrinol*. 2014;391(1-2):41–9. doi:10.1016/j.mce.2014.04.013.

193. Wang Y-T, Tsai P-C, Liao Y-C, Hsu C-Y, Juo S-HH. Circulating microRNAs have a sex-specific association with metabolic syndrome. *J Biomed Sci.* 2013;20:72. doi:10.1186/1423-0127-20-72.
194. Mestdagh P, Feys T, Bernard N, et al. High-throughput stem-loop RT-qPCR miRNA expression profiling using minute amounts of input RNA. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(21):e143. doi:10.1093/nar/gkn725.
195. Sah S, McCall MN, Eveleigh D, Wilson M, Irizarry R a. Performance evaluation of commercial miRNA expression array platforms. *BMC Res Notes.* 2010;3:80. doi:10.1186/1756-0500-3-80.
196. Yauk CL, Rowan-Carroll A, Stead JD, Williams A. Cross-platform analysis of global microRNA expression technologies. *BMC Genomics.* 2010;11:330. doi:10.1186/1471-2164-11-330.
197. Git A, Dvinge H, Osborne M, et al. Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression. 2010:991–1006. doi:10.1261/rna.1947110.one.
198. Moldovan L, Batte KE, Trgovcich J, Wisler J, Marsh CB, Piper M. Methodological challenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers. *J Cell Mol Med.* 2014;18(3):371–90. doi:10.1111/jcmm.12236.
199. Miller MB, Tang Y-W. Basic Concepts of Microarrays and Potential Applications in Clinical Microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(4):611–633. doi:10.1128/CMR.00019-09.
200. Naidu CK, Suneetha Y. Current Knowledge on Microarray Technology - An Overview. 2012;11(February):153–164.
201. Affymetrix. FlashTag Biotin HSR RNA Labeling Kit.
202. Affymetrix. Data Sheet GeneChip miRNA 3.0. :1–4.
203. Benes V, Castoldi M. Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods.* 2010;50(4):244–9. doi:10.1016/j.ymeth.2010.01.026.
204. Krishnarao A. *MicroRNAs: From basic science to disease biology.*; 2007.
205. Chen C, Ridzon D a, Broomer AJ, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(20):e179. doi:10.1093/nar/gni178.
206. Schmittgen TD, Lee EJ, Jiang J, et al. Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. 2008;44(1):31–38. doi:10.1016/j.ymeth.2007.09.006.Real-time.
207. Van Rooij E. The art of microRNA research. *Circ Res.* 2011;108(2):219–34. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.227496.

208. Shaffer J, Schlumpberger M, Lader E. miRNA profiling from blood — challenges and recommendations. *Qiagen*.:1–10.
209. Raymond CK, Roberts BS, Garrett-engele P, Lim LEEP, Johnson JM. Simple , quantitative primer-extension PCR assay for direct monitoring of microRNAs and short-interfering RNAs. 2005;(2003):1737–1744. doi:10.1261/rna.2148705.2004.
210. Aguilar-Salinas C a, Rojas R, Gómez-Pérez FJ, et al. High prevalence of metabolic syndrome in Mexico. *Arch Med Res*. 2004;35(1):76–81. doi:10.1016/j.arcm.2003.06.006.
211. Instituto Nacional de Salud Pública. *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012*.
212. Murguía-Romero M, Jiménez-Flores JR, Sigrist-Flores SC, et al. Prevalence of Metabolic Syndrome in Young Mexicans: a Sensitivity Analysis on Its Components. *Nutr Hosp*. 2015;32(n01):189–195. doi:10.3305/nh.2015.32.1.9031.
213. Aballay LR, Eynard AR, Díaz MDP, Navarro A, Muñoz SE. Overweight and obesity: a review of their relationship to metabolic syndrome, cardiovascular disease, and cancer in South America. *Nutr Rev*. 2013;71(3):168–79. doi:10.1111/j.1753-4887.2012.00533.x.
214. Aguilar-Salinas C a, Gómez-Pérez FJ, Rull J, Villalpando S, Barquera S, Rojas R. Prevalence of dyslipidemias in the Mexican National Health and Nutrition Survey 2006. *Salud Publica Mex*. 2010;52 Suppl 1(2):S44–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20585729>.
215. Gautier L, Cope L, Bolstad BM, Irizarry R a. affy--analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics*. 2004;20(3):307–15. doi:10.1093/bioinformatics/btg405.
216. Carvalho BS, Irizarry R a. A framework for oligonucleotide microarray preprocessing. *Bioinformatics*. 2010;26(19):2363–7. doi:10.1093/bioinformatics/btq431.
217. Carvhalo B. pd.mirna.3.0: Platform Design Info for Affymetrix miRNA-2_9.R package version 3.12.0. :1–2.
218. Smyth GK. Limma : Linear Models for Microarray Data. (2005):397–420.
219. Irizarry RA, Hobbs B, Beazer-barclay YD, Antonellis KJ, Scherf UWE, Speed TP. Exploration , normalization , and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. 2003:249–264.
220. Irizarry R a. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(4):15e–15. doi:10.1093/nar/gng015.
221. Bolstad BM, Irizarry R., Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*. 2003;19(2):185–193. doi:10.1093/bioinformatics/19.2.185.
222. Smyth GK. Linear Models and Empirical Bayes Methods for Assessing Differential Expression in Microarray. 2009;3(1):1–26.

223. Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N. miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. *J Biomed Inform.* 2011;44(5):839–47. doi:10.1016/j.jbi.2011.05.002.
224. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell.* 2005;120(1):15–20. doi:10.1016/j.cell.2004.12.035.
225. Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett- P, Lim LP, Bartel DP. MicroRNA targeting specificity in mammals : determinants beyond seed pairing. *Mol Cell.* 2007;27(1):91–105. doi:10.1016/j.molcel.2007.06.017.MicroRNA.
226. Vlachos IS, Kostoulas N, Vergoulis T, et al. DIANA miRPath v.2.0: investigating the combinatorial effect of microRNAs in pathways. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(Web Server issue):W498–504. doi:10.1093/nar/gks494.
227. Huang DW, Sherman BT, Lempicki R a. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(1):1–13. doi:10.1093/nar/gkn923.
228. Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(Database issue):D199–205. doi:10.1093/nar/gkt1076.
229. Kanehisa M, Goto S. KEGG : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. 2000;28(1):27–30.
230. Mi H, Muruganujan A, Thomas PD. PANTHER in 2013: modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Database issue):D377–86. doi:10.1093/nar/gks1118.
231. Croft D, Mundo AF, Haw R, et al. The Reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(Database issue):D472–7. doi:10.1093/nar/gkt1102.
232. Milacic M, Haw R, Rothfels K, et al. Annotating cancer variants and anti-cancer therapeutics in reactome. *Cancers (Basel).* 2012;4(4):1180–211. doi:10.3390/cancers4041180.
233. Goni R, García P, Foissac S. The qPCR data statistical analysis. *Intergenomics.* 2009;(September):1–9.
234. Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics.* 2006;7:85. doi:10.1186/1471-2105-7-85.
235. McDonald JS, Milosevic D, Reddi H V, Grebe SK, Algeciras-Schimnich A. Analysis of circulating microRNA: preanalytical and analytical challenges. *Clin Chem.* 2011;57(6):833–40. doi:10.1373/clinchem.2010.157198.
236. Lui L, Lowe T. Small nucleolar RNAs and RNA-guided post-transcriptional modification. *Essays Biochem.* 2013;54:53–77. doi:10.1042/bse0540053.

237. Stepanov G a, Filippova J a, Komissarov AB, Kuligina E V, Richter V a, Semenov D V. Regulatory role of small nucleolar RNAs in human diseases. *Biomed Res Int*. 2015;2015:206849. doi:10.1155/2015/206849.
238. Brandis K a., Gale S, Jinn S, et al. Box C/D Small Nucleolar RNA (snoRNA) U60 Regulates Intracellular Cholesterol Trafficking. *J Biol Chem*. 2013;288(50):35703–35713. doi:10.1074/jbc.M113.488577.
239. Basu A, Poddar D, Robinet P, et al. Ribosomal protein L13a deficiency in macrophages promotes atherosclerosis by limiting translation control-dependent retardation of inflammation. *Atheroscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(3):533–542. doi:10.1161/ATVBAHA.113.302573.Ribosomal.
240. Michel CI, Holley CL, Scruggs BS, et al. Small nucleolar RNAs U32a, U33 and U35a are critical mediators of metabolic stress. *Cell Metab*. 2011;14(1):33–44. doi:10.1016/j.cmet.2011.04.009.Small.
241. Bolmeson C, Esguerra JLS, Salehi A, Speidel D, Eliasson L, Cilio CM. Differences in islet-enriched miRNAs in healthy and glucose intolerant human subjects. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;404(1):16–22. doi:10.1016/j.bbrc.2010.11.024.
242. Farooqi AA, Qureshi MZ, Coskunpinar E, Naqvi SK, Yaylim I, Ismail M. miR-421 , miR-155 and miR-650 : Emerging Trends of Regulation of Cancer and Apoptosis. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2014;15(5):1909–1912.
243. Lario S, Ramírez-Lázaro MJ, Aransay a M, et al. microRNA profiling in duodenal ulcer disease caused by Helicobacter pylori infection in a Western population. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(8):E273–82. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03849.x.
244. Abdalla MA, Haj-Ahmad Y. Promising Candidate Urinary MicroRNA Biomarkers for the Early Detection of Hepatocellular Carcinoma among High-Risk Hepatitis C Virus Egyptian Patients. *J Cancer*. 2012;3(3):19–31. doi:10.7150/jca.3.19.
245. Greco S, Fasanaro P, Castelvechio S, et al. MicroRNA dysregulation in diabetic ischemic heart failure patients. *Diabetes*. 2012;61(6):1633–41. doi:10.2337/db11-0952.
246. Le Carré J, Lamon S, Léger B. Validation of a multiplex reverse transcription and pre-amplification method using TaqMan® MicroRNA assays. *Front Genet*. 2014;5(4465407):1–7. doi:10.3389/fgene.2014.00413.
247. Walden TB, Timmons J a., Keller P, Nedergaard J, Cannon B. Distinct expression of muscle-specific MicroRNAs (myomirs) in brown adipocytes. *J Cell Physiol*. 2009;218(2):444–449. doi:10.1002/jcp.21621.
248. Zhang H, Guan M, Townsend KL, et al. MicroRNA- 455 regulates brown adipogenesis via a novel HIF 1 an-AMPK-PGC 1 a signaling network. 2015;16(10):1378–1393.
249. Derghal A, Djelloul M, Airault C, et al. Leptin is required for hypothalamic regulation of miRNAs targeting POMC 3'UTR. *Front Cell Neurosci*. 2015;9(May):172. doi:10.3389/fncel.2015.00172.

250. He Z, Cen D, Luo X, et al. Downregulation of miR-383 promotes glioma cell invasion by targeting insulin-like growth factor 1 receptor. *Med Oncol*. 2013;30(2):557. doi:10.1007/s12032-013-0557-0.
251. Nesca V, Guay C, Jacovetti C, et al. Identification of particular groups of microRNAs that positively or negatively impact on beta cell function in obese models of type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2013;56(10):2203–12. doi:10.1007/s00125-013-2993-y.
252. Choi S, Park J, Choi JH. Revisiting PPAR γ as a target for the treatment of metabolic disorders. *BMB Rep*. 2014;47(11):599–608.
253. Sand M, Skrygan M, Sand D, et al. Comparative microarray analysis of microRNA expression profiles in primary cutaneous malignant melanoma, cutaneous malignant melanoma metastases, and benign melanocytic nevi. *Cell Tissue Res*. 2013;351(1):85–98. doi:10.1007/s00441-012-1514-5.
254. Cheuk BLY, Cheng SWK. Identification and characterization of microRNAs in vascular smooth muscle cells from patients with abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 2014;59(1):202–9. doi:10.1016/j.jvs.2013.02.244.
255. Tambyah P a, Sepramaniam S, Mohamed Ali J, et al. microRNAs in circulation are altered in response to influenza A virus infection in humans. *PLoS One*. 2013;8(10):e76811. doi:10.1371/journal.pone.0076811.
256. Rigamonti AE, Agosti F, De Col A, et al. Severely obese adolescents and adults exhibit a different association of circulating levels of adipokines and leukocyte expression of the related receptors with insulin resistance. *Int J Endocrinol*. 2013;2013:565967. doi:10.1155/2013/565967.
257. Yadav A, Kataria M a, Saini V, Yadav A. Role of leptin and adiponectin in insulin resistance. *Clin Chim Acta*. 2013;417:80–4. doi:10.1016/j.cca.2012.12.007.
258. Miyazaki M, Ntambi JM. Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in lipid metabolism. *Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids*. 2003;68(2):113–121. doi:10.1016/S0952-3278(02)00261-2.
259. Ntambi JM, Miyazaki M, Stoehr JP, et al. Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(17):11482–6. doi:10.1073/pnas.132384699.
260. MacDonald MLE, Singaraja RR, Bissada N, et al. Absence of stearoyl-CoA desaturase-1 ameliorates features of the metabolic syndrome in LDLR-deficient mice. *J Lipid Res*. 2008;49(1):217–29. doi:10.1194/jlr.M700478-JLR200.
261. Brown JM, Chung S, Sawyer JK, et al. Inhibition of Stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) dissociates insulin resistance and obesity from atherosclerosis. *Circulation*. 2009;118(14):1467–1475. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.793182.Inhibition.
262. Matsui H, Yokoyama T, Sekiguchi K, et al. Stearoyl-CoA Desaturase-1 (SCD1) Augments Saturated Fatty Acid-Induced Lipid Accumulation and Inhibits Apoptosis in Cardiac Myocytes. Stadler K, ed. *PLoS One*. 2012;7(3):e33283. doi:10.1371/journal.pone.0033283.


263. García-Serrano S, Moreno-Santos I, Garrido-Sánchez L, et al. Stearoyl-CoA desaturase-1 is associated with insulin resistance in morbidly obese subjects. *Mol Med*. 2011;17(3-4):273–80. doi:10.2119/molmed.2010.00078.
264. Li F, Jiang C, Larsen MC, et al. Lipidomics Reveals a Link between CYP1B1 and SCD1 in Promoting Obesity. *J Proteome Res*. 2014;13(5):2679–2687. doi:10.1021/pr500145n.
265. Fernandez-Marcos PJ, Auwerx J. Regulation of PGC-1 α , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *Am J Clin Nutr*. 2011;93(4):884S–90. doi:10.3945/ajcn.110.001917.
266. Engeli S, Birkenfeld AL, Badin P, et al. Natriuretic peptides enhance the oxidative capacity of human skeletal muscle. *J Clin Invest*. 2012;122(12):4675–4679. doi:10.1172/JCI64526.we.
267. Patti ME, Butte a. J, Crunkhorn S, et al. Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(14):8466–8471. doi:10.1073/pnas.1032913100.
268. Hoekstra AS, Bayley J-P. The role of complex II in disease. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1827(5):543–51. doi:10.1016/j.bbabi.2012.11.005.
269. He J, Watkins S, Kelley DE. Skeletal Muscle Lipid Content and Oxidative Enzyme Activity in Relation to Muscle Fiber Type in Type 2 Diabetes and Obesity. *Diabetes*. 2001;50(4):817–823. doi:10.2337/diabetes.50.4.817.
270. Walenta E, Pessentheiner AR, Pelzmann HJ, et al. α/β -hydrolase domain containing protein 15 (ABHD15)--an adipogenic protein protecting from apoptosis. *PLoS One*. 2013;8(11):e79134. doi:10.1371/journal.pone.0079134.

APÉNDICE I

Regulación	Nombre	Tipo	p	B	Razón de cambio
	SNORD114-17	snoRNA C/D Box	0.0015	-1.0541	1.2780
	SNORA22	snoRNA H/ACA Box	0.0004	0.1181	1.2182
	SNORD56	snoRNA C/D Box	0.0017	-1.1471	1.2245
	SNOU13	snoRNA C/D Box	0.0041	-1.8719	1.2197
	SNOU13	snoRNA C/D Box	0.0002	0.4299	1.4026
	SNOU13	snoRNA C/D Box	0.0006	-0.3652	2.6825
	SNOU13	snoRNA C/D Box	0.0011	-0.8151	1.4112
	SNOU13	snoRNA C/D Box	0.0043	-1.9103	1.2379
	SNOU13	snoRNA C/D Box	0.0014	-1.0078	1.3254
	SNOU13	snoRNA C/D Box	0.0042	-1.8912	1.3205
	SNOU13	snoRNA C/D Box	0.0034	-1.7144	1.2929
	SNOU13	snoRNA C/D Box	0.0030	-1.6261	1.2799
	SNOU13	snoRNA C/D Box	0.0003	0.2938	1.4976
	SNOU13	snoRNA C/D Box	0.0002	0.8073	1.3005
	SNOU13	snoRNA C/D Box	0.0006	-0.2416	1.4529
	SNOU13	snoRNA C/D Box	0.0009	-0.6508	1.2870
	SNOU13	snoRNA C/D Box	0.0030	-1.6274	1.2548
	SNOU13	snoRNA C/D Box	0.0004	0.0028	1.4165
	SNOU13	snoRNA C/D Box	0.0003	0.2889	1.3345
	SNOU13	snoRNA C/D Box	0.0045	-1.9619	1.7846
	SNOU13	snoRNA C/D Box	0.0033	-1.7045	2.1082
	SNOU13	snoRNA C/D Box	0.0003	0.2830	1.2808
	SNOU13	snoRNA C/D Box	0.0008	-0.5808	2.0757
	SNOU13	snoRNA C/D Box	9.77E-06	2.9832	2.2327
	SNOU13	snoRNA C/D Box	0.0038	-1.8046	1.2881
	SNORD45	snoRNA C/D Box	0.0023	-1.4012	1.3627
	SNORA31	snoRNA H/ACA Box	0.0008	-0.5726	1.2304
	SNORA31	snoRNA H/ACA Box	0.0016	-1.0830	1.2763
	pre-hsa-let-7d	pre-miRNA	0.0007	-0.4393	1.2289
	pre-hsa-mir-16-2	pre-miRNA	0.0028	-1.5776	1.3505
	pre-hsa-mir-3143	pre-miRNA	0.0028	-1.5683	1.2414
	pre-hsa-mir-365-1	pre-miRNA	0.0026	-1.4960	1.2994
	pre-hsa-mir-4267	pre-miRNA	0.0015	-1.0758	1.2788
	pre-hsa-mir-4657	pre-miRNA	0.0019	-1.2279	1.4313
	pre-hsa-mir-526b	pre-miRNA	6.50E-05	1.4884	1.3442
	pre-hsa-mir-548ag-1	pre-miRNA	0.0010	-0.7318	1.2838
	pre-hsa-mir-548aj-2	pre-miRNA	0.0008	-0.5157	1.4924
	pre-hsa-mir-548al	pre-miRNA	0.0005	-0.1283	1.3111
	pre-hsa-mir-548an	pre-miRNA	0.0006	-0.3489	1.2684
	pre-hsa-mir-548g	pre-miRNA	0.0030	-1.6213	1.3750
	pre-hsa-mir-9-1	pre-miRNA	0.0026	-1.5172	1.2451
	hsa-miR-1263	miRNA	0.0004	0.0694	1.8775
	hsa-miR-1272	miRNA	0.0003	0.3427	2.3069
	hsa-miR-202-star	miRNA	0.0004	0.0707	1.6556
	hsa-miR-3148	miRNA	0.0019	-1.2685	1.3883
	hsa-miR-324-5p	miRNA	0.0001	1.0276	1.3753
	hsa-miR-383	miRNA	0.0039	-1.8462	1.2237
	hsa-miR-3921	miRNA	0.0037	-1.7927	1.6422
	hsa-miR-455-3p	miRNA	0.0013	-0.9177	2.8110
	hsa-miR-493-star	miRNA	0.0022	-1.3795	1.2178
	hsa-miR-548a-3p	miRNA	0.0021	-1.3386	2.7863
	hsa-miR-548ae	miRNA	4.01E-05	1.8744	2.5531
	hsa-miR-548h	miRNA	0.0011	-0.7947	1.3524
	hsa-miR-548x	miRNA	0.0009	-0.6573	2.0188
	SNORD27	snoRNA C/D Box	0.0010	-0.7603	1.2900
	SNORD32A	snoRNA C/D Box	0.0022	-1.3515	1.2120



APÉNDICE I (CONTINUACIÓN)

Regulación	Nombre	Tipo	p	B	Razón de cambio
	SNORD74	snoRNA C/D Box	0.0033	-1.6984	1.2742
	pre-hsa-mir-4540	pre-miRNA	0.0025	-1.4852	1.2179
	pre-hsa-mir-607	pre-miRNA	0.0006	-0.3370	1.2968
	hsa-miR-1260	miRNA	0.0025	-1.4828	1.6594
	hsa-miR-188-3p	miRNA	0.0002	0.4879	1.2840
	hsa-miR-1973	miRNA	0.0006	-0.3356	1.2211
	hsa-miR-2116-star	miRNA	0.0044	-1.9306	1.3575
	hsa-miR-4478	miRNA	0.0006	-0.2905	1.2147
	hsa-miR-4514	miRNA	0.0028	-1.5549	1.3252
	hsa-miR-4687-5p	miRNA	0.0001	0.8506	1.5051
	hsa-miR-650	miRNA	0.0014	-1.0259	1.2254

APÉNDICE II

Vía de señalización	p	Número de genes	Número de miRNAs reguladores
ErbB	5.09E-22	52	18
Rutas en cáncer	9.58E-21	154	18
Cáncer de prostata	1.36E-20	51	13
Adhesión focal	1.36E-20	94	16
Quimiocinas	4.33E-20	88	17
Carcinoma de células renales	5.72E-19	41	15
Sinapsis glutamatérgica	5.72E-19	61	16
MAPK	1.18E-18	117	18
Leucemia mieloide crónica	1.69E-18	44	15
<i>Gap junction</i>	1.69E-18	46	16
Sinapsis colinérgica	1.43E-17	61	17
TGF-beta	2.62E-17	44	13
Neurotrofina	2.78E-17	60	16
Glioma	2.78E-17	41	17
<i>Adherens junction</i>	3.84E-17	45	14
PI3K-Akt	5.57E-17	143	18
Cáncer colorectal	7.02E-17	38	14
Sinapsis dopaminérgica	1.00E-16	64	17
Cáncer pancreático	8.28E-16	38	13
Cáncer de células pequeñas pulmonares	1.25E-15	42	12
Long-term potentiation	2.47E-15	38	17
<i>Axon guidance</i>	2.53E-15	63	16
p53	5.79E-15	35	11
Invasión bacteriana de células epiteliales	1.12E-14	38	15
Leucemia mieloide aguda	1.37E-14	34	12
Cáncer de células no pequeñas pulmonares	5.42E-14	30	15
Infección por HTLV-I	1.39E-13	112	17
Supervisión de mRNA	1.59E-13	46	15
Cáncer de endometrio	3.22E-13	31	14
Desregulación transcripcional en cáncer	7.17E-13	84	18
Wnt	1.04E-12	74	19
Adipocitocinas	1.80E-12	35	14
Endocitosis	3.80E-12	88	18
Regulación de citoesqueleto de actina	2.52E-11	94	17
Degradación de RNA	2.52E-11	36	13
Receptor de células T	4.18E-11	50	15
Melanogenesis	4.18E-11	48	16
Insulina	4.46E-11	61	17
Fagocitosis mediada por Fc gamma R	4.55E-11	44	15
Receptor de células B	6.65E-10	36	14
Ritmo circadiano	7.11E-10	21	10
GnRH	9.21E-10	42	16
Hepatitis B	1.28E-08	69	17
Procesamiento de proteínas en el retículo endoplásmico	1.61E-08	76	15
Reabsorción de sodio regulado por aldosterona	2.88E-08	20	13
Notch	3.03E-08	23	10
Enfermedades priónicas	4.58E-08	15	12
Melanoma	5.95E-08	34	12
HIF-1	7.75E-08	49	15
Regulación endocrina de la reabsorción de Calcio	1.38E-07	27	13
Señalización endocannabinoide retrógrada	1.44E-07	51	16
Formación del eje dorso- ventral	1.67E-07	18	13
Secresión de ácido gástrico	2.05E-07	35	15
Hedgehog	4.51E-07	24	11
Ciclo celular	3.08E-06	58	17
Jak-STAT	7.94E-06	62	16

APÉNDICE II (CONTINUACIÓN)

Vía de señalización	p	Número de genes	Número de miRNAs reguladores
Infección por <i>Vibrio cholerae</i>	4.82E-05	24	11
Metabolismo de selenocompuestos	0.0001	10	8
Hepatitis C	0.0001	53	16
Infección patogénica por <i>Escherichia coli</i>	0.0001	24	13
Shigellosis	0.0002	27	11
Factores de transcripción basales	0.0002	20	8
Secreción salivaria	0.0003	36	13
Sinapsis GABAérgica	0.0004	45	15
Biosíntesis de glicosaminoglicanos	0.0004	14	10
VEGF	0.0004	28	15
Cáncer tiroideo	0.0004	15	11
Enfermedad de Chagas	0.0005	44	16
Sistema de señalización de fosfatidilinositol	0.0007	40	17
Secreción pancreática	0.0008	39	15
Carcinoma de células basales	0.0014	23	12
Contracción de células musculares vasculares lisas	0.0014	50	18
mTOR	0.0015	27	13
Fc epsilon RI	0.0016	29	15
Apoptosis	0.0024	39	13
Sarampión	0.0041	56	14
Señalización en células epiteliales por infección por <i>Helicobacter pylori</i>	0.0044	27	9
Metabolismo de inositol fosfato	0.0076	26	13
Diferenciación de osteoclastos	0.0103	49	14
Cardiomiopatía de ventrículo derecho	0.0108	34	14
Cardiomiopatía dilatada	0.0134	35	14
<i>Tight junction</i>	0.0171	55	15
Exportación de proteínas	0.0184	10	8
Biosíntesis de esteroides	0.0201	10	9
<i>Spliceosome</i>	0.0211	49	13
Meiosis de ovocitos	0.0259	51	17
Maduración de ovocitos mediada por progesterona	0.0266	32	13
Cardiomiopatía hipertrófica	0.0266	32	13
Digestión y absorción de carbohidratos	0.0325	17	11
Sinapsis serotoninérgica	0.0359	43	13
Adicción a nicotina	0.0409	19	12