



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Papel de los miARNs en la programación metabólica de la obesidad. Análisis de un miARN específico.

Andrea Sánchez Bueno

Grau de Bioquímica

Any acadèmic 2018-19

Treball tutelat per Juana Sánchez Roig
Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X			X

Paraules clau del treball:

miARN, miR-200a, programación metabólica, obesidad, metabolismo lipídico, resistencia insulínica

ÍNDICE

1. Resumen	2
2. Introducción	3
2.1. Biogénesis, mecanismo y funciones de los miARNs	3
2.2. Programación metabólica de la obesidad y miARNs en la leche materna	5
2.2.1. Teorías de transmisión de miARNs de la leche de madre a hijo ...	6
2.2.2. Alteración del patrón de miARNs en leche materna según la dieta y obesidad materna	7
2.3. miR-200a	9
3. Objetivos	10
4. Materiales y métodos	10
4.1. Diseño experimental	10
4.2. Cultivo celular	11
4.3. Transfección in vitro	11
4.3.1. Teoría del mimético e inhibidor específico del miR-200a	12
4.4. Extracción, purificación y cuantificación de ARN total	13
4.5. Retrotranscripción (RT)	13
4.6. Real Time PCR (RT-PCR)	14
4.7. Análisis estadístico	14
5. Resultados y discusión	15
5.1. Validación experimental de la transfección mediante Controles positivos del mimético e inhibidor	15
5.2. Efecto del mimético e inhibidor específico del miR-200a sobre la expresión génica	16
6. Conclusiones	17
7. Bibliografía	18

1. Resumen

Algunas patologías crónicas con gran prevalencia entre la población como la obesidad comienzan a ser desarrolladas desde etapas muy tempranas en el desarrollo humano. Se ha visto que alteraciones en el estado nutricional de la madre favorecen el riesgo de aparición de dichas patologías en lo que se conoce como “programación metabólica temprana”. Los miARNs han surgido como reguladores esenciales en dicho proceso. Estas moléculas se ven alteradas en la leche materna en un estado obesogénico per se o inducido por una dieta hipercalórica.

El objetivo del presente trabajo de fin de grado es analizar los efectos de un miARN específico alterado en la leche materna por un ambiente obesogénico, el miR-200a, sobre la expresión de algunos genes relevantes de la vía insulínica y el metabolismo lipídico en un cultivo celular de hepatocitos (HepG2).

Para ello, en primer lugar, se pretende validar la técnica de transfección *in vitro* mediante controles positivos del mimético miR-1 y el inhibidor del miARN let-7c endógeno. Una vez verificado, se analiza la expresión de los genes *INSR*, *IRS1* y *FASN* tras la transfección *in vitro* con un mimético e inhibidor específico del miR-200a. Además, se pretende corroborar si el *IRS1*, diana predictiva del miR-200a según *Target Scan* es una diana directa o no.

Los resultados muestran un claro efecto del mimético del miR-200a sobre el receptor de insulina (*INSR*), incrementando sus niveles. En cambio, los resultados obtenidos para la expresión del *IRS1* y *FASN* no son concluyentes, aunque se muestra una tendencia al incremento de la expresión de *FASN*, que podría ser efecto directo de la presencia del mimético del miR-200a o indirecto por el incremento de *INSR*. Por último, *IRS1* no se ha podido validar como diana del miR-200a.

1. Abstract

Some chronic pathologies with high prevalence among the population such as obesity begin to be developed from very early stages in human development. It has been seen that alterations in the nutritional state of the mother favor the risk of appearance of such pathologies in what is known as “early metabolic programming”. miRNAs have emerged as essential regulators in this process. These molecules are altered in breast milk in an obesogenic state per se or induced by a hypercaloric diet.

The aim of this end-of-grade work is to analyze the effects of a specific miRNA altered in breast milk by an obesogenic environment, miR-200a, on the expression of some relevant genes of the insulinic pathway and lipid metabolism in a cell-hepatocytic culture (HepG2).

In order to do this, the first step is to validate the in vitro transfection technique by means of positive controls of the miR-1 mimetic and the endogenous miRNA let-7c inhibitor. Once verified, the expression of the INSR, IRS1 and FASN genes after in vitro transfection is analyzed with a miR-200a specific mimetic and inhibitor. In addition, it is intended to corroborate whether the IRS1, predictive target of miR-200a according to Target Scan is a direct target or not.

The results show a clear effect of the miR-200a mimic on the insulin receptor (INSR), increasing its levels. On the other hand, the results obtained for the expression of IRS1 and FASN are not conclusive, although there is a tendency to increase the expression of FASN, which could be a direct effect of miR-200a mimic or mediated by the increase of INSR. Finally, IRS1 could not be validated as a target of miR-200a.

2. Introducción

2.1. Biogénesis, mecanismo y funciones de los miARNs

El descubrimiento de los microARNs (miARNs) ha sido un gran avance para el campo de la biología molecular. El primer miARN descubierto fue gracias a un estudio genético para caracterizar y aislar variantes mutantes de linajes de *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), donde se identificó el gen *lin-4* que en principio se creía que codificaba para una proteína implicada en el desarrollo de nematodo ¹. Posteriormente se observó que codificaba para un ARN pequeño de 22 nucleótidos con función reguladora, que se unía por complementariedad antisentido a otro ARNm de la red de desarrollo de *C. elegans*, *lin-14*, ejerciendo una regulación post-traduccional sobre este ^{2,3}. También se descubrió otro miARN, *let-7*, muy conservado en distintos organismos además de en *C. elegans* (también en humanos), sugiriendo la importancia de estos pequeños ARNs reguladores en distintos procesos biológicos ⁴. El ARN *let-7* se expresa en diversos tejidos humanos como hígado, cerebro, corazón, pulmón, riñón, en distintos niveles de concentración durante etapas tardías del desarrollo ⁴. Se ha visto que lleva a cabo una función importante en el control del metabolismo de la glucosa y en la sensibilidad a la insulina ⁵.

Por tanto, se definen los miARNs como pequeños ARN no codificantes de unos 22 nucleótidos, presentes en diversos fluidos corporales, tejidos y células, cuya función es reprimir ARN mensajeros diana específicos bloqueando su traducción o degradándolos ².

La mayoría de transcritos de miARN derivan directamente de genes miARN, pero otra porción (una cuarta parte de los genes miARN humanos) proviene de intrones o regiones UTR de pre-ARNm codificantes de proteínas. La transcripción de estos genes miARN en el núcleo por la ARN polimerasa II da lugar a transcritos primarios policistrónicos (con múltiples productos génicos) que presentan estructuras secundarias en horquilla, también llamadas tallo-bucle (*stem-loop*) o bucle en horquilla, formadas por una región de secuencias ARN complementarias antisentido, una secuencia de bases desemparejadas que forman el loop y los segmentos flanqueantes de ARN de cadena simple (5' y 3') ^{6,7}. Este transcrito primario se conoce como pri-miARN o miARN primario, y es procesado en el núcleo por el enzima endonucleasa Drosha (RNasa III) y la proteína DGCR8 (complejo Drosha-DGCR8) dando lugar al precursor en horquilla o pre-miARN, de unos 70 pb aproximadamente (*Figura 1*) ^{2,8}. Este sale del núcleo hacia el citoplasma gracias a la proteína Exportina 5 de manera dependiente de Ran-GTP, y es procesado por el enzima Dicer (otra endonucleasa RNasa) junto con la proteína de unión al ARN-TAR (TRBP) que separan la estructura lazo-bucle que mantenía unidas ambas cadenas de ARN por un extremo ⁷. Así se habrá formado un dúplex imperfecto tipo siARN con dos cadenas complementarias de miARNs de unos 22 nucleótidos aproximadamente cada uno ⁶. Por un lado está la cadena denominada "5p" (del extremo 5' del lazo-bucle del pre-miARN) y por otro la "3p" (del extremo 3'); pero solo una de ellas se incorporará como el miARN maduro en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC o miRISC), siendo la otra eliminada ². Generalmente se denomina a esta cadena que será degradada como la cadena asterisco, del inglés "*star strand*", o miARN* ².

En la formación de este complejo ribonucleoproteico participan varias proteínas, destacando miembros de la familia Argonauta (AGO 1-4) que median tanto en el procesamiento del pre-miARN como en el ensamblaje del complejo RISC junto con la proteína Dicer y TRBP. En humanos no se ha identificado diferencias entre la función de estas cuatro proteínas AGO, por lo que se cree que todas ellas modulan indistintamente este proceso ⁷. Por último, participa una helicasa que separa ambas cadenas complementarias del dúplex miARN, dejando por un lado el miARN maduro unido a la proteína AGO, y por otro la cadena miARN complementaria que se elimina ⁶.

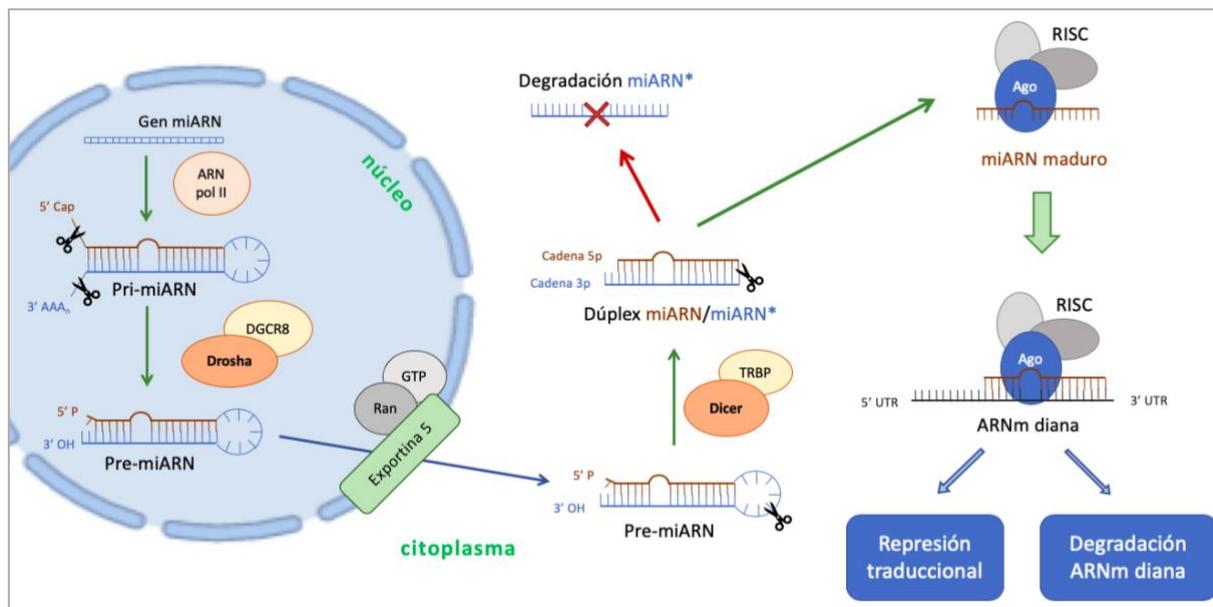


Figura 1. Modelo de biogénesis de miARNs en humanos. Transcripción de un gen miARN por la RNA pol II, procesamiento del pri-microRNA por el enzima Drosha, transporte del precursor pre-miARN al citoplasma y procesamiento por el enzima Dicer. Escisión del dúplex miARN junto con la formación del complejo RISC (y la familia proteica AGO) sobre el miARN maduro y degradación de la cadena complementaria. Represión del ARNm diana por parte del complejo miARN/RISC. Elaboración propia adaptada de ⁹.

Los miARNs maduros del complejo de silenciamiento actúan reprimiendo a los ARNm de secuencia complementaria mediante degradación por endonucleasa o por la represión traduccional de dicha diana. Una vez formado el complejo de silenciamiento RISC, gracias a la interacción de la proteína AGO con el miARN maduro, se comienza la búsqueda de las dianas complementarias, permitiendo su interacción. La asociación miARN-ARNm se puede dar por la denominada región semilla (del inglés “seed región”) situada en el extremo 5’ del miARN que comprende los nucleótidos 2-7, por la región central (entre los nucleótidos 9 y 11) y/o por el extremo 3’ del miARN ².

Si el emparejamiento de la región central es lo suficientemente perfecto se activa la degradación por AGO2 a través de su actividad endonucleasa, ejerciendo un corte entre los nucleótidos 10 y 11 ⁶. En cambio, si este no es del todo complementario se activaría el mecanismo de represión traduccional. Pero además, hay ocasiones en las que la interacción no se da por la región central sino por la región semilla (extremo 5’ del miARN) y en vez de darse la degradación por AGO2 se reclutarían cuerpos P citoplasmáticos con complejos con capacidad deadenilasa que eliminarían la cola de poliA del ARNm bloqueando su traducción ².

En muchos casos, el mecanismo de represión traduccional mediado por miARN se cree que está determinado por la complementariedad de la región 5’ de estos con la 3’UTR del ARNm diana ⁶.

Se ha intentado elucidar las funciones biológicas que presentan los miARNs, y gracias a diversos estudios *knockout* en modelos animales transgénicos de genes como Dicer o DGCR8, necesarios para la biogénesis de miARNs se vio que dicho déficit provocaba la muerte del embrión ¹⁰. Por tanto, se ha atribuido a este tipo de ARNs pequeños no codificantes un papel esencial en el desarrollo de mamíferos, demostrando su participación en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos y en el estado de diferenciación de estos ². Concretamente se ha demostrado su interacción en la formación y función de la red neuronal, el desarrollo de líneas hematopoyéticas, músculo cardíaco, células madre y del sistema inmune mamario ⁸.

Además, cambios en el patrón normal de expresión de miARNs o en la regulación de estos se han asociado con la presencia de patologías como el cáncer, la enfermedad metabólica y patogénesis vírica (hepatitis), aunque la mayoría de consecuencias fenotípicas no se conocen del todo ^{2,6}. Otro de los enfoques para

conseguir elucidar su función es a través de modelos computacionales en los que se analiza el rol de la diana predictiva de dicho miARN.

Por otro lado, se han identificado algunos miARNs como importantes moduladores epigenéticos, los denominados epi-miARN. El epigenoma juega un papel importante en el desarrollo del fenotipo, permitiendo adaptar la expresión génica y el fenotipo a las influencias ambientales. La regulación epigenética consiste en modificaciones reversibles sobre el ADN, histonas y la estructura de la cromatina que no afectan a la secuencia génica y que pueden transmitirse por herencia transgeneracional. Estas modificaciones permiten regular la expresión génica y consisten principalmente en: metilación del ADN (principalmente en las islas CpG de regiones promotoras de un gen), modificaciones post-traduccionales de histonas (acetilación, metilación, fosforilación, etc) y regulación por ARNs no codificantes, como los miARN ^{11,12}.

Los miARN pueden actuar sobre componentes enzimáticos de la maquinaria epigenética como ADN metiltransferasas (DNMT), histona metiltransferasas (HMT) e histona desacetilasas (HDAC), pero además, la expresión de algunos miARNs también está condicionada bajo la regulación por enzimas moduladores epigenéticos, creándose un círculo de retroalimentación entre miARN y epigenética, tal y como se muestra en la *Figura 2* ¹².

Los miARN influyen sobre la metilación del ADN mediante la represión de enzimas relacionados con la metilación (DNMTs) y desmetilación del ADN (TET), influyendo sobre la expresión de los genes diana afectados por estos enzimas epigenéticos. Además, pueden regular la modificación histónica mediante la represión de enzimas HMT o HDAC, uniéndose a la región 3'UTR de sus ARNm codificantes durante la espermatogénesis en mamíferos. Por lo que una sobreexpresión de estos epi-miARN que regulan las HDAC, disminuiría su expresión, incrementando los niveles de algunas marcas de acetilación que favorecen la expresión del gen diana de esa región ¹².

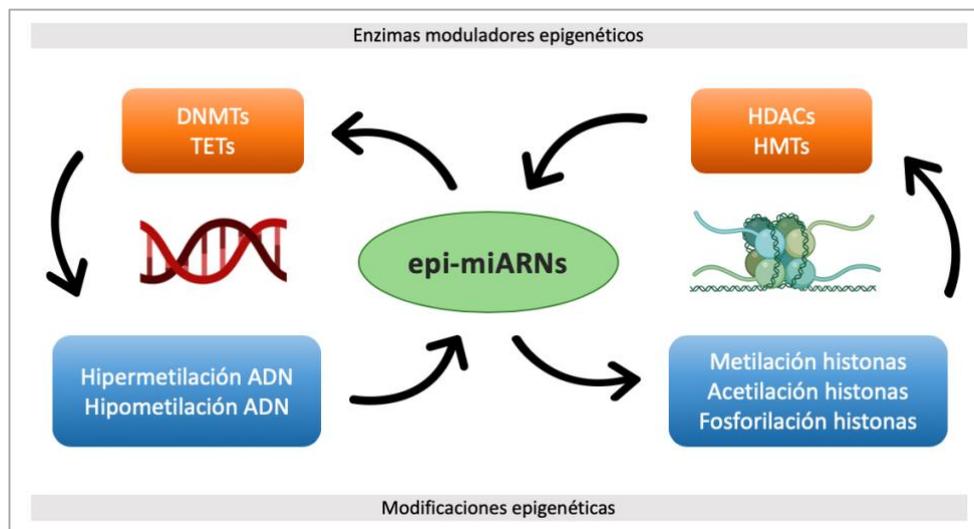


Figura 2. Ilustración del bucle de retroalimentación miARN-epigenética. Elaboración propia adaptada de ¹².

2.2. Programación metabólica de la obesidad y miARNs en la leche materna

La obesidad es una patología multifactorial que presenta una gran prevalencia en la población actual, es causada por factores genéticos y ambientales que conllevan cambios en las vías de señalización del control alimenticio, la adipogénesis y la eficiencia energética en tejidos como el hígado, músculo y tejido adiposo del individuo. Cursa con un balance energético positivo que es productor del incremento patológico de grasa corporal en el individuo afectado. Cada vez son más las evidencias que abalan que su origen pueda darse durante etapas muy tempranas del desarrollo (en la gestación) mostrando la existencia de factores

que aumentan el riesgo de padecer dicha patología en la edad adulta, en lo que se conoce como el fenómeno de la **programación metabólica temprana** ¹³⁻¹⁷.

Existen “periodos críticos” en los cuales una mínima alteración en el programa de desarrollo por cambios en el ambiente materno puede tener efectos duraderos a lo largo de la vida del neonato, pudiendo darse en el estado prenatal, perinatal o posterior al nacimiento, y afectando al epigenotipo y fenotipo de este ¹⁸. Un creciente número de investigaciones muestran cómo la malnutrición de la madre durante el proceso de gestación, véase por una restricción calórica o por un exceso energético (dietas obesogénicas), puede conllevar una mayor susceptibilidad de padecer determinadas alteraciones o patologías en la vida adulta del individuo neonato ¹⁹. Así mismo, se está asociando la obesidad materna con el riesgo de tener un niño con una mayor masa corporal, y con mayor predisposición a padecer obesidad o resistencia a la insulina, pudiendo derivar incluso en una diabetes mellitus ¹¹.

La leche materna es la principal fuente de alimentación del neonato. Esta contiene diversos componentes nutricionales y bioactivos que proporcionan los recursos óptimos para su nutrición, protección inmunológica, procesos metabólicos, desarrollo y crecimiento durante el proceso de lactancia ^{8,18,20}. Desde hace tiempo se sabe que los miARNs están presentes en diversos fluidos de mamíferos, intracelulares y extracelulares, tales como la saliva, orina, heces, plasma y la leche materna; siendo la leche (en humanos) uno de los más enriquecidos, con unos 1400 miARN maduros aproximadamente ^{2,20}.

El fluido lácteo presenta tres fracciones: células mamarias lácteas (como los lactocitos, derivadas del epitelio de la glándula mamaria), la fracción lipídica y la leche desnatada (también denominada “plasma de la leche”). La mayor proporción de miARNs se atribuye a las células mamarias, siendo la leche desnatada, la que menor cantidad presenta tanto de miARNs como de ARN total ^{9,20}. Además, la fracción celular, a parte de ser la que más contenido de miARNs tiene, muestra una gran relación en cuanto al patrón de expresión entre especies con la fracción lipídica ⁹.

En modelos de ratón se ha demostrado que los miARNs participan tanto en el desarrollo del tejido mamario, durante el embarazo y la lactancia, como en la producción de leche por parte de la glándula mamaria ⁹. Además, en un estudio posterior, Alsaweed y su equipo confirmaron que es la glándula mamaria la que contribuye mayormente en la biosíntesis de miARNs de la leche en comparación con los aportados desde la sangre materna, puesto que los lactocitos y los lípidos lácteos se originan en la glándula ²¹.

A parte de otros componentes con efecto inmunoprotector de la leche como leucocitos, inmunoglobulinas, lisozimas, lactoferrina y oligosacáridos, diversos estudios han demostrado la comunicación molecular y transmisión de miARN relacionados con el sistema inmunitario entre madre e hijo. Se han propuesto dichas moléculas como agentes protectores frente a problemas digestivos, infecciones respiratorias y gastrointestinales y enfermedades crónicas como la obesidad o la diabetes en el recién nacido. Tras superar las fuertes condiciones del tracto GI, los miARN permiten el desarrollo del sistema inmune del bebé mediante su transmisión y comunicación con las células inmunológicas ^{22,23}. Los resultados del estudio de Kosaka mostraron que los miARN derivados de exosomas de la leche materna coordinan el aumento del número de células T reguladoras CD4+ y CD25+, y la activación de la diferenciación de células B, por lo que actúan de forma similar a la comunicación por citoquinas ²².

2.2.1. Teorías de transmisión de miARNs de la leche de madre a hijo

Crecientes evidencias afirman que los miARN que se transfieren al bebé neonato a través de la leche que ingieren durante la lactancia, lo hacen dentro de los denominados “vehículos de transporte” tales como exosomas, microvesículas y células somáticas. Estos una vez ingeridos viajan a lo largo del tracto gastrointestinal (GI) del niño superando las condiciones adversas del ambiente (pH ácido y elevadas temperaturas), y son finalmente absorbidos e internalizados por las células intestinales alcanzando el

plasma. Una vez ahí, viajan hacia otros tejidos o células, donde ejercen la función reguladora sobre la expresión de sus genes diana ^{8,20}.

Uno de los modelos más defendido es el transporte mediado por exosomas, vesículas con una fina capa lipídica de origen endocítico que envuelven al miARN facilitando su transmisión en la comunicación célula-célula. Existen evidencias que demuestran un alto contenido de miARNs relacionados con el sistema inmune en exosomas de la leche materna que resisten a adversas condiciones. Zhou y su equipo comprobaron dicha resistencia exponiendo los exosomas extraídos de la leche materna humana a largas incubaciones a temperatura ambiental y a 100°C, así como a diversos ciclos de congelación y descongelación, ebullición y degradación por RNAsa. En todos los casos se recuperaron intactos demostrando su gran estabilidad. Sugiriendo por tanto la eficacia de estos complejos exosoma-miARN en la transmisión madre-hijo ^{8,24,25}.

Estas vesículas extracelulares se captan por endocitosis mediante el reconocimiento por glicoproteínas en la superficie de distintos tipos celulares del recién nacido, internalizando así las vesículas a la circulación ^{9,24}.

Los miARNs también pueden viajar **libres** sin asociarse a vehículos de transporte gracias a su propia gran estabilidad en condiciones adversas. Se ha visto que no desnaturalizan su estructura cuando son expuestos a altas y bajas temperaturas (condiciones que se dan en procesos de pasteurización de la leche o almacenaje de esta), ni tampoco frente a pH muy ácidos (pH 1) típicos de regiones como el sistema digestivo o el tracto intestinal. La supervivencia de estas moléculas en el transporte tras la ingesta se ve además favorecida en los bebés neonatos, puesto que el pH de su tracto GI es menos ácido que el de una persona adulta. Por último, son resistentes frente a la degradación por RNAsas (enzimas ribonucleasas que rompen las moléculas de ARN en pequeños fragmentos) que están presentes en altas concentraciones en la leche de mamíferos ⁹.

De hecho, en estudios de detección de miARNs maduros extracelulares circulantes en sangre periférica y medios celulares, se ha visto como el 97% de miARN estaban libres de exosomas, revelando solo una pequeña fracción asociada a exosomas en pellets tras procesos de centrifugación ²⁶. Andrey Turchinovich y su equipo proponen que una porción significativa de miARN extracelulares son exportados mediante su unión a proteínas de la familia **AGO**, con las que forman intracelularmente el complejo de silenciamiento RISC. Esta unión favorece su resistencia a enzimas ribonucleasas como la RNAsa permaneciendo estables en el plasma sanguíneo. De otra manera, sugieren que, debido a la gran estabilidad de los miARN intracelulares libres, la alta fracción extracelular pueda derivar de células muertas por necrosis o apoptosis ²⁶.

Por último, se ha constatado que también podrían participar en este transporte madre-hijo células somáticas cargadas con miARN como las células mamarias de la leche, células madre o incluso células inmunitarias de la leche ⁹.

2.2.2. Alteración del patrón de miARNs en leche materna según la dieta y obesidad materna

Actualmente, se está investigando sobre los cambios en el contenido y expresión de miARNs en la leche de mamíferos influenciados por el estado de la madre. Durante el embarazo y la lactancia, tanto el ambiente inmunológico materno, como el metabólico y el endocrino pueden afectar a este patrón, conllevando efectos futuros en la progenie ^{8,18}.

Por un lado, se está estudiando el efecto del **estado de salud** de la madre, concretamente el de su pecho. En un estudio con modelos bovinos que analizaban vacas sanas y vacas infectadas con *S. uberis* se observó cambios en la expresión de una serie de miARNs con efecto inmunológico sobre el bebé ^{9,27}. En este se

declaró que el contenido inmunológico de la leche materna varía en función del estado de salud tanto de la madre como del niño para favorecer la protección y mejoría del neonato^{23,28}.

Otro de los factores que destaca en el proceso de regulación del patrón de miARNs son las hormonas. Una de las más influyentes es la prolactina, que estimula el desarrollo de la glándula mamaria, la producción de leche durante la lactancia y altera los niveles de miARN de dicho fluido. En personas obesas se ha visto como el incremento de los niveles de leptina (típico de esta patología) genera resistencia a la acción de la prolactina, por lo que se altera los procesos mediados por dicha hormona²⁹. A esto se le suman evidencias que muestran cómo un bloqueo temprano en la acción leptinémica en ratas recién nacidas, altera el patrón de expresión de determinados miARN en el hipotálamo favoreciendo la predisposición al sobrepeso³⁰. Además, se sabe que la leptina está implicada en la organización de la red neuronal del hipotálamo, por lo que alteraciones en los niveles o acción de la leptina durante el estado perinatal por el estado obesogénico de la madre pueden afectar al control de la homeostasis energética en la edad adulta del descendiente³¹.

La leche, antes o después de la **alimentación materna**, también puede variar. Después de la ingesta alimenticia (estado post-alimentación) este fluido presenta un mayor contenido lipídico y celular en comparación con la leche en estado de pre-alimentación materna (antes de la ingesta). El contenido total de miARNs no varía prácticamente, pero sí lo hace de forma significativa la expresión o patrón de alguno de ellos, aumentando. Además, en la glándula mamaria lactante, esta regulación tras el estado post-alimenticio puede llevar asociada un incremento en la síntesis de lactocitos, estimulando su división celular y, por tanto, una mayor síntesis de leche. Los miARNs expresados a la alza tras la alimentación de la madre regulan la expresión de diversos genes, involucrados en la síntesis de lactosa, la producción de Inmunoglobulina A (una de las más importantes en la defensa del tracto GI del neonato frente a infecciones), ácidos grasos, etc²⁰.

Pero no solo influye el consumo de alimentos, sino también el **tipo de dieta** ingerida y la **adiposidad *per se*** de la madre²⁹.

En embriones ovinos se vio como la exposición a la obesidad materna durante la concepción mostraba un incremento de la expresión de los miARN hepáticos miR-29b, miR-103 y miR-107, lo cual además se relacionó con los defectos que disminuían la señalización insulínica en hígado y tejido adiposo, favoreciendo la aparición de resistencia insulínica y posible obesidad y/o diabetes mellitus en la descendencia^{11,12}.

Por otro lado, diversos estudios han demostrado que tanto la restricción calórica como dietas hipercalóricas (como la dieta de cafetería) influyen sobre los niveles de miARN de la leche materna, afectando a la programación metabólica y fenotipo del lactante, y aumentando el riesgo de padecer futuras patologías crónicas^{29,31-33}. Sin embargo, a pesar de las crecientes evidencias que lo abalan, no se conocen del todo los mecanismos que lo llevan a cabo.

En un estudio reciente se analizaron los niveles de miARN en la leche de dos modelos de rata: modelo cafetería y post-cafetería²⁹. Las primeras eran ratas normopeso alimentadas con una dieta obesogénica durante la lactancia; las ratas del modelo post-cafetería son ratas con obesidad inducida por la dieta (ratas alimentadas con dieta de cafetería de día 10 a día 100 edad) a las que se les normaliza la dieta 1 mes antes de la gestación. El primer modelo muestra la influencia de la ingesta y el segundo la influencia de la obesidad o adiposidad *per se* de la madre. En ambos casos se cursó un incremento del contenido graso, proveniente del propio proceso de lactancia, no por el tipo de dieta ingerida²⁹.

Se examinó en ambos modelos los niveles de ARN total, miARNs y ARNs pequeños en leche a día 5, 10 y 15 de lactancia. Se vio que, durante la lactancia, tanto en los modelos control como en el cafetería, todos ellos aumentaron, aunque el modelo cafetería presentó concentraciones más bajas respecto al control. Sin embargo, en el post-cafetería no se observaron diferencias significativas (ni entre grupos ni en el periodo de lactancia). Asimismo, se analizó qué miARNs específicos estaban alterados en la leche dependiendo de

la dieta ingerida y de la situación de adiposidad de la madre en general. Estos miARN fueron seleccionados, consultando fuentes bibliográficas, por estar relacionados con diferentes procesos fisiopatológicos asociados con la obesidad ²⁹.

Uno de los miARN alterados en leche de ratas alimentadas con dieta de cafetería es el **miR-200a**, analizado experimentalmente en el presente trabajo, del cual no se apreciaron diferencias significativas entre los grupos control y post-cafetería. En cambio, en el modelo cafetería se observó un descenso significativo de su concentración (respecto del control) tras los 15 días de ingesta de la dieta hipercalórica, reflejando el impacto de este tipo de dieta durante la lactancia en el perfil de este miARN ²⁹.

En última instancia, en dicho estudio se validó como alteraciones en los niveles de expresión de ciertos miARNs en la leche del modelo cafetería se asocian con cambios en la expresión de sus dianas predictivas en las crías lactantes ²⁹.

Por último, de forma similar, la extracción de leche y la alimentación del neonato son factores que pueden influir sobre el contenido de miARNs de la leche materna, hecho que está siendo investigado actualmente ⁸.

2.3. miR-200a

En el presente trabajo fin de grado, se ha seleccionado un miARN específico, el miR-200a, cuyos niveles están alterados (menores niveles) en leche de ratas alimentadas con una dieta obesogénica, la dieta de cafetería.

El precursor (pre-miARN) se trata de un ARN lineal compuesto por 90 pb presente en distintas especies animales. En el ser humano, la secuencia nucleotídica de ambas cadenas derivadas del procesamiento del pre-miARN (5p y 3p) se muestra en la *Tabla 1*.

Cadena madura derivada del precursor	Secuencia nucleotídica
hsa-miR-200a-5p	5' - caucuaccggacagugcugga - 3'
hsa-miR-200a-3p	5' - uaacacugucugguaacgaugu - 3'

Tabla 1. Se muestra la secuencia nucleotídica específica de las cadenas 5p y 3p derivadas del precursor hsa-miR-200a obtenidas de la base de datos miRBase.

Consultando bibliografía sobre el papel que pueda tener este miARN se ha constatado que está implicado en distintos procesos del organismo. Concretamente el miR-200a-3p se ha relacionado con el linfoma de Hodgkin y algunos cánceres orales, destacando entre los top-10 miARNs involucrados en funciones reguladoras del sistema inmune ²⁵. Un reciente estudio publicado en marzo de 2019 demuestra el papel positivo del miARN-200a en la inhibición de la vía HGF/c-Met, que permite la supresión de la migración e invasión de las células de cáncer de pulmón (NSCLC, en inglés *nonsmall cell lung cancer cells*) ³⁴. Además, en el estado metastásico del cáncer de mama se ha relacionado una sobreexpresión de este miARN con la resistencia al efecto del tratamiento quimioterapéutico ³⁵. Los ejemplos son variados en cuanto al papel que ejerce en distintos tipos de cáncer, siendo el patrón alterado de expresión del miR-200a en muchos casos un biomarcador en la detección clínica ³⁶. Se ha visto por otro lado, que el miR-200a podría estar implicado en la activación de los mecanismos de apoptosis en neuronas dopaminérgicas de trastornos neurodegenerativos como el Alzheimer o la Esclerosis múltiple, mediante la regulación de su diana SIRT1 ³⁷.

Oger y su equipo han observado en el tejido adiposo blanco visceral de modelos murinos obesos con resistencia a la insulina (ob/ob) que el miR-200a es uno de los miARNs con niveles de expresión más alterados, disminuyendo respecto a ratones control no obesos (*wild-type*). Este hecho fue confirmado en

pacientes diabéticos obesos, donde además se mostró que esta disminución de la expresión de miR-200a era específica del tejido adiposo visceral, no mostrándose alteraciones en músculo ni hígado. Además, se confirmó que tras la disminución de los niveles del miR-200a sus dianas validadas también se veían alteradas, en una relación inversa de su expresión³⁸.

Se han elaborado estudios similares sobre la acción del miR-200a en la regulación de la vía insulínica en modelos de obesidad y diabetes. En 2016, Guo *et al.* realizaron un estudio sobre el posible efecto beneficioso del *bypass* duodeno-yeyuno en la resistencia insulínica hepática como modelo de mejora de pacientes diabéticos u obesos. Se procedió a una transfección *in vitro* con lentivirus sobre líneas celulares de hígado de rata con un inhibidor y mimético del miR-200a, y se observó que la diana Rheb (un homólogo de la familia proteica Ras que regula la vía insulínica) aumentó su expresión tras la transfección con el inhibidor del miARN, sucediendo lo contrario con el mimético. Este aumento en la expresión de Rheb como respuesta de una baja expresión del miR-200a se relacionó con una recuperación en la señalización insulínica en dichos modelos, sugiriendo una posible mejora del fenotipo obeso/diabético³⁹.

Por otro lado, se ha constatado que un bloqueo en la acción leptinémica de ratas recién nacidas alteraba los niveles del miR-200a en el hipotálamo y el hígado de tal forma que las predisponía a la aparición de resistencia a la insulina y a la leptina en la vida adulta de la rata³⁰.

3. Objetivos

La leche materna contiene miARNs. Los niveles de algunos de estos miARNs pueden estar alterados ante un ambiente obesogénico durante la lactancia. Previamente se había descrito que los niveles de miR-200a están disminuidos en leche de ratas alimentadas con dieta de cafetería en comparación con ratas control. Además, esta disminución se relaciona con la ingesta de la dieta obesogénica más que con la obesidad materna *per se*, ya que en un modelo de obesidad dietética a la que se le normaliza la dieta antes de la gestación, no se observa esta disminución en los niveles de miR-200a. Hay indicios de sugieren que cambios en los niveles de miARNs específicos de la leche pueden afectar a la expresión de sus genes diana en los individuos lactantes. Por ello, resulta interesante conocer cuáles son las dianas del miR-200a, como un primer paso para poder estudiar en profundidad los posibles efectos en la descendencia.

En el presente trabajo fin de grado se profundizará en el papel de este miARN presente en la leche materna que está alterado en animales de experimentación sometidos a una dieta obesogénica durante la lactancia.

En concreto el objetivo principal de este trabajo es identificar y/o validar las dianas moleculares del miARN de interés, que pueden estar relacionados con la programación metabólica de la obesidad. Para ello se realizarán estudios *in vitro* con miméticos e inhibidores del miR-200a.

En primer lugar, se pretende validar experimentalmente la técnica de transfección del mimético y del inhibidor mediante el uso de los controles positivos, diseñados para tal efecto.

Y, en segundo lugar, analizar en un modelo *in vitro* el efecto de la presencia del mimético y del inhibidor en la expresión de genes relacionados con la señalización de la insulina y el metabolismo lipídico.

4. Materiales y métodos

4.1. Diseño experimental

El objetivo es estudiar el efecto de la presencia de un mimético y de un inhibidor del miR-200a en una línea celular hepática (HepG2).

En primer lugar, se siembran las células HepG2 para obtener el cultivo sobre el que realizar el estudio. Sobre este se realiza la transfección *in vitro* con un mimético (o mimic) y un inhibidor específico del miR-200a mediante liposomas, que los envuelve en su interior favoreciendo la incorporación a las células. Para la transfección del mimético y del inhibidor se emplean dos concentraciones: 10 nM y 50 nM, con el objetivo de verificar qué dosis es la más óptima para el efecto del miARN en las células. Además de estos tenemos un grupo control y controles negativos y positivos del mimético y del inhibidor para evaluar la eficacia de la transfección y validar el método.

Una vez realizado este proceso se extrae el ARN de las células, se retrotranscribe a ADNc y se analiza la expresión de genes de interés mediante una PCR a tiempo real.

En primer lugar, para comprobar que los miméticos e inhibidores se han incorporado y se usan, se analiza la expresión de los genes *TWF1* y *HMGA2*, las dianas de los miARN de los controles positivos del mimético y del inhibidor, respectivamente.

A continuación, se pretende comprobar la expresión de varios genes implicados en el metabolismo lipídico: el receptor de insulina (del inglés *insulin receptor*, *INSR*), el sustrato 1 del receptor de insulina (del inglés *insulin receptor substrate 1*, *IRS1*) y la ácido graso sintasa (del inglés *fatty acid sintase*, *FASN*). Nos centramos en el análisis de la expresión de genes de la vía insulínica ya que como se ha indicado, esta participa sustancialmente en el desarrollo de la patología de la obesidad. Por ello se analiza el *INSR* y el *IRS1*. Este último se ha clasificado como una diana predictiva del miR-200a según las bases de datos consultadas. Se empleó la base de datos *Target Scan* como sistema predictivo de dianas, fijando el *Aggregate P_{CT}* > 0.1, y se buscaron algunas implicadas en el metabolismo energético, concretamente en la vía insulínica, seleccionándose el *IRS1* (*Insuline Receptor Substrate 1*).

4.2. Cultivo celular

A continuación, se describe el protocolo de cultivo celular llevado a cabo, en el que he colaborado.

Para el cultivo celular *in vitro* se emplearon viales de la línea celular Hep G2 [HEPG2] (ATCC® HB-8065™) almacenados en nitrógeno líquido. Se cultivaron 1mL de estas en frascos de cultivo celular T-75 Corning® (de 75 cm²) en 14 mL del medio de cultivo completo recomendado por la casa comercial, en una atmosfera en 5% de CO₂, a 37°C en la incubadora. Este medio completo contiene de base el medio ATCC (Eagle's Minimum Essential Medium, EMEM Catalog No. 30-2003) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% y una mezcla de antibiótico P/S (Penicilina/Estreptomina) al 1%.

Una vez sembradas se dejaron crecer cambiando el medio de cultivo dos veces por semana como se indica en el protocolo comercial. Para poder realizar la transfección, se recogieron las células sembradas en los frascos de cultivo T-75 Corning®, se realizaron dos lavados con PBS, y se añadió Tripsina 1x para despegar las células. Después se neutralizó la tripsina con la adición de medio completo y se centrifugó para obtener el pellet con las células.

Mediante el método de Tripán Blue y la cámara de Neubauer se hizo el conteo celular para realizar los cálculos consiguientes. Mientras se prepara el medio de transfección se siembran las células con el medio completo en placas de 24 pocillos. Interesa tener unas 50.000 células/pocillo, en un volumen final de 500 µL/pocillo.

4.3. Transfección *in vitro*

Se ha empleado el protocolo de transfección Lipofectamine™ RNAiMAX, siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Para ello, se prepara 100 µL de medio de transfección que se pipetea en cada pocillo de la placa. Este medio contiene los reactivos y cantidades recomendados por el comerciante, indicadas en la *Tabla 2*. El medio Opti-MEM® es un medio sin suero ni antibióticos.

En la *Tabla 3* se resumen los diferentes tratamientos realizados.

Opti-MEM® I Reduce Serum Medium	96 µL
miARN específico	3 µL
Lipofectamine™ RNAiMAX Reagent	1 µL

Tabla 2. Medio de transfección empleado en el protocolo de transfección Lipofectamine™ RNAiMAX.

	Controles negativos		Controles positivos		miR-200a			
	C- mimético	C- inhibidor	C+ mimético	C+ inhibidor	Inhibidor-200a		Mimético-200a	
[miARN] deseada	50 nM	50 nM	50 nM	50 nM	10 nM	50 nM	10 nM	50 nM

Tabla 3. Soluciones preparadas y sus concentraciones para cada grupo.

Posteriormente se recogen las células, 48 h después de la transfección, para almacenarlas a -70°C hasta el día de la extracción de ARN.

Los **Controles Negativos** son secuencias de ARN que no tienen ningún efecto sobre la línea celular de estudio (HepG2), por lo que se emplean de referencia para ver que los efectos en la expresión que estamos viendo tras la transfección son específicos de la secuencia miARN (mimético o inhibidor).

Por otro lado, los **Controles Positivos** son secuencias de miARN de la casa comercial de las que se conoce su efecto sobre la expresión de determinados genes. Sus dianas no son las mismas que el miR-200a. Se emplea para ver que el proceso de transfección ha sido efectivo, verificando que las células han incorporado el mimético e inhibidor adecuadamente.

En este estudio se utiliza, como Control Positivo del mimético, el **mirVana™ miRNA Mimic miR-1**, cuyo efecto es el silenciamiento del ARNm diana *PTK9* (o *TWF1*), disminuyendo su expresión. Por otro lado, se emplea, como Control Positivo del inhibidor, el **mirVana™ miRNA Inhibitor let-7c**, que es un inhibidor del miARN let-7c endógeno, que disminuía los niveles del ARNm diana *HMG2*; por lo que, si se bloquea la actividad del miARN endógeno con el inhibidor, se espera que aumente la expresión de su diana *HMG2*.

4.3.1. Teoría del mimético e inhibidor específico del miR-200a

El mimético del miR-200a es una molécula idéntica al miARN 200a endógeno que se emplea con la intención de incrementar los efectos de este, como si se sobreexpresara. Por lo que en las células transfectadas con el mimético se espera que las dianas directas (ARNm) disminuyan su expresión, y por tanto las veremos disminuidas en el análisis mediante RT-PCR.

Al contrario, el inhibidor del miR-200a es una molécula complementaria al miARN endógeno que pretende bloquear su actividad para impedir que este se una y degrade o bloquee la expresión de sus ARNm diana, por lo que podremos analizar el efecto de la pérdida de función del miR-200a.

4.4. Extracción, purificación y cuantificación de ARN total

Para la extracción de ARN total a partir de las células HepG2, se ha realizado un protocolo de extracción de ARN con TriPure. Este permite despegar las células de los pocillos, disgregarlas y liberar su contenido (ADN, ARN y proteínas). Se sigue el protocolo como se indica. La adición de cloroformo permite la separación de las fases para poder recoger en un eppendorf con isopropanol la fase acuosa (ARN). Es muy importante invertir varias veces al añadir el isopropanol para que el ARN precipite, y posteriormente, con el lavado con etanol al 75% se eliminan los restos de ADN o proteínas del ARN. Por último, se añade agua libre de nucleasas para obtener el ARN total purificado, eliminando el etanol restante para evitar que interfiera en la cuantificación.

Una vez purificado se cuantifica a 260/280 nm, utilizando el NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Se quiere que todas las muestras presenten una concentración de 25 ng/ μ L para poder realizar la retrotranscripción, por lo que antes de continuar se realizan las diluciones correspondientes (con agua libre de RNAsas) ajustándolas con el NanoDrop.

4.5. Retrotranscripción (RT)

Una vez preparadas todas las muestras de ARN total a la concentración deseada, se realiza un paso previo al análisis de la expresión del ARNm por la PCR a tiempo real. Este consiste en la retrotranscripción del ARN a ADNc por el enzima transcriptasa inversa o retrotranscriptasa (RT). Para ello se emplea el protocolo iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc).

Para llevarla a cabo se prepara la RT-Mix, cuyos componentes se detallan en la *Tabla 4*. La reacción Mix 5x iScript es una mix ya preparada con los oligo(dT) y los primers (cebadores) hexaméricos aleatorios.

Componentes	Volumen para 1 muestra (μ L)
Reacción Mix 5x	2
Retrotranscriptasa inversa	0,5
Agua libre de RNAsas + ARN purificado	7,5
Volumen total	10

Tabla 4. Componentes de la solución RT-Mix empleada en la retrotranscripción del ARN total purificado a ADNc. Se muestran los volúmenes necesarios para una muestra (un pocillo).

Una vez pipeteados los volúmenes en la placa, se incuba en el termociclador Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystem, Madrid, Spain) siguiendo el programa mostrado en la *Tabla 5*.

Unión de los cebadores	5 min a 25°C
Reacción retrotranscripción	20 min a 46°C
Inactivación del enzima RT	1 min a 95°C
Reposo	Indefinido a 4°C

Tabla 5. Programa seguido en el termociclador para el proceso de retrotranscripción.

4.6. Real Time PCR (RT-PCR)

Una vez se tiene el ADNc se realiza la cuantificación de la expresión del ARNm de los genes *TWF1*, *HMG2*, *FASN*, *INSR*, y *IRS1*, además del gen *RPLP0* que se toma como gen referencia de expresión constitutiva (*Housekeeping*). Para ello se realiza una PCR cuantitativa a tiempo real con *SyberGreen* (*SYBR Green*).

La señal se detecta al final de cada ciclo de amplificación formándose una curva entre la fluorescencia emitida y el número de ciclos. El *crossing point* de cada muestra es el ciclo de amplificación a partir del cual el incremento de fluorescencia es exponencial. Además, con el sistema se obtiene la curva de desnaturalización (*melting*), que indica los picos de la T_m o *temperatura de melting* de cada producto amplificado (ya sea la diana o algún fragmento no específico). Debe salir una curva con un pico de T_m . La T_m se define como la temperatura a la que tenemos la mitad de los fragmentos hibridados, y define el % de complementariedad o grado de especificidad de los amplicones.

Para comenzar este proceso es necesario realizar una dilución del producto de retrotranscripción de la RT de cada una de las muestras para poder ajustarnos al rango de linealidad, ya que si no saldría saturado por la gran cantidad de ADNc. En este caso se realizó una dilución 1/10 con agua libre de RNAsas.

Se emplea 2 μ L de la dilución 1/10 del producto de la RT junto con 9 μ L de la Mix-SYBR Green, cuyos componentes y cantidades se muestran en la *Tabla 6*. Se emplean primers específicos para amplificar cada uno de los genes indicados.

Power SYBR Green	5 μ L
Primers forward/reverse (20 μ M)	0,45 μ L/0,45 μ L
Agua libre de RNAsas	3,1 μ L

Tabla 6. Componentes de la Mix-SyberGreen empleada para la RT-PCR. Volumen (μ L) para una muestra (1 pocillo).

Una vez pipeteados los volúmenes en la placa de PCR, se introducen en el Applied Biosystems StepOne-Plus™ Real-Time Systems (Applied Biosystems) siguiendo las siguientes condiciones: 10 minutos a 95°C; 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C; y para la obtención de la curva de *Melting* 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C y 15 segundos a 95°C. Una vez finalizado se conservan a -20°C.

Con la ayuda del software StepOnePlus™ v2.3 (ThermoFisher) se determina el *crossing point* de cada amplificación. A continuación, se realizan los cálculos empleando la fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$, y corrigiendo la expresión de cada gen en referencia al gen constitutivo *Rplp0*.

4.7. Análisis estadístico

Para el estudio estadístico se emplea el software IBM SPSS® Statistics v25. Los resultados se representan en gráficas con el valor medio de cada grupo experimental y el error estándar de la media (media \pm SEM). Las pruebas estadísticas del mimético y del inhibidor se realizan por separado, aunque en las gráficas se muestre de manera conjunta para facilitar la comprensión de los resultados.

Antes de realizar las pruebas estadísticas y representar las gráficas, se detectan los valores atípicos (*outliers*) de todos los grupos, es decir, los valores que se desvían mucho del conjunto de datos obtenido, y que es necesario eliminar para ajustar el intervalo. Para la identificación de los valores atípicos se realizaron diagramas de cajas de cada grupo experimental. Una vez señalados y eliminados se procede a realizar el estudio estadístico.

En primer lugar, se realiza la prueba de normalidad con el test Shapiro-Wilk para comprobar si la distribución de las medias es normal ($p > 0,05$). Una vez confirmada, se realiza el test ANOVA de un factor ($p < 0,05$) junto con la prueba de homogeneidad de varianzas ($p > 0,05$) para comparar de cada gen por

separado, las medias de todos los grupos entre sí. Se comparan los grupos control (C), control negativo (C-), mimético 10 nM (mimic 10) y mimético 50 nM (mimic 50); y lo mismo con el inhibidor.

Por último, se realiza una prueba no paramétrica comparando las medias de 2 muestras independientes (p.e. Control negativo vs mimético 10) realizando el test U-Mann Witney ($p < 0,05$). Con ello se determina si las diferencias entre las medias de los grupos analizados (grupos por pares) son significativas ($p < 0,05$) o no.

5. Resultados y discusión

5.1. Validación experimental de la transfección mediante Controles positivos del mimético e inhibidor

En la *Figura 3* se reflejan los resultados de la expresión génica medida por RT-PCR de los genes *TWF1* y *HMGA2*, dianas de los controles positivos del mimético y del inhibidor (respectivamente). Tal y como se esperaba, con la transfección del miARN del **C+ del mimético** (miR-1) se observa una disminución significativa en la expresión ($p = 0,057$) del gen *TWF1*, su diana, respecto del grupo control. Con ello, se verifica que el miR-1 ha sido captado por las células.

Con la transfección del miARN del **C+ del inhibidor** (let-7c) cabría esperar un aumento en la expresión de su gen diana, el *HMGA2*. Lo que podría indicar que el inhibidor del C+ es efectivo contra el miARN let7-c endógeno, bloqueando su función de degradación del ARNm *HMGA2*, el cual debería sobreexpresarse.

Si bien, en nuestro caso se muestra una tendencia al incremento de la expresión de *HMGA2* respecto al grupo control, aunque esta no sea significativa estadísticamente. Cabe comentar que los resultados obtenidos son fruto de una única replica celular, es decir, que solo se realizó una vez el cultivo de las células HepG2 con varias réplicas experimentales de cada tratamiento. Por lo que, para tener resultados más concluyentes y robustos, deberían hacerse de nuevo el cultivo y la transfección *in vitro* siguiendo el mismo procedimiento comercial. Cabe comentar que posteriormente se realizaron otros cultivos adicionales con células de adipocito (ensayo en el que no he participado), en los que se vio que efectivamente la transfección con el C+ de inhibidor produce un incremento en la expresión de *HMGA2*.

Por lo que, tras los resultados obtenidos, queda validada la técnica de transfección de los controles positivos, confirmando que las células HepG2 han internalizado dichos miARN control y por tanto las moléculas del mimético del miR-200a y su inhibidor específico.

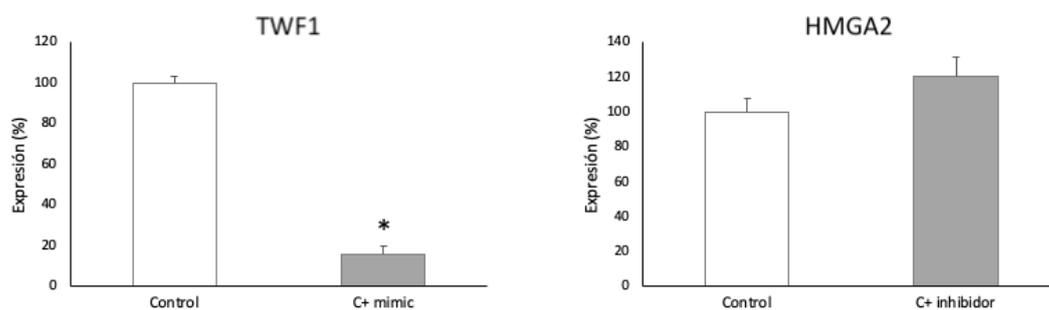


Figura 3. Representación gráfica de la expresión génica de los genes *TWF1* y *HMGA2* entre los controles positivos del mimético y del inhibidor respecto al grupo control. C+ mimetic: Control positivo del mimético; C+ inhibidor: control positivo del inhibidor. Se muestra la media del % versus el grupo control de cada grupo junto con la SEM. *, $p < 0,05$ test U-Mann Witney

5.2. Efecto del mimético e inhibidor específico del miR-200a sobre la expresión génica

A continuación, en la *Figura 4* se representan las gráficas de los resultados de la expresión génica de los genes de interés analizados: *INSR*, *IRS1* y *FASN*.

En la gráfica **4A**, se muestra el efecto del mimético y el inhibidor del miR-200a en células HepG2 en la expresión del **receptor de insulina (*INSR*)**. Se observa un aumento significativo en la expresión de *INSR* con la dosis 10 nM del mimético respecto a su control negativo ($p=0,016$). También se intuye un aumento, aunque no significativo ($p=0,286$), con la dosis 50 nM. En relación al inhibidor específico contra el miR-200a, se esperarían resultados contrarios a los obtenidos en el mimético, pero en este caso, la concentración 10 nM no disminuyó la expresión del *INSR*, sino que apenas se observan cambios respecto a su control negativo. En cambio, con la dosis 50 nM sí se observa una reducción, aunque no es significativa.

El incremento en la expresión del receptor de insulina, si este aumento se traduce también en un aumento a nivel de proteína, supondría un incremento de la vía de señalización de dicha hormona, desencadenándose toda una serie de reacciones de fosforilación sobre sustratos celulares clave y activación de diversas vías metabólicas. Entre estas destacan el incremento de captación de glucosa, un aumento en la lipogénesis, en la glucogenogénesis y la síntesis proteica ⁴⁰.

En la gráfica **4B**, se muestra la expresión del **sustrato 1 del receptor de insulina (*IRS1*)**, primera diana fosforilada en la vía de señalización insulínica tras la activación del receptor de insulina tirosina quinasa ⁴¹. Con ninguna de las dos dosis del mimético se consigue una reducción respecto a su control negativo. No se han obtenido resultados significativos y esto puede ser debido a la gran variabilidad en el grupo C- del mimético. Por otro lado, la concentración 10 nM del inhibidor específico del miR-200a consigue un ligero aumento en su expresión respecto al control negativo; suceso que no se da con la dosis 50 nM. Ningún resultado es significativo en esta prueba, aunque la tendencia de estos puede mostrar una ligera idea del efecto del miR-200a sobre dicho gen.

Según lo consultado en la base de datos *Target Scan*, el ARNm *IRS1* es una diana teórica del miR-200a. Por ello esperábamos que, tras la transfección con el mimético e inhibidor, se observara una reducción de la expresión de *IRS1* como efecto de la sobreexpresión del miR-200a con el mimético, y un aumento de la expresión de *IRS1* por el efecto del inhibidor. En cambio, los resultados obtenidos no concuerdan con lo esperado inicialmente. Como ya se ha indicado en los resultados de los controles positivos, sólo se ha realizado un único cultivo celular, por lo que necesitaríamos realizar nuevamente el cultivo celular de la línea HepG2, así como la transfección *in vitro* y el análisis de la expresión génica. Con ello podríamos comprobar los resultados y elucidar si realmente el ARNm *IRS1* es una diana directa o no del miR-200a. Además, no pueden descartarse otros efectos mediados por otros mecanismos de regulación que puedan modular la expresión de *IRS1*. Por último, en la gráfica **4C** se muestra la expresión del gen que codifica para la **ácido graso sintasa (*FASN*)**, enzima encargado de la lipogénesis mediante la síntesis de ácido palmítico (C16:0) a partir de acetil-CoA y malonil-CoA ⁴². Tanto en la transfección con el mimético como con el inhibidor se aprecia una tendencia a la sobreexpresión de *FASN* respecto a sus controles negativos correspondientes, aunque los resultados no muestren una significancia estadística.

En principio no podemos afirmar que el ARNm *FASN* sea una diana directa del miR-200a en las células HepG2, ya que no vemos efectos claros tras la sobreexpresión de dicho miARN.

Al igual que lo comentado para los controles positivos y la expresión génica del *IRS1*, debería repetirse el cultivo celular y los posteriores pasos del diseño experimental para comprobar los resultados obtenidos y mejorar la significancia del análisis.

Es importante destacar que la insulina ejerce un control positivo sobre genes importantes de la lipogénesis como la *FASN* en el hígado. La insulina cuando interacciona con su receptor *INSR* activa la vía

de señalización *downstream* induciendo la transcripción del gen *SREBP-1c*, que codifica para la proteína de unión al elemento regulador de esterol-1c. Este es un factor de transcripción que al ser inducido por la insulina de forma temprana participa en la activación transcripcional del gen de la *FASN*, mediante la unión a los elementos reguladores de esteroides (SRE) de su promotor ⁴³.

Por ello, el ligero aumento que se observa en los resultados de la expresión génica de *FASN* podría ser, o por un efecto del miR-200a (lo cual necesitaría confirmarse con cultivos adicionales) o por un efecto secundario del incremento del receptor de insulina *INSR*. Como con la presencia del mimético del miR-200a aumenta la expresión del *INSR*, esto podría tener un efecto sobre el incremento de la expresión del gen *FASN* observado. Recapitulando todo lo expuesto se observa que en células HepG2 el mimético de miR-200a aumenta significativamente la expresión del *INSR*. En cambio, el miR-200a no actúa directamente sobre su diana predictiva *IRS1*, puesto que con la sobreexpresión del miR-200a no se observa una reducción del ARNm. Pero, al ser estos resultados no significativos, no se puede afirmar del todo que *IRS1* no sea una diana directa, así que debería repetirse el análisis o incluso la transfección en posteriores estudios para verificarlo. Por último, sobre el gen *FASN* no se observan efectos claros, pero los resultados obtenidos pueden deberse al efecto del miR-200a, a un efecto secundario del incremento de expresión del *INSR*, o a errores en el análisis o la transfección del diseño experimental.

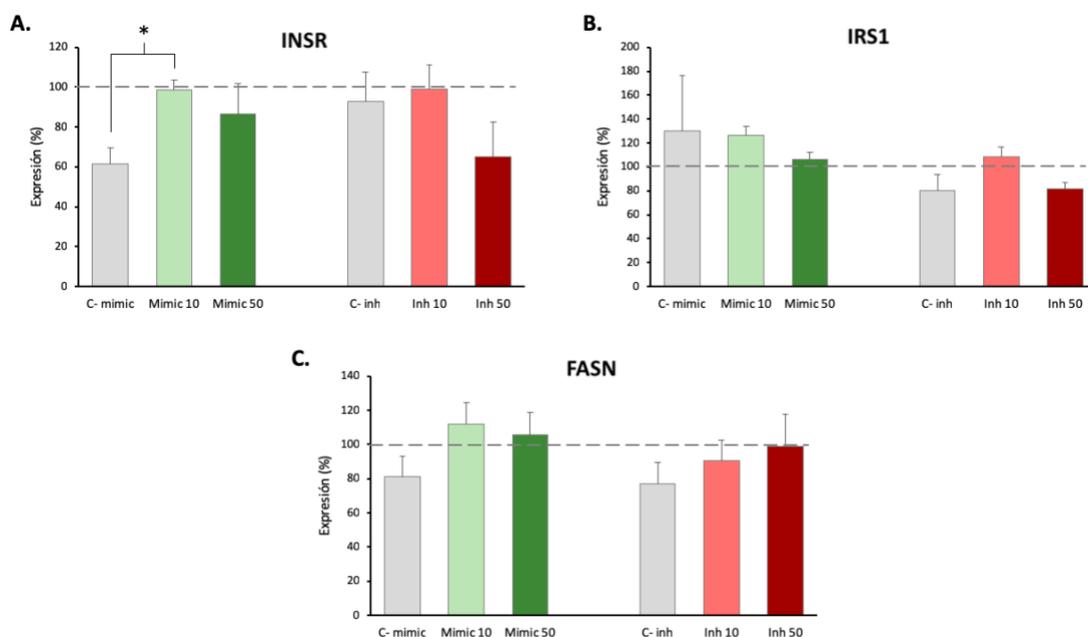


Figura 4. Representación gráfica de la expresión génica en las células HepG2 de los genes: **A.** *INSR*; **B.** *IRS1*; **C.** *FASN*. En cada gráfica se muestra los valores promedios (%) ± su error estándar (SEM) de cada grupo experimental (C- mimic, mimic 10nM, mimic 50nM; C- inhibidor, inh 10nM, inh 50nM) respecto al grupo control (100%) representado con la línea discontinua. Se representa la significancia (*) entre los valores medios de los grupos C- mimic y mimic 10nM, obtenida estadísticamente por el test de ANOVA de un factor ($p < 0,05$).

6. Conclusiones

Tras la revisión bibliográfica consultada y el análisis de los resultados obtenidos por el diseño experimental llevado a cabo en el presente trabajo, se puede concluir con los siguientes aspectos:

- 1- El estado obesogénico derivado de la obesidad *per se* o la ingesta de dietas hipercalóricas por parte de la madre alteran el patrón de los niveles de miARNs de la leche materna que son ingeridos en el proceso de lactancia por el neonato. La desregulación del patrón de algunos miARNs influye sobre la programación metabólica del individuo lactante favoreciendo un incremento en el riesgo de padecer futuras patologías crónicas como la obesidad.

- 2- Se ha puesto en marcha y validado la técnica de transfección *in vitro* con los controles positivos del mimético del miR-1 y del inhibidor específico del let-7c endógeno. La transfección con **C+ del mimético** (miR-1) disminuye significativamente en la expresión de su gen diana, *TWF1*. Los resultados de la transfección del **C+ del inhibidor** (lec-7c) son menos concluyentes ya que el aumento en la expresión de su diana no muestra significancia estadística.
- 3- El mimético miR-200a aumenta la expresión del **INSR** significativamente en la línea HepG2.
- 4- El **IRS1** no se ha podido validar como diana directa del miR-200a ya que los resultados obtenidos no son significativos, por lo que se necesitarían estudios adicionales, para poder obtener resultados más concluyentes en este sentido.
- 5- La expresión de **FASN** tiende a incrementar, aunque no de forma significativa en los cultivos con presencia del mimético del miR-200a. Los efectos en la desregulación del enzima lipogénico podrían ser consecuencia directa de la acción del miR-200a o darse como un efecto secundario de la sobreexpresión del **INSR**.

7. Bibliografía

1. Horvitz HR, Sulston JE. Isolation and genetic characterization of cell-lineage mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 1980;96(2):435-454. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7262539><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1214309>.
2. Hammond SM. An overview of microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;87:3-14. doi:10.1016/J.ADDR.2015.05.001
3. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993;75(5):855-862. doi:10.1016/0092-8674(93)90530-4
4. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000;408(6808):86-89. doi:10.1038/35040556
5. Frost RJA, Olson EN. Control of glucose homeostasis and insulin sensitivity by the *Let-7* family of microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(52):21075-21080. doi:10.1073/pnas.1118922109
6. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*. 2004;116(2):281-297. doi:10.1016/S0092-8674(04)00045-5
7. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(2):126-139. doi:10.1038/nrm2632
8. Alsaweed M, Hartmann PE, Geddes DT, Kakulas F. MicroRNAs in breastmilk and the lactating breast: Potential immunoprotectors and developmental regulators for the infant and the mother. *Int J Environ Res Public Health*. 2015;12(11):13981-14020. doi:10.3390/ijerph121113981
9. Alsaweed M, Hartmann PE, Geddes DT, Kakulas F. MicroRNAs in Breastmilk and the Lactating Breast: Potential Immunoprotectors and Developmental Regulators for the Infant and the Mother. *Int J Environ Res Public Health*. 2015;12(11):13981-14020. doi:10.3390/ijerph121113981
10. Park CY, Choi YS, McManus MT. Analysis of microRNA knockouts in mice. *Hum Mol Genet*. 2010;19(R2):R169-R175. doi:10.1093/hmg/ddq367
11. Nicholas LM, Morrison JL, Rattanatravay L, Zhang S, Ozanne SE, McMillen IC. The early origins of obesity and insulin resistance: timing, programming and mechanisms. *Int J Obes*. 2016;40(2):229-238. doi:10.1038/ijo.2015.178
12. Yao Q, Chen Y, Zhou X. The roles of microRNAs in epigenetic regulation. *Curr Opin Chem Biol*. 2019;51:11-17. doi:10.1016/J.CBPA.2019.01.024

13. Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología A. *Revista Mexicana de Endocrinología, Metabolismo & Nutrición*. Vol 10.; 2002. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=10282>. Accessed June 8, 2019.
14. Basain Valdés JM, Valdés Alonso M del C, Pérez Martínez M, Jorge Díaz M de los Á, Linares Valdés H. *Revista Cubana de Pediatría*. Vol 88. Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas; 1946. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75312016000100009. Accessed June 8, 2019.
15. González-Jiménez E, Schmidt Río-Valle J. [Regulation of dietary intake and energy balance: factors and mechanisms involved]. *Nutr Hosp*. 2012;27(6):1850-1859. doi:10.3305/nh.2012.27.6.6099
16. Dearden L, Ozanne SE. Early life origins of metabolic disease: Developmental programming of hypothalamic pathways controlling energy homeostasis. *Front Neuroendocrinol*. 2015;39:3-16. doi:10.1016/j.yfrne.2015.08.001
17. Palou A, Serra F, Bonet ML, Picó C. Obesity: Molecular bases of a multifactorial problem. *Eur J Nutr*. 2000;39(4):127-144. doi:10.1007/s003940070017
18. Bartol FF, Wiley AA, Miller DJ, et al. LACTATION BIOLOGY SYMPOSIUM: Lactocrine signaling and developmental programming1,2. *J Anim Sci*. 2013;91(2):696-705. doi:10.2527/jas.2012-5764
19. Barker DJP. The effect of nutrition of the fetus and neonate on cardiovascular disease in adult life. *Proc Nutr Soc*. 1992;51(2):135-144. doi:10.1079/PNS19920023
20. Alsaweed M, Lai CT, Hartmann PE, Geddes DT, Kakulas F. Human milk cells contain numerous miRNAs that may change with milk removal and regulate multiple physiological processes. *Int J Mol Sci*. 2016;17(6):956. doi:10.3390/ijms17060956
21. Alsaweed M, Lai CT, Hartmann PE, Geddes DT, Kakulas F. Human milk miRNAs primarily originate from the mammary gland resulting in unique miRNA profiles of fractionated milk. *Sci Rep*. 2016;6(1):20680. doi:10.1038/srep20680
22. Kosaka N, Izumi H, Sekine K, Ochiya T. microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. *Silence*. 2010;1(1):7. doi:10.1186/1758-907X-1-7
23. Hassiotou F, Geddes DT. Immune cell-mediated protection of the mammary gland and the infant during breastfeeding. *Adv Nutr*. 2015;6(3):267-275. doi:10.3945/an.114.007377
24. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007;9(6):654-659. doi:10.1038/ncb1596
25. Zhou Q, Li M, Wang X, et al. Immune-related microRNAs are abundant in breast milk exosomes. *Int J Biol Sci*. 2012;8(1):118-123. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22211110>. Accessed June 1, 2019.
26. Turchinovich A, Weiz L, Langhein A, Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(16):7223-7233. doi:10.1093/nar/gkr254
27. Lawless N, Reinhardt TA, Bryan K, et al. MicroRNA regulation of bovine monocyte inflammatory and metabolic networks in an in vivo infection model. *G3 (Bethesda)*. 2014;4(6):957-971. doi:10.1534/g3.113.009936
28. Hassiotou F, Hepworth AR, Metzger P, et al. Maternal and infant infections stimulate a rapid leukocyte response in breastmilk. *Clin Transl Immunol*. 2013;2(4):e3. doi:10.1038/cti.2013.1
29. Pomar CA, Castro H, Picó C, Serra F, Palou A, Sánchez J. Cafeteria Diet Consumption during Lactation in Rats, Rather than Obesity Per Se, alters miR-222, miR-200a, and miR-26a Levels in Milk. *Mol Nutr Food Res*. 2019;63(8):1-11. doi:10.1002/mnfr.201800928
30. Benoit C, Ould-Hamouda H, Crepin D, Gertler A, Amar L, Taouis M. Early leptin blockade predisposes fat-fed rats to overweight and modifies hypothalamic microRNAs. *J Endocrinol*. 2013;218(1):35-47. doi:10.1530/joe-12-0561

31. Picó C, Palou M, Priego T, Sánchez J, Palou A. Metabolic programming of obesity by energy restriction during the perinatal period: different outcomes depending on gender and period, type and severity of restriction. *Front Physiol.* 2012;3:436. doi:10.3389/fphys.2012.00436
32. Cottrell EC, Ozanne SE. Early life programming of obesity and metabolic disease. *Physiol Behav.* 2008;94(1):17-28. doi:10.1016/j.physbeh.2007.11.017
33. Garibay-Nieto N, Miranda-Lora AL. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de México.* Vol 65. AMERBAC; 2008. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-11462008000600006&lng=es&nrm=iso&tlng=es. Accessed June 17, 2019.
34. Du M, Wang J, Chen H, et al. MicroRNA-200a suppresses migration and invasion and enhances the radiosensitivity of NSCLC cells by inhibiting the HGF/c-Met signaling pathway. *Oncol Rep.* 2018;41(3):1497-1508. doi:10.3892/or.2018.6925
35. Shao B, Wang X, Zhang L, et al. Plasma microRNAs Predict Chemoresistance in Patients With Metastatic Breast Cancer. *Technol Cancer Res Treat.* 2019;18:153303381982870. doi:10.1177/1533033819828709
36. Belén Arroyo-Rodríguez A, Salloum-Asfar S. MicroRNAs circulantes: ¿Nuevos biomarcadores en cáncer? *Eubacteria.* 2013;7. https://www.um.es/eubacteria/MicroRNAs_circulantes_biomarcadores_cancer.pdf.
37. Salimian N, Peymani M, Ghaedi K, Nasr Esfahani MH. Modulation in miR-200a/ SIRT1 axis is associated with apoptosis in MPP + -induced SH-SY5Y cells. *Gene.* 2018;674:25-30. doi:10.1016/j.gene.2018.06.061
38. Oger F, Gheeraert C, Mogilenko D, et al. Cell-Specific Dysregulation of MicroRNA Expression in Obese White Adipose Tissue. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(8):2821-2833. doi:10.1210/jc.2013-4259
39. Guo W, Han H, Wang Y, et al. miR-200a regulates Rheb-mediated amelioration of insulin resistance after duodenal-jejunal bypass. *Int J Obes.* 2016;40(8):1222-1232. doi:10.1038/ijo.2016.60
40. Haeusler RA, McGraw TE, Accili D. Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(1):31-44. doi:10.1038/nrm.2017.89
41. Posner BI. Insulin Signalling: The Inside Story. *Can J diabetes.* 2017;41(1):108-113. doi:10.1016/j.jcjd.2016.07.002
42. Paulauskis JD, Sul HS. Hormonal regulation of mouse fatty acid synthase gene transcription in liver. *J Biol Chem.* 1989;264(1):574-577.
43. Hansmannel F, Mordier S, Iynedjian PB. Insulin induction of glucokinase and fatty acid synthase in hepatocytes: analysis of the roles of sterol-regulatory-element-binding protein-1c and liver X receptor. *Biochem J.* 2006;399(2):275-283. doi:10.1042/BJ20060811