

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



**ESTUDIO DEL PAPEL DE miR-148a EN LA
REGULACIÓN DE GENES DEL METABOLISMO
LIPÍDICO Y LA ADIPOGÉNESIS**

**Tesis doctoral presentada por Javier Pérez López,
Licenciado en bioquímica, para optar al Grado de Doctor
por la Universidad de Cantabria**

Marzo de 2016

El **Dr. José Carlos Rodríguez Rey**, Catedrático del Departamento de Biología Molecular de La Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria

Certifica que:

La memoria de la Tesis Doctoral realizada bajo mi dirección por Don Javier Pérez López, la cual lleva por título: **“Estudio del papel de miR-148a en la regulación de genes del metabolismo lipídico y la adipogénesis”**, reúne los requisitos necesarios para su presentación como memoria de doctorado con objeto de poder optar al Grado de Doctor por la Universidad de Cantabria.

Santander, marzo de 2016

Fdo. José Carlos Rodríguez Rey

Este trabajo ha sido posible gracias al proyecto PS09/00962: “Contribución de la variabilidad en el promotor del gen del receptor de LDL a la hipercolesterolemia multigénica. Subproyecto 4: Caracterización funcional de variantes de la región promotora” hasta el año 2012. Y partir de ese año gracias al proyecto PI12/00637: “Bases genéticas de las Hipercolesterolemias Hereditarias no dependientes del receptor de LDL ni apolipoproteína B. Caracterización y análisis funcional de variantes de las regiones reguladoras”. Ambos proyectos del **Instituto IDIVAL** fueron financiados por el **INSTITUTO DE SALUD CARLOS III**.

"Lo que sabemos es una gota de agua;
lo que ignoramos es el océano".

Isaac Newton

A mis padres y mi hermana

AGRADECIMIENTOS

Hasta que no llega el momento de redactar estas líneas uno no es consciente de lo difícil que es escribir en una página en blanco, en unas pocas palabras, todo aquello por lo que se siente agradecido en esta etapa de trabajo y convivencia profesional. Sin embargo es un placer y un deber ineludible acordarse y dar las gracias a toda la gente que me ha ayudado y me ha apoyado durante estos años, ya que estoy completamente de acuerdo con el proverbio hebreo que dice "El que da, no debe volver a acordarse; pero el que recibe nunca debe olvidar".

En primer lugar quiero dar las gracias a mi director, José Carlos Rodríguez Rey, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación y realizar esta tesis doctoral, así como por todo lo que me ha enseñado, por invertir tiempo en mí y por el trato recibido en estos años bajo su dirección.

A Alfonso Bolado, mi compañero de poyata y grupo de investigación todos estos años, amigo desde los tiempos en la Facultad de Ciencias de la UPV, muchas gracias por tu ayuda y apoyo, es un privilegio haber tenido en el trabajo a un amigo tan generoso compartiendo tiempo y conocimientos; aprendí de ti en los tiempos de la licenciatura y seguí aprendiendo de ti en los tiempos del doctorado.

Al catedrático José Antonio Riancho por su estudio de asociación y por la colaboración y el interés mostrado siempre en nuestro trabajo. A Ignacio Varela por ayudarnos a solventar las dudas sobre el secuenciado de RNA. También a Flor Pérez y Alicia Noriega por su ayuda inestimable y fundamental en algunos experimentos y por ser mi enlace con el laboratorio cuando ya me encontraba escribiendo esta tesis doctoral en Bilbao.

A los catedráticos Javier León y Dolores Delgado, por su amabilidad y por el interés que siempre mostraron en mi trabajo. También quiero acordarme de Alberio Gandarillas y Alberto Sánchez, con los que compartí menos tiempo, pero a los que agradezco también su interés y amabilidad.

También quiero dar las gracias a toda la gente con la que compartí laboratorio, piezas fundamentales para haber logrado un inmejorable ambiente de trabajo. A Manuel Rosa por enseñarme a ver la Ciencia de otra manera, por contagiarme su capacidad de trabajo y por su amistad transoceánica. A M^a Carmen Lafita por su infinita paciencia con mis dudas con el western blot, por enseñarme la importancia de los oncogenes de tres letras y el valor del esfuerzo en este trabajo. A Lucía García por ayudarme también con el western blot con filosofía japonesa, por su alegría en el laboratorio y por su ayuda en cualquier momento. A Pilar Frade por su cariño y su ayuda resolviendo problemas de todo tipo. A Gabriel Bretones porque su pasión por la Ciencia es contagiosa y siempre estuvo disponible en cualquier momento para ayudarme con cualquier duda. A Juan Caraballo por su paciencia a la hora de resolver dudas, su talante y su apoyo.

A Rosa Blanco por tratarme siempre como si fuera uno más de su grupo. A Andrea Quintanilla y María Cortiguera por su compañerismo y su paciencia. A Ana Freije, Laura Ceballos y Eva García por su generosidad y el buen ambiente con el que compartimos el cuarto de cultivos. A Iago Molist y Magda Foltman, que fueron unos grandes compañeros y vecinos de poyata. Y a Marina Puente, por su ayuda siempre, sobre todo con el maquetado de esta tesis haciendo fácil lo que para mí es desesperante, por haberme contagiado su alegría en los peores momentos, por su eterna sonrisa y por marcar un antes y un después en mi etapa en Santander.

Y por supuesto, gracias a todo el personal de la Facultad de Medicina y al resto de compañeros de otros laboratorios y departamentos. No puedo escribir todos los nombres porque eso haría de este apartado el más largo de la tesis. ¡Mil gracias a todos y todas!

Para terminar quiero agradecer a toda mi familia, sobre todo a mi madre y mi hermana, su apoyo incondicional y su paciencia durante estos años de tesis. También a José Miguel y Almudena por acogerme en su casa de Pedreña durante el primer año de mi estancia en Santander, y a Rafael Margallo por tenderme la mano en los momentos difíciles. Por último, el agradecimiento más especial a mi padre, porque es difícil aprender tanto y tan bueno de un hombre en tan poco tiempo; sin tu ejemplo nada de esto habría sido posible.

ÍNDICES

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	13
1.1. Dislipidemias	15
1.1.1. Aterosclerosis	19
1.1.2. Hipercolesterolemias hereditarias	21
1.2. La variabilidad genética como factor de susceptibilidad	23
1.2.1. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP)	25
1.2.1.1. SNPs reguladores (rSNPs)	26
1.3. miRNAs	29
1.3.1. Biogénesis de los miRNAs	31
1.3.2. Mecanismo de acción de los miRNAs y regulación de regiones 3'UTR	32
1.4. Obesidad	35
1.4.1. Factores asociados a la obesidad	37
1.4.2. El tejido adiposo y el papel de la adipogénesis en la obesidad	39
1.5. Adipogénesis	44
1.5.1. Compromiso	45
1.5.2. Diferenciación de adipocitos	48
1.5.3. Papel de los miRNAs en la adipogénesis	54
OBJETIVOS	59
2.1. Objetivo general	61
2.2. Objetivos específicos	61
MATERIALES Y MÉTODOS	63
3.1. Cultivos celulares	65
3.1.1. Cultivo y mantenimiento de las líneas celulares	65
3.1.2. Diferenciación de las células 3T3-L1	66
3.1.3. Transfección con inhibidores y <i>mimics</i> de miRNAs	67
3.1.4. Construcción de las líneas de células 3T3-L1 con sobreexpresión y silenciamiento de Nr5a2	68
3.1.4.1. Construcción de la línea con sobreexpresión de Nr5a2 (PCEFL-Nr5a2)	68
3.1.4.2. Construcción de la línea con silenciamiento de Nr5a2 (shNr5a2)	68

3.2. Medición de la expresión génica.....	70
3.2.1. Extracción de RNA total	71
3.2.2. Síntesis de DNA complementario (cDNA).....	72
3.2.3. PCR cuantitativa (qPCR)	73
3.3. Western blot	74
3.3.1. Extracción de proteínas	75
3.3.2. Western blot	76
3.4. Ensayo de retardo en gel (EMSA).....	77
3.4.1. Extracción de proteínas nucleares.....	78
3.4.2. Anillamiento de las sondas para retardo en gel	79
3.4.3. Ensayo de retardo en gel	79
3.4.4. Ensayo de superretardo en gel.....	80
3.5. Clonado	81
3.5.1. Reacción de la polimerasa en cadena (PCR).....	82
3.5.2. Mutagénesis dirigida	84
3.5.3. Ligación	85
3.5.4. Transformación.....	86
3.5.5. Extracción de DNA plasmídico	88
3.6. Ensayo de actividad luciferasa	88
3.7. Ensayo de ELISA de APOB.....	90
3.8. Ensayo de ELISA de Wnt5b.....	91
3.9. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).....	93
RESULTADOS	97
4.1. Análisis funcional de regiones 3'UTR de genes asociados a hipercolesterolemias hereditarias	99
4.2. Análisis funcional del miRSNP rs12720763 localizado en la región 3'UTR de APOB.....	100
4.3. Efecto de la inhibición de miR-148a-3p y miR-148a-5p sobre la expresión génica de APOB.....	102
4.3.1. Validación del modelo de inhibición de miR-148a-3p y miR-148a-5p en células HepG2	102
4.3.2. Estudio de la expresión génica de APOB.....	103
4.4. Efecto de la inhibición de miR-148a-3p sobre la expresión génica de PCSK9 y LDLR.....	104

4.5. Estudio del efecto de miR-148a-3p en la diferenciación de adipocitos en células 3T3-L1.....	105
4.5.1. Validación del modelo de inhibición de miR-148a-3p en células 3T3-L1.....	105
4.5.2. Efecto de la inhibición de miR-148a-3p en células 3T3-L1 no diferenciadas	107
4.5.3. Efecto de la inhibición de miR-148a-3p en la diferenciación de adipocitos en células 3T3-L1	110
4.5.4. Efecto de la sobreexpresión de miR-148a-3p en células 3T3-L1 y la diferenciación de adipocitos	112
4.6. Efecto de Nr5a2 sobre la expresión de miR-148a-3p y la diferenciación de adipocitos en células 3T3-L1	114
4.6.1. Efecto de Nr5a2 sobre la expresión de miR-148a-3p en células 3T3-L1	115
4.6.2. Efecto de Nr5a2 en la diferenciación de adipocitos en células 3T3-L1	119
4.7. Análisis funcional del SNP rs4722551 localizado en el promotor de miR-148a	122
DISCUSIÓN	127
CONCLUSIONES	141
BIBLIOGRAFÍA.....	145
ANEXOS.....	163
8.1. Tablas suplementarias	165

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura I1. Transporte de ácidos grasos.....	17
Figura I2. Transporte de colesterol.....	18
Figura I3. Fases en el desarrollo de la aterosclerosis.....	21
Figura I4. Factores de riesgo asociados a enfermedades monogénicas y complejas.....	23
Figura I5. Efecto de los rSNPs en la unión de factores de transcripción.....	27
Figura I6. Localización de los miRSNPs en regiones 3'UTR diana.....	28
Figura I7. Biogénesis de miRNAs en mamíferos.....	32
Figura I8. Tipos de sitios de unión de los miRNAs en sus secuencias diana.....	33
Figura I9. Mecanismos de inhibición por miRNAs.....	34
Figura I10. Mapa mundial de la prevalencia de la obesidad en el año 2014.....	36
Figura I11. Principales enfermedades asociadas a la obesidad.....	37
Figura I12. Esquema de los distintos factores asociados al desarrollo de la obesidad.....	39
Figura I13. Diferencias entre adipocitos blancos y marrones.....	41
Figura I14. Representación esquemática de las distintas rutas de señalización de Wnt.....	47
Figura I15. Esquema con cronograma de las fases de la diferenciación de adipocitos.....	51
Figura I16. Efecto proadipogénico de la inhibición de la ruta canónica de Wnt.....	54

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura M1. Fotografías de células 3T3-L1 sin diferenciar y diferenciadas.....	66
Figura M2. Mapas de los vectores empleados para la síntesis de lentivirus.....	69
Figura M3. Mapas de los vectores reporteros luciferasa pmirGLO y pGL3 basic.....	82
Figura M4. Proceso de mutagénesis dirigida.....	84

RESULTADOS

Figura R1. Actividad luciferasa de 3'UTR de genes relacionados con hipercolesterolemias hereditarias.....	99
Figura R2. Actividad luciferasa del SNP rs12720763.....	101
Figura R3. Actividad luciferasa del SNP rs12720763 con miR-148a-3p y miR-148a-5p inhibidos.....	102
Figura R4. Validación de la inhibición de miR-148a-3p y miR-148a-5p en HepG2.....	103

Figura R5. Expresión relativa de miR-148a-3p y miR-148a-5p en HepG2.....	103
Figura R6. Expresión de <i>APOB</i> con miR-148a-3p y miR-148a-5p inhibidos en HepG2.....	104
Figura R7. Expresión de <i>PCSK9</i> y <i>LDLR</i> con miR-148a-3p inhibido en células HepG2.....	105
Figura R8. Validación del modelo de inhibición de miR-148a-3p en células 3T3-L1.....	106
Figura R9. <i>Heat map</i> del secuenciado de RNA en preadipocitos 3T3-L1 con miR-148a-3p inhibido.....	107
Figura R10. Expresión génica en preadipocitos 3T3-L1 con inhibición de miR-148a-3p.....	108
Figura R11. ELISA de Wnt5b en preadipocitos 3T3-L1 con inhibición de miR-148a-3p.....	109
Figura R12. Actividad luciferasa del 3'UTR de Wnt10b con miR-148a-3p inhibido.....	109
Figura R13. Western blot de β -Catenina con miR-148a-3p inhibido.....	110
Figura R14. Expresión de Axin2 en preadipocitos 3T3-L1 con miR-148a-3p inhibido.....	110
Figura R15. Expresión génica de marcadores de diferenciación con miR-148a-3p inhibido....	111
Figura R16. Validación del modelo de sobreexpresión de miR-148a-3p en células 3T3-L1....	113
Figura R17. Expresión de genes de la ruta Wnt en preadipocitos 3T3-L1 con sobreexpresión de miR-148a-3p.....	113
Figura R18. Expresión génica de marcadores de diferenciación con miR-148a-3p sobreexpresado.....	114
Figura R19. Expresión de Nr5a2 en células 3T3-L1.....	115
Figura R20. Validación de los modelos de sobreexpresión y silenciamiento de Nr5a2.....	116
Figura R21. Efecto de Nr5a2 sobre la expresión de miR-148a-3p en preadipocitos 3T3-L1....	117
Figura R22. Superretardo para el estudio de la unión de Nr5a2 al promotor de miR-148a.....	118
Figura R23. ChIP para el estudio de la unión de Nr5a2 al promotor de miR-148a murino.....	119
Figura R24. Efecto de Nr5a2 en la expresión de genes de la ruta Wnt.....	120
Figura R25. Western blot para el estudio del efecto de Nr5a2 sobre β -Catenina.....	121
Figura R26. Efecto de la sobreexpresión de Nr5a2 en la expresión génica de marcadores de diferenciación.....	121
Figura R27. Efecto del silenciamiento de Nr5a2 en la expresión génica de marcadores de diferenciación.....	122
Figura R28. EMSA del SNP rs4722551.....	123
Figura R29. Actividad luciferasa del SNP rs4722551.....	124
Figura R30. Superretardo del SNP rs4722551 para el estudio de la unión de AR.....	125

ÍNDICE DE TABLAS

RESULTADOS

Tabla R1. Análisis bioinformáticos para los dos alelos del SNP rs12720763.....	100
Tabla R2 Análisis bioinformáticos para el promotor de miR-148a humano y murino.....	115
Tabla R3. Análisis bioinformáticos para los dos alelos del SNP rs4722551.....	123

ANEXOS

Tabla S1. Secuencias del <i>mimic</i> y los inhibidores empleados.....	165
Tabla S2. Secuencias de los cebadores para la detección de la expresión de genes humanos en células HepG2.....	165
Tabla S3. Secuencias de cebadores para la detección de la expresión de genes murinos en células 3T3-L1.....	165
Tabla S4. Anticuerpos primarios utilizados en los experimentos de western blot.....	166
Tabla S5. Secuencias de los oligonucleótidos para anillado de las sondas de EMSA.....	166
Tabla S6. Secuencias de los cebadores para el clonado de las secuencias 3'UTR.....	167
Tabla S7. Secuencias de los cebadores para el experimento de mutagénesis dirigida.....	167
Tabla S8. Secuencias de los cebadores para los experimentos de ChIP.....	167

ABREVIATURAS

A

A:	Adenina
ABCA1:	<i>ATP-binding cassette, sub-family A member 1</i>
ABCG1:	<i>ATP-binding cassette, sub-family G member 1</i>
ABCG5:	<i>ATP-binding cassette, sub-family G member 5</i>
ABCG8:	<i>ATP-binding cassette, sub-family G member 8</i>
Acetil-CoA:	Acetil Coenzima A
Actb:	<i>β-Actin</i>
ADF:	Hipercolesterolemia APOB100 Defectuosa Familiar
Adipoq:	<i>Adiponectin, C1Q and collagen domain containing</i>
AGO2:	<i>Argonaute 2</i>
AP-1:	<i>Activating Protein 1</i>
APC:	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
APOA1:	<i>Apolipoprotein A1</i>
APOA5:	<i>Apolipoprotein A5</i>
APOB:	<i>Apolipoproteína B</i>
APOB48:	<i>Apolipoprotein B48</i>
APOB100:	<i>Apolipoprotein B100</i>
APOE:	<i>Apolipoprotein E</i>
APS:	Persulfato de amonio
AR:	<i>Androgen Receptor</i>
ARH:	Hipercolesterolemia Autosómica Recesiva
ATCC:	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP:	Adenosín trifosfato

B

BMP:	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BMP2:	<i>Bone Morphogenetic Protein 2</i>
BMP4:	<i>Bone Morphogenetic Protein 4</i>
BMPR1a:	<i>Bone Morphogenetic Protein Receptor, type 1a</i>
BMPR2:	<i>Bone Morphogenetic Protein Receptor, type 2</i>
BSA:	Seroalbúmina bovina

C

C:	Citosina
°C:	Grado centígrado
CaCl ₂ :	Cloruro de calcio
CAMKII:	<i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II</i>
cAMP:	Adenosín monofosfato cíclico
CBY:	<i>Chibby</i>
CD36:	Molécula CD36 (<i>thrombospondin receptor</i>)
CD40:	Molécula CD40
CD40L:	Ligando de la Molécula CD40
CD68:	Molécula CD68
CDC42:	<i>Cell Division Cycle 42</i>
CDK:	<i>Cyclin-Dependent Kinase</i>
cDNA:	DNA complementario
C/EBP α :	<i>CCAAT/Enhancer Binding Protein α</i>
C/EBP β :	<i>CCAAT/Enhancer Binding Protein β</i>
CETP:	<i>Cholesteryl Ester Transfer Protein</i>
c-FOS:	<i>c-FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>
ChIP:	Inmunoprecipitación de Cromatina
cLDL:	LDL colesterol
CML:	Células Musculares Lisas
CNV:	<i>Copy Number Variations</i> (Variación en el Número de Copias)
Cols:	Colaboradores
CpG:	Citosina-fosfato-guanina
CREB:	<i>cAMP Responsive Element Binding protein</i>
cSNP:	SNP codificante
Ct:	<i>Threshold cycle</i> (Ciclo de amplificación umbral)
Cyp19a1:	<i>Cytochrome P450, family 19, subfamily a, polypeptide 1</i>

D

DBS:	<i>Donor Bovine Serum</i>
dbSNP:	<i>Single Nucleotide Polymorphism Database</i>
Dcl1:	<i>Dicer like protein 1</i>

DGCR8:	<i>DGCR8 microprocessor complex subunit</i>
DHH:	<i>Desert hedgehog</i>
DKK1:	<i>Dickkopf Wnt signaling pathway inhibitor 1</i>
DLX5:	<i>Distal-Less Homeobox 5</i>
DNA:	Ácido Desoxirribonucleico
DNMT1:	<i>DNA (cytosine-5)-MethylTransferase 1</i>
DMT1:	Diabetes Mellitus Tipo 1
DMT2:	Diabetes Mellitus Tipo 2
dNTP:	Desoxinucleótido trifosfato
DSH:	<i>Dishevelled</i>
dsRBD:	<i>double-stranded RNA Binding Domain</i>
DTT:	Ditiotreitol

E

E2F:	<i>E2F transcription factor</i>
E2F3:	<i>E2F transcription factor 3</i>
EDTA:	Ácido etildiaminotetraacético
EGR2:	<i>Early Growth Response 2</i>
EID-1:	<i>EP300 Interacting inhibitor of differentiation 1</i>
eIF4E:	<i>Eukaryotic translation Initiation Factor 4E</i>
eIF6:	<i>Eukaryotic translation Initiation Factor 6</i>
ELISA:	<i>Enzyme-Linked Immunosorbant Assay</i>
EMSA:	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
ERK5:	<i>Mitogen Activated Protein Kinase 7 (MAPK7)</i>

F

FA:	<i>Fatty Acid (Ácido graso)</i>
FABP4:	<i>Fatty Acid Binding Protein 4</i>
FASN:	<i>Fatty Acid Synthase</i>
FBS:	<i>Fetal Bovine Serum (Suero fetal bovino)</i>
FOS-B:	<i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B</i>
FOXO1:	<i>Forkhead box O1</i>
FFA:	<i>Free Fatty Acids (Ácidos grasos libres)</i>

Abreviaturas

FRA1:	<i>kinesin-like protein FRA1</i>
FTO:	<i>Fat mass and obesity associated</i>
Ftz-F1:	<i>Fushi Tarazu transcription factor 1</i>
Fw:	<i>Forward</i>
FZD:	<i>Frizzled</i>
FZD2:	<i>Frizzled 2</i>

G

G:	Guanina
g:	Gramo
GABPA:	<i>GA binding protein transcription factor α subunit</i>
GATA2:	<i>GATA binding protein 2</i>
GATA3:	<i>GATA binding protein 3</i>
gDNA:	DNA genómico
GEMIN3:	<i>Gem (nuclear organelle) associated protein 3</i>
GEMIN4:	<i>Gem (nuclear organelle) associated protein 4</i>
GLI:	<i>GLI family zinc finger</i>
GLUT4:	<i>Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter) 4</i>
GPAT:	<i>Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase</i>
GSK3:	<i>Glycogen Synthase Kinase 3</i>
GW182:	<i>Trinucleotide Repeat Containing 6A (TNRC6A)</i>
GWAS:	<i>Genome-Wide Association Study</i>

H

H ₂ SO ₄ :	Ácido sulfúrico
HBS:	Tampón Salino de HEPES
HCl:	Ácido clorhídrico
HDL:	<i>High Density Lipoprotein</i>
HEPES:	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
HF:	Hipercolesterolemia Familiar
HF3:	Hipercolesterolemia Familiar 3
HFC:	Hiperlipidemia Familiar Combinada
HH:	Hipercolesterolemias Hereditarias

Hh:	<i>Hedgehog</i>
HMGA2:	<i>High Mobility Group AT-hook 2</i>
HMGCR:	<i>3-Hydroxy-3-MethylGlutaryl-CoA Reductase</i>
HNF1A:	<i>HNF1 homeobox α</i>
HRP:	<i>HorseRadish Peroxidase</i>
HTGL:	<i>Hepatic Triglyceride Lipase</i>

I

IBMX:	<i>3-Isobutyl-1-MethylXanthine</i>
IDL:	<i>Intermediate Density Lipoprotein</i>
IFN- γ :	<i>Interferon γ</i>
IGF-1:	<i>Insulin like Growth Factor 1</i>
IgG:	<i>Inmunoglobulin G</i>
IHH:	<i>Indian Hedgehog</i>
IMC:	<i>Índice de Masa Corporal</i>
IPO8:	<i>Importin 8</i>

J

JNK:	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
JUN:	<i>c-JUN proto-oncogen</i>

K

KCl:	<i>Cloruro de potasio</i>
KLF2:	<i>Kruppel-Like Factor 2</i>
KLF5:	<i>Kruppel-Like Factor 5</i>
KLF15:	<i>Kruppel-Like Factor 15</i>

L

l:	<i>Litro</i>
LB:	<i>Medio de cultivo Luria Bertoni</i>
LCAT:	<i>Lecithin-Cholesterol Acyltransferase</i>
LDL:	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LDLR:	<i>Low Density Lipoprotein Receptor</i>

LDLRAP1:	<i>Low Density Lipoprotein Receptor Adaptor Protein 1</i>
LEF1:	<i>Lymphoid Enhancer binding Factor 1</i>
LEP:	<i>Leptin</i>
LEPR:	<i>Leptin Receptor</i>
LIPE:	<i>Lipase, hormone sensitive</i>
LOX:	<i>Lysyl Oxidase</i>
LPL:	<i>Lipoprotein Lipase</i>
LRP5:	<i>Low density lipoprotein receptor-related Protein 5</i>
LRP6:	<i>Low density lipoprotein receptor-related Protein 6</i>
M	
M:	Molaridad
m:	Mili
μ:	Micro
MAFB:	<i>v-Maf musculoaponeurotic Fibrosarcoma oncogene B</i>
MAG:	Monoacilglicerol
MAPK:	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MEF:	<i>Mouse Embryo Fibroblast</i>
MC4R:	<i>Melanocortin 4 Receptor</i>
MCP-1:	<i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i>
M-CSF:	<i>Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>
MgCl ₂ :	Cloruro de magnesio
miRNA:	microRNA
miR SNP:	<i>miRNA-related Single Nucleotide Polymorphism</i>
miRISC:	<i>miRNA-Induced Silencing Complex</i>
MOV10:	<i>Mov10 RISC complex RNA helicase</i>
mRNA:	RNA mensajero
MSC:	<i>Mesenchymal Stem Cell (Célula Madre Mesenquimal)</i>
MTP:	<i>Microsomal Triglyceride transfer Protein</i>
MYC:	<i>MYC avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
MYF5:	<i>Myogenic factor 5</i>

N

N:	Normal
n:	Nano
NaCl:	Cloruro de Sodio
NAFLD:	Hígado graso no alcohólico
NCBI:	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NLK:	<i>Nemo-Like kinase</i>
NPC1L1:	<i>Niemann-Pick C1-Like 1</i>
NR0B2:	<i>Nuclear Receptor subfamily 0, group B, member 2</i>
NR5A2:	<i>Nuclear Receptor subfamily 5, group A, member 2 (LRH-1)</i>
Nt:	Nucleótido

O

OMS:	Organización Mundial de la Salud
ORF:	<i>Open Reading Frames</i>

P

PABP1:	<i>Polyadenylate Binding Protein 1</i>
pb:	Pares de bases
PBS:	Tampón Fosfato Salino
PCK1:	<i>Phosphoenolpyruvate CarboxyKinase 1</i>
PCP:	Polaridad Celular Planar
PCR:	Reacción de la polimerasa en cadena
PCSK9:	<i>Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9</i>
piRNA:	piwi RNA
PKA:	<i>Protein kinase A</i>
PKC:	<i>Protein Kinase C</i>
PLTP:	<i>PhosphoLipid Transfer Protein</i>
Pol II:	<i>RNA Polimerase II</i>
Poli-dIdC:	Poli-desoxinosina desoxicitosina
PPAR γ :	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ</i>
PRDM16:	<i>PR domain containing 16</i>
PTCH1:	<i>Patched 1</i>

Abreviaturas

PTCH2:	<i>Patched 2</i>
p/v:	Peso/volumen

Q

qPCR:	PCR cuantitativa
-------	------------------

R

RAC:	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog (Akt1)</i>
RB:	<i>Retinoblastoma</i>
RB2/p130:	Retinoblastoma 2/p130
Re:	<i>Reverse</i>
RHO:	<i>Rhodopsin</i>
ROCK1:	<i>Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1</i>
ROS:	Especies Reactivas de Oxígeno
RNA:	<i>Ácido Ribonucleico</i>
<i>RNasa</i> :	Ribonucleasa
RNAseq:	Secuenciado de RNA
rpm:	Revoluciones por minuto
RPS14:	<i>Ribosomal Protein S14</i>
rSNP:	SNP regulador
RUNX2:	<i>Runt related transcription factor 2</i>
RXR:	<i>Retinoid X Receptor</i>

S

SDS:	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SFRP1:	<i>Secreted Frizzled-Related Protein 1</i>
SHH:	<i>Sonic hedgehog</i>
shRNA:	<i>Small hairpin RNA</i> (RNA pequeño de horquilla)
Sin3b:	<i>SIN3 transcription regulator family member b</i>
siRNA:	<i>Small interfering RNA</i> (RNA pequeño de interferencia)
SIRT1:	<i>Sirtuin 1</i>
SMAD1:	<i>Smad family member 1</i>

SMAD4:	<i>Smad family member 4</i>
SMAD5:	<i>Smad family member 5</i>
SMAD8:	<i>Smad family member 8</i>
SMO:	<i>Smoothened, frizzled class receptor</i>
SNP:	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SORT1:	<i>Sortilin 1</i>
SR-A:	<i>Macrophage Scavenger Receptor 1 (MSR1)</i>
SREBP1a:	<i>Sterol Regulatory Element Binding Protein 1a</i>
SREBP1c:	<i>Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c</i>
SREBP2:	<i>Sterol Regulatory Element Binding Protein 2</i>
SREBF1:	<i>Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 1</i>
SREBF2:	<i>Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 2</i>
STAT3:	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
STAT5A:	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 5A</i>
STAT5B:	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 5B</i>
SVF:	<i>Stromal Vascular Fraction (Fracción Estromo-Vascular)</i>

T

T:	Timina
t:	Tiempo
TAK1:	<i>TGF-β Activated kinase 1</i>
TBE:	Tampón TRIS borato EDTA
TCF4:	<i>Transcription Factor 4</i>
TCF7L2:	<i>Transcription Factor 7-Like 2 (T-cell specific, HMG-box)</i>
TEMED:	Tetrametiletilendiamina
TF:	<i>Transcription Factor (Factor de Transcripción)</i>
TFBS:	<i>Transcription Factor Binding Site</i>
TG:	Triglicérido
TGF- β :	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
TGM:	Tampón Tris Glicina Metanol
TGS:	Tampón Tris Glicina SDS
TMB:	Tetra Metil Bencidina
TNF:	<i>Tumor Necrosis Factor</i>

Abreviaturas

TNF α :	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
TpG:	Timina-fosfato-guanina
TPT1:	<i>Tumor Protein, Translationally-controlled 1</i>
TRBP:	<i>TAR RNA Binding Protein</i>
TRIS:	Tris (hidroximetil) aminometano
TTBS:	<i>Tween 20 Tris Buffer Saline</i>
TZD:	Tiazolidindionas
U	
U:	Uracilo
U6:	<i>Small nuclear RNA U6</i>
UCP1:	<i>Uncoupling Protein 1</i>
UI:	Unidad Internacional
UTR:	<i>Untranslated Region</i>
V	
V:	Voltio
VLDL:	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>
W	
WISP2:	<i>WNT1 inducible signaling pathway protein 2</i>
Wnt:	<i>Wingless-type MMTV integration site family</i>
WNT1:	<i>Wingless-type MMTV integration site family member 1</i>
WNT4:	<i>Wingless-type MMTV integration site family member 4</i>
WNT5A:	<i>Wingless-type MMTV integration site family member 5A</i>
WNT5B:	<i>Wingless-type MMTV integration site family member 5B</i>
WNT6:	<i>Wingless-type MMTV integration site family member 6</i>
WNT10A:	<i>Wingless-type MMTV integration site family member 10A</i>
WNT10B:	<i>Wingless-type MMTV integration site family member 10B</i>
X	
XPO5:	<i>Exportin 5</i>

INTRODUCCIÓN

"No hay inversión más rentable que la del conocimiento".

Benjamin Franklin

En los últimos años la prevalencia de las enfermedades metabólicas, como la obesidad, la diabetes mellitus o las enfermedades cardiovasculares causadas por dislipidemias, ha aumentado de manera significativa. Tanto es así que hoy en día este grupo de enfermedades constituyen la principal causa de mortalidad en el mundo. Salvo excepciones la mayoría de ellas están dentro de la categoría de enfermedades complejas y todavía se desconoce mucho de su componente genético. Por todo esto, la investigación de los factores genéticos de estas enfermedades supone un gran reto para la ciencia médica en la actualidad (1, 2).

Los microRNAs o miRNAs son reguladores postranscripcionales de gran importancia biológica. Esto queda patente al comprobar el alto número de genes que regulan directamente y la alta conservación tanto en las secuencias de los miRNAs como en las de sus dianas. Esta abundancia de genes diana hace de los miRNAs unos importantes reguladores en la mayoría de los procesos biológicos, como la diferenciación y la proliferación celulares, el desarrollo y el metabolismo (3, 4). Por ello, la investigación científica ha puesto el foco de atención en el estudio de estas moléculas reguladoras y su importante papel en el desarrollo de multitud de patologías, entre las que se incluyen las enfermedades metabólicas como la obesidad y las enfermedades cardiovasculares relacionadas con las dislipidemias.

1.1. DISLIPIDEMIAS

Se denominan dislipidemias a las alteraciones en las concentraciones normales de lípidos y lipoproteínas en sangre. Si consisten en un aumento en los niveles sanguíneos de triglicéridos (TG) o de colesterol se denominan hipertrigliceridemias o hipercolesterolemias respectivamente. También puede darse una dislipidemia mixta, en la cual existen variaciones tanto en los niveles de TG como en los de colesterol en sangre. Las consecuencias típicas de la dislipidemia consisten en un aumento en la concentración de TG en el suero, un aumento de los ácidos grasos libres (FFA), una disminución de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) unidas a colesterol y un aumento de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) unidas a colesterol en el suero (5, 6). Las dislipidemias constituyen el principal factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, que a su vez constituyen la principal causa de mortalidad en el mundo actual (7).

Numerosos procesos intervienen en el consumo, transporte y almacenamiento de lípidos, y cualquier anomalía en alguno de estos procesos que se detallarán a continuación puede acarrear como consecuencia una dislipidemia. Después de una ingesta de alimentos que contienen grasas, los enterocitos captan de la sangre los FFA y los 2-monoacilgliceroles (MAG), resultado de la lipólisis de los TG, por difusión pasiva o mediante transportadores específicos como CD36, y el colesterol mediante el transportador NPC1L1. Dentro del enterocito, los FFA y MAG son convertidos de nuevo en TG y el colesterol es transformado en ésteres de colesterol; ambos forman junto con la apolipoproteína B48 (APOB48) los quilomicrones, que a continuación pasan al torrente sanguíneo. Paralelamente y en respuesta al aumento de TG en el hígado, éste sintetiza lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) compuestas por TG, ésteres de colesterol y apolipoproteína B100 (APOB100) (8, 9). Tanto APOB100 como APOB48 son codificadas por el mismo gen, pero la apolipoproteína APOB48 es el resultado de una modificación postranscripcional (10).

Tanto los quilomicrones como las VLDL transportan los ácidos grasos (FA) en forma de TG al músculo esquelético y tejido adiposo para el gasto energético y el almacenamiento respectivamente. La liberación de los FA de los quilomicrones y las VLDL depende de la enzima Lipoprotein Lipasa (LPL), estimulada por la insulina y con una gran expresión en músculo y tejido adiposo, siendo la encargada de la lipólisis de los TG (11). La insulina liberada tras la ingesta promueve la captación de los FA por los miocitos y los adipocitos e inhibe la Lipasa sensible a hormonas (LIPE), enzima clave en la lipólisis. Además, la insulina también tiene un papel importante en la regulación del transporte de los FA desde los adipocitos a otros tejidos como el músculo esquelético donde son oxidados para la obtención de energía; de ahí que la resistencia a insulina juegue un papel fundamental en las dislipidemias provocando un gran impacto en el metabolismo de los FA y las lipoproteínas. Los FA que se quedan en la circulación y no son captados por los miocitos y los adipocitos son transportados al hígado por la albúmina (12). En la Figura I1 se muestra un esquema del transporte de FA.

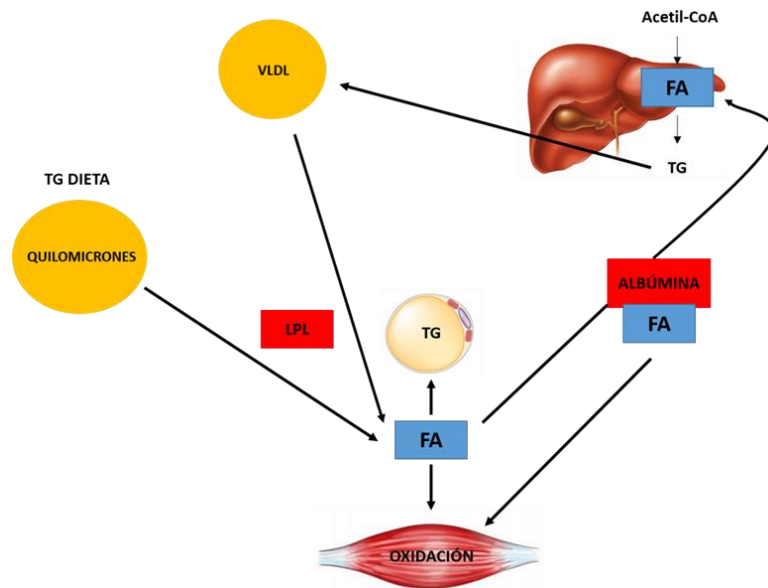


Fig.11. Transporte de ácidos grasos (FA). Los quilomicrones y partículas VLDL transportan los FA en forma de TG al músculo esquelético y el tejido adiposo, donde son liberados por acción de la enzima LPL. En el músculo, los FA son oxidados para la obtención de energía y en el tejido adiposo se almacenan en forma de TG. Los FA que quedan en circulación son transportados por la albúmina al hígado, donde se sintetizan TG que serán transportados por las partículas VLDL.

En cuanto al transporte de colesterol, durante el proceso de lipólisis, los quilomicrones y las partículas VLDL pueden disminuir de tamaño para formar remanentes de quilomicrones y lipoproteínas de baja densidad (LDL) respectivamente. Este proceso catabólico de quilomicrones y VLDL está mediado por las enzimas LPL y lipasa hepática (HTGL). Las partículas VLDL son convertidas en partículas de densidad intermedia (IDL) por la acción de LPL, y éstas a su vez en partículas LDL por acción de la HTGL. Las partículas LDL son recogidas por el hígado mayoritariamente mediante el LDLR, el cual está sometido a un continuo reciclaje por la proteína PCSK9, que se encarga de regular el proceso de degradación del receptor (13-15). La neutralización o disminución de la expresión de PCSK9 conlleva un aumento de LDLR en la membrana celular del hepatocito, lo que resulta en una disminución de los niveles en plasma de partículas LDL unidas a colesterol (cLDL) (14, 16).

Además del metabolismo de TG y partículas LDL, el intestino y el hígado juegan un papel fundamental en el transporte reverso de colesterol mediante la síntesis de lipoproteínas de alta densidad (HDL). Estas partículas HDL tienen a la apolipoproteína A1 (APOA1) como proteína estructural y son las encargadas de transportar el colesterol desde

los tejidos periféricos hasta el hígado. La proteína LCAT es la encargada de esterificar el colesterol a ésteres de colesterol para el transporte en las partículas HDL, y además estas partículas se ven enriquecidas por más ésteres de colesterol en la circulación por la acción de dos proteínas: CETP y PLTP. En este proceso, las partículas HDL adquieren TG de las lipoproteínas ricas en estos lípidos por la acción de CETP. Ya en el hígado, la enzima HTGL hidroliza los fosfolípidos y los TG asociados a las partículas HDL induciendo la formación de nuevas pequeñas partículas HDL que seguirán actuando en el transporte reverse de colesterol (17, 18). La proteína NPC1L1 de los enterocitos regula la absorción del colesterol de la dieta y de las sales biliares sintetizadas en el hígado, para que tenga lugar el catabolismo del colesterol (17, 19). En la figura I2 se muestra un esquema del transporte de colesterol en el organismo.

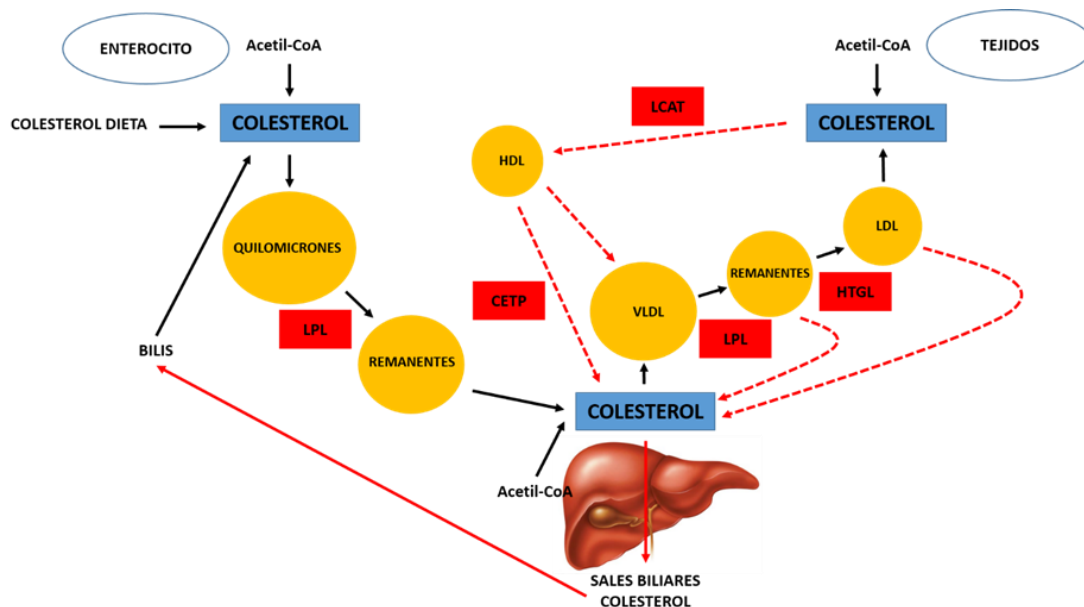


Fig.I2. Transporte de colesterol. Los quilomicrones y sus remanentes transportan el colesterol al hígado donde se sintetizan sales biliares. El resto del colesterol es transportado por las partículas VLDL, sus remanentes y las partículas LDL al resto de tejidos. Las partículas VLDL son convertidas por acción de la enzima LPL en remanentes, y estos a su vez en partículas LDL por acción de la enzima HTGL. Los remanentes de VLDL y partículas LDL son recogidas por el hígado. En el transporte reverse de colesterol las partículas HDL transportan colesterol esterificado por acción de la enzima LCAT al hígado. En este proceso, las partículas HDL se ven enriquecidas por más ésteres de colesterol de las partículas VLDL por acción de la enzima CETP.

Existen elementos reguladores como factores de transcripción (TF) y microRNAs (miRNAs), de los cuales se hablará en profundidad más adelante, que juegan un papel fundamental en la regulación del metabolismo lipídico y por tanto son importantes en el estudio de las dislipidemias. Dentro de los factores de transcripción hay que destacar los *Sterol Regulatory Element Binding Proteins* (SREBPs): SREBP1a y SREBP1c, codificadas por

el mismo gen y SREBP2. SREBP1a y SREBP2 activan la expresión de importantes genes relacionados con el colesterol como *LDLR* y *HMGCR*, que codifica la enzima limitante en la síntesis de colesterol, HMG CoA Reductasa. Por su parte, SREBP1c activa la expresión de genes relacionados con la síntesis de ácidos grasos como la sintasa de ácidos grasos (*FASN*) (20, 21). En cuanto a miRNAs cabe destacar miR-33b y miR-33a, que se localizan en intrones de los genes que codifican los SREBPs, en *SREBF1* y *SREBF2* respectivamente. Ambos miRNAs regulan postranscripcionalmente varios genes que codifican proteínas implicadas en el transporte del colesterol, y además la inhibición de estos miRNAs aumenta los niveles de partículas HDL en plasma (21).

Las dislipidemias son trastornos en los cuales existen componentes ambientales y genéticos. Entre los factores ambientales más importantes para padecer dislipidemias está el estilo de vida sedentario, la ingesta calórica y la dieta rica en carbohidratos. También son más sensibles a padecer dislipidemias los individuos obesos, con resistencia a insulina, síndrome metabólico y diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) (22). En cuanto al factor genético en el riesgo de padecer estos desórdenes lipídicos, se han descrito variantes asociadas a dislipidemias en multitud de genes importantes del metabolismo de lípidos y lipoproteínas (23-26). A la hora de hablar del componente genético merecen una mención aparte las hipercolesterolemias hereditarias, un grupo de trastornos genéticos de los cuales se hablará más adelante.

1.1.1. ATHEROSCLEROSIS

Según el último informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) el conjunto de las enfermedades cardiovasculares es la principal causa de mortalidad en el mundo, de hecho en 2012 el 31% de las muertes registradas se debieron a estas enfermedades. La aterosclerosis es un proceso patológico que está en la base del desarrollo de las enfermedades cardiovasculares. Su desarrollo se ve influenciado por el aumento en los niveles de glucosa, el desequilibrio en los niveles de lípidos o dislipidemia, la inflamación sistémica y el incremento de la presión sanguínea, siendo la obesidad uno de los factores principales responsables de estos efectos (27, 28).

La aterosclerosis está caracterizada por la acumulación de lípidos y elementos fibrosos en las grandes arterias. El primer paso en el desarrollo de este proceso patológico

consiste en la acumulación de partículas LDL en la matriz subendotelial de las arterias, debido a una alta concentración en el plasma de estas partículas que transportan el colesterol. Debido a la interacción con ROS (Especies Reactivas de Óxígeno) las partículas LDL se oxidan, estimulando así a las células endoteliales para producir moléculas de adhesión, proteínas quimiotácticas como MCP-1 y factores de crecimiento como M-CSF, lo que conduce al reclutamiento de leucocitos a la pared arterial. Los agregados de LDL oxidadas son reconocidos por los receptores *scavenger* (SR-A, CD36 y CD68) de los macrófagos, los cuales internalizan estas partículas por endocitosis, transformándose así en las denominadas células espumosas. La muerte de estas células conlleva un aumento en la masa de lípidos extracelulares y otros restos, creando así un foco necrótico donde se desarrolla la placa de ateroma. El aumento en los niveles de homocisteína y angiotensina II provoca la migración y proliferación de células musculares lisas (CML) de la capa íntima de la arteria. Además, la interacción del receptor CD40 de los macrófagos con su ligando CD40L de la familia de TNF, expresado por los linfocitos T, estimula la expresión de citoquinas como IFN- γ en macrófagos y linfocitos T, lo que conlleva la inflamación y la proliferación de CML. Estos últimos acontecimientos provocan la formación de una placa fibrosa denominada ateroma, la cual puede desprenderse y provocar una isquemia o un trombo, que podrían desembocar a su vez, bien en un infarto agudo de miocardio o en un infarto cerebral (29, 30). En la figura I3 se muestra un esquema de los acontecimientos que dan lugar a la placa de ateroma.

Varios estudios epidemiológicos han señalado diferentes factores ambientales y genéticos que están asociados a la aterosclerosis. Entre estos factores cabe destacar: el tabaquismo, la hipertensión, la dieta, la edad, la raza (31, 32), la obesidad, ya mencionada anteriormente, y la DMT2 (33, 34). Sin embargo, el factor de riesgo más determinante en la aterosclerosis es la dislipidemia definida por niveles altos de partículas LDL unidas a colesterol (cLDL) en el plasma (32, 35). En muchos casos, este aumento de la concentración plasmática de cLDL ocurre como consecuencia de alteraciones genéticas, por lo que a estas alteraciones se las conoce genéricamente como hipercolesterolemias hereditarias (36).

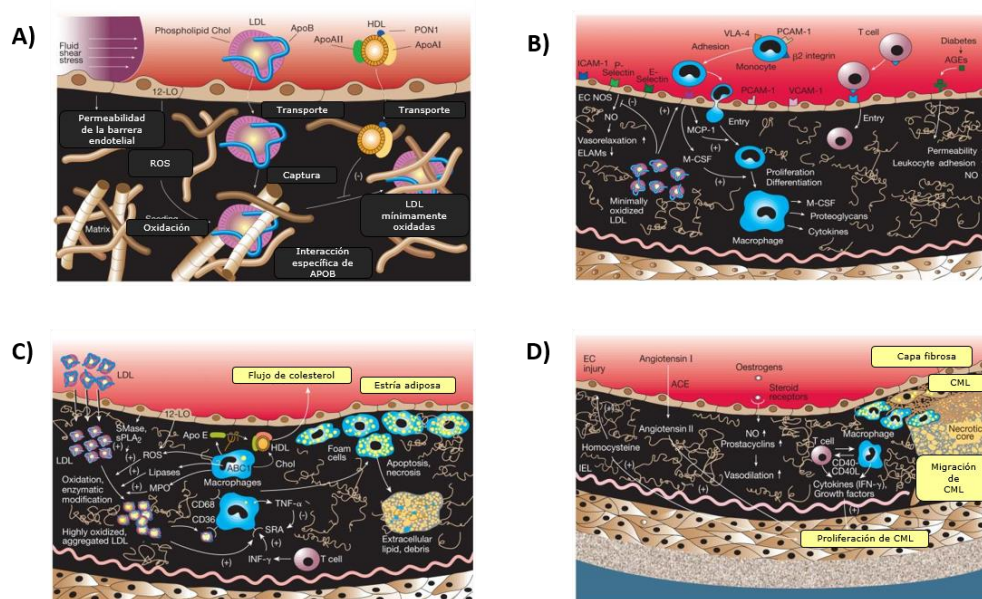


Fig.13. Fases en el desarrollo de la aterosclerosis. A) En la primera etapa se acumulan en la matriz subendotelial partículas LDL que son oxidadas debido a la interacción con especies reactivas de oxígeno (ROS). B) Las partículas LDL oxidadas estimulan a las células endoteliales para sintetizar moléculas de adhesión como MCP-1 y M-CSF que inducen el reclutamiento de leucocitos a la pared arterial. C) Las partículas LDL oxidadas son reconocidas por los receptores *scavenger* de los macrófagos, los cuales las internalizan convirtiéndose así en *células espumosas*. D) La interacción de CD40 y CD40L estimula la expresión de citoquinas como IFN- γ en linfocitos T y macrófagos, lo que conlleva la inflamación y la proliferación de células musculares lisas (CML). Además, la muerte de las células espumosas conlleva un aumento en la masa de lípidos extracelulares y otros restos, creando así un foco necrótico donde se desarrolla la placa de ateroma. Figura adaptada de (29).

1.1.2. HIPERCOLESTEROLEMIAS HEREDITARIAS

Las hipercolesterolemias hereditarias (HH) se pueden dividir en cuatro grupos atendiendo al tipo de herencia genética que presentan: hipercolesterolemias autosómicas dominantes, autosómicas recesivas, poligénicas o complejas (36).

Las hipercolesterolemias autosómicas dominantes, también conocidas como hipercolesterolemias familiares (HF), son relativamente frecuentes en la población, ya que afectan a una de cada quinientas personas aproximadamente, siendo *LDLR* el gen más frecuentemente afectado. A los trastornos provocados por mutaciones en este gen se los conoce como hipercolesterolemias familiares LDLR, habiéndose encontrado hasta la fecha más de 1700 mutaciones en este gen que provocan este tipo de enfermedad (36-39). Existen además otros dos tipos de HF. Por un lado, las provocadas por las mutaciones en el gen *APOB*, que codifica el ligando del LDLR y apolipoproteína mayoritaria en las

partículas VLDL y LDL, y por otro lado, las provocadas por mutaciones en el gen *PCSK9*. Cuando el trastorno es el resultado de mutaciones en el gen de *APOB* se le denomina hipercolesterolemia APOB100 Defectuosa Familiar (ADF) (38, 40) y cuando el responsable es alguna mutación en *PCSK9* su nombre es hipercolesterolemia Familiar 3 (HF3) (26, 38, 41). Estas dos últimas enfermedades, ADF y HF3, son trastornos menos comunes que la hipercolesterolemia familiar LDLR.

El siguiente tipo de hipercolesterolemias hereditarias, de herencia autosómica recesiva, son muy raras ya que las padecen aproximadamente una entre cinco millones de personas (38). Estas enfermedades son consecuencia de mutaciones en los genes *LDLRAP1*, *ABCG5* y *ABCG8*. Cuando las mutaciones se encuentran en el gen *LDLRAP1*, que codifica una proteína del mismo nombre encargada de adaptar y estabilizar el LDLR en la membrana plasmática celular, provocan una enfermedad denominada Hipercolesterolemia autosómica recesiva (ARH) (42, 43). Cuando las mutaciones se dan en los genes *ABCG5* y *ABCG8*, que codifican dos proteínas que forman un heterodímero, cuya función es actuar como transportador de esteroides en el hígado y el intestino, causan una enfermedad denominada sitosterolemia (44).

El tercer tipo de hipercolesterolemia, la poligénica, es la más frecuente. Se caracteriza por provocar un incremento de los niveles plasmáticos de cLDL más moderado que las hipercolesterolemias autosómicas dominantes y recesivas. Esta enfermedad es heterogénea en sus bases genéticas, ya que en su desarrollo actúan muchos *loci* diferentes con un efecto muy pequeño de cada uno de ellos. Diferentes estudios de GWAS han demostrado la asociación de variantes génicas en *APOB*, *APOE*, *PCSK9*, *SORT1*, *HNF1A*, *HMGCR*, *HTGL* y *LDLR* con estos *loci* (45).

En el cuarto tipo, las hipercolesterolemias complejas, cabe destacar la Hiperlipidemia Familiar Combinada (HFC), que se caracteriza por un aumento en los niveles plasmáticos tanto de colesterol como de triglicéridos. En estas enfermedades hay un efecto de *loci* desconocidos en la hipercolesterolemia poligénica, que hace posible la confusión clínica entre estos dos últimos tipos de dislipidemias hereditarias. Este tipo de enfermedades se caracterizan por ser heterogéneas genéticamente y por tener una gran interacción con otros factores como el sobrepeso y el modo de vida (46).

1.2. LA VARIABILIDAD GENÉTICA COMO FACTOR DE SUSCEPTIBILIDAD

Atendiendo al componente genético las enfermedades pueden dividirse en simples o monogénicas y complejas. Las primeras se caracterizan por tener un solo *locus* contribuyendo a la enfermedad y seguir un patrón de herencia mendeliana. Además el componente ambiental no es muy relevante a la hora de predecir la aparición de la enfermedad. En las segundas, las enfermedades complejas, el componente genético es debido a varios *loci*, cada uno de los cuales tiene un efecto pequeño, a diferencia de las enfermedades monogénicas, en las que un solo *locus* tiene un gran efecto. Además, en las enfermedades complejas, el factor ambiental juega un papel muy importante en el riesgo de desarrollar dichas enfermedades. Muchas veces el gran número de *loci* que determinan el desarrollo de las mismas hace muy difícil predecir el riesgo de padecimiento, siendo en ocasiones desconocidos algunos de estos *loci*, lo que dificulta aún más el conocimiento de la predisposición de un individuo a padecer una enfermedad compleja (1, 2, 47) (Fig.14).

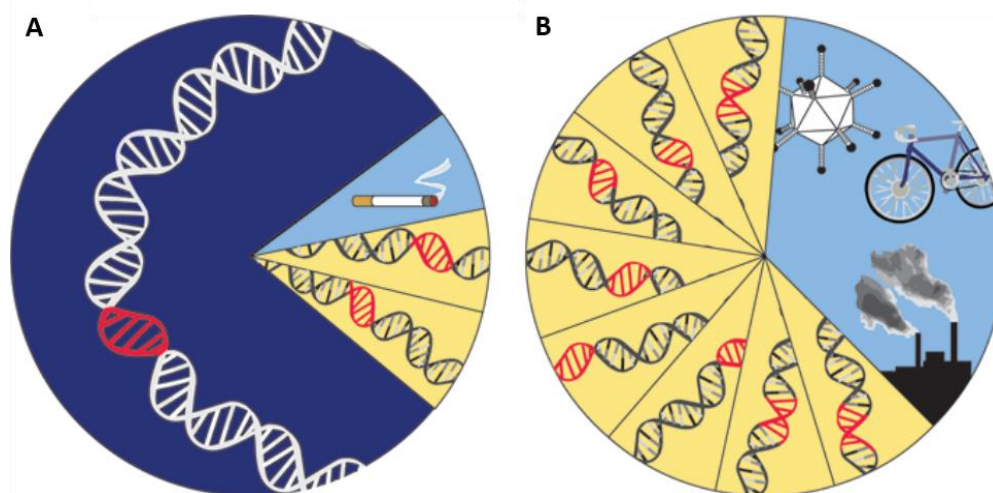


Fig.14. Factores de riesgo asociados a enfermedades A) monogénicas y B) complejas. Se aprecia cómo en las enfermedades monogénicas el factor genético es más importante y asociado casi por completo a un único *locus*, mientras que en las enfermedades complejas el factor genético está asociado a un número más grande de *loci* y los factores ambientales tienen mayor importancia. Figura extraída de (2).

La variabilidad genética de una especie o un individuo es el producto de variaciones genéticas en su secuencia nucleotídica. Estas variaciones pueden ser de varios tipos: variaciones en el número de copias de una secuencia concreta del genoma como los *Copy Number Variations* (CNV) y los microsatélites, inserciones, deleciones, inversiones o

polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), de los que se hablará más adelante y que constituyen el grupo más importante (48, 49).

Las variaciones en la secuencia nucleotídica pueden producir un efecto grande o pequeño en el fenotipo del individuo. Cuando el efecto sobre el fenotipo es grande, estas variaciones tienden a eliminarse de la población por efecto de la presión selectiva, ya que tienen un impacto negativo sobre la viabilidad del individuo y por lo tanto también en su capacidad de transmitir su acervo génico. Este tipo de cambios tan bruscos en el fenotipo son característicos de las enfermedades monogénicas. Por otro lado, cuando las variaciones provocan un pequeño cambio en el fenotipo del individuo es más probable que se fije en la población ya que estos cambios no suponen un gran problema en la viabilidad del individuo ni en su capacidad reproductiva. Una gran suma de estas variaciones en varios *loci* diferentes provoca un cambio fenotípico mayor en el individuo. Aunque no estén sometidos a la presión selectiva, estos individuos tendrán una respuesta diferente a los cambios ambientales o de modo de vida. El conjunto de estas variaciones en múltiples *loci* y los cambios ambientales pueden dar como resultado el riesgo de padecer una enfermedad compleja (48-50).

En una enfermedad compleja o poligénica se habla del riesgo o susceptibilidad de padecerla, ya que el que un individuo porte una variante alélica de riesgo no significa necesariamente que vaya a desarrollarla (1, 2, 47). Este factor complica mucho la caracterización de las enfermedades comunes, ya que dos individuos que desarrollen la misma enfermedad pueden tener un componente genético diferente (1). Además, en el riesgo de padecer enfermedades comunes hay que tener en cuenta otros factores que pueden ser diferentes entre individuos predispuestos al padecimiento, como la relación gen-ambiente y el diferente modo de vida (1, 2, 47-49). Todo esto hace que la caracterización de variantes asociadas a estas enfermedades se haya convertido en un reto difícil pero importante de abordar científicamente.

En el caso de ciertas enfermedades complejas, hay una gran cantidad de variantes génicas que contribuyen a la predisposición a padecer estas enfermedades. Se ha propuesto que esta situación no es casual, lo que sugiere la hipótesis de que estas variantes se fijaran en la población por un proceso de presión selectiva, ya que en algún momento de nuestra historia como especie habrían supuesto una ventaja evolutiva. Sin

embargo, hoy en día esas hipotéticas ventajas se habrían convertido en desventajas al producirse un cambio ambiental y de tipo de vida en las sociedades occidentalizadas. Van Neel en 1962 fue el primer científico en defender esta teoría denominada “del gen ahorrador” (50). Según esta teoría, aplicada al gran aumento en la prevalencia de enfermedades como la obesidad y la DMT2 a lo largo de la última parte del siglo XX (50-52), ciertas variantes se fijaron en la población cazadora-recolectora del paleolítico como respuesta a la presión selectiva en condiciones de hambre e inanición que cíclicamente afectaba a estas poblaciones. Estos periodos de hambre unidos a la gran actividad física de la población condujeron a la selección de los individuos con un genotipo que favorecía el almacenamiento energético en periodos de falta de alimento. Pero ese acervo génico heredado hasta nuestros días, hoy supone una desventaja ya que en la actualidad en las sociedades occidentales no hay periodos de hambruna, hay un exceso de ingesta calórica y una vida más bien sedentaria, por lo que aquello que antiguamente hizo a algunos individuos más aventajados para sobrevivir al hambre, hoy hace a sus descendientes más susceptibles de padecer obesidad y DMT2 (50).

1.2.1. POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO (SNP)

Los polimorfismos de un solo nucleótido, conocidos por el acrónimo SNP (en inglés, *Single Nucleotide Polymorphism*), son la fuente de variabilidad génica más abundante en el genoma (53). Se define como SNP una variación en el genoma consistente en la sustitución de un nucleótido por otro dando como resultado dos variantes alélicas, siendo la frecuencia del alelo menos común superior al 1% en la población. Pese a que las sustituciones con una frecuencia alélica inferior a este porcentaje son consideradas mutaciones puntuales, se tiende a catalogarlas como SNPs, al igual que las sustituciones nucleotídicas que tienen como resultado variantes de tres o cuatro alelos. En la actualidad se cree que existe un SNP cada 100-300 pb en el genoma humano (53, 54), habiéndose registrado hasta la fecha más de 160 millones de estas variantes en la página de dbSNP del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Cuando varios SNPs se encuentran cercanos en la misma región de un cromosoma forman un haplotipo, definido como un conjunto de variables alélicas en desequilibrio de ligamiento (55).

Los SNPs son mutaciones producidas por errores en la replicación del DNA, y pese a que sería previsible asumir que debería haber la misma densidad de estas mutaciones a lo largo de todo el genoma, no es así. Hay zonas en las que hay una mayor concentración de SNPs y otras zonas, llamadas “desiertos de SNP”, donde no se encuentran estas variantes génicas (56). Una de las posibles razones para explicar la razón de la existencia de regiones del genoma sin SNPs es que las diferencias en el empaquetamiento de la cromatina a lo largo del genoma generan zonas con diferente susceptibilidad a tener mutaciones, y a que éstas sean reparadas (56, 57). Otra posible explicación sería que existen zonas genómicas con mayor selección evolutiva en las cuales las mutaciones no ventajosas desde un punto de visto evolutivo serían rápidamente eliminadas (56). En cuanto a las zonas del genoma con mayor densidad de SNPs, se encuentran dentro de regiones no codificantes, en secuencias reguladoras, de ahí que se denomine a estas mutaciones SNP reguladores (rSNP). Dentro de estas zonas reguladoras, la abundancia de los SNPs es mayor en las regiones promotoras de los genes y aumenta considerablemente cuanto mayor es la cercanía con del inicio de la transcripción (58, 59).

Además de existir heterogeneidad en la frecuencia de SNPs a lo largo del genoma también la hay en la frecuencia de los tipos de sustituciones nucleotídicas. Dentro de estas sustituciones la más frecuente, representando más del 25% de los casos, es la que sustituye un metil-CpG por un TpG, atribuyéndose a este cambio el aumento de heterocigosidad en las islas CpG (55, 59, 60).

1.2.1.1. SNPs REGULADORES (rSNPs)

Cuando la existencia de un SNP produce un efecto sobre el gen en el que se localiza se denomina SNP funcional (58). Los SNPs se pueden dividir en dos grupos en función de la región del gen en que se encuentran. Un primer tipo son los SNP reguladores (rSNP), los cuales se encuentran en regiones no codificantes; y un segundo tipo son los SNP codificantes (cSNP) que se localizan en regiones codificantes (58, 61). Los rSNPs pueden encontrarse en varios tipos de regiones reguladoras: promotores, intrones y regiones 5'UTR o 3'UTR (24, 58, 62, 63). En cuanto a los cSNPs se encuentran en regiones codificantes del gen, pudiendo producir o no cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína.

Los cSNPs, que se encuentran situados en regiones codificantes de los genes, pueden dividirse en cSNPs sinónimos y no sinónimos. Los sinónimos son aquellos que no producen un cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteína. En cambio, los cSNPs no sinónimos son aquellos que producen un cambio en la secuencia de aminoácidos, que puede conllevar cambios en la actividad de la proteína, cambios en la estructura de la misma, una modificación en la pauta de lectura o la creación de un nuevo codón de parada que trunque la proteína. Además, algunos cSNPs pueden provocar una alteración en la estabilidad del mRNA o su *splicing* (61, 64, 65). Existen también SNPs situados en partes no codificantes del mRNA cuyo efecto puede ser: modificar la estabilidad del mRNA, su estructura, producir cambios en la traducción de exones o cambios en el *splicing* que a su vez produzcan formas alteradas de la proteína (66).

Los rSNPs tienen un efecto sobre la regulación de la expresión del gen en el que se encuentran mediante la modificación de su transcripción; ya estén situados en una región promotora del gen, en uno de sus intrones o en la región 5' o 3' (58, 59). Cuando este tipo de SNPs se hallan en la región promotora del gen, concretamente en un sitio de unión para un determinado factor de transcripción (TF), llamado *Transcription Factor Binding Site* (TFBS), pueden variar la afinidad con la que ese factor se une al TFBS, e incluso pueden anular por completo la capacidad de unión de dicho factor al DNA. Cuando un rSNP afecta a la afinidad de un TF por su sitio de unión en el DNA puede provocar un cambio en los niveles de mRNA del gen en el que está situado (53, 58, 67) (Fig.15).

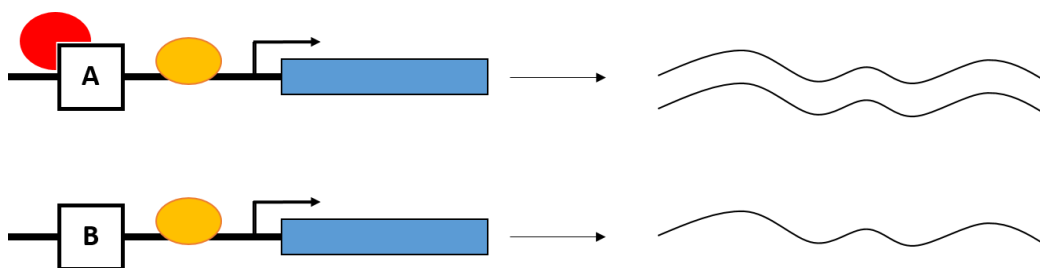


Fig.15. Efecto de los rSNPs en la unión de TFs. Un rSNP localizado en la secuencia de unión de un TF (en rojo) puede afectar a su afinidad, lo que conlleva una variación en los niveles de mRNA.

Existe otro tipo de rSNPs que también varían la afinidad con la que los TFs se unen al DNA. Sin embargo, no tienen por qué encontrarse necesariamente en la secuencia del TFBS, pudiendo estar situados en una secuencia más alejada del promotor. Este tipo de rSNPs afecta a la topología del DNA, pudiendo producir diferentes efectos: una zona de

curvatura en el DNA producida por un SNP puede aumentar la unión de varios TFs que por impedimentos estéricos no podrían estar unidos a la vez, o bien puede aumentar la interacción de varios TFs cercanos (58). Este tipo de rSNPs que varían la topología del DNA son menos comunes, aunque quizás no se han detectado muchos por lo complejo de su identificación y caracterización.

Cuando un rSNP está situado en la región 3'UTR de un gen afectando a la afinidad con la que se une un miRNA a su secuencia diana se le conoce como miRSNP. Los miRNAs se unen a su secuencia diana en la región 3'UTR de un gen con las primeras 6-8 bases de su extremo 5'. De manera que cuando existe un SNP funcional en una secuencia diana de una región 3'UTR, ese miRSNP puede crear o destruir un sitio de unión para un miRNA o modificar, como en la mayoría de los casos, la afinidad en la unión. Cuando sucede esto, el miRNA verá alterada su función como regulador del gen en el que se encuentra el miRSNP, bien sobre la inhibición de la traducción de la proteína o bien sobre la degradación del mRNA (62, 68, 69) (Fig.16).

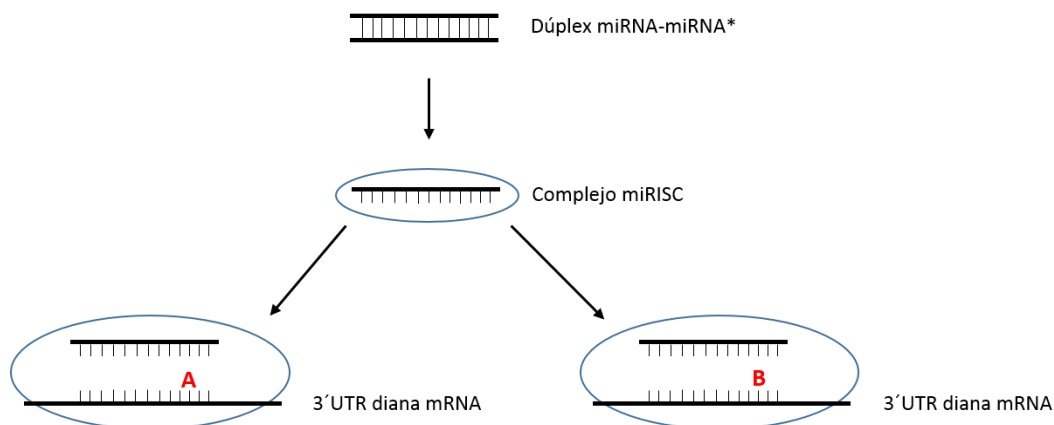


Fig.16. Localización de los miRSNPs en los sitios de unión de miRNAs en regiones 3'UTR diana de un mRNA. Un miRSNP (en rojo) localizado en una secuencia 3'UTR puede afectar a la creación o destrucción de un sitio de unión para un miRNA, o al cambio de afinidad con la que éste se une a la región. Esto puede conllevar la alteración de la función reguladora del miRNA sobre la inhibición de la traducción o sobre la degradación del mRNA diana.

El hecho de que haya una mayor abundancia de SNPs en zonas reguladoras que en zonas codificantes del genoma se ha asociado con un efecto evolutivo sobre la regulación de la expresión. Basándose en esto, algunos autores han formulado la hipótesis de que las variaciones en el nivel de expresión de los genes son las responsables de la complejidad y la variedad en los fenotipos humanos. En consecuencia, los rSNPs podrían ser la principal fuente de variabilidad humana (49, 58, 70). Además, los cambios en los niveles de mRNA

debido a los rSNPs suelen ser de pequeña magnitud, entre 1,5 y 2 veces entre los diferentes alelos, lo que no supone una alteración brusca e inmediata del fenotipo. Una de las mayores pruebas de la importancia de los rSNPs es el hecho de que existen numerosos cambios entre las secuencias reguladoras de especies muy próximas evolutivamente (71), lo que apoya la hipótesis de que los rSNPs podrían ser uno de los principales mecanismos implicados en la divergencia evolutiva.

1.3. miRNAs

Los microRNAs o miRNAs, como suele nombrárseles abreviadamente, son pequeños RNAs no codificantes de entre 21 y 25 nt, similares estructuralmente a otros RNAs no codificantes como los piRNAs y los siRNAs, cuya función es la regulación postranscripcional de la expresión génica (72, 73). El primer miRNA en ser aislado fue Lin-4 (74), descubierto en 1993 por Lee y cols en el organismo *C.elegans*, siendo la función de este pequeño RNA no codificante la regulación negativa de los niveles de la proteína Lin-14. No fue hasta siete años más tarde cuando Reinhart y cols descubrieron el segundo de estos pequeños RNAs no codificantes, let-7 (75), también en *C.elegans*, cuyo estudio demostró por primera vez la existencia de varias dianas para un mismo miRNA. En el periodo comprendido entre estos primeros hallazgos y la actualidad se han descubierto más de 10000 miRNAs en virus, hongos, plantas y metazoos, de los cuales más de 1000 son humanos (3, 73, 76).

El origen de los miRNAs puede encontrarse bien en genes independientes que han sido transcritos por la RNA polimerasa II o III, o bien en intrones de genes que codifican proteínas. La transcripción de dichos genes o intrones da lugar a un transcrito primario denominado pri-miRNA, el cual, tras una serie de procesos, da lugar al miRNA maduro y activo (3, 72).

Los miRNAs actúan regulando negativamente la expresión génica mediante la unión a regiones complementarias de sus dianas, principalmente en regiones 3'UTR, si bien también pueden unirse en algunos casos a regiones 5'UTR y ORFs (73). La región semilla del miRNA, situada en su región 5' y que comprende del segundo al séptimo nucleótido, se une a la secuencia 3'UTR del gen diana en función de la complementariedad de las

bases. Una vez que se ha unido el miRNA a la secuencia de la región 3'UTR regula negativamente la expresión génica de su diana de dos maneras diferentes: bien inhibiendo la traducción del mRNA a proteína, o bien degradando el mRNA (3, 77). Tanto el proceso de biogénesis de los miRNAs como su mecanismo de acción se describirán en profundidad posteriormente.

La nomenclatura de los miRNAs sigue una serie de pautas a la hora de asignar un nombre sistemático a cada uno de ellos. Todos ellos comienzan con tres letras que hacen referencia a la especie; por ejemplo: hsa en el caso de humanos y mmu en el caso de ratón. A continuación, se añaden las letras miR seguido de un guión y un número, el cual es asignado en cada especie secuencialmente por orden de descubrimiento. Hay excepciones, ya que en el caso de encontrarse un miRNA idéntico en otra especie se tiende a conservar el nombre del que se descubrió antes. Cuando distintas secuencias precursoras y distintos *loci* dan lugar a miRNAs con idéntica secuencia se les nombra con un 1 o un 2 tras el número; por ejemplo: miR-121-1 y miR-121-2. Si la secuencia de dos miRNAs no es idéntica pero sí muy parecida y ambos provienen de genes diferentes, se les nombra con una letra a o b; por ejemplo: miR-148a y miR-148b. En ocasiones dos miRNAs provienen de un mismo precursor por lo que en su nomenclatura se tienen en cuenta dos cuestiones para nombrarlos. Si uno de ellos es mucho menos abundante que el otro se le añade un asterisco para diferenciarlo; por ejemplo: miR-56*. O bien, se les puede identificar en función de su origen en la parte 5' del precursor o en la parte 3'; por ejemplo: miR-148a-5p y miR-148a-3p. Hay que tener en cuenta ciertas excepciones en la nomenclatura de los miRNAs, puesto que los anteriormente mencionados lin-4 y let-7 no siguen estas pautas y los nombres en plantas suelen empezar con las letras en mayúsculas; por ejemplo: MIR168 (78).

La importancia biológica de los miRNAs como reguladores postranscripcionales queda de manifiesto al comprobar el alto número de genes diana y la elevada conservación, tanto en las secuencias de los propios miRNAs como en las secuencias diana de las regiones 3'UTR de los genes, entre distintas especies de mamíferos incluidos los humanos (4). Tal es así, que aproximadamente uno de cada tres genes que codifican proteínas en humanos tienen conservadas las secuencias dianas de miRNAs en regiones 3'UTR en varias especies animales (4, 79). La abundancia de genes diana de miRNAs hace

que estén involucrados en la mayoría de procesos biológicos: proliferación, diferenciación, desarrollo, metabolismo... Dentro de la fisiología humana, la regulación anómala y la expresión aberrante de los miRNAs juegan un importante papel en el desarrollo de multitud de patologías. Esto ha puesto el foco investigador en estas moléculas para abordar el estudio de dichas enfermedades, bien como posibles dianas terapéuticas, bien como biomarcadores de las patologías mediante su detección en el suero (3, 80). Entre las patologías en las que se han hallado anomalías en la expresión o en la regulación de miRNAs se encuentran el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas, las enfermedades cardiovasculares y los trastornos metabólicos como la DMT1 y DMT2 (3, 81).

1.3.1. BIOGÉNESIS DE LOS miRNAs

La biogénesis de los miRNAs es un proceso complejo que tiene lugar en el núcleo y el citoplasma para transformar el primer producto de la transcripción en un miRNA maduro y activo. En un primer paso los miRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II o III si están localizados en regiones intergénicas o exclusivamente por la RNA polimerasa II como parte de un pre-mRNA si se trata de un miRNA localizado en un intrón (3, 72, 77, 82). Este primer transcrito formado por bucles, denominado pri-miRNA, es recubierto y poliadenilado, y posteriormente cortado en una reacción catalizada por una ribonucleasa de la familia RNasa III, Drosha (Dcl1 en el caso de plantas). Para catalizar la reacción de escisión Drosha necesita un cofactor con dos dominios de unión dsRBD, DGCR8, para formar así el complejo microprocesador que formará el precursor de miRNA ya cortado, el cual se denomina pre-miRNA. Sin embargo, en los casos en los que el miRNA procede del transcrito de un intrón, la formación del pre-miRNA no sucede de esta manera sino que se usa el *splicing* del pri-miRNA para liberar la región intrónica que es idéntica a la estructura del pre-miRNA (72, 77).

El segundo paso del procesamiento de los miRNAs consiste en la escisión del bucle terminal del pre-miRNA para formar un dúplex de miRNAs maduros de entre 21 y 25 pb, dependiendo del miRNA (3, 72, 77). Esta reacción es catalizada en el núcleo por la enzima Dcl1 en el caso de las plantas, mientras que en animales la reacción se lleva a cabo en el citoplasma con la catálisis de la ribonucleasa III DICER junto a la proteína TRBP, previa

exportación del pre-miRNA desde el núcleo por una proteína de la familia de las exportinas, generalmente XPO5 (3, 72, 77, 82, 83).

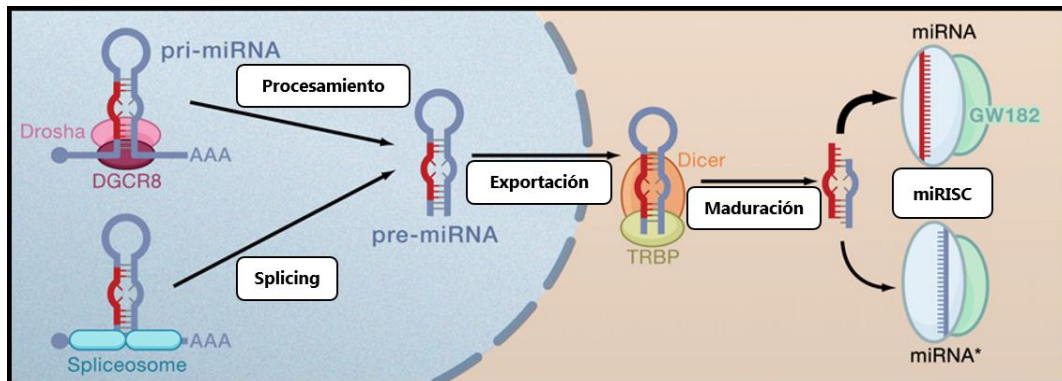


Fig.I7. Biogénesis de miRNAs en mamíferos. En un primer paso en el núcleo, el transcrito del miRNA denominado pri-miRNA es procesado bien por Drosha, o bien por *splicing* o ajuste, para formar el pre-miRNA. El pre-miRNA es exportado por una proteína exportina al citoplasma, donde la enzima DICER escinde el miRNA para dar lugar a un dúplex de miRNA. A este dúplex unido al complejo formado por DICER y TRBP se unen las proteínas AGO y GW182 para formar, con cada uno de los dos miRNAs maduros, el complejo de silenciamiento miRISC. Pese a que los dos miRNAs maduros del dúplex pueden unirse a la proteína AGO de manera estable, una de ellas se unirá con mayor afinidad. Figura adaptada de (77).

Una vez formado el dúplex de miRNA, la proteína AGO se une rápidamente al complejo formado por esta doble hebra unida a las proteínas DICER y TRBP, con el fin de escindir el dúplex. En mamíferos este complejo proteico AGO2/DICER1 está asociado a las proteínas GEMIN3, GEMIN4, MOV10 e IPO8. A este complejo proteico de unión al dúplex de miRNA se le une por último la proteína GW182 para formar el complejo de silenciamiento de la expresión, llamado miRISC (3, 72, 77). Pese a que las dos hebras del dúplex pueden unirse a la proteína AGO2 de manera estable para formar el complejo de silenciamiento miRISC, en ocasiones una de ellas se unirá con mayor afinidad para formar el miRISC. Como se ha dicho anteriormente, a la hebra más afín del dúplex se la denomina con el nombre del miRNA (sin asterisco), mientras que la menos afín lleva un asterisco detrás del nombre, miRNA* (77). En la figura I7 se detalla el proceso de biogénesis de los miRNAs.

1.3.2. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS miRNAs Y REGULACIÓN DE REGIONES 3'UTR

El miRNA maduro actúa como un adaptador específico del complejo miRISC al mRNA diana para realizar su función como regulador postranscripcional (3, 72, 77). Como se ha comentado anteriormente, la unión del miRNA al mRNA ocurre generalmente en regiones

3'UTR mediante apareamiento complementario de bases con la región semilla del miRNA, del segundo al séptimo nucleótido de su región 5'.

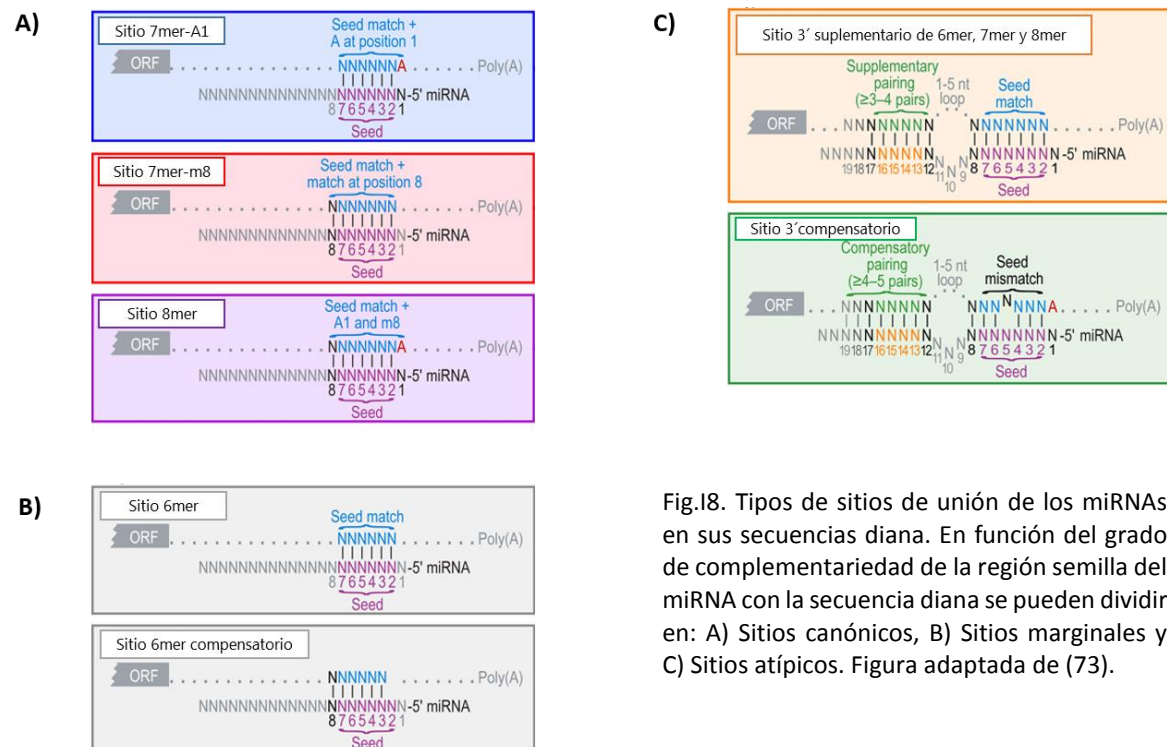


Fig.I8. Tipos de sitios de unión de los miRNAs en sus secuencias diana. En función del grado de complementariedad de la región semilla del miRNA con la secuencia diana se pueden dividir en: A) Sitios canónicos, B) Sitios marginales y C) Sitios atípicos. Figura adaptada de (73).

En función del grado de complementariedad de la región semilla con su secuencia diana, las uniones miRNA-mRNA son más o menos estables y los sitios de unión localizados en esas secuencias se clasifican en tres grupos (4, 73):

- **Sitios canónicos:** Por orden de complementariedad: 8mer, del nucleótido 2 al 8 de la región semilla son complementarios con la secuencia diana seguida de un adenina. 7mer-m8, del nucleótido 2 al 8 de la región semilla son complementarios con la secuencia diana. 7mer-A1, del nucleótido 2 al 7 de la región semilla son complementarios con la secuencia diana seguida de una adenina (Fig.I8A).
- **Sitios marginales:** 6mer, del nucleótido 2 al 7 de la región semilla son complementarios con la secuencia diana. 6mer offset, del nucleótido 3 al 8 son complementarios con la secuencia diana, estando el nucleótido 8 fuera de la región semilla del miRNA en este caso (Fig.I8B).
- **Sitios atípicos:** 3' suplementario, cuando a un sitio canónico o marginal se le suma un sitio en la región 3'UTR para la unión de varios nucleótidos del 13 al 16 en la

región 3' del miRNA. 3' compensatorio, cuando a un sitio sin mucha complementariedad se le suma un sitio de unión compensatorio para los nucleótidos del 13 al 16 del miRNA (Fig.18C).

Herramientas bioinformáticas como *miRBase* y *TargetScan* ayudan a predecir el grado de complementariedad de los miRNAs con las regiones 3'UTR de los genes, definiendo el tipo de unión predicho en las secuencias diana.

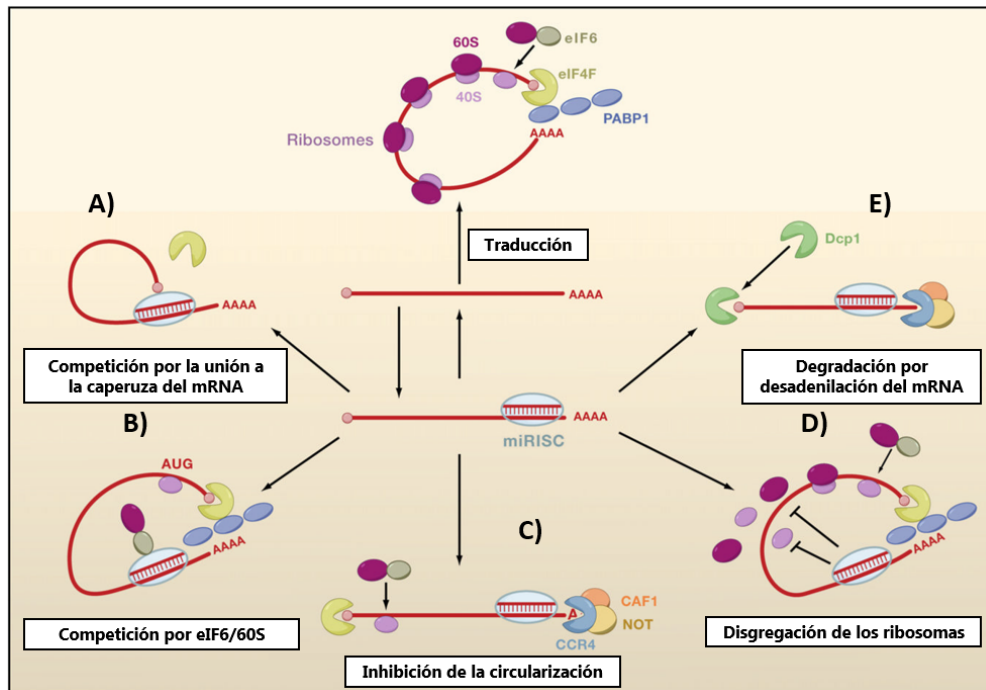


Fig.19. Mecanismos de inhibición por miRNAs. A) Competición del miRISC por la unión a la caperuza del mRNA. B) Competición por la unión a la subunidad 60S ribosomal. C) Desadenilación e inhibición de la circularización del mRNA. D) Represión de la traducción por la disgregación prematura de los ribosomas. E) Degradación del mRNA por desadenilación y desenvoltura de la caperuza. Figura adaptada de (77).

El grado de complementariedad miRNA-mRNA es fundamental para llevar a cabo la función de regulación postranscripcional por parte del complejo miRISC. Una vez dicho complejo se ha unido específicamente al mRNA, puede inhibir la expresión de su diana por degradación del mRNA o por represión de la traducción (72, 73, 77). La degradación del mRNA se puede producir por desadenilación, desenvoltura de la capa que rodea al mRNA o por digestión exonucleolítica del mRNA. Cuando la regulación del miRNA ocurre por represión en la traducción puede darse también de varias maneras. En uno de los modelos de represión de la traducción, AGO2 compite con el factor de iniciación de la traducción eIF4E por la unión a la caperuza del mRNA diana. En otro modelo de represión,

ésta se produce por la desadenilación del mRNA, lo que provoca que PABP1 no pueda unirse a la caperuza del mRNA, inhibiéndose así su circularización. Otro modelo inhibitorio de la traducción consiste en la disgregación de los ribosomas, y en el último modelo de represión de la traducción, el complejo miRISC impide la unión de la subunidad 60S del ribosoma con la subunidad 40S, mediante la unión competitiva al complejo eIF6/60S, lo que impide la actividad traductora ribosomal. Algunos estudios plantean que los dos tipos de acción de los miRNAs, por degradación del mRNA y por represión de la traducción son compatibles y acoplados, si bien existen casos en los que uno de los dos tipos prevalece sobre el otro, lo que puede deberse a la situación espacial concreta de la secuencia diana donde se une el miRNA (73, 77). En la figura I9 se muestran los distintos mecanismos de inhibición de los miRNAs.

1.4. OBESIDAD

La obesidad se define como una enfermedad de origen multifactorial caracterizada por una acumulación anormal o excesiva de grasa corporal. Para determinar si una persona está obesa o tiene sobrepeso se utiliza la medida del Índice de Masa Corporal (IMC), que se obtiene del cálculo del peso del individuo (Kg) dividido entre su altura al cuadrado (m^2). La OMS clasifica a los individuos con un IMC entre 25-29,9 Kg/ m^2 como población con sobrepeso, y a los que superan los 30 Kg/ m^2 como individuos obesos. Cabe señalar que también se tienen en cuenta otros parámetros como la circunferencia abdominal y la relación cintura-cadera para determinar si una persona padece obesidad, debido a que el IMC no tiene en cuenta la proporción de tejido adiposo respecto a tejidos de otro origen (84).

Según una nota de prensa de la OMS publicada en enero de 2015 la prevalencia de la obesidad en el mundo se había duplicado en los últimos 35 años. En el año 2014 más de 1900 millones de adultos en el mundo tenían sobrepeso, de los cuales más de 600 millones eran obesos. Además, actualmente la mayoría de la población mundial vive en países donde el sobrepeso y la obesidad se cobran más vidas de personas que la insuficiencia ponderal (85). En la figura I10 se muestra un mapa mundial con la prevalencia de la obesidad.

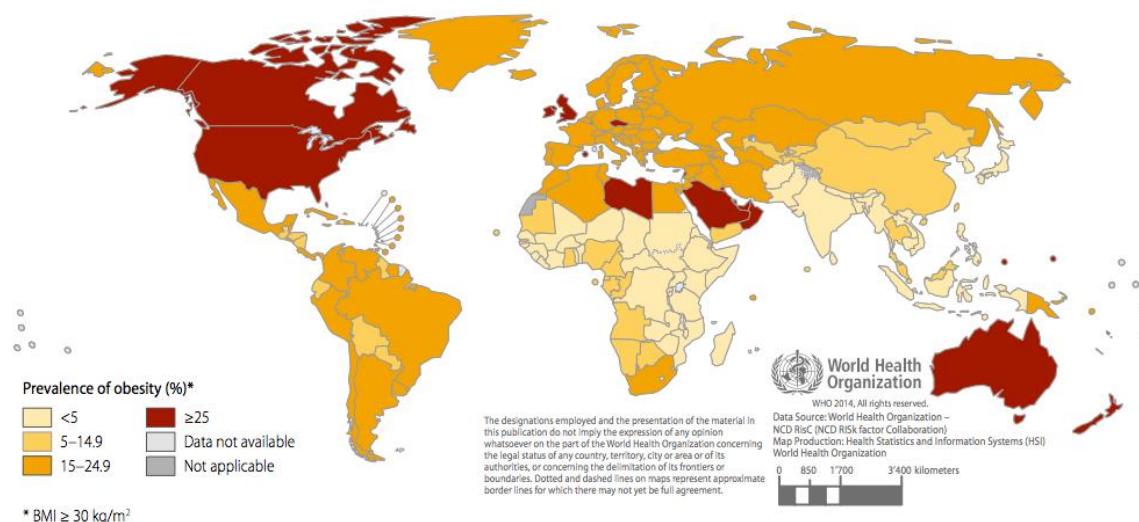


Fig.110. Mapa mundial que muestra la prevalencia de la obesidad en la población por países en el año 2014. A la izquierda se muestran por colores los distintos porcentajes de prevalencia de la obesidad ($\text{IMC} \geq 30 \text{ Kg/m}^2$). Imagen extraída de la página web de la OMS.

Los datos de un estudio sobre la evolución del sobrepeso y la obesidad en Estados Unidos desde el año 1999 al 2004, demostraron el aumento en la prevalencia de la obesidad en el país más desarrollado del mundo. En 2004 un 32% de la población de Estados Unidos era obesa y un 5% era extremadamente obesa, siendo el IMC de esta población superior a 40 Kg/m^2 . Asimismo, en este estudio se señalaba que un 17% de niños estadounidenses tenían sobrepeso, siendo sensibles a padecer obesidad en la edad adulta (86).

Actualmente se considera que la obesidad es un factor de riesgo importante para sufrir ciertas enfermedades, que se muestran esquematizadas en la figura 111. Además de estas enfermedades, existen otras patologías inflamatorias y dislipidemias que tienen la obesidad como factor de riesgo (84). En cuanto a los niños obesos, no sufren sólo los riesgos futuros de padecer las enfermedades mencionadas relacionadas con la obesidad, sino que además sufren ya en la infancia graves problemas como dificultades respiratorias, mayor riesgo de fracturas óseas e hipertensión, además de presentar marcadores tempranos de enfermedad cardiovascular, resistencia a insulina y efectos psicológicos (87).

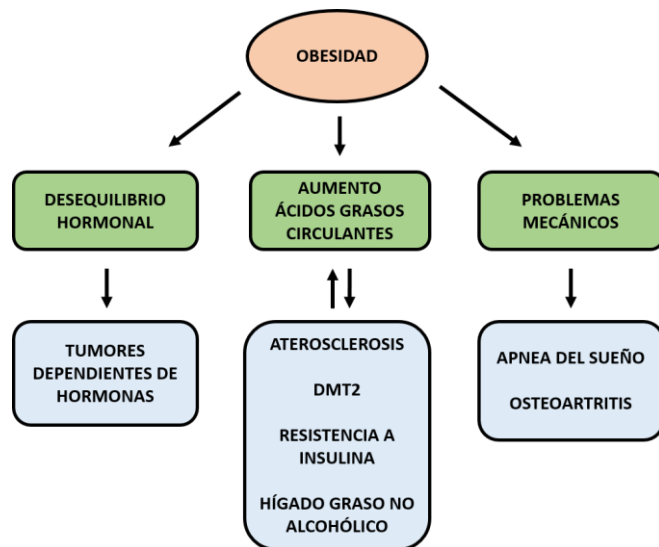


Fig.I11. Principales enfermedades asociadas a la obesidad. En color verde se muestran los efectos sobre el organismo producidos por la obesidad, y en azul las enfermedades asociadas a la obesidad. La doble flecha señala la retroalimentación entre el aumento de los niveles de ácidos grasos circulantes y algunas enfermedades.

1.4.1. FACTORES ASOCIADOS A LA OBESIDAD

La obesidad es una enfermedad multifactorial en la cual influyen tanto factores genéticos como ambientales y socioeconómicos. Es en los países desarrollados donde la prevalencia de la obesidad está aumentando de manera dramática en las últimas décadas, debido en gran parte a factores ambientales como el modo de vida sedentario, el aumento en la ingesta de comida y la composición de la dieta (84, 88-90). Parece que la composición de la dieta tiene un mayor efecto sobre la obesidad que la ingesta; existen estudios que demuestran la importancia de una dieta equilibrada complementada con ejercicio físico en la disminución significativa del IMC en individuos obesos (91). Dentro de estos países desarrollados, el factor socioeconómico tiene una gran importancia, siendo los individuos económicamente desfavorecidos más sensibles al riesgo de padecer obesidad y sus consecuencias (92).

Los factores genéticos asociados a la susceptibilidad de padecer obesidad han ganado relevancia en las últimas décadas. Esto se debe a los resultados obtenidos en diversos estudios realizados con gemelos idénticos y niños adoptados. Estos estudios señalan que las diferencias genéticas de una población podrían determinar qué individuos serían potencialmente obesos en unas condiciones ambientales determinadas (84, 93, 94). Hay casi unanimidad en la comunidad científica al señalar que el balance energético y el peso corporal son fenómenos regulados, si bien todavía se desconoce mucho sobre los mecanismos que dirigen la ingesta, la actividad física y el metabolismo. Diversos

estudios han destacado el carácter poligénico de la obesidad, asociando distintos grupos de genes al riesgo de padecer esta enfermedad. El efecto de estos genes abarca desde la composición de la grasa corporal, su distribución anatómica, la ingesta, el gasto energético o el tránsito y reparto de nutrientes entre el tejido muscular y adiposo (84, 95). La acumulación de pequeños cambios en la expresión de estos grupos de genes asociados a la obesidad, actúa sobre la expresión y la actividad génica provocando cambios fenotípicos en la población. Los responsables principales de estos cambios son los polimorfismos de una sola base o SNPs (96, 97).

Pese al carácter poligénico de la obesidad, se han descrito varios genes capaces de inducir obesidad de origen monogénico (94). Cabe destacar las obesidades producidas por mutaciones de genes pertenecientes a la ruta leptina-melanocortina, que integra las señales hipotalámicas responsables de regular el apetito y la saciedad (98). Los genes más estudiados son: leptina (*LEP*) y su receptor (*LEPR*) (98, 99) y el receptor 4 de melanocortina (*MC4R*) (98, 100). De hecho, dos modelos de ratón ampliamente utilizados en el estudio de la obesidad, *ob/ob* y *db/db*, que tienen noqueada la expresión de la leptina y su receptor respectivamente, tienen como característica fundamental la obesidad y una alta hiperinsulinemia en los animales (101). Además de las obesidades producidas por las mutaciones en los genes de la ruta leptina-melanocortina, y de mayor importancia si cabe, hay que destacar la obesidad monogénica producida por mutaciones en el gen *Fat mass and obesity associated protein* (*FTO*) (102, 103). Como ejemplo para demostrar su importancia, un SNP asociado a IMC situado en el primer intrón de este gen, rs9939609, produce una media de aumento de peso de 3 Kg en los individuos homocigotos para el alelo de riesgo respecto a los que tienen el otro alelo (104).

Los factores ambientales y genéticos que afectan al riesgo de padecer obesidad tienen una diferencia importante entre sí. Los primeros actúan de forma directa sobre el balance ingesta/gasto energético, de manera que producirán obesidad si el individuo tiene un superávit energético en dicho balance. En cambio, los segundos pueden afectar tanto a este balance como directamente al IMC y a la distribución de grasa en el individuo. En la figura I12 están resumidos los factores que aumentan el riesgo de sufrir obesidad, así como la manera en que producen este aumento.

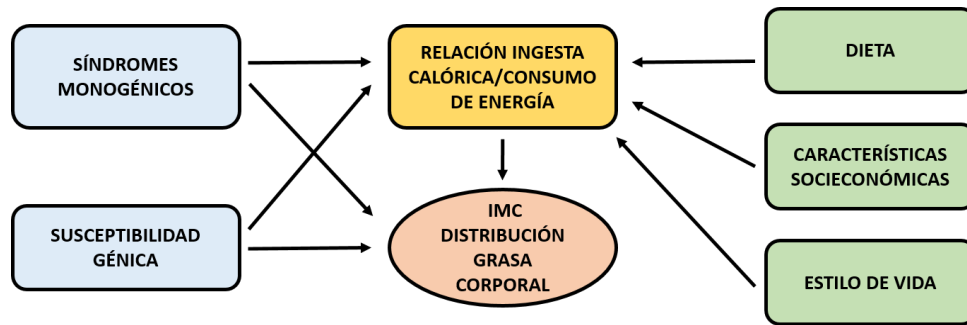


Fig.112. Esquema de los distintos factores asociados al desarrollo de la obesidad. En azul se presentan los factores genéticos y en verde los factores ambientales. Se señala también si la relación de cada factor es directa o indirecta con el IMC y la distribución de grasa corporal. Figura adaptada de (84, 95).

1.4.2. EL TEJIDO ADIPOSO Y EL PAPEL DE LA ADIPOGÉNESIS EN LA OBESIDAD

El tejido adiposo es un órgano complejo con una alta actividad metabólica y endocrina. Está compuesto por adipocitos maduros predominantemente y otros tipos celulares de la denominada Fracción Estromo-Vascular (SVF) tales como células madre mesenquimales (MSC), preadipocitos, fibroblastos, células endoteliales vasculares y células del sistema inmune como los macrófagos. Todos estos componentes celulares del tejido adiposo funcionan como un único órgano con varias funciones como la regulación de la temperatura corporal, el almacenamiento de lípidos y la homeostasis energética. Además el tejido adiposo también sirve para proteger órganos sensibles en respuesta a un estrés mecánico (105, 106).

Existen dos tipos de tejido adiposo: tejido adiposo marrón y tejido adiposo blanco, los cuales presentan diferencias entre sí en cuanto a la morfología de los adipocitos que los componen mayoritariamente, las funciones fisiológicas de ambos tejidos, su localización y el origen de sus adipocitos (105, 106).

El tejido adiposo marrón tiene como componente principal los adipocitos marrones. Estos son típicamente elipsoides, tienen múltiples vesículas lipídicas (multiloculares) y poseen un gran número de mitocondrias que expresan el transportador de protones UCP1, específico de este tipo de adipocitos. El tejido adiposo marrón tiene como función principal la termogénesis, proceso mediado por UCP1. Este transportador localizado en la membrana interna mitocondrial, desacopla la cadena transportadora de electrones de la producción de ATP permitiendo la disipación de la energía en forma de calor (105-107).

Los neonatos poseen una gran cantidad de tejido adiposo marrón, presumiblemente para proporcionar calor en los momentos posteriores al nacimiento. Los niños también poseen una considerable cantidad de este tejido, que se pierde a medida que avanzan los años, de manera que sólo se puede encontrar en pequeñas cantidades en individuos adultos en la región espinal y supraclavicular (106, 108). Por último, estos adipocitos presentes en el tejido marrón presentan diferencias también en cuanto al origen respecto a los adipocitos blancos; provienen de células precursoras mesenquimales que expresan el factor MYF5 (105, 109). El hecho de poseer una alta cantidad de tejido adiposo marrón está asociado con la protección contra la obesidad, debido a que este tejido es capaz de consumir gran cantidad de TG en el proceso de termogénesis (107, 110).

Se ha demostrado la existencia de un tipo celular similar a los adipocitos marrones, denominado adipocitos *beige*, presentes en depósitos de tejido adiposo blanco. Se ha sugerido que estas células pueden estar programadas para ser bifuncionales, bien almacenando energía en ausencia de estímulos termogénicos o bien liberando calor cuando existe ese estímulo. El origen de los adipocitos *beige* dentro del tejido adiposo blanco parece estar en la conversión de adipocitos blancos en este tipo celular en respuesta a una estimulación β 3-adrenérgica, una inducción crónica del factor de transcripción PPAR γ o la exposición al frío. En este proceso de conversión tiene un papel determinante el factor de transcripción PRDM16 (105, 106, 110).

El segundo tipo de tejido adiposo, el tejido adiposo blanco, está formado mayoritariamente por los denominados adipocitos blancos. Estos tienen una morfología generalmente esférica y están formados por una grande y única vesícula lipídica (uniloculares) que ocupa casi la totalidad de la célula, con el núcleo comprimido entre la membrana plasmática y el resto de orgánulos dispersos por todo el citoplasma. Las funciones del tejido adiposo blanco, además de la protección del organismo frente al estrés mecánico, son el almacenamiento de lípidos y la homeostasis energética, actuando como un órgano endocrino. En momentos posteriores a la ingesta capta la glucosa a través del receptor GLUT4 por un estímulo dependiente de insulina y almacena la energía en forma de TG en su vesícula lipídica. Posteriormente, en momentos de ayuno, libera en la circulación esa energía en forma de FA mediante la lipólisis de los triglicéridos (105, 106). Además el tejido adiposo blanco, en su función de órgano paracrino y endocrino, secreta

proteínas como la leptina y la adiponectina que llevan a cabo sus efectos metabólicos, neuroendocrinos e inmunológicos en el propio tejido adiposo o en otros órganos. También sintetiza enzimas implicadas en el metabolismo de hormonas esteroideas (111). En cuanto al origen de los adipocitos blancos, estos provienen de MSC pluripotentes, que con los estímulos adecuados derivan en preadipocitos comprometidos. Posteriormente, los preadipocitos se diferencian a adipocitos blancos maduros, proceso denominado diferenciación de adipocitos o diferenciación terminal, del cual se hablará más adelante con detenimiento (112). En la figura I13 se muestran las diferencias entre los adipocitos blancos y marrones.

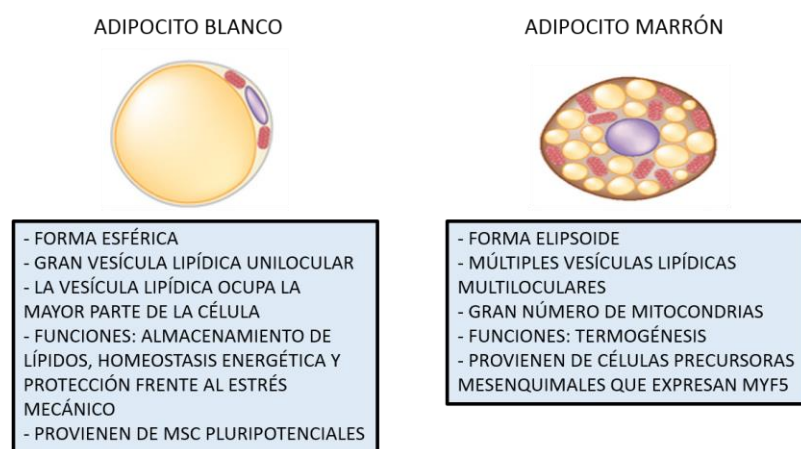


Fig.I13. Diferencias entre adipocitos blancos y marrones.

En función de su localización en el organismo, el tejido adiposo blanco puede clasificarse generalmente en subcutáneo o visceral. Los depósitos de tejido subcutáneo pueden encontrarse bajo la piel en las regiones abdominal, gluteal y femoral; mientras que los depósitos más importantes de tejido visceral están en la región omental, mesentérica y retroperitoneal (106, 113).

Estos dos tipos de tejido adiposo blanco presentan diferencias en algunos aspectos además de su localización. Algunas regiones de tejido adiposo subcutáneo parecen ser protectoras a nivel metabólico, inmunológico y mecánico, siendo tejidos especializados en almacenar reservas energéticas a largo plazo y actuando como secuestrador de potenciales FFA lipotóxicos. La disfuncionalidad del tejido adiposo subcutáneo está asociada con un aumento en la masa de tejido adiposo visceral, la inflamación y la lipotoxicidad. Ambos tipos de tejido adiposo, subcutáneo y visceral, se ven ampliados con la ingesta de nutrientes; sin embargo los depósitos viscerales aumentan rápidamente

mientras que los subcutáneos lo hacen de una manera más escalonada. En individuos con un IMC normal o con ligero sobrepeso, el exceso de tejido visceral está asociado a la resistencia a insulina, mientras que en individuos obesos con un exceso de este tipo de tejido no existe una asociación independiente fiable de la masa de grasa visceral con la resistencia a insulina. Además, el aumento en los depósitos de tejido adiposo visceral está asociado al riesgo de padecer diabetes, dislipidemias, hipertensión, aterosclerosis y algunos tipos de cáncer (113, 114).

Cuando la ingesta de calorías en un individuo es superior al gasto energético se promueve la hipertrofia y la hiperplasia del tejido adiposo blanco. La hipertrofia consiste en el aumento de tamaño de los adipocitos a causa de un incremento en el almacenamiento de TG, mientras que se denomina hiperplasia al aumento del número de adipocitos en el tejido adiposo mediante el proceso biológico de la adipogénesis (112). Este proceso comienza con el compromiso a preadipocitos de las MSC existentes en la SVF del tejido adiposo. Tras esto, los preadipocitos se someten a múltiples mitosis, en un paso conocido como expansión clonal mitótica y por último se diferencian a adipocitos maduros (105, 112). El número en la población de adipocitos aumenta durante la infancia y la adolescencia, permaneciendo constante cuando el individuo llega a la edad adulta. Aproximadamente un 10% de los adipocitos son renovados anualmente en individuos adultos (115, 116). La adipogénesis es un proceso complejo regulado en todos sus pasos por diferentes proteínas y miRNAs, por lo que se hablará sobre él con detenimiento en el siguiente apartado de esta introducción.

Existe una relación estrecha entre la obesidad y la diferenciación de adipocitos. Debido a que la hiperplasia es menos común en individuos adultos que en niños y adolescentes, la obesidad en la edad adulta está más estrechamente relacionada con la hipertrofia de los adipocitos. Cuando la obesidad es causada por la hipertrofia, ésta suele estar más asociada con la resistencia a insulina y otros trastornos metabólicos. En cambio, cuando la obesidad es debida a la hiperplasia, lo que es menos habitual en individuos adultos, se puede hablar de obesos metabólicamente normales (116, 117). Se ha demostrado que la capacidad de diferenciación de los preadipocitos se ve disminuida con la obesidad causada por la hipertrofia, y además es inversamente proporcional al IMC y al tamaño de los adipocitos. Esta correlación negativa entre diferenciación e IMC puede ser

debida a un descenso en el número de preadipocitos o a una disminución en su capacidad de diferenciación (116, 118-120).

En individuos adultos con una dieta prolongada altamente calórica, los adipocitos se hipertrofian aumentando su tamaño en respuesta a la necesidad de almacenar grandes cantidades de energía en forma de TG, lo que conlleva padecer obesidad hipertrófica. Estos adipocitos hipertrofiados tienen graves disfunciones que afectan a su metabolismo y a la diferenciación de preadipocitos localizados en el tejido adiposo. Segregan gran cantidad de citoquinas proinflamatorias como MCP-1 y $\text{TNF}\alpha$ que provocan la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo y una respuesta inflamatoria (116, 118, 121). De hecho, la población de macrófagos en el tejido adiposo puede pasar de un 10% del total de células en el tejido de individuos con IMC normal al 50% de la población en individuos obesos (122).

A nivel del metabolismo de los adipocitos, los altos niveles de $\text{TNF}\alpha$ provocan un descenso en la esterificación de FA y un aumento de la lipólisis. Los niveles de GLUT4, LPL y $\text{PPAR}\gamma$ se ven reducidos, lo que conlleva un descenso en el transporte de glucosa y en la esterificación de FA. Además, $\text{TNF}\alpha$ estimula la lipólisis incrementando los niveles de cAMP, activando la lipasa LIPE y disminuyendo los niveles de perilipina a través de la activación de la ruta MAPK. Los altos niveles de $\text{TNF}\alpha$ secretados en los adipocitos de individuos obesos también afectan a la adipogénesis, inhibiéndola mediante la regulación negativa de dos TF imprescindibles en este proceso de diferenciación, $\text{PPAR}\gamma$ y $\text{C/EBP}\alpha$ (118, 121, 123).

Por lo tanto, en un estado de obesidad los preadipocitos ven disminuida su capacidad de diferenciarse y los adipocitos se hipertrofian, inhibiéndose así su capacidad de almacenar TG, aumentando la lipólisis y la liberación de FA a la circulación. Además hay que tener en cuenta que una ingesta calórica produce un aumento de la síntesis de partículas VLDL por el hígado y un aumento de la síntesis de ácidos grasos. La suma de todas estas situaciones puede provocar la acumulación ectópica de lípidos en otros órganos como el hígado y el músculo esquelético, aumentando considerablemente el riesgo de padecer resistencia a insulina, DMT2, NAFLD (Hígado graso no alcohólico) y aterosclerosis (116, 121).

En conclusión, existe una gran asociación entre la obesidad y sus enfermedades derivadas, con las disfunciones del tejido adiposo y la disminución en la capacidad de diferenciación de adipocitos. Desde este punto de vista, es interesante el estudio de la adipogénesis y las estrategias encaminadas a mejorar los niveles de diferenciación de adipocitos para tratar la obesidad hipertrófica y las enfermedades que provoca.

1.5. ADIPOGÉNESIS

Las MSC, presentes en la fracción estromo-vascular del tejido adiposo, tienen la capacidad de comprometerse para posteriormente diferenciarse a adipocitos, miocitos, osteocitos y condrocitos (112, 124). Cuando estas células mesenquimales reciben los estímulos apropiados, se produce la primera fase de la adipogénesis que se denomina compromiso, un proceso por el cual las células mesenquimales progenitoras se convierten en preadipocitos restringidos ya al linaje adipocítico. La segunda y última fase denominada de diferenciación terminal o diferenciación de adipocitos es el proceso por el cual los preadipocitos se convierten en adipocitos maduros. Esta fase empieza con una expansión clonal, proceso en el cual los preadipocitos comprometidos y parados en fase G1 vuelven a entrar en el ciclo celular y se someten a dos rondas de división celular aproximadamente, tras lo cual los preadipocitos se diferencian finalmente a adipocitos maduros (112). La adipogénesis está regulada en todos sus pasos por TFs, otras proteínas y miRNAs. Es por ello que se hablará con detenimiento de cada una de las fases de la adipogénesis y su regulación a lo largo de este capítulo de la introducción.

Existen gran variedad de modelos celulares para abordar el estudio de las rutas moleculares de la adipogénesis y las funciones biológicas de los adipocitos *in vitro*. Estos modelos pueden dividirse en dos clases atendiendo a si se utilizan para estudiar el proceso de adipogénesis completo o sólo la fase de diferenciación terminal. La primera clase, para estudiar el proceso completo de adipogénesis, está formada por fibroblastos pluripotenciales que son capaces de diferenciarse a condrocitos, osteocitos y miocitos además de a adipocitos. Los más utilizados son las líneas celulares de fibroblastos C3H10T1/2, BALB/c-3T3, RCJ3.1, CHEF/18 y los cultivos celulares de MSC. La segunda clase está formada por preadipocitos tipo fibroblasto que están ya comprometidos y que se diferencian a adipocitos con un cóctel de agentes inductores en cultivo. Cabe destacar en

este grupo los preadipocitos 3T3-F422A, 1246, Ob1771, TA1, 30A5, MEFs y sobre todo la línea murina 3T3-L1, que es sin duda el modelo más utilizado para el estudio de la adipogénesis (105, 112, 125).

1.5.1. COMPROMISO

El reclutamiento de las MSC al linaje de los adipocitos es promovido por una ingesta energética y una captación de glucosa elevada. Este estado metabólico parece generar señales que inducen a las MSC a entrar en la fase de compromiso que conlleva la hiperplasia y la adquisición del fenotipo preadipocítico (112, 126). Existen varios factores que regulan, bien promoviendo o bien inhibiendo, la fase de compromiso de las MSC a preadipocitos, entre los que cabe destacar algunas proteínas pertenecientes a las familias *Bone Morphogenetic protein* (BMP), Hedgehog (Hh) y *Wingless-Type MMTV Integration site* (Wnt); así como algunos miRNAs. En las MSC tiene lugar una cascada de señalización que activa a ciertos factores que determinan el tipo celular al que son comprometidas estas células. Es el balance de estas moléculas señalizadoras el que finalmente determina el compromiso de las MSC a un linaje en concreto, inhibiendo en ocasiones la conversión a otros linajes celulares (112).

Las proteínas BMP forman una familia de factores de crecimiento que pertenecen a la superfamilia de TGF- β . Dos miembros, BMP2 y BMP4, activan positivamente el proceso de compromiso de las células pluripotenciales a preadipocitos. Se ha demostrado que la exposición del modelo celular C3H10T1/2 a BMP2 o BMP4 da lugar a que las células alcancen el fenotipo preadipocítico y que sean capaces de diferenciarse a adipocitos al tratarlas con inductores de la diferenciación (127-129). Por otro lado, el papel de BMP4 en la fase de compromiso se ha validado también en células proliferativas C3H10T1/2 por los altos niveles de expresión de genes involucrados en la ruta de señalización de BMP (128, 129), entre los que cabe destacar el propio *BMP4*, los receptores *BMPR1a* y *BMPR2*, y *SMAD1*, *SMAD5* y *SMAD8*. La unión de las proteínas BMP, como BMP4, al complejo formado por los receptores BMPR1 y BMPR2 produce la fosforilación y la activación de BMPR1 kinasa. A su vez, el receptor BMPR1 fosforila SMAD1,-5,-8, las cuales forman un complejo con SMAD4 que se trasloca al núcleo y activa la expresión génica, regulando positivamente el compromiso de las células pluripotenciales a preadipocitos (127). Se han

encontrado al menos tres genes diana de la ruta de señalización de BMPs: *LOX*, *TPT1* y *α B-Crystallin*, que aumentan su expresión cuando se sobreexpresa BMP2 o BMP4. Codifican proteínas asociadas al citoesqueleto, y su importancia en la fase del compromiso radica en la regulación positiva de la forma celular del linaje adipocítico (130).

Se han identificado tres ligandos de la ruta de señalización de Hh en vertebrados: Sonic (SHH), Indian (IHH) y Desert (DHH), que inician una cascada de señalización mediada por los receptores PTCH1 y PTCH2. En presencia de uno de estos tres ligandos, la proteína SMO es activada y la señal es transmitida vía fosforilación y traslocación nuclear de las proteínas GLI (131, 132). La ruta de señalización Hh tiene un efecto inhibitorio en la adipogénesis y activador en la osteogénesis, como se ha podido demostrar en modelos de fibroblastos pluripotenciales (133). Sin embargo no se han logrado definir con exactitud los mecanismos que unen esta ruta de señalización con la adipogénesis y la elección del linaje celular.

La proteína retinoblastoma (RB) también juega un papel importante en el compromiso de las MSC (134). RB inhibe el ciclo celular mediante la unión y represión de los miembros de la familia de activadores transcripcionales E2F, que son reguladores de la adipogénesis (135). Tras la hiperfosforilación de RB por kinasas dependientes de ciclinas, E2F es liberado y promueve la activación de genes que codifican proteínas activadoras del ciclo celular, lo cual es fundamental para que tenga lugar la expansión clonal, etapa obligada para el programa de diferenciación de adipocitos (136). Por un lado, en ciertas condiciones la proteína RB puede unirse a RUNX2 y promover la osteogénesis, mientras que por otro lado, en otras condiciones puede actuar suprimiendo la subunidad γ de PPAR, inhibiendo así la adipogénesis. Por tanto, el balance en los niveles de RB es decisivo en la elección del linaje osteocítico o adipocítico en las MSC (134, 137).

La familia Wnt está formada por diecinueve glicoproteínas que juegan un papel de gran importancia en la regulación de la proliferación y diferenciación celular incluida la adipogénesis, la migración celular y la organogénesis durante el desarrollo embrionario. Existen tres rutas de señalización de Wnt: una ruta canónica dependiente de β -Catenina y dos rutas no canónicas independientes de β -Catenina, la ruta de polaridad celular planar (PCP) y la de Wnt/ Ca^{2+} (138, 139) (Fig.114).

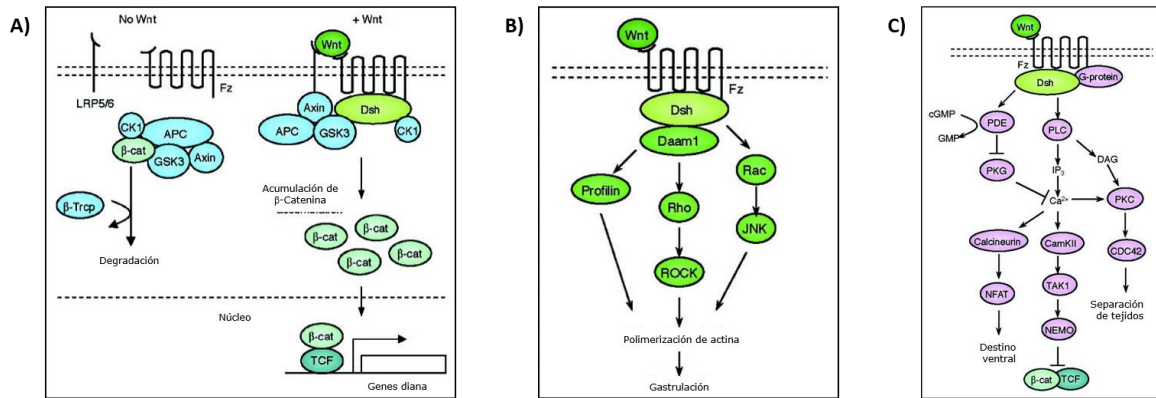


Fig.114. Representación esquemática de las distintas rutas de señalización de Wnt. A) Ruta canónica: La unión de las proteínas Wnt a los receptores FZD y los correceptores LRP5/6, tras una serie de eventos, provoca la disgregación del complejo de degradación de β -Catenina (β -cat), y la traslocación de esta proteína al núcleo donde lleva a cabo su actividad transcripcional. B) Ruta no canónica PCP (Polaridad Celular Planar): La unión de las proteínas Wnt a los receptores FZD, independientemente de LRP5/6, provoca una señal conducida a través de Dsh, que activa varias rutas que conllevan la polimerización de la actina. C) Ruta no canónica Wnt/ Ca^{2+} : Las proteínas Wnt se unen a los receptores FZD, independientemente de LRP5/6, lo que provoca una señal que induce la liberación de Ca^{2+} intracelular. Esto a su vez activa una ruta, en la que están implicadas proteínas sensibles a Ca^{2+} , que conduce a la inhibición de la actividad transcripcional de β -Catenina/TCF. Figura adaptada de (138).

La ruta de señalización canónica comienza con la unión de las proteínas Wnt al complejo receptor formado por las proteínas Frizzled (FZD) y LRP5/6. Esto conlleva, tras una serie de eventos, la disrupción del complejo APC/AXIN/GSK3 de degradación de β -Catenina, la cual tras estabilizarse y acumularse en el citoplasma, se trasloca al núcleo. Una vez allí, β -Catenina realiza sus funciones como coactivador transcripcional junto a varios TFs entre los que se encuentran TCF7L2 y LEF1, activando la transcripción de genes como *MYC*, *ciclina D1* y *AXIN2* (138, 140, 141).

En cuanto a la ruta no canónica PCP, comienza con la unión de las proteínas Wnt a los receptores FZD independientemente del correceptor LRP5/6. La señal es conducida a la proteína DSH, que activa dos rutas paralelas que activan a las pequeñas GTPsas RHO y RAC. Por un lado RHO activa a ROCK y miosina lo que conlleva la recomposición del citoesqueleto, y por otro lado RAC activa a JNK. La otra ruta no canónica, Wnt/ Ca^{2+} , comienza con la unión de algunas proteínas Wnt a los receptores FZD independientemente del correceptor LRP5/6 y la estimulación de la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplasmático. La acumulación intracelular de calcio activa algunas proteínas sensibles a Ca^{2+} como PKC y CAMKII. PKC regula la separación de tejidos durante la gastrulación mediante la regulación de CDC42, mientras que CAMKII activa dos quinasas,

TAK1 y NLK, las cuales antagonizan con la ruta canónica de Wnt mediante la inhibición de la función transcripcional de β -Catenina/TCF (138, 140, 142).

Las proteínas Wnt tienen un papel importante en las dos fases de la adipogénesis: compromiso y diferenciación terminal, si bien de la implicación en esta última fase se hablará en el siguiente capítulo. Existe controversia sobre el papel de la ruta canónica de Wnt en la fase de compromiso. Por un lado, se ha descrito que esta ruta se activa en la conversión de MSC a preadipocitos. La expresión de genes de la ruta canónica aumenta en la línea de preadipocitos A33 en fase proliferativa respecto a la línea de células mesenquimales C3H10T1/2. Entre estos genes cabe destacar los que codifican las proteínas R-Spondins 2 y 3, que son moléculas activadoras de la ruta canónica de Wnt, y los que codifican dianas de esta ruta como WISP2 (143). Por el contrario, también se ha descrito que la activación de la ruta canónica de Wnt tiene un papel fundamental en la elección del linaje de las MSC, inhibiendo el compromiso a preadipocitos (144). La sobreexpresión de WNT10B, proteína activadora de la ruta canónica, en células mesenquimales estimula la osteoblastogénesis en detrimento de la adipogénesis (145). Además, la sobreexpresión de WNT10B en mioblastos inhibe la expresión de genes adipogénicos, promoviendo también la diferenciación miogénica (146). Así pues, la ruta canónica de Wnt juega un papel fundamental en la elección del linaje celular de las MSC, pero no está claro de qué manera regula la conversión de MSC a preadipocitos.

1.5.2. DIFERENCIACIÓN DE ADIPOCITOS

Una vez que las MSC se han comprometido a preadipocitos, tiene lugar la fase final de la adipogénesis conocida como diferenciación terminal o diferenciación de adipocitos. Como se ha dicho anteriormente, el modelo más utilizado para estudiar la diferenciación es el de la línea de preadipocitos murinos 3T3-L1. Los preadipocitos proliferan hasta la parada del ciclo celular en fase G1, momento en que se induce la diferenciación con un cóctel compuesto por altas cantidades de insulina, dexametasona y un agente que aumenta los niveles de cAMP como el IBMX, todo ello en un medio de cultivo rico en suero (147). Estos tres inductores activan las rutas de señalización de IGF-1, glucocorticoides y cAMP respectivamente, lo que conlleva una serie de eventos que regulan el proceso de diferenciación. Pasado un periodo de 16 a 24 horas tras la inducción, los preadipocitos

vuelven a entrar en el ciclo celular y se someten a varias rondas de mitosis, lo que se conoce como expansión clonal. Tras esto, las células salen del ciclo celular y pierden su morfología fibroblástica, comenzando a almacenar TGs y alcanzando una morfología y un metabolismo típicamente adipocíticos (112, 147). Todo este proceso final de diferenciación está regulado por una serie de miRNAs y proteínas, entre ellas algunos TFs importantes, cuyo papel se explicará a lo largo de este capítulo de la introducción.

El proceso de diferenciación terminal sigue una serie de complejos pasos que concluyen con la conversión de los preadipocitos a adipocitos maduros. Aproximadamente cinco minutos después de la inducción de la diferenciación de los preadipocitos, tiene lugar la parada de la proliferación. La proteína CREB se fosforila en respuesta a los niveles de cAMP y activa a C/EBP β , TF que no tiene capacidad de unión a DNA en este punto. De 14 a 16 horas después de la inducción tiene lugar la transición de fase G1 del ciclo celular a fase S. En este punto C/EBP β adquiere capacidad de unión a DNA y los preadipocitos vuelven a entrar en el ciclo celular (148-150). Entre las 16 y las 24 horas después de la inducción tiene lugar la expansión clonal en la que las células se someten a dos rondas de división celular. Estos eventos están también relacionados con la expresión de histonas, la expresión coordinada de proteínas del ciclo celular (Ciclinas y kinasas CDK) y la replicación del DNA (112, 150). C/EBP β es fosforilada dos veces en los primeros pasos de la diferenciación terminal, siendo un TF fundamental para la fase de expansión clonal de los adipocitos. Una primera fosforilación es producida por MAPK a las 4 horas de la inducción y una segunda por GSK3 β a las 12-16 horas de la inducción, siendo ésta la que produce la activación del TF y su capacidad de unión al DNA (151).

Una vez terminada la expansión clonal y transcurridas de 18 a 24 horas tras la inducción de la diferenciación, C/EBP β activa la expresión de los TFs C/EBP α y PPAR γ mediante la unión directa a los elementos reguladores C/EBP de los promotores de estos genes (150, 152). Estos dos TFs son los más importantes para la diferenciación terminal de los adipocitos, siendo PPAR γ necesario y suficiente en tal proceso. Una vez expresado C/EBP α , éste es capaz de regular su expresión y la de PPAR γ , y juntos a su vez, son capaces de activar la transcripción de un gran grupo de genes que producen el fenotipo adipocítico, lo que conlleva la diferenciación terminal (152, 153). La redundancia de los TFs C/EBP β y C/EBP α en ciertos momentos de la diferenciación se puede interpretar por

la capacidad antimitótica de éste último. Una expresión temprana de C/EBP α podría producir la interrupción de la expansión clonal, y por tanto la inhibición de la diferenciación terminal (154).

El TF PPAR γ existe como tres isoformas: PPAR γ 1, PPAR γ 2 y PPAR γ 3, siendo PPAR γ 2 la isoforma más abundante en los adipocitos. Estas tres isoformas son transcritas a partir del mismo gen por *splicing* alternativo y diferentes promotores (155). Para unirse a sus regiones específicas de unión al DNA, se requiere la unión de un ligando a PPAR γ y la formación de un heterodímero con el receptor nuclear RXR. Si bien no se conoce un ligando natural, sí que existen ligandos sintéticos como las tiazolidindionas (TZD), capaces de unirse y activar a PPAR γ , lo que produce a su vez una activación de la diferenciación de adipocitos (156). PPAR γ es el regulador maestro del proceso de diferenciación de adipocitos y regula la expresión de varios genes importantes en la diferenciación y el metabolismo de los adipocitos. Entre estos genes se encuentran PCK1, que codifica la proteína del mismo nombre implicada en la gliceroneogénesis en los adipocitos, y FABP4, que codifica una proteína específica de adipocitos implicada en el transporte y metabolismo de los FA (156, 157).

Transcurridas aproximadamente 30 horas desde la inducción de la diferenciación y tras la expresión de C/EBP α y PPAR γ , se expresa SREBP1c, TF perteneciente a la familia de las proteínas SREBPs de las cuales se habló con anterioridad en esta introducción (20, 158). SREBP1c se encuentra en el retículo endoplasmático, de donde es liberado por la estimulación por insulina. A continuación, en el aparato de Golgi es sometido a un corte proteolítico que libera su región básica hélice-lazo-hélice para poder traslocarse al núcleo (159). Una vez en el núcleo activa la transcripción de genes que codifican proteínas importantes en la síntesis de FA como *FASN* y síntesis de TG como *GPAT*. Así pues, SREBP1c es importante en los pasos finales de la diferenciación, regulando genes implicados en la adquisición del fenotipo de los adipocitos y su metabolismo (158, 159). Después de la inducción de la diferenciación, pasan varios días hasta que las células alcanzan un fenotipo visible típicamente adipocítico. En la figura I15 se muestra un esquema con un cronograma de las fases iniciales de la diferenciación de adipocitos.

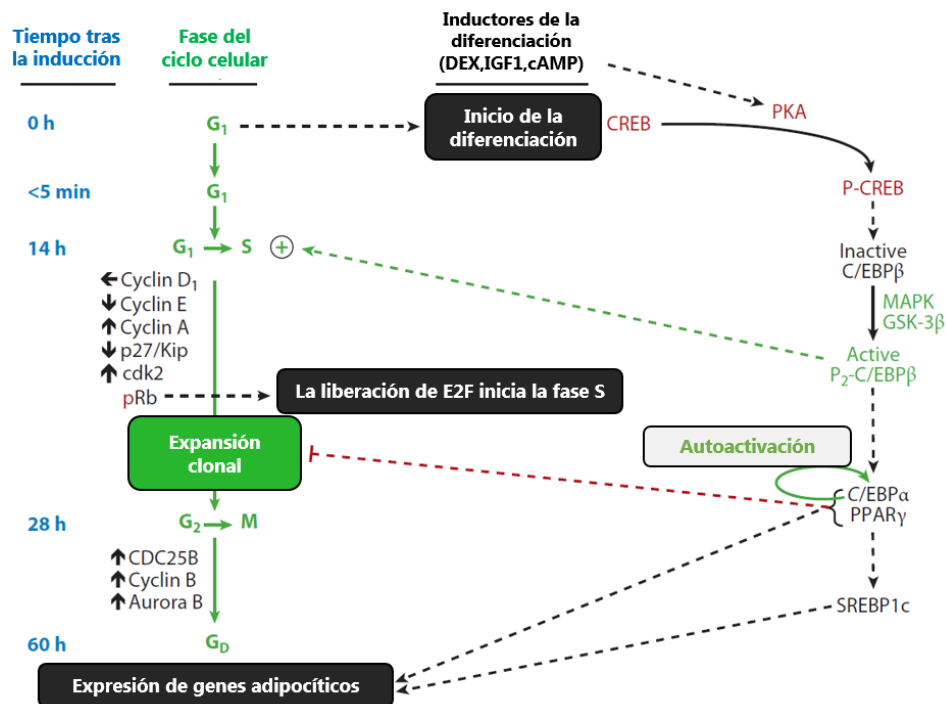


Fig.I15. Esquema con cronograma de las fases de la diferenciación de adipocitos. Con la inducción de la diferenciación se activa la kinasa PKA, la cual fosforila a CREB, que induce la expresión de C/EBPβ. Ésta se activa mediante dos fosforilaciones (llevadas a cabo por MAPK y GSK-3β) e induce la transición G1-S del ciclo celular a las 14-16 horas tras la inducción, para la posterior entrada en la expansión clonal. A las 18-24 horas tras la inducción, C/EBPβ activa a C/EBPα (el cual se autorregula) y PPARγ, que reprimen la expansión clonal, además de activar la expresión de genes importantes en el metabolismo y la diferenciación de adipocitos. A las 30 horas de la inducción se activa la expresión de SREBP1c, que a su vez regula la expresión de genes adipocíticos. Figura adaptada de (112).

Durante la diferenciación de adipocitos tiene lugar una fina regulación por parte de varias familias de proteínas: AP-1, KLF, STAT, GATA y Wnt entre otras. La familia de proteínas AP-1 está formada por un amplio grupo de TFs entre los que cabe destacar c-FOS, FRA1, FOS-B y varias proteínas JUN. Estas proteínas forman homodímeros o heterodímeros para unirse al DNA y activar la expresión de genes implicados en procesos de proliferación y diferenciación, además de tener un papel en la apoptosis (105). Dentro del papel de AP-1 en la diferenciación de adipocitos, se ha descrito que c-FOS regula la expresión de FABP4, proteína específica de adipocitos, mediante la interacción con secuencias reguladoras de su promotor (160), y que la disfunción de JUN conlleva una disminución en el desarrollo del tejido adiposo blanco en ratones (161).

Otra familia de TFs implicados en la regulación de la diferenciación de adipocitos son las proteínas *Kruppel-Like Factor* (KLF), algunas de ellas activando el proceso de

diferenciación y otras inhibiéndolo. Entre los miembros que regulan positivamente el proceso está KLF5, que actúa junto a C/EBP β en la activación del promotor de PPAR γ , siendo un TF clave para que se lleve a cabo la diferenciación de adipocitos (162). Otro miembro pro-adipogénico de la familia es KLF15, cuya expresión aumenta a medida que avanza la diferenciación, y regula positivamente la expresión del receptor de glucosa específico de adipocitos y músculo GLUT4 (163). En cuanto a los miembros de la familia que regulan negativamente la diferenciación de adipocitos se puede destacar KLF2, del que se ha descrito que su sobreexpresión en preadipocitos 3T3-L1 provoca una inhibición en los niveles de expresión de PPAR γ y una disminución en la acumulación de lípidos en estas células (164).

La familia de proteínas *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT) está formada por siete miembros de los cuales al menos tres (STAT3, STAT5A y STAT5B) tienen un papel importante en la diferenciación de adipocitos regulando positivamente el proceso. STAT3 aumenta su actividad durante la fase proliferativa de la diferenciación en células 3T3-L1 (165), y la expresión ectópica de una forma dominante negativa de la proteína y el silenciamiento del gen que la codifica inhibe el proceso de diferenciación (166). En cuanto a STAT5A y STAT5B, se ha descrito que pueden inducir la expresión de PPAR γ y su actividad transcripcional, promoviendo así la diferenciación de adipocitos en células 3T3-L1 (167).

Las proteínas GATA forman parte de una familia de seis miembros de TFs con dominio de dedos de zinc que se unen al DNA en sus secuencias consenso (A/T)GATA(A/G), y regulan procesos de proliferación y diferenciación celular (167). Dos miembros de esta familia, GATA2 y GATA3, son reguladores negativos de la diferenciación de adipocitos. Se ha descrito que la expresión constitutiva de GATA2 y GATA3 provoca una inhibición de la diferenciación debida en parte a la represión directa sobre PPAR γ (168). Asimismo, tanto GATA2 como GATA3 son capaces de asociarse con C/EBP α y C/EBP β inhibiendo su actividad transcripcional y con ello regulando negativamente la diferenciación (169).

Además de su papel en la regulación de la fase de compromiso, la familia de proteínas Wnt también juega un papel fundamental en la diferenciación terminal de

adipocitos a través de sus tres rutas de señalización, la canónica y las dos no canónicas o independientes de β -Catenina (144). La ruta canónica de Wnt actúa inhibiendo la diferenciación de adipocitos. La sobreexpresión de WNT1, proteína que activa la ruta canónica, conlleva la estabilización de β -Catenina y su traslocación al núcleo donde activa la transcripción de sus genes diana, lo que inhibe la expresión de PPAR γ y la diferenciación (170). Por otro lado, la activación de PPAR γ en preadipocitos provoca un descenso en los niveles proteicos de β -Catenina, lo que indica que son proteínas mutuamente antagonistas en el proceso de diferenciación (144, 170, 171). La sobreexpresión de WNT10B, cuyos niveles disminuyen a medida que avanza la diferenciación de adipocitos, también activa la ruta canónica estabilizando β -Catenina e inhibiendo la diferenciación mediante la supresión de la expresión de los TFs C/EBP α y PPAR γ (172, 173). Además, se ha descrito que ratones transgénicos que sobreexpresan WNT10B poseen menos acumulación de grasa corporal y más resistencia a la acumulación de tejido adiposo blanco tras una dieta rica en grasa (174). La sobreexpresión de WNT6 y WNT10A también inhibe la diferenciación a través de un mecanismo dependiente de β -Catenina (173).

En cuanto a las rutas no canónicas de Wnt independientes de β -Catenina pueden regular el proceso de diferenciación de adipocitos tanto activándolo como inhibiéndolo. Además, no está del todo demostrado en qué ruta no canónica actúan exactamente en este proceso algunas proteínas Wnt. Por un lado, se ha descrito que la sobreexpresión de WNT5B en preadipocitos 3T3-L1 disminuye la traslocación nuclear de β -Catenina al núcleo y promueve la diferenciación de adipocitos (175, 176). También se ha descrito que el silenciamiento de WNT5A y WNT4, que actúan a través de una ruta no canónica de β -Catenina, inhibe el proceso de diferenciación en preadipocitos 3T3-L1, lo que los sitúa como reguladores positivos del proceso (177). Por otro lado, también se demostró en un estudio la acción inhibitoria sobre la diferenciación de adipocitos de la señal inducida por Wnt mediante el receptor FZD2, asociado a la ruta no canónica independiente de β -catenina. Sin embargo, este efecto se revierte parcialmente por la inhibición de la calcineurina, proteína implicada en la ruta no canónica Wnt-Ca²⁺ (178). Este resultado parece indicar que las dos rutas no canónicas podrían tener efectos opuestos en la diferenciación de adipocitos (144), si bien no está clara la implicación de las dos rutas en el proceso.

La ruta de Wnt canónica dependiente de β -Catenina puede ser inhibida por antagonistas como DKK1, que se une a los correceptores LRP5/6 inhibiendo así la ruta. Se ha demostrado que la expresión ectópica de DKK1 en células 3T3-L1 inhibe la señalización de la ruta canónica de Wnt y promueve la diferenciación de adipocitos (179). La delección del antagonista de la ruta canónica SFRP1, conlleva un 20% de reducción en la grasa corporal en ratones, acompañado de un aumento en la masa ósea (180). También CBY, proteína que se une a β -Catenina inhibiendo su actividad transcripcional y los efectos de la ruta canónica, promueve la diferenciación de adipocitos en células 3T3-L1 (181). En la figura I16 se muestra un esquema con el efecto proadipogénico de la inhibición de la ruta canónica de Wnt.

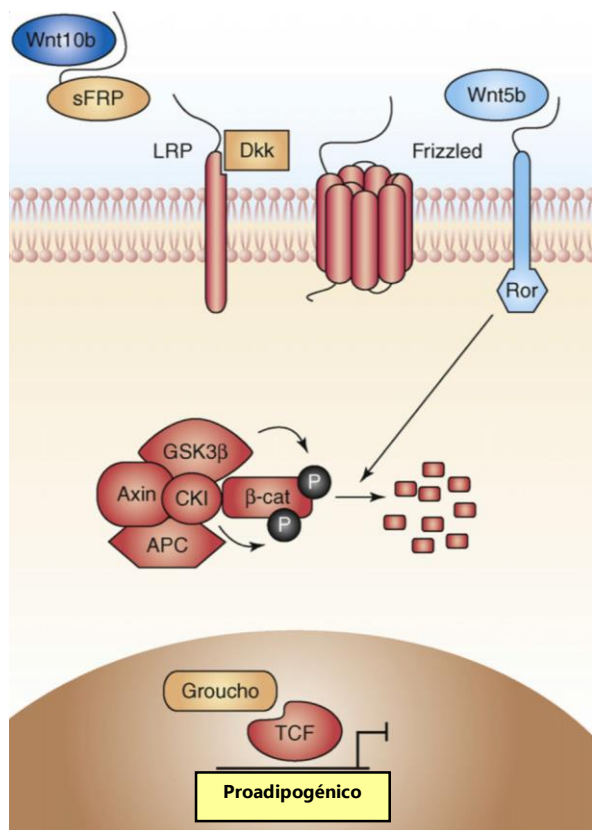


Fig.I16. Efecto proadipogénico de la inhibición de la ruta canónica de Wnt en preadipocitos. Por un lado, SFRP y DKK1 pueden inhibir la señalización de la ruta canónica, por represión de proteínas como WNT10B o por unión al complejo LRP5/6 respectivamente. Por otro lado, la activación de la ruta no canónica por WNT5B conlleva la degradación de β -Catenina y por tanto una menor translocación de esta proteína al núcleo. En ambos casos se promueve la adipogénesis. Figura adaptada de (144).

1.5.3. PAPEL DE LOS miRNAs EN LA ADIPOGÉNESIS

Los miRNAs juegan un papel importante en la regulación postranscripcional de multitud de genes involucrados en procesos biológicos de proliferación y la diferenciación celular, entre los que cabe destacar la adipogénesis. Los miRNAs actúan como reguladores postranscripcionales de un gran número de genes diana implicados en la regulación de la adipogénesis, lo que convierte a estos pequeños RNAs no codificantes en reguladores de

este proceso *per se*. Dependiendo de su diana, los miRNAs pueden actuar como reguladores en las diferentes fases de la adipogénesis: en el compromiso de las MSC a preadipocitos y en el proceso terminal de diferenciación, incluyendo la expansión clonal. Asimismo, pueden actuar bien promoviendo o bien inhibiendo el proceso de la adipogénesis (182, 183).

Existen miRNAs que participan en la fase de compromiso de las MSC, favoreciendo la conversión a preadipocitos, al regular genes diana importantes de la osteogénesis. Tal es el caso de miR-124, que se une a la región 3'UTR de DLX5, un TF pro-osteogénico, regulando negativamente sus niveles de expresión y promoviendo la adipogénesis (184). También miR-204 y su homólogo miR-211 regulan el compromiso de MSC al linaje adipocítico u osteoblástico uniéndose a la región 3'UTR de RUNX2, un TF importante y determinante en la diferenciación de osteoblastos, inhibiendo su expresión e induciendo así la adipogénesis (185).

La expansión clonal, primera etapa dentro de la diferenciación terminal de adipocitos, está también sometida a regulación por miRNAs. El cluster miR-17-92 aumenta sus niveles de expresión durante la expansión clonal e inhibe por unión directa la expresión del supresor tumoral RB2/p130, regulando así positivamente la diferenciación de adipocitos (186). Otro miRNA importante en esta fase es miR-363, cuya sobreexpresión inhibe la expansión clonal y la diferenciación terminal, mediante la represión directa de E2F3, un TF de la familia E2F, clave en la regulación del crecimiento y la proliferación durante esta fase de la diferenciación (187). Let-7 también tiene un papel regulador en este paso de la adipogénesis. Este miRNA inhibe la expresión de HMGA2, cuyos niveles aumentan durante la expansión clonal, actuando de esta manera como un inhibidor de la diferenciación de adipocitos (188).

Algunos miRNAs pueden tener una función reguladora en el paso final de la diferenciación terminal, que convierte a los preadipocitos en adipocitos maduros, bien como reguladores negativos del proceso o bien como reguladores positivos. Buenos ejemplos de reguladores negativos son miR-27a (189), miR-27b (190) y miR-130 (191), que inhiben de manera directa la expresión del TF PPAR γ , inhibiendo así la diferenciación de adipocitos. Otro miRNA que regula negativamente la diferenciación terminal de

adipocitos es miR-448, cuya sobreexpresión inhibe los niveles de KLF5 por unión directa, provocando la inhibición de la expresión de marcadores de diferenciación como PPAR γ y un descenso en la acumulación de TG (192). miR-155 también es un inhibidor de la diferenciación de adipocitos y su sobreexpresión está asociada a una disminución en los niveles de las proteínas CREB y C/EBP β , de gran importancia en los pasos tempranos de la diferenciación terminal (193). Otro miRNA que actúa como regulador negativo inhibiendo la diferenciación es miR-224-5p, que se une directamente a la región 3'UTR de EGR2, un TF que activa positivamente el proceso en los pasos tempranos de la diferenciación de adipocitos, inhibiendo su expresión (194). miR-138 también es considerado un inhibidor de la diferenciación al unirse directamente a EID-1 y provocando así un descenso en los niveles de la expresión de esta proteína que actúa promoviendo la diferenciación de adipocitos (195).

Entre los miRNAs que regulan positivamente el proceso de diferenciación terminal se encuentra miR-143. Éste regula directamente la expresión de ERK5, un gen que codifica una proteína MAPK, inhibiendo su expresión e induciendo la diferenciación (196). Entre los miembros de este grupo de reguladores que inducen la diferenciación también se encuentra miR-146b, que inhibe directamente la expresión de SIRT1. Esta proteína inhibe la diferenciación de adipocitos mediante la inducción de la deacetilación de FOXO1 (197). miR-210 es otro conocido miRNA proadipogénico, que inhibe por unión directa la expresión de TCF7L2, TF de gran importancia en la señalización de la ruta canónica de Wnt/ β -Catenina, lo que induce un aumento en la diferenciación de adipocitos (198). Por otra parte, se ha demostrado que la sobreexpresión de los miembros de la familia de miR-8 en la línea celular ST2 inhibe la ruta canónica de Wnt, promoviendo la diferenciación de adipocitos, aumentando la expresión de FABP4 y la acumulación de lípidos (199). Existen miRNAs que pese a tener un efecto regulador en la diferenciación, no tienen aún una diana conocida aunque tengan dianas predichas bioinformáticamente; tal es el caso de miR-103, cuya sobreexpresión en preadipocitos induce un aumento de la diferenciación (200).

Por último, numerosos estudios han relacionado los niveles de ciertos miRNAs con parámetros médicos de la obesidad. Por ejemplo, los niveles de expresión de miR-17-5p y miR-132 son más bajos en la sangre y el omentum de individuos obesos que en los

individuos control, por lo que la expresión de estos miRNAs puede servir como un marcador de la obesidad (201).

OBJETIVOS

"Los obstáculos son esas cosas espantosas que ves cuando apartas los ojos de tu meta".

Henry Ford

2.1. OBJETIVO GENERAL

Dada la importancia de los miRNAs en multitud de procesos biológicos y en el desarrollo de un gran número de patologías, nos propusimos analizar como primer paso de esta tesis doctoral las regiones 3'UTR de varios genes relacionados con hipercolesterolemias hereditarias. Este análisis nos condujo a determinar la implicación de un miRNA en concreto, miR-148a, en la regulación del gen *APOB*. Asimismo, el estudio de la bibliografía sobre este miRNA nos llevó a continuación a analizar el papel del miRNA maduro mayoritario del dúplex, miR-148a-3p, en la diferenciación de adipocitos, para intentar determinar así su potencial relación en el desarrollo de la obesidad.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Analizar las regiones 3'UTR de genes relacionados con las hipercolesterolemias hereditarias.
- 2) Estudiar el efecto regulador de miR-148a-3p y miR-148a-5p sobre la expresión de *APOB*.
- 3) Estudiar el papel de miR-148a-3p en la diferenciación de adipocitos.
- 4) Estudiar el efecto regulador de Nr5a2 sobre la expresión de miR-148a-3p, así como su papel en la diferenciación de adipocitos.
- 5) Determinar la posible funcionalidad del SNP rs4722551, localizado en el promotor de miR-148a y asociado con IMC.

MATERIALES Y MÉTODOS

"En el fondo, los científicos somos gente con suerte: podemos jugar a lo que queramos durante toda la vida".

Lee Smolin

3.1. CULTIVOS CELULARES

3.1.1. CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE LAS LÍNEAS CELULARES

Para la realización de esta tesis doctoral se utilizaron tres líneas celulares: HepG2, 3T3-L1 y HEK293T.

Las células HepG2 (*número ATCC: HB-8065*), obtenidas originariamente a partir de un carcinoma hepatocelular, se utilizaron como modelo de hígado en los experimentos para estudiar el efecto de la inhibición de miR-148a sobre la expresión de APOB, PCSK9 y LDLR. También se utilizaron estas células para la obtención de extractos nucleares para ensayos de EMSA, en la extracción de proteínas para ensayos luciferasa y en el aislamiento y extracción de DNA para el clonado de regiones 3'UTR humanas. Estas células HepG2 se cultivaron en medio DMEM-Glutamax (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, 100 UI de penicilina y 100 mg/ml de estreptomicina.

Para todos los estudios del efecto de miR-148a y Nr5a2 sobre la diferenciación de adipocitos se utilizó la línea celular murina 3T3-L1 (*número ATCC: CL-173*). Esta línea celular se emplea comúnmente para los estudios de diferenciación de adipocitos ya que son fibroblastos de ratón tipo preadipocitos, y en las debidas condiciones de cultivo se diferencian hasta convertirse en adipocitos maduros. También se utilizaron estas células para la extracción de RNA para cuantificar la expresión génica, de DNA para clonado y de proteínas para ensayos de actividad luciferasa, EMSA, western blot, ELISA y ChIP. Las células 3T3-L1 se cultivaron en medio DMEM-Glutamax suplementado con suero bovino DBS al 10%, 100 UI de penicilina y 100 mg/ml de estreptomicina.

Para la síntesis de lentivirus con el shRNA de Nr5a2 se utilizó la línea celular humana HEK293T (*número ATCC: CRL 1573*), la cual se emplea habitualmente para realizar transfecciones. Se cultivaron en medio DMEM-Glutamax suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, 100 UI de penicilina y 100 mg/ml de estreptomicina.

Todas estas líneas celulares son adherentes y se subcultivaron antes de que alcanzasen la confluencia. Para ello, se lavaron las placas de células con PBS (4,3 mM

Na_2HPO_4 , 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,4 mM KH_2PO_4) y se añadió una solución de tripsina-EDTA precalentada a 37°C. Se incubaron las células a 37°C durante 5 o 10 minutos, dependiendo de la línea, y se le añadió 5 ml de medio de cultivo completo. Se resuspendieron bien las células y se sembraron en placas con medio de cultivo fresco. Todas las líneas celulares se crecieron a 37°C en una atmósfera humidificada al 5 % de CO_2 , y se cambió el medio de cultivo por medio fresco cada 48 horas. Todos los reactivos de cultivo celular fueron adquiridos en la casa comercial LONZA (Basilea, Suiza).

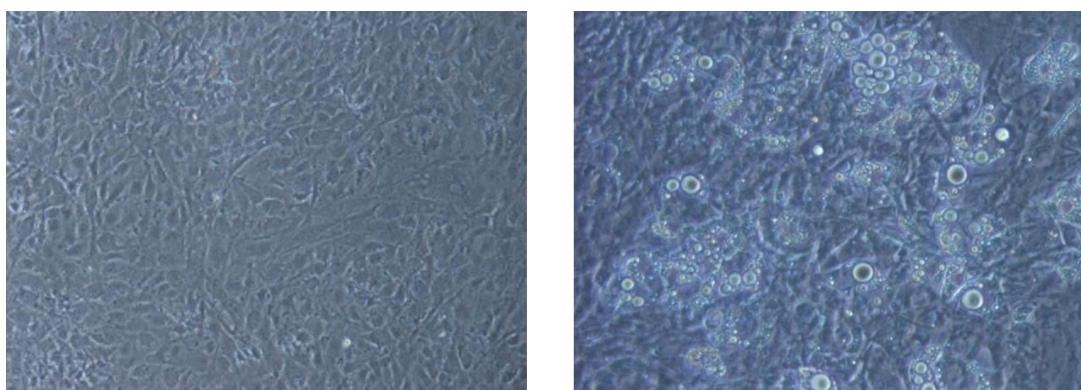


Fig.M1. Fotografías de células 3T3-L1 sin diferenciar y diferenciadas. A la izquierda, preadipocitos justo antes de la inducción de la diferenciación (día 0), y a la derecha, adipocitos maduros ya diferenciados (día 9). Estas fotografías fueron tomadas con un microscopio óptico a un aumento de 20x.

3.1.2. DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS 3T3-L1

Las células 3T3-L1 se sembraron y cultivaron en pocillos de placas adherentes T24 con medio de cultivo DMEM-Glutamax suplementado con suero bovino DBS al 10%, 100 UI de penicilina y 100 mg/ml de estreptomicina. Tras alcanzar la confluencia se mantuvieron las células con este medio de cultivo de mantenimiento durante 24 horas, y trascurrido este tiempo se cambió el medio por el medio de diferenciación que estaba compuesto por el medio de cultivo de mantenimiento suplementado con insulina 1 μM , IBMX 0,5 mM y dexametasona 1 μM (**día 0**). Tras permanecer las células 72 horas con este medio de diferenciación, se sustituyó este medio por medio de cultivo de mantenimiento con insulina 1 μM , que se reemplazó por este mismo medio fresco cada 48 horas hasta que las células 3T3-L1 se diferenciaron completamente a adipocitos maduros (**día 9**), 9 días después de comenzar el proceso de diferenciación. En la figura M1 se muestran unas fotografías realizadas con el microscopio de preadipocitos 3T3-L1 y adipocitos maduros ya diferenciados, 9 días después de la inducción.

3.1.3. TRANSFECCIÓN CON INHIBIDORES Y *MIMICS* DE miRNAs

Para conocer el efecto de miR-148a en las distintas líneas celulares empleadas se utilizaron *miRCURY LNA microRNA Inhibitors* de Exiqon (Copenhage, Dinamarca) como inhibidores de los miRNAs miR-148a-3p y miR-148a-5p, y *MISSION miRNA MIMICS* de Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA) como *mimic* del miRNA miR-148a-3p. Los inhibidores utilizados eran oligonucleótidos complementarios a la secuencia del miRNA que se deseaba inhibir, y los *mimics* oligonucleótidos con la misma secuencia del miRNA de estudio, con lo que se consiguió la sobreexpresión del mismo aumentando su número de copias. Tanto inhibidores como *mimics* se adquirieron tratados, para que tuvieran resistencia a la acción de RNasas celulares y fueran estables con el tiempo (se probó su eficacia en nuestro laboratorio durante al menos 14 días). Como control, en todos los experimentos se transfectaron células con un oligonucleótido *non-target* con el mismo tratamiento que los inhibidores y que no hibridaba con ninguna secuencia conocida. En la tabla suplementaria S1 se muestran las secuencias de los inhibidores y *mimic* utilizados.

Para transfectar tanto inhibidores como *mimics* se utilizó el agente jetPEI de Polyplus (New York, USA), agente basado en polímeros catiónicos derivados de la polietilenimina. Se añadieron 1 µl de inhibidores o *mimic* con una concentración de 20 µM y 50 µl de NaCl 150 mM en un tubo eppendorf. Paralelamente, en otro tubo se añadieron 2 µl del agente jetPEI y 50 µl de NaCl 150 mM por cada una de las muestras a transfectar. A continuación, se mezclaron los dos tubos con el vórtex y se centrifugaron suavemente, tras lo cual se añadió la solución de jetPEI gota a gota a los tubos con las diferentes soluciones de inhibidores o *mimic*. Se volvió a agitar la muestra de jetPEI y oligonucleótidos en el vórtex y se centrifugó, incubándola después a temperatura ambiente durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, se añadió gota a gota la mezcla de transfección a las células, sembradas en placas adherentes T24 y con 500 µl de medio de cultivo fresco por pocillo. La concentración final de los inhibidores o *mimic* en el medio fue de 40 nM en todos los experimentos y con todas las líneas celulares. 24 horas después de la transfección, las células se utilizaron para varios experimentos en los que se investigó el efecto de los distintos miRNAs de estudio: extracción de RNA, extracción de proteínas o como punto de inicio de la diferenciación a adipocitos (**día 0**) para estudiar el efecto de miR-148a-3p en dicho proceso.

3.1.4. CONSTRUCCIÓN DE LAS LÍNEAS DE CÉLULAS 3T3-L1 CON SOBREEXPRESIÓN Y SILENCIAMIENTO DE Nr5a2

Se construyeron dos líneas de células 3T3-L1 con sobreexpresión (PCEFL-Nr5a2) y silenciamiento (shNr5a2) de Nr5a2 para estudiar el efecto de este receptor nuclear sobre la expresión de miR-148a y sobre la diferenciación de adipocitos.

3.1.4.1. CONSTRUCCIÓN DE LA LÍNEA CON SOBREEXPRESIÓN DE Nr5a2 (PCEFL-Nr5a2)

Como primer paso para establecer una línea de células 3T3-L1 que sobreexpresase Nr5a2, se clonó la secuencia del DNA complementario del receptor nuclear Nr5a2 en el vector de expresión en eucariotas PCEFL. Una vez secuenciado el fragmento y clonado en el vector PCEFL, se transfectó en células 3T3-L1 sembradas en una placa de cultivo P-100, tras dejarlas crecer hasta una confluencia del 50%. Para la transfección se utilizó el agente jetPEI de Polyplus. Se añadieron 10 µg del plásmido PCEFL-Nr5a2 y 250 µl de NaCl 150 mM en un tubo eppendorf. Paralelamente, en otro tubo se añadieron 20 µl del agente jetPEI y 250 µl de NaCl 150 mM. A continuación, se agitaron los dos tubos con el vórtex y se centrifugaron suavemente, tras lo cual se añadió la solución de jetPEI gota a gota al tubo que tenía el plásmido. Se volvió a agitar la muestra de jetPEI y plásmido en el vórtex y se centrifugó, incubándola después a temperatura ambiente durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, se añadió gota a gota la mezcla de transfección a las células 3T3-L1 sembradas en la placa P-100 con medio de cultivo fresco.

A las 48 horas se cambió el medio de las placas y se suplementó el medio de las células transfectadas con geneticina de la casa comercial Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA) a una concentración de 750µg/ml. A continuación se seleccionaron los clones resistentes a la geneticina y estas células seleccionadas se crecieron independientemente en otras placas de cultivo, comprobando *a posteriori* si efectivamente tenían sobreexpresada la expresión del receptor nuclear Nr5a2 mediante experimentos de PCR cuantitativa (qPCR).

3.1.4.2. CONSTRUCCIÓN DE LA LÍNEA CON SILENCIAMIENTO DE Nr5a2 (shNr5a2)

Para el silenciamiento de la expresión de shNr5a2 en las células 3T3-L1 se usaron lentivirus que contenían plásmidos que expresaran shRNAs específicos contra el mRNA de Nr5a2 de la casa Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA). Para la síntesis de los lentivirus se

utilizaron tres plásmidos diferentes: el plásmido con uno de los shRNA específicos contra Nr5a2, un vector con el gen que codificaba para la envuelta proteica, pCI-VSVG, y un vector de empaquetado, psPAX2 (Fig.M2). Los plásmidos adquiridos con los shRNA, específicos de ratón, para silenciar Nr5a2 empleados fueron TRCN0000025966 y TRCN0000025971.

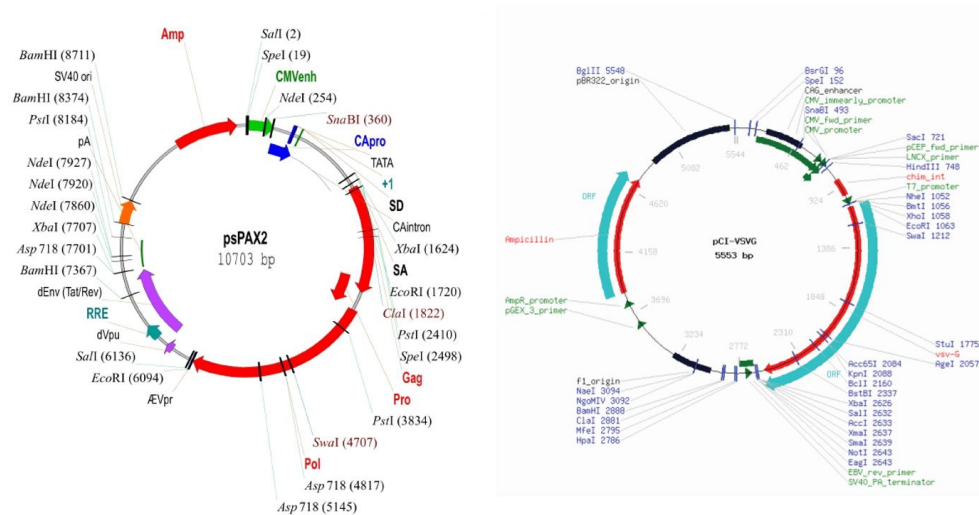


Fig.M2. Mapas de los vectores empleados para la síntesis de lentivirus. A la izquierda el psPAX2, vector de empaquetado, y a la derecha el pCI-VSVG, vector para la envoltura proteica.

Para la transfección de los plásmidos lentivirales se utilizó el método del CaCl_2 . Este método consigue la transfección mediante la formación de un precipitado formado por el calcio y los grupos fosfato del DNA. Estos precipitados son adsorbidos por las células teniendo como resultado final la transfección del DNA. Se cultivaron células HEK293T en placas P150 y cuando éstas alcanzaron un 60% de confluencia se cambió el medio por medio fresco y se procedió a realizar la transfección. Por cada placa a transfectar se mezcló en un tubo Falcon, 20µg del plásmido correspondiente, 15µg del vector de empaquetado psPAX2 y 6µg del vector que codifica para la envoltura pCI-VSVG. Esta mezcla se llevó a un volumen de 438µl con agua miliQ filtrada y a continuación se añadieron 62µl de CaCl_2 2M y se dejó incubando 5 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación se adicionaron 500µl de tampón HBS 2x (2g de glucosa, 250mM de NaCl, 5mM de KCl, 1,5mM de Na_2HPO_4 y 42mM de HEPES a pH=7,05), se agitó con vórtex la mezcla y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 20 minutos, tras lo cual se adicionó la mezcla resultante a las células HEK293T gota a gota por toda la placa. A las

12 horas se cambió el medio por medio fresco y tras esto, cada 24 horas durante 3 días, se recogió el medio y se reemplazó por medio fresco.

El medio celular recogido de esta manera se centrifugó a 3000 rpm durante 3 minutos, descartándose el pellet compuesto por restos celulares y pasando el sobrenadante a través de un filtro de 0,45 μm . Los medios obtenidos de esta forma se almacenaron a -80°C para su posterior ultracentrifugación. Para ello, los medios que contenían los lentivirus se centrifugaron en una ultracentrífuga Optima™ XL-100K de Beckman Coulter (California, USA), con un rotor SW28 Beckman Coulter a 26000rpm durante 2 horas y 15 minutos a 4°C . Tras la centrifugación se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet que contenía los lentivirus en medio fresco, se alicuotó y se almacenó a -80°C .

Una vez obtenidos los lentivirus, éstos se adicionaron con medio fresco a las células, dejándose 48h. Tras este tiempo se procedió al cambio de medio y a la selección con puromicina de Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA) a $1,5\mu\text{g/ml}$. Tras otras 48 horas se eliminó el medio, se lavaron las placas con PBS 1x y se aislaron los clones resistentes a la puromicina y por tanto con el shRNA contra Nr5a2, mediante una punta de pipeta con tripsina, cultivándose de forma aislada y comprobando *a posteriori* si efectivamente tenían silenciada la expresión de Nr5a2 por qPCR.

3.2. MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Para determinar la variación de la expresión génica de los genes de interés en las células transfectadas con los inhibidores y *mimics* de miRNAs, así como en las líneas celulares de 3T3-L1 que tenían silenciado o sobreexpresado Nr5a2, se utilizó la técnica de PCR cuantitativa (qPCR) o PCR a tiempo real. A partir del RNA extraído de las células se llevó a cabo la síntesis de DNA complementario (cDNA), el cual se cuantificó con la ya mencionada técnica de PCR cuantitativa. Esta técnica consiste en la medición de un fluoróforo incorporado a los fragmentos de DNA amplificados en cada ciclo de PCR, lo que permite una medición precisa de los niveles de expresión relativos de los genes de interés estudiados.

3.2.1. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

Para la extracción del RNA de las distintas líneas celulares se empleó el método con TRIZOL de Invitrogen (California, USA), salvo en el caso de las muestras utilizadas en el secuenciado de RNA, para las que se utilizó el kit *RNeasy Plus* con columnas de QIAGEN (Hilden, Alemania).

El método de extracción con TRIZOL es ampliamente utilizado por su gran rendimiento y su bajo coste. En el primer paso se recogieron las células tripsinizándolas de la placa y centrifugándolas a 1000 rpm durante 5 minutos en tubos eppendorf de 1,5 ml. A este pellet celular se añadió el TRIZOL a razón de 1 ml del mismo por 5×10^6 células, resuspendiendo con la pipeta hasta homogeneizar la mezcla de TRIZOL y células. Después de incubar este homogeneizado durante 5 minutos se añadió cloroformo a razón de 0,2 ml por 1 ml de TRIZOL, agitando vigorosamente durante 15 segundos e incubando después durante 2 o 3 minutos a temperatura ambiente. A continuación se centrifugaron las muestras a 12000 rpm 15 minutos en una centrífuga atemperada a 4°C, separándose así dos fases. La fase inferior de color rojo contenía el fenol cloroformo, y la fase superior acuosa transparente el RNA. Se pasó el contenido de esta última fase a tubos eppendorf limpios de 1,5 ml, tras lo cual se añadió isopropanol a razón de 0,5 ml por 1 ml de TRIZOL para precipitar el RNA, incubando después durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación se centrifugaron las muestras a 12000 rpm 20 minutos a 4°C, desechando el sobrenadante y añadiendo al pellet (de tipo gel transparente y muchas veces imperceptible) etanol 75% (disuelto en agua libre de RNasas) a razón de 1ml de esta solución de etanol por 1 ml de TRIZOL y mezclando las muestras con el vórtex. Se centrifugaron las muestras a 7500 rpm durante 5 minutos a 4°C y se desechó el sobrenadante, dejando de 5 a 10 minutos el pellet de RNA al aire para que se secase. Transcurrido este tiempo se resuspendió el pellet en 30 µl de agua libre de RNasas y se cuantificó el RNA en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 de Thermo Scientific (Waltham, USA), guardando posteriormente las muestras a -80°C.

Como se dijo al comienzo de este apartado, el kit *RNeasy plus* de QIAGEN se utilizó para extraer el RNA de las células 3T3-L1 transfectadas con el inhibidor del miR-148a-3p y el oligonucleótido control *non-target* para el secuenciado de RNA (RNAseq), puesto que se necesitó una mayor pureza de las muestras para esta técnica. Como primer paso en la

extracción, las células se lavaron dos veces con PBS 1X y se lisaron directamente sobre la placa, añadiendo sobre la misma 350 µl de tampón de lisis *RLT plus*. Se recogió el lisado con una jeringuilla de 1 ml con una punta G20 de 0,9 mm de diámetro, pasándose 5 veces por la jeringuilla para conseguir una mejor lisis y homogeneizado de la muestra. A continuación, se pasó el lisado a una columna de eliminación de DNA genómico *gDNA eliminator*, se centrifugó durante 1 minuto a 10000 rpm y se recogió el líquido resultante. A éste se le añadió un volumen de etanol 70% (v/v) y se pasó a una columna de purificación de RNA, centrifugando 1 minuto a 10000 rpm. Se desechó el líquido y se lavó la columna con 700 µl de tampón RW1, centrifugando 1 minuto a 10000 rpm. Tras esto, se volvió a desechar el líquido y se añadieron a la columna 500 µl de tampón de lavado *RPE*, centrifugando después durante 1 minuto a 10000 rpm. Este último paso se repitió una vez más, y acto seguido, se secó la columna centrifugándola 1 minuto a 12000 rpm. Para finalizar la extracción se añadieron 50 µl de agua libre RNasas dejando unos segundos para que se adsorbiera en la columna. A continuación, se centrifugó 1 minuto a 10000 rpm y se recogió la elución que contenía el RNA, midiendo su concentración en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 y guardándolo a -80°C.

3.2.2. SÍNTESIS DE DNA COMPLEMENTARIO (cDNA)

Para la síntesis de DNA complementario (cDNA) o retrotranscripción a partir del RNA extraído de las diferentes líneas celulares se utilizó el *iScript cDNA Synthesis Kit* de BIORAD (California, USA). Se añadieron en un tubo eppendorf 0,5 µg de RNA total, 1µl de la enzima retrotranscriptasa, 4 µl del tampón que se suministra en el kit y agua libre de nucleasas hasta un volumen total de 20 µl. Esta mezcla se sometió a tres incubaciones consecutivas: Una primera de 5 min a 20°C para que se estabilice la muestra, la siguiente de 30 minutos a 42°C para que la enzima hiciese la retrotranscripción del RNA y una última de 5 minutos a 85°C para inactivar el enzima. Tras esta última incubación, la muestra se atemperó y se guardó a -20°C.

También se llevó a cabo la síntesis de cDNA a partir de miRNA para los experimentos en los que se quiso conocer su expresión. Para ello se utilizó el kit *Mir-X miRNA First-Strand Synthesis* de Clontech (California, USA), partiendo de RNA total extraído con el método del TRIZOL, tal y como se detalla en el apartado anterior. En un tubo eppendorf

se añadieron 100 ng de muestra de RNA total, 5 µl de tampón *mRQ*, 1,25 µl de la mezcla de enzimas *mRQ* y agua libre de RNasas hasta un volumen de 10 µl. Esta mezcla se incubó primero 1 hora a 37°C para llevar a cabo las reacciones enzimáticas, y luego 5 minutos a 85°C para inactivar los enzimas. Transcurrido este último tiempo de incubación se dejó atemperar la muestra, se añadieron 90 µl de agua miliQ y se guardó a -20°C. En esta síntesis de cDNA a partir de miRNA tuvieron lugar dos reacciones enzimáticas: la primera fue la poliadenilación de los miRNAs con una poliA polimerasa, y la segunda, la retrotranscripción con una transcriptasa reversa.

3.2.3. PCR CUANTITATIVA (qPCR)

Como se ha dicho anteriormente, para medir la variación de la expresión génica de los genes de interés se recurrió a la técnica de PCR cuantitativa (qPCR) o PCR a tiempo real. En esta técnica de PCR, un fluoróforo se une al DNA sintetizado en cada nuevo ciclo, de manera que se puede cuantificar la cantidad relativa de ese fragmento de DNA midiendo su fluorescencia a tiempo real. Para aislar y amplificar la región de los genes que se desearon estudiar se recurrió al uso de parejas de cebadores específicos, diseñados con el programa *primer3*, cuya longitud de amplicón varió entre 100 y 250 pb.

Todas las reacciones de PCR cuantitativa se llevaron a cabo en un volumen final de 13 µl por muestra para cada cDNA, haciendo duplicados para cada muestra. En cada uno de los pocillos de una placa de PCR cuantitativa de *4Titude* (Dorking, Reino Unido) se añadieron 6,25 µl de *IQTM SYBR Green Supermix 2x* de BIORAD (California, USA), que contenía SYBR Green como fluoróforo, dNTPs, tampón de reacción y una *Taq* polimerasa que es inactiva a temperatura ambiente, pero que se activa cuando la enzima se somete a temperaturas elevadas. Además de este mix, se añadieron 1 µl de cDNA, el volumen de cebadores necesario para la concentración deseada de los mismos y agua miliQ hasta llegar al volumen final de 13 µl. La secuencia de los cebadores utilizados para humano y para ratón, así como las concentraciones empleadas de los mismos se pueden ver en las tablas suplementarias S2 y S3. Para todos los experimentos de PCR cuantitativa se empleó un termociclador *iQ5* de BIORAD (California, USA).

Se llevaron a cabo dos tipos diferentes de reacciones de PCR cuantitativa a partir de cDNA, de mRNA por un lado y de miRNA por otro lado. En los dos tipos de reacción se

programó un ciclo inicial de 95°C durante 5 minutos para la desnaturalización del DNA, seguido de un protocolo de 40 ciclos de PCR para amplificar los fragmentos de DNA deseado, y para finalizar un ciclo de 5 minutos a 72°C para la elongación final. En el caso de las reacciones con cDNA a partir de mRNA, cada uno de los 40 ciclos se dividió en un paso de desnaturalización de 15 segundos a 95°C, un paso de hibridación de la pareja de cebadores con el cDNA de 30 segundos a la temperatura específica de cada pareja de cebadores, y un paso de elongación de 30 segundos a 72°C. Se pueden ver las condiciones de temperatura de fusión para las parejas de cebadores de los diferentes genes humanos y murinos en las tablas suplementarias S2 y S3 respectivamente. Para las reacciones con cDNA a partir de miRNAs, en cada uno de los cuarenta ciclos se programó un paso de hibridación de 5 segundos a 60°C para todas las parejas de cebadores, seguido de un paso de elongación de 30 segundos a 72°C. Se utilizaron tres *housekeeping* o genes de control en los experimentos de PCR cuantitativa. Para la cuantificación relativa de los cDNA de mRNA humanos se seleccionaron cebadores del gen de la proteína ribosomal S14 (*RPS14*), y para los murinos, cebadores del gen de la β -Actina (*Actb*). Como gen de control para la cuantificación de miRNAs, se utilizó una pareja de cebadores del RNA espliceosomal U6 (U6), que fueron suministrados en el kit *Mir-X miRNA First-Strand Synthesis* y cuya secuencia es desconocida.

Para calcular la expresión génica relativa en los diferentes experimentos de qPCR se empleó el método delta-delta Ct, siendo Ct el ciclo de PCR en el que la amplificación de la expresión del gen estudiado empieza a ser exponencial. Se restó la Ct del *housekeeping* a la Ct del gen de estudio, tanto en la muestra con el tratamiento o transfección como en el control. Como se quiso saber la relación de la expresión génica entre las muestras y los controles se utilizó la siguiente ecuación en todos los casos: $\text{Relación} = 2^{-(\Delta C_{\text{muestra}} - \Delta C_{\text{control}})}$. Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos se utilizó el método de la t de Student.

3.3. WESTERN BLOT

Se utilizó la técnica de western blot para el análisis de la abundancia relativa de las diferentes proteínas de estudio en las células 3T3-L1 sin diferenciar tratadas con el inhibidor de miR-148a-3p por un lado, y por otro lado, en las células 3T3-L1 PCEFL-Nr5a2

y 3T3-L1 shNr5a2 que sobreexpresaban y tenían silenciado el receptor nuclear Nr5a2 respectivamente. Las proteínas de estudio fueron β -Catenina en todos los casos y Nr5a2 en las células que sobreexpresaban esta proteína, a modo de comprobación de que el sistema de sobreexpresión funcionaba. En el caso de β -Catenina también se quiso analizar su translocación al núcleo en las condiciones de estudio ya mencionadas. La técnica de western Blot o Inmunoblot se utiliza ampliamente para la detección de proteínas específicas en una muestra determinada. Mediante una electroforesis en gel se separan las distintas proteínas de la muestra en base a su distinto peso molecular, y a continuación se transfieren a una membrana adsorbente donde se localizan las proteínas de interés, utilizando anticuerpos específicos contra ellas.

3.3.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Para los experimentos cuyo objeto de estudio fue β -Catenina se necesitaron las fracciones proteicas tanto citoplasmáticas como nucleares de las células 3T3-L1 con los tratamientos para el estudio indicados en el párrafo anterior: transfectadas con el inhibidor de miR-148a-3p, con el vector de sobreexpresión PCEFL-Nr5a2 y silenciadas con shNr5a2. En el caso de los experimentos para medir los niveles de la proteína Nr5a2 se utilizaron las proteínas totales. Para la extracción de proteínas se utilizó el kit *Preparation of Nuclear Extract* de Active Motif (California, USA). Tras sembrar las células 3T3-L1 en placas adherentes P100 y someterlas al tratamiento correspondiente, se tripsinizaron y se pasaron a un tubo Falcon de 15 ml.

Se centrifugó el homogeneizado celular a 500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente para sedimentar las células, se desechó el sobrenadante y se lavó el pellet dos veces con 5 ml del tampón de lavado (10% de PBS 10x, 5% de inhibidores de fosfatasas y 85% de agua destilada), centrifugando a 4°C 500 rpm durante 5 minutos tras cada lavado y desechando el sobrenadante. A continuación se resuspendió el pellet en 1 ml de tampón de lisis hipotónico 1x (10% de tampón de lisis hipotónico 10x suministrado en el kit y 90% de agua destilada) y se incubó la muestra a 4°C durante 15 minutos para que se llevara a cabo la lisis de la membrana plasmática celular. Transcurrido este tiempo se añadieron 50 μ l de detergente a la muestra, se agitó en el vórtex vigorosamente durante 10 segundos y se centrifugó a 12000 rpm 1 minuto a 4°C. Se guardó el sobrenadante que contenía la

fracción de proteínas citoplasmáticas, y se resuspendió el pellet con 100 µl del tampón de lisis completa (10% DTT 10mM, 89% tampón de lisis AMD suministrado en el kit y 1% de inhibidores de proteasas) para lisar los núcleos celulares. Se incubó la suspensión durante 30 minutos a 4°C en una noria a 150 rpm, tras lo cual se centrifugó 10 minutos a 12000 rpm también a 4°C. Se recuperó el sobrenadante de esta última centrifugación, que contenía la fracción proteica nuclear, y se midió la concentración de proteínas de las muestras citoplasmáticas y nucleares en un fluorímetro *Qubit 2.0* de Life Technologies (California, USA).

3.3.2. WESTERN BLOT

Una vez extraídas las fracciones proteicas citoplasmáticas y nucleares de las células 3T3-L1 con los tratamientos, tanto de inhibición de miR-148a-3p por un lado, como de sobreexpresión y silenciamiento de Nr5a2 por otro lado, se procedió a la técnica de western blot para la detección de las proteínas de estudio. Como primer paso se calentaron a 100°C durante 10 minutos 80 µg de cada una de las muestras proteicas a las que se había añadido previamente Laemli 6X para desnaturalizar las proteínas. Una vez calentadas las muestras, se corrieron en un gel de electroforesis SDS-PAGE junto con el marcador de pesos moleculares, primero durante 30 minutos a 80V a través del *stacking* del gel y finalmente durante 90 minutos a través del *resolving* del gel a 125V. La composición del gel de electroforesis fue diferente para cada una de las partes de las que estaba compuesto. El *stacking* contenía un 15% de acrilamida 0,05 % bis-acrilamida (p/v), tampón TRIS-HCl pH=6,8, SDS al 10%, un 0,06% de APS, un 0,2% de TEMED y agua miliQ. A su vez, el *resolving* contenía un 10% de acrilamida 0,05 % bis-acrilamida (p/v), tampón TRIS-HCl pH=8,8, SDS al 10%, un 0,06% de APS, un 0,2% de TEMED y agua miliQ. La electroforesis se llevó a cabo en un litro de tampón TGS, compuesto por 100 ml de una solución ya preparada de TRIS-Glicina 10X, 50 ml de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10% (p/v) y 850 ml de agua miliQ.

Una vez acabado el tiempo de electroforesis y corridas ya las muestras, se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa Whatman (Maidstone, Reino Unido) utilizando para ello un aparato de transferencia semiseca de la casa comercial BIORAD (California, USA) durante 30 minutos a 20V, empapando el gel y la

membrana en tampón de transferencia TGM (10% de TRIS-Glicina 10X, 20% de metanol y 70% de agua miliQ). Transcurrido este tiempo, el gel se tiñó con azul de coomassie durante 30 minutos y se destiñó posteriormente con agua en sucesivos lavados cada 30 minutos durante tres horas incubando a temperatura ambiente el gel con agitación. Por otro lado, la membrana con las proteínas transferidas, se incubó con agitación durante una hora a temperatura ambiente con 10 ml de solución de bloqueo, consistente en 10 g de leche en polvo y hasta 10 ml de tampón de lavado TTBS (TRIS-HCl 1M pH=7,5, Tween-20, NaCl 4M y de agua miliQ).

Una vez finalizado el bloqueo, la membrana se lavó tres veces con 10 ml de tampón de lavado TTBS, incubando durante 10 minutos con agitación a temperatura ambiente entre cada uno de los lavados. Posteriormente se incubó la membrana durante toda la noche con agitación a 4°C, con 10 ml de una solución con el anticuerpo primario específico correspondiente dependiendo de la proteína de estudio (Tabla suplementaria S4), diluido en tampón TTBS con un 1% de seroalbúmina bovina (BSA). A la mañana siguiente se recuperaron los anticuerpos primarios diluidos y se lavó la membrana tres veces con 10 ml de tampón TTBS, incubando 10 minutos con agitación entre cada lavado. A continuación se añadieron 10 ml del anticuerpo secundario correspondiente, anti-rabbit (con referencia 926-68073) o anti-goat (con referencia 926-68074) dependiendo del anticuerpo primario utilizado, con marcaje fluorescente *IRDye680* de la casa LI-COR (Nebraska, USA), diluido 1:10000 en tampón TTBS con 1% BSA, y se incubó la membrana a temperatura ambiente con agitación durante una hora protegiendo siempre la membrana de la luz. Transcurrido este tiempo, la membrana se volvió a lavar tres veces con tampón TTBS, con sus correspondientes incubaciones de 10 minutos con tampón TTBS entre cada lavado, y a continuación se resolvieron las uniones de los anticuerpos específicos a las proteínas de estudio en la membrana mediante el escáner para fluorescencia *Odyssey* de LI-COR (Nebraska, USA).

3.4. ENSAYO DE RETARDO EN GEL (EMSA)

Los EMSAs (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) o retardos en gel para el estudio funcional del SNP rs4722551 situado en el gen de miR-148a humano, y para el estudio de la unión de Nr5a2 en el promotor de miR-148a humano y murino se llevaron a cabo

básicamente como describen Buratowski y cols (202), salvo por el uso de sondas ya marcadas fluorescentemente. El uso de esta técnica permite determinar la capacidad de unión de una o varias proteínas a una región concreta del genoma, de manera que cuando una o varias proteínas se unen a una sonda de DNA bicatenario marcada fluorescentemente se produce un retardo visible en el gel respecto a la sonda marcada libre, debido al peso del complejo de unión de proteína-DNA. Si se quiere saber qué proteína se une a la sonda de DNA, se incubaba esta sonda fluorescente con un extracto de proteínas nucleares y un anticuerpo que detecta la proteína en cuestión. A esta técnica se la conoce como *supershift* o superretardo en español.

3.4.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS NUCLEARES

Para llevar a cabo los experimentos de EMSA se necesitó la extracción de proteínas nucleares de HepG2 y 3T3-L1. Se utilizaron extractos nucleares de HepG2 por varios motivos: se cultivan fácilmente, es una línea celular humana como las secuencias de DNA que se quieren estudiar en el gen de miR-148a, tanto el SNP de estudio como el hipotético sitio de unión para NR5A2 humano que se deseaba analizar, y estas células tienen una gran expresión de miR-148a. Los extractos de células murinas 3T3-L1 se utilizaron para el experimento de EMSA con el hipotético sitio de unión de Nr5a2 en el promotor murino de miR-148a.

Para la extracción de las proteínas nucleares se utilizó el kit *Preparation of Nuclear Extract* de Active Motif (California, USA). Se cultivaron células HepG2 o 3T3-L1 en una placa adherente grande P150 hasta que la confluencia celular alcanzó el 80%, tras lo cual se tripsinizaron las células y se pasaron a un tubo Falcon de 15 ml. A continuación se extrajo la fracción proteica nuclear de las células con la misma metodología que se explica en el apartado 3.3.1. de este capítulo, desechando la fracción citoplasmática, ya que para el ensayo de EMSA sólo se necesitaba la fracción nuclear, que contenía los TF. Por último se midió la concentración proteica en un fluorímetro *Qubit 2.0* de Life Technologies, se hicieron alícuotas de 20 µl y se guardaron a -80°C.

3.4.2. ANILLAMIENTO DE LAS SONDAS PARA RETARDO EN GEL

El día anterior al experimento se anillaron las sondas bicatenarias que se iban a utilizar en el retardo en gel, tanto las sondas marcadas fluorescentemente como las sondas no marcadas o sondas frías que se usan como competición. Se añadieron en un tubo eppendorf de 1,5 ml, 10 μ l a una concentración de 100 μ M de cada uno de los oligonucleótidos complementarios utilizados en cada caso. A continuación se añadió a las mezclas 80 μ l de tampón de anillado que contenía un 5% de TRIS pH=7,6 1M, un 1% de $MgCl_2$ y un 94 % de agua miliQ. Se calentaron las muestras a 100°C durante 5 minutos y se dejaron a temperatura ambiente durante la noche, guardándose a -20°C a la mañana siguiente. Los oligonucleótidos marcados fluorescentemente (sólo uno de los oligonucleótidos de cada una de las sondas marcadas llevaba el marcaje) se obtuvieron ya marcados con el fluoróforo *IRDye680*, que emite en color rojo. En la tabla suplementaria S5 se pueden ver los oligonucleótidos empleados en el anillamiento de las sondas para el EMSA.

3.4.3. ENSAYO DE RETARDO EN GEL

Para estudiar la funcionalidad del SNP rs4722551 se utilizó la técnica de EMSA o retardo en gel. En primer lugar se incubó a 4°C durante 10 minutos la mezcla de 20 μ g de extractos nucleares de HepG2, agua miliQ y el tampón de EMSA al 6X que contenía $MgCl_2$ 2 mM, espermidina 2 mM, DTT 0,75 mM, 3 μ g de BSA, 0,8 μ g de poli-dIdC y mix 5X (HEPES 100 mM, KCl 250 mM, EDTA 0,5 mM y glicerol al 50%). Esta primera incubación tiene como finalidad favorecer las uniones inespecíficas de las proteínas al DNA. Transcurridos los 10 minutos de la incubación se añadió la sonda fría (sonda no marcada) en un exceso proporcional a la cantidad de sonda marcada: 10X (10 veces la concentración de sonda marcada), 20X, 50X, 100X, en los tubos con competición, y a continuación se añadió la misma cantidad de sonda marcada a todas las muestras, 0,25 μ l con una concentración de 10 μ M. Se procedió a una incubación de las muestras durante 30 minutos a 4°C, y al mismo tiempo se precorrió el gel de la electroforesis 30 minutos a 160V. Terminada esta última incubación, las muestras, con un volumen final de 20 μ l, se corrieron en el gel de electroforesis durante 90 minutos a 160V y las uniones de las proteínas de los extractos nucleares al DNA se resolvieron en el escáner fluorescente *Odyssey* de LI-COR. La

intensidad de las bandas fue cuantificada con el programa *imageJ*. Se utilizó para el EMSA un gel nativo al 5% de acrilamida compuesto por un 5% de acrilamida 0,05 % bis-acrilamida (p/v), 0,25X de tampón TBE (Tris-HCl 50 mM, H₃BO₃ 1 M y EDTA 1 mM), un 0,06% de persulfato de amonio (APS), un 0,2% de TEMED y agua miliQ hasta un volumen final de 50 ml. Se utilizó para la electroforesis un litro de tampón TBE hasta llenar casi por completo la cubeta de electroforesis.

3.4.4. ENSAYO DE SUPERRETARDO EN GEL

Durante el trabajo experimental de esta tesis doctoral, se llevaron a cabo dos ensayos de superretardo en gel. Por un lado, se estudió la posibilidad de que el receptor de andrógenos (AR) se estuviera uniendo a una de las sondas, correspondiente al alelo C del SNP rs4722551, perdiendo el sitio de unión en la sonda del alelo T. Por otro lado, se quiso estudiar la posible unión del receptor nuclear Nr5a2 en una región del promotor del gen miR-148a humano y murino. Para comprobar estas dos hipótesis basadas en estudios bioinformáticos realizados con el programa Chip Mapper, se recurrió a la técnica de superretardo o *supershift* en inglés. La única diferencia con el retardo en gel es que en el superretardo se añade a la muestra un anticuerpo contra la proteína de la que se quiere conocer su posible interacción con la sonda. También se varía la composición del gel de electroforesis, siendo en el superretardo del 4% de acrilamida 0,04 % bis-acrilamida (p/v), 0,25X de tampón TBE (Tris-HCl 50 mM, H₃BO₃ 1 M y EDTA 1 mM), 0,06% de persulfato de amonio (APS), 0,2% TEMED y agua miliQ. Tanto el tampón de la electroforesis como el volumen final de la muestra, 20 µl, son los mismos.

24 horas antes de la extracción de proteínas nucleares para el superretardo del receptor de andrógenos se trataron las células HepG2 con testosterona 100 nM de la casa comercial Sigma-Aldrich (Saint-Louis, USA) para conseguir la traslocación del receptor de andrógenos al núcleo y su unión al DNA. En el caso del superretardo de Nr5a2 se utilizaron extractos nucleares de HepG2 para el estudio de la unión en el promotor humano y de 3T3-L1 en el caso del promotor murino, sin tratar y con sobreexpresión de Nr5a2 (PCEFL-Nr5a2) Tras la primera incubación de 10 minutos a 4°C de 20 µg de los extractos de proteínas nucleares y agua miliQ con el tampón de EMSA 6X se añadieron 2 µl de anticuerpo contra el receptor de andrógenos, *Androgen receptor antibody pAb* de Active

Motif (California, USA) en el primer caso, o 2 µl de anticuerpo contra NR5A2, *Anti-NR5A2 antibody ab18293* de Abcam (Cambridge, Reino Unido) en el segundo caso, añadiendo en una de las calles en ambos experimentos 2 µl de un anticuerpo inespecífico contra la proteína Actina *sc-1616* de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA) como control negativo. Se dejaron las muestras otra vez a 4°C durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, se añadió la sonda marcada, y la fría en la calle que correspondiese, y se incubó durante 30 minutos a 4°C como se explica en el apartado anterior. Pasados los 30 minutos y ya precorrido el gel de electroforesis durante 30 minutos a 160V, se corrieron las muestras en el gel durante 90 minutos a 160V, y las uniones del anticuerpo a los complejos proteína-DNA se resolvieron en el escáner *Odyssey* de LI-COR. Cabe explicar que cuando se produce la unión del anticuerpo a un complejo proteína-DNA el retardo es mayor que cuando la unión es sólo de la proteína al DNA debido al mayor peso molecular del complejo, de ahí el nombre de superretardo.

3.5. CLONADO

Para comprobar el efecto de las regiones 3'UTR de los diferentes genes y del SNP rs4722551 situado en el promotor de miR-148a, se decidió clonar estos fragmentos de DNA en los vectores reporteros luciferasa pmirGLO y pGL3 basic de Promega (Southampton, Reino Unido) para las regiones 3'UTR y para los dos alelos del SNP respectivamente (Fig.M3). Estos vectores contienen el cDNA de la luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*), para posteriormente hacer ensayos luciferasa. Se clonaron las regiones 3'UTR de los genes: *APOB*, *ABCG5*, *ABCG8*, *LDLRAP1*, *PCSK9*, *SREBF1*, *SREBF2* humanas, *Wnt10b* murina y los dos alelos del SNP rs4722551 del promotor de miR-148a humano. Se obtuvieron estos fragmentos de DNA por PCR (Reacción de la polimerasa en cadena) a partir de muestras de DNA genómico (gDNA), de células HepG2 en el caso de los genes humanos y de células 3T3-L1 en el caso de los genes murinos. En el caso de los dos alelos del SNP rs4722551 sólo hubo que subclonar los fragmentos, ya adquiridos a una casa comercial, en el vector pGL3 basic. A continuación se detallan todos los pasos del clonado de DNA, desde el aislamiento y la amplificación de los fragmentos por PCR hasta la posterior ligación en el vector reportero correspondiente, la transformación bacteriana y la extracción del DNA plasmídico.

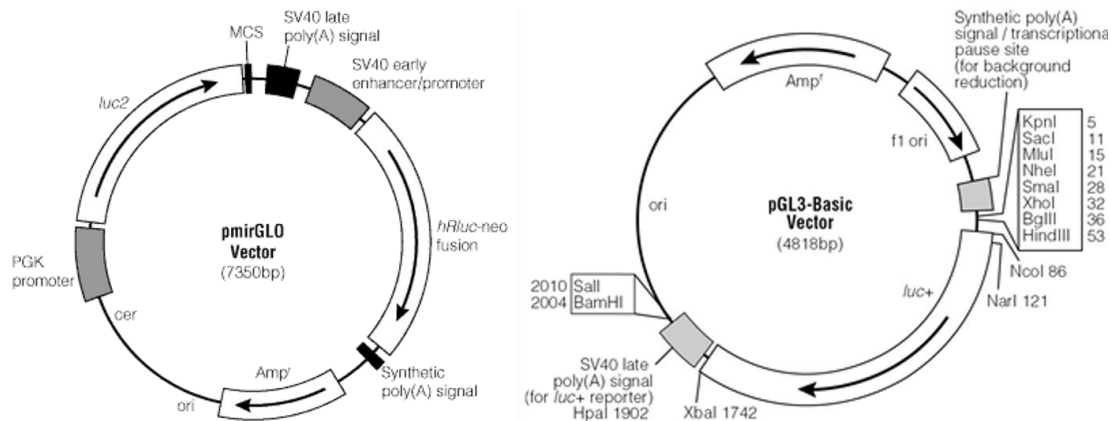


Fig.M3. Mapas de los vectores reporteros luciferasa utilizados en el clonado de las secuencias reguladoras. A la izquierda el pmirGLO, en el que se clonaron las secuencias de regiones 3'UTR, y a la derecha el pGL3 basic, en el que se clonaron ambos alelos del SNP rs4722551 situado en el promotor de miR-148a. Ambos vectores son de la casa comercial Promega.

3.5.1. REACCIÓN DE LA POLIMERASA EN CADENA (PCR)

Se recurrió a la técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction* en inglés) (203), para aislar y amplificar los fragmentos de DNA deseados usando cebadores específicos que flanquearan las regiones 3'UTR por clonar. En esta técnica, los cebadores utilizados se emplean para aislar las regiones elegidas y en sucesivos ciclos con diferentes pasos de temperaturas y tiempos se consigue amplificar el DNA, obteniendo una buena concentración del fragmento ya aislado. Para llevar a cabo los diferentes experimentos de PCR se empleó el kit *Expand High Fidelity PCR System* de Roche (Basilea, Suiza) en un termociclador *C1000™* de BIORAD (California, USA). Para cada reacción de PCR se añadieron: 5 µl de tampón con MgCl₂ 50mM, 1 µl de dNTPs 10mM, 1 µl de gDNA, un volumen de la pareja de cebadores específicos necesaria para la concentración deseada de los mismos, 0,5 µl de la polimerasa y agua miliQ hasta completar un volumen final de 50 µl. La secuencia de los cebadores, con la secuencia de las dianas de restricción en sus extremos 5', así como la concentración de los mismos, utilizadas para cada 3'UTR se muestra en la tabla suplementaria S6. El protocolo de las diferentes reacciones de PCR se basó en un paso inicial de 5 minutos a 95°C para desnaturalizar el DNA, seguido de 40 ciclos con los siguientes pasos: 30 segundos a 95°C para la desnaturalización de la doble hebra de DNA, 30 segundos a una temperatura específica en las diferentes secuencias clonadas para la hibridación de los cebadores, y un paso de elongación a 72°C durante un tiempo de 1 minuto por cada 1000 pares de bases del producto de PCR, aumentando en

5 segundos este tiempo por cada ciclo. Para terminar, se añadió un último paso de elongación a 72°C durante 7 minutos. En la tabla suplementaria S6 se muestran las condiciones de temperatura de fusión y tiempo de elongación para cada caso.

Para la extracción del gDNA de células HepG2 y 3T3-L1 utilizado en las reacciones de PCR se empleó el kit *InstaGen Matrix* de BIORAD (California, USA). Para ello, se cultivaron 10^4 células en una placa P60 con medio de mantenimiento y a las 24 horas se tripsinizaron y se recogieron en un tubo eppendorf de 1,5 ml. Se centrifugaron las células resuspendidas durante 3 minutos a 3000 rpm a temperatura ambiente, desechando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet en 100 µl de agua miliQ. A continuación se añadieron 20 µl de esta suspensión a 200 µl de *InstaGene Matrix* y se incubó la mezcla con agitación durante 30 minutos a 56°C. Transcurrido este tiempo, se agitó la muestra en el vórtex durante 10 segundos y se calentó el tubo a 100°C durante 8 minutos, centrifugándolo para terminar a 12000 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente, y utilizando el sobrenadante resultante como gDNA para las reacciones de PCR.

Una vez terminado el protocolo de PCR se dejaron enfriar las muestras hasta alcanzar la temperatura ambiente y se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% (p/v) con bromuro de etidio en tampón TAE 0,5 % (Tris acetato 0,02 M y 1 mM de EDTA) a 100V durante 15 minutos. Las bandas del gel con el tamaño deseado se resolvieron en un transiluminador de la casa Fotodyne (Wisconsin, USA), cortándolas con un bisturí y purificando el DNA de la agarosa con el *QIAquick Gel Extraction Kit Protocol* de QIAGEN (Hilden, Alemania). Como primer paso de esta purificación, se cortó el gel de agarosa con la banda de DNA, se pasó a un tubo eppendorf de 2 ml y se pesó su contenido. A continuación, se añadieron 300 µl del tampón QG por cada 100 µg de agarosa y se calentó la mezcla a 50°C durante 10 minutos con agitación constante para disolver el gel. Una vez disuelto, se añadieron 100 µl de isopropanol por 100 µg de agarosa pesados al principio y se pasó la mezcla a una columna *QIAquick* para que se uniera a ella el DNA. Se centrifugó a 10000 rpm durante 1 minuto y se desechó el líquido. Tras esto, se añadieron 500 µl de tampón QG y se volvió a centrifugar a 10000 rpm durante 1 minuto, desechando el líquido de nuevo. Se lavó la columna con 750 µl de tampón PE, centrifugando a 10000 rpm durante 1 minuto, y tras desechar el líquido, se secó la columna centrifugándola a 13000

rpm durante 1 minuto. Por último, se eluyó el DNA ya purificado, añadiendo 20 µl de agua miliQ y centrifugando a 10000 rpm durante 1 minuto.

3.5.2. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

También se quiso saber el efecto del miRSNP rs12720763 situado en la región 3'UTR de APOB, el cual, según la herramienta bioinformática *miRBase*, parecía modificar la capacidad de unión de miR-148a-5p a esa región dependiendo del alelo. Para ello, se llevó a cabo la técnica de mutagénesis dirigida, consistente en la variación del sitio concreto del genoma por PCR con cebadores que llevan en su secuencia la mutación puntual que se desea copiar y amplificar. Como primer paso, una vez clonada en el vector reportero pmirGLO la secuencia de la región 3'UTR salvaje de APOB, se mandó a secuenciar, para conocer si poseía el alelo G del SNP.

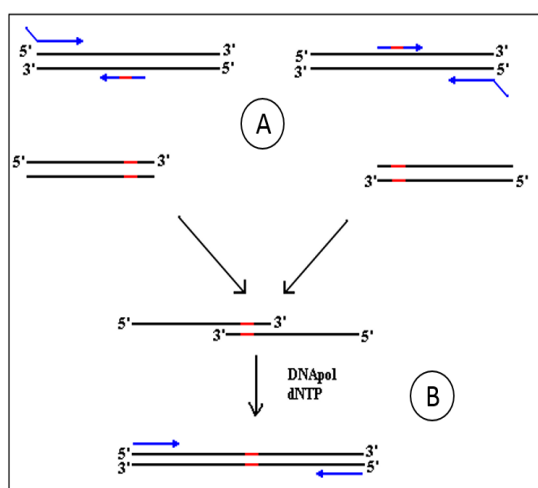


Fig.M4. Proceso de mutagénesis dirigida. A) Primero se llevan a cabo dos reacciones de PCR utilizando un DNA molde: una con el cebador *fw* de la secuencia total del fragmento a clonar y el cebador *re* con la secuencia mutada (en rojo), y otra con el cebador *fw* con la secuencia mutada (en rojo) y el cebador *re* de la secuencia total del fragmento a clonar. Como resultado se obtienen dos fragmentos de DNA bicatenario, ambos con la mutación (en rojo). B) En este paso se lleva a cabo una PCR de fusión con los dos fragmentos de DNA obtenidos en el paso A, utilizando los cebadores *fw* y *re* de la secuencia total a clonar. Como resultado final se obtiene un DNA bicatenario con la secuencia total y la mutación puntual (en rojo).

En el siguiente paso, utilizando como DNA molde el vector pmirGLO con la región 3'UTR de APOB clonada, se llevaron a cabo dos reacciones de PCR: una con el cebador *forward* de la secuencia total y el cebador *reverse* con la secuencia mutada, y otra con el cebador *forward* con la secuencia mutada y el cebador *reverse* de la secuencia total. De esta manera, se consiguieron dos fragmentos de la secuencia 3'UTR de APOB, ambos con la mutación deseada en los extremos de su secuencia. En la tabla suplementaria S7 se muestran las secuencias de los cebadores utilizados en el experimento de mutagénesis. Una vez purificados del gel de agarosa los dos fragmentos, como se explica en el apartado anterior, se llevó a cabo una PCR de fusión en la que se unieron y amplificaron los dos fragmentos dando como resultado el fragmento de DNA con la secuencia de la región

3'UTR de APOB y la mutación correspondiente al alelo T del miRSNP rs12720763. Todo el proceso de la mutagénesis dirigida se explica gráficamente en la figura M4.

Las condiciones de las tres reacciones de PCR fueron las mismas, tanto para las dos reacciones de mutagénesis como para la de fusión. Sólo cambió el DNA molde utilizado, en las dos reacciones de PCR de mutagénesis se utilizaron 5 ng del plásmido del vector pmirGLO con la secuencia de la región 3'UTR de APOB salvaje clonada, y en el caso de la PCR de fusión se utilizaron 5 ng de cada uno de los dos fragmentos de DNA con la mutación en ambos. Se utilizó el kit *Expand High Fidelity PCR System* de Roche, igual que se explica en el apartado anterior, con la siguiente mezcla de reacción: 5 µl de tampón con MgCl₂ 50mM, 1 µl de dNTPs 10mM, la cantidad de DNA antes mencionada para cada caso, 300 nM de cada uno de los cebadores específicos en cada caso, 0,5 µl de la polimerasa y agua miliQ hasta completar un volumen final de 50 µl. El protocolo de las tres reacciones de PCR consistió en un primer paso de desnaturalización de 95°C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos con un paso de desnaturalización de 30 segundos a 95°C, un paso de hibridación de 30 segundos a 55°C y un paso de elongación de 1 minuto a 72°C. Para terminar se añadió un paso de elongación final de 72°C durante 7 minutos.

3.5.3. LIGACIÓN

Una vez eluidos los productos de PCR de las regiones reguladoras de interés, se ligaron en el vector pGEM-T de Promega (Southampton, Reino Unido), con el fin de, una vez ligado el producto de PCR en este vector, transformar las bacterias con el plásmido, crecer estas bacterias y extraer el plásmido con el inserto del producto de PCR. Se añadieron a 3 µl de producto de PCR, 5 µl de tampón de ligación 2X, 1 µl del pGEM-T y 1 µl de DNA ligasa T4 (3 U/µl), dejando la mezcla de ligación a 4°C durante toda la noche y transformando las bacterias a la mañana siguiente. Fueron dos los motivos por los que se decidió clonar primero los productos de PCR en este vector: el primero, para aumentar el número de copias del inserto o producto de PCR, y el segundo, para eliminar de estos productos la cola de poliadeninas (PoliA) que deja la polimerasa utilizada en la PCR, cortando dicha cola con las enzimas de restricción correspondientes. Tanto el protocolo de transformación bacteriana como el de extracción de DNA plasmídico se explican en los dos apartados posteriores de este capítulo.

En el siguiente paso se llevó a cabo la digestión de los dos plásmidos, por un lado el vector reportero vacío (pmirGLO o pGL3 basic), y por otro lado el vector pGEM-T con la región reguladora clonada. Para ello se añadió en tubos eppendorf de 1,5 ml, 1 µg de DNA plásmidico, 1 µl de cada una de las dos enzimas de restricción de Thermo Scientific (Massachusetts, USA), un volumen de tampón *Y-Tango* de la misma casa comercial para una concentración en la mezcla de 1X ó 2X dependiendo de la pareja de enzimas utilizadas y agua miliQ hasta un volumen final de 20 µl. Estas mezclas se incubaron a 37°C durante 2 horas, corriéndolas posteriormente en un gel de agarosa al 1% (p/v) y purificando las bandas del tamaño deseado con la misma metodología que se explica en el apartado 3.5.1. Una vez digeridos y purificados de la agarosa los fragmentos del vector reportero vacío y el inserto de la región reguladora de interés, se procedió a la ligación de ambos.

Previamente a esto, se desfosforiló el vector reportero luciferasa digerido con la *Rapid Alkaline Phosphatase* de Roche (Basilea, Suiza) para evitar su religación. Para ello, se añadió al vector digerido 1 µl de tampón de desfosforilación (0,5 M Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH=8,5) y un 1 µl de fosfatasa alcalina (1 U/µl) en un volumen final de 10 µl. Acto seguido, se incubó a 37°C durante 10 minutos y después a 72°C durante 15 minutos para inactivar el enzima, corriendo a continuación el vector en un gel de agarosa al 1% (p/v) y purificándolo de la banda extraída. Para la ligación del inserto y el vector reportero se utilizaron varias relaciones de concentración de los mismos en varios tubos diferentes junto con 1 µl de enzima *DNA T4 ligasa* de Takara (Otsu, Japón) y 1 µl de tampón de ligación (Tris-HCl 60 mM, pH=7,8, MgCl₂ 20 mM, DTT 20 mM, ATP 2 mM y polietilenglicol al 10%) suministrado junto al enzima, por cada muestra de ligación. También se realizó un control negativo consistente en 1 µl de vector digerido con 9 µl de agua miliQ sin inserto y sin ligasa. Estas mezclas de ligación se incubaron durante toda la noche a 4°C.

3.5.4. TRANSFORMACIÓN

Antes de transformar las mezclas de ligación, éstas se dializaron para evitar interferencias de las sales del tampón de ligación en la transformación. Para ello, se colocaron los 10 µl de la mezcla de ligación en una membrana para la diálisis de diámetro de poro 0,05 µm de Millipore (Massachusetts, USA). Se dejó la membrana con las muestras en una placa Petri con agua miliQ durante 30 minutos a temperatura ambiente,

tras lo cual se añadió la mezcla de ligación, ya dializada, a un tubo eppendorf de 1,5 ml con 50 µl de bacterias *E.Coli DH5α* quimiocompetentes y se incubó en hielo a 4°C durante 1 hora. A continuación, las bacterias con el DNA ligado se sometieron a un choque térmico de 42°C durante 90 segundos, tras lo cual se incubaron a 4°C durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se añadieron 700 µl de medio LB *Luria-Bertoni* (NaCl 10 g/l, Bactotripton 10 g/l y extracto de levadura 5 g/l) diluido en agua miliQ, y se incubó a 37°C durante 1 hora con agitación. Tras esto, se centrifugaron las bacterias a 5000 rpm durante 8 minutos y se resuspendió el pellet en 50 µl de medio LB, distribuyendo este volumen de bacterias en una placa de Petri con LB-agar (NaCl 10 g/l, Bactotripton 10 g/l y extracto de levadura 5 g/l solidificado con Bacto-agar (1,5% p/v)) suplementado con 100 µg/ml de ampicilina, el antibiótico de resistencia. Las placas se dejaron toda la noche en un incubador a 37°C, y a la mañana siguiente se analizaron las colonias bacterianas.

Se quiso saber si las colonias de las placas de Petri eran positivas, es decir, si contenían el plásmido del vector reportero con la secuencia reguladora clonada. Para ello, se picaron las colonias con palillos de madera y se introdujeron en un tubo eppendorf de 1,5 ml con 100 µl de agua miliQ. Se incubó a 100°C durante 5 minutos para lisar las bacterias y se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos. A continuación, se llevó a cabo una reacción de PCR con 1 µl del lisado bacteriano, 6,5 µl de *Taq Mix Polymerase* de Bioline (Londres, Reino Unido) que contenía la polimerasa en su tampón con MgCl₂ y dNTPs, 200 nM de una pareja de cebadores específicos diseñados en nuestro laboratorio para hibridar con el vector pmirGLO o el vector pGL3 basic, según procediese, y agua miliQ hasta un volumen final de 13 µl. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: un paso de desnaturalización de 95°C durante 5 minutos, seguido por 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C, y 72°C durante un tiempo de 1 minuto por cada 1000 pares de bases del inserto clonado. Para terminar se programó un paso de 7 minutos a 72°C para la elongación de los fragmentos. Las colonias bacterianas que resultaron positivas por PCR se enviaron a secuenciar. Como las secuencias fueron clonadas con dos enzimas de restricción diferentes, uno en 5' y otro en 3', se aseguró la correcta orientación 5'-3' del fragmento clonado en el vector.

3.5.5. EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO

Se picó con un palillo una colonia positiva y se añadió a un cultivo de 100 ml de medio LB *Luria Bertoni* suplementado con 100 µg/ml de ampicilina, incubando durante la noche a 37°C con agitación. A la mañana siguiente, se centrifugó a 6000 rpm durante 15 minutos a 4°C el cultivo bacteriano ya crecido, desechando el sobrenadante. Se utilizó el *Plasmid Midi kit purification* de QIAGEN (Helben, Alemania) para extraer el DNA plasmídico. Se añadieron 4 ml de tampón de resuspensión *P1* al pellet celular, pipeteando suavemente hasta conseguir una completa homogeneización de la muestra. A continuación se añadieron 4 ml del tampón de lisis *P2* y se dejó incubando durante 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se añadieron 4 ml de tampón de neutralización *P3* y se incubó la muestra a 4°C durante 15 minutos, tras lo cual, se centrifugó a 6000 rpm durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante se pasó por una columna *QIAGEN-tip 100* previamente equilibrada con 4 ml de tampón *QBT*, para que el DNA se quedara adsorbido. Se hicieron dos lavados pasando dos veces 10 ml de tampón *QC* por la comuna y el DNA plasmídico fue eluído con 5 ml de tampón de elución *QF*. Se añadieron 3,5 ml de isopropanol puro a la muestra eluída y se centrifugó a 6000 rpm durante 2 horas a 4°C en un tubo Falcon para que precipitase el DNA. Se desechó el sobrenadante con sumo cuidado y se lavó el pellet vítreo con 1 ml de etanol al 70 %. Tras dejar secar el pellet al aire durante 10 minutos, se resuspendió en 200 µl de agua miliQ, y la concentración de DNA plasmídico se midió en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 de Thermo Scientific, guardando la muestra a -20°C.

3.6. ENSAYO DE ACTIVIDAD LUCIFERASA

Una vez clonadas las regiones reguladoras de los genes de estudio en los vectores reporteros pmirGLO y pGL3 basic, se realizaron los ensayos de actividad luciferasa. Esta técnica permite estudiar el efecto de una secuencia reguladora clonada en 5' o 3' del gen de la enzima luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) existente en el vector reportero utilizado. Se puede analizar la capacidad reguladora de la secuencia de estudio midiendo la luminiscencia producida por la luciferasa de la muestra, puesto que la cuantificación de la regulación positiva o negativa de la secuencia varía en función de la luminiscencia producida por la muestra, que a su vez depende del número de copias de enzima

luciferasa traducidas. Los resultados de luminiscencia se presentan como relativos a la cuantificación del vector reportero vacío, es decir, sin ninguna región clonada en los extremos del gen de la luciferasa de luciérnaga. Como normalizador, el vector reportero pmirGLO utilizado tiene el gen de la luciferasa de pensamiento de mar (*Renilla reniformis*) que también emite luminiscencia y no varía de una muestra a otra. En el caso del vector pGL3 basic, éste no tiene el gen de la luciferasa de *Renilla*, por lo que es necesario cotransfectar con otro vector que la exprese para poder normalizar los resultados.

En el primer paso del experimento se sembraron 10^5 células HepG2 o 5×10^4 células 3T3-L1 por cada pocillo en una placa adherente de cultivo T6. A las 24 horas se transfectaron las células con los plásmidos que contenían el vector reportero con las secuencias reguladoras de interés clonadas, además del control consistente en el vector pmirGLO o pGL3 basic vacíos, es decir, sin ninguna secuencia de DNA clonada. Para la transfección se utilizó el reactivo jetPEI de Polyplus.

En tubos eppendorf independientes se añadieron, por un lado 1 µg del plásmido con 100 µl de NaCl 150 mM por cada pocillo y por otro lado, 2 µl de jetPEI por cada µg de DNA total a transfectar junto con 100 µl de NaCl 150 mM por cada µg de DNA total. Cuando se quiso cotransfectar inhibidores de miRNAs junto con los plásmidos, se añadió 1 µl a una concentración de 20 µM de estos inhibidores a la solución de DNA con NaCl. Tras mezclar todas las muestras en el vórtex y centrifugarlas suavemente, se añadió la disolución de jetPEI a cada uno de los tubos con el DNA gota a gota. A continuación se volvieron a mezclar las muestras con el vórtex y se centrifugaron suavemente, tras lo cual los tubos con la mezcla de DNA y jetPEI se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se añadió la mezcla de transfección de DNA y jetPEI gota a gota a los pocillos con las células en 1 ml de medio de cultivo fresco (DMEM-Glutamax suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, 100 UI de penicilina y 100 mg/ml de estreptomycin). A las 24 horas se añadió 1 ml del mismo medio de cultivo a cada uno de los pocillos, y otras 24 horas después se realizó el experimento de actividad luciferasa.

Para medir la actividad luciferasa se utilizó el kit *Dual-Luciferase Reporter Assay System* de Promega (Southampton, Reino Unido). Como primer paso, se lavaron las células dos veces con PBS, tras lo cual se añadieron 250 µl del tampón *Passive Lysis* al 1X diluido en agua miliQ. Las células se incubaron en este tampón durante 10 minutos a

temperatura ambiente y se centrifugaron a 14000 rpm durante 5 minutos a 4°C, obteniéndose un sobrenadante que contenía los extractos proteicos. A continuación se midió la actividad luciferasa de estos extractos en un luminómetro *TD 20/20* de Turner Designs (California, USA), añadiendo 75 µl de *LarII* (sustrato de la luciferasa de luciérnaga) a una alícuota de 20 µl de extractos y midiendo la luminiscencia de la muestra. Tras esto, se añadieron 75 µl de *Stop&Glo* (inhibidor de la reacción anterior y sustrato de la luciferasa de *Renilla*) al 1X y se midió la luminiscencia otra vez para normalizar el resultado obtenido anteriormente.

Para cada una de las muestras se realizó la transfección y la medida de la actividad luciferasa por duplicado. El resultado final para cada muestra fue la actividad de la luciferasa de luciérnaga dividida entre la actividad de la luciferasa de *Renilla* como normalizador.

3.7. ENSAYO DE ELISA DE APOB

Se llevó a cabo un ensayo de ELISA de APOB en células HepG2 transfectadas con los inhibidores de miR-148a-3p por un lado y miR-148a-5p por otro lado, con el propósito de determinar la variación de la concentración de esta proteína en el medio de estas células. El fin último del experimento fue el análisis del efecto de la inhibición de estos miRNAs en los niveles de APOB, componente mayoritario de las partículas VLDL. Se utilizó un kit comercial de detección de APOB por ELISA de la casa Mabtech (Nacka Strand, Suecia).

Se sembraron 10⁴ células HepG2 por pocillo en una placa T24 y a las 24 horas se transfectaron los inhibidores de miR-148a-3p y miR-148a-5p además del control *non-target*, los tres por duplicado, con la metodología que se indica en el apartado 3.1.3, siendo su concentración final de 40 nM. Ocho horas después de la transfección se cambió el medio de mantenimiento por medio DMEM-Glutamax con 100 UI de penicilina y 100 mg/ml de estreptomicina sin suero, suplementando con 200 nM de ácido oleico. Transcurridas 16 horas se recogieron los medios de los diferentes pocillos y se diluyeron en una relación 1:10 en tampón de incubación (PBS 1X, Tween-20 0,05% (v/v) y BSA 0,1% (p/v)). Como primer paso del ensayo se añadieron a cada pocillo de una placa de ELISA 100 µl de un anticuerpo específico contra APOB a una concentración de 2 µg/ml diluido

en PBS 1X, y se dejó incubando toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente se desechó el anticuerpo y se lavaron los pocillos dos veces con 200 µl de PBS 1X, tras lo cual, se añadieron 200 µl de tampón de incubación (PBS 1X, Tween-20 0,05% (v/v) y BSA 0,1% (p/v)) y se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora.

Pasado este tiempo de incubación se desechó el líquido y se lavaron los pocillos tres veces con 200 µl de tampón de lavado (PBS 1X y Tween-20 0,05%). A continuación se añadieron a los pocillos los medios celulares diluidos 1:10 además de los estándares de APOB proporcionados por el propio kit para hacer la recta patrón. Se incubó 2 horas a temperatura ambiente y se volvió a lavar tres veces cada pocillo con 200 µl de tampón de lavado. Finalizados estos lavados, se añadieron 100 µl de anticuerpo biotinilado contra APOB a una concentración de 1 µg/ml y se incubó 1 hora a temperatura ambiente, tras lo cual se desechó el líquido de los pocillos y se lavó tres veces con tampón de lavado. A continuación se añadieron 100 µl por pocillo de estreptavidina-HRP diluida 1:1000 en tampón de incubación, y se dejó incubando durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras volver a lavar tres veces los pocillos con 200 µl de tampón de lavado, se añadieron 100 µl por pocillo de una solución de peróxido de hidrógeno al 30% y TMB, y se dejó llevar a cabo la reacción durante 20 minutos. Transcurridos estos 20 minutos, se paró la reacción añadiendo 50 µl de H₂SO₄ 2N y se midió la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro, sustrayendo el valor de absorbancia a 540 nm.

Finalmente, los datos se interpolaron en una recta patrón con los valores de absorbancia de los estándares de APOB, y se normalizaron por la cantidad de proteína de los lisados celulares cuantificada en un fluorímetro *Qubit 2.0* de Life Technologies.

3.8. ENSAYO DE ELISA DE Wnt5b

Se realizó un ensayo de ELISA para determinar los niveles de la proteína Wnt5b en células 3T3-L1 tratadas con el inhibidor de miR-148a-3p. Para ello se utilizó un kit de detección de ELISA para Wnt5b *ELISA Assay Kit* de Mybiosource (California, USA). Como primer paso, se sembraron 10⁴ células 3T3-L1 en pocillos de placas T24 y a las 24 horas se transfectaron el inhibidor de miR-148a-3p y el control *non-target* como se indica en el apartado 3.1.3, con una concentración final de 40 nM. 12 horas después de la transfección

se reemplazó el medio de cultivo por medio compuesto por DMEM-Glutamax con 100 UI de penicilina y 100 mg/ml de estreptomicina sin ningún tipo de suero. Transcurridas otras 12 horas se recogieron los medios de los diferentes pocillos por un lado, para el experimento de detección de Wnt5b, y se lisaron las células por otro lado, para cuantificar la cantidad de proteína y normalizar los resultados.

Para la lisis celular se tripsinizaron las células y una vez recogidas éstas en tubos eppendorf se les añadió 250 µl de un tampón de lisis consistente en detergente NP-40 al 0,05% (p/v) y SDS al 0,1% (p/v) diluidos en agua miliQ, resuspendiendo vigorosamente con la pipeta. La mezcla se incubó durante 20 minutos a 4°C y a continuación se centrifugó a 12000 rpm 10 minutos a 4°C, teniendo como resultado un pellet que se desechó y un sobrenadante con la fracción proteica que se utilizó para cuantificar en un fluorímetro *Qubit 2.0* de Life Technologies la concentración proteica de las muestras. El objeto de la cuantificación es normalizar los resultados por cantidad de proteína total de cada una de las muestras.

Se añadieron a los pocillos del kit de ELISA 100 µl de los diferentes medios por duplicado, además de 100 µl de los estándares de proteína Wnt5b que se proporcionan en el kit con diferentes concentraciones conocidas. Se incubaron las muestras durante 2 horas a 37°C, tras lo cual se retiró el líquido y se añadieron 100 µl de anticuerpo de biotina 1X por pocillo, incubando esta vez durante 1 hora a 37°C. Transcurrido este tiempo se desechó el líquido y se lavaron los pocillos tres veces con 200 µl del tampón de lavado proporcionado en el kit de ELISA, añadiendo 100 µl de HRP-avidina 1X una vez que los pocillos se secaron completamente. Se volvieron a incubar las muestras durante 1 hora a 37°C, y una vez acabado este tiempo se volvió a desechar el líquido y se lavó cinco veces con 200 µl de tampón de lavado. Se añadieron 90 µl de sustrato TMB a cada pocillo y se incubó a 37°C 30 minutos en un lugar oscuro con total protección de la luz. Finalizada esta última incubación se añadieron 50 µl de la solución de *Stop* y se agitó la placa para que se mezclara correctamente y la reacción se llevara a cabo. Se midió la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro, interpolándose los datos en una recta patrón con los valores de absorbancia de los estándares de Wnt5b proporcionados en el kit. Como se dijo anteriormente, los valores de las muestras se normalizaron por la cantidad de proteína cuantificada en los lisados celulares.

3.9. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (ChIP)

Se utilizó la técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con el kit de la casa comercial Diagenode (Lieja, Bélgica) para comprobar la posible unión de Nr5a2 al promotor de miR-148a murino. Previamente a esto, se analizó mediante el uso de la herramienta bioinformática ChIP Mapper, la hipotética unión de TFs en el promotor de miR-148a, hallándose un sitio de unión para Nr5a2 a -1532 pb del inicio de la transcripción. El ChIP es una técnica ampliamente utilizada para analizar sitios de unión de TFs en regiones concretas del genoma. En dicha técnica la cromatina es cortada en pequeños fragmentos, a los cuales están unidos los diferentes TFs. Las muestras con estos pequeños fragmentos del genoma se inmunoprecipitan con un anticuerpo contra la proteína de estudio, la cual permanece unida a sus regiones específicas de DNA. Tras este proceso, se lleva a cabo una qPCR con los fragmentos de DNA purificados de la inmunoprecipitación, mediante el uso de cebadores específicos para esas regiones. Si tiene lugar un aumento de la amplificación respecto a los controles, significa que la muestra está enriquecida con el TF de estudio, por lo que se puede demostrar así la unión de dicho factor de transcripción a esa región concreta del genoma.

Como primer paso se cultivaron en tres placas de cultivo P150, 10^6 células 3T3-L1 por placa, una se utilizó para inmunoprecipitar la proteína de estudio Nr5a2 y las otras dos como controles negativos, una para inmunoprecipitar la inmunoglobulina G (IgG) y otra la RNA polimerasa II (PolII). Cuando las células llegaron a la confluencia total (unas 10^7 células por placa) se tripsinizaron transfiriéndose a continuación a tubos Falcon de 50 ml. Se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C, tras lo cual se desechó el sobrenadante, añadiendo a continuación al pellet 15 ml de *tampón C* frío proporcionado en el kit para fijar las células. Tras homogeneizar las muestras celulares con la pipeta se incubó durante 10 minutos con agitación constante a 4°C en la cámara fría. Transcurrido este tiempo se centrifugó otra vez a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C, desechando nuevamente el sobrenadante y resuspendiendo el pellet resultante en 300 µl de una mezcla del *tampón D* del kit con inhibidores de proteasas (12 µl de inhibidores de proteasas y 288 µl de *tampón D*) para lisar las células. Estos lisados se sonicaron para fragmentar la cromatina en un Bioruptor de la casa Diagenode (Lieja, Bélgica) con un protocolo de 15 ciclos 30 segundos ON y 30 segundos OFF a 0°C, tras lo cual las muestras

se pasaron a tubos eppendorf de 2 ml. Se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se pasaron 30 µl del sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf de 1,5 ml para llevar a cabo la inmunoprecipitación, guardando el sobrante a -20°C.

Se añadieron 269,5 µl de mezcla de incubación para inmunoprecipitación (6 µl de BSA, 10 µl de inhibidores de fosfatasas, 60 µl de *tampón E*, 30 µl de beads de proteína G previamente lavadas y 163,5 µl de agua miliQ) a los 30 µl de sobrenadante de cada muestra recogidos anteriormente. A continuación se añadieron 2 µg del anticuerpo específico contra Nr5a2 *Anti-NR5A2 antibody ab18293* de Abcam, 2 µg del anticuerpo anti-IgG y 2 µg del anticuerpo anti-PolIII al tubo del experimento y los dos controles negativos respectivamente, incubando las muestras con los anticuerpos durante toda la noche a 4°C en una noria a 150 rpm. A la mañana siguiente se centrifugaron las muestras durante 2 minutos 3000 rpm a 4°C, desechando el sobrenadante y lavando el pellet que contenía las *beads* con las proteínas inmunoprecipitadas con 350 µl de tampón de lavado frío. Se incubó a 4°C durante 5 minutos en una noria a 150 rpm y se centrifugó durante 2 minutos a 4000 rpm, desechando el sobrenadante y repitiendo este proceso de lavado otras cuatro veces. Finalizados los lavados, se eluyó el complejo DNA-proteínas-beads. Para ello, se añadieron 400 µl de *tampón F* del kit (tampón de elución) y se incubó la mezcla durante 20 minutos a temperatura ambiente en una noria a 150 rpm, centrifugando después a 3000 rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se transfirió el sobrenadante, que contenía el DNA eluído con las *beads*, a tubos eppendorf de 1,5 ml limpios.

Se le añadió al DNA eluído 16 µl de NaCl 5M y se dejó la mezcla incubando en un termoagitador durante 4 horas a 65°C. Finalizado este proceso, se dejaron enfriar las muestras hasta alcanzar la temperatura ambiente y se añadieron 400 µl de una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico en proporciones volumétricas de 25:24:1, tras lo cual, se centrifugó a 13000 rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente. Como resultado de esta centrifugación se obtuvo una fase acuosa en la parte superior del sobrenadante, la cual se transfirió a un tubo eppendorf limpio de 1,5 ml. Se añadieron 400 µl de una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico en proporciones volumétricas de 24:1 y se agitó en el vórtex durante 5 segundos. Se centrifugó a 13000 rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente y de nuevo se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio, añadiendo

después 5 µl de coprecipitante de DNA, proporcionado por el kit, y 1 ml de etanol frío al 100%. Esta mezcla se agitó suavemente y se dejó a -20°C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 13000 rpm durante 25 minutos a 4°C, añadiendo posteriormente al pellet 500 µl de etanol frío al 70%. Se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y se dejaron los tubos abiertos durante 30 minutos para que se secase bien el pellet. Una vez secado, el pellet que contenía el DNA ya purificado se resuspendió en 200 µl de agua miliQ, llevando a cabo posteriormente la qPCR con este DNA. Para la qPCR se utilizó el mismo protocolo que se indica en el apartado 3.2.3 de esta tesis doctoral, añadiendo 1 µl de las distintas muestras de DNA purificadas en el ChIP por cada reacción de qPCR y usando tres parejas de cebadores específicos en unas condiciones determinadas (Tabla suplementaria S8), que hibridaban con la secuencia en la que hipotéticamente se unía Nr5a2.

RESULTADOS

"Las ciencias tienen las raíces amargas,
pero muy dulces los frutos".

Aristóteles

4.1. ANÁLISIS FUNCIONAL DE REGIONES 3'UTR DE GENES ASOCIADOS A HIPERCOLESTEROLEMIAS HEREDITARIAS

Como inicio del trabajo se eligieron varios genes humanos importantes relacionados con hipercolesterolemias hereditarias (HH) para realizar análisis funcionales de sus regiones 3'UTR y comprobar si estaban o no regulados negativamente por miRNAs. Los siete genes candidatos elegidos para el estudio fueron: *APOB*, *ABCG5*, *ABCG8*, *LDLRAP1*, *PCSK9*, *SREBF1* y *SREBF2*.

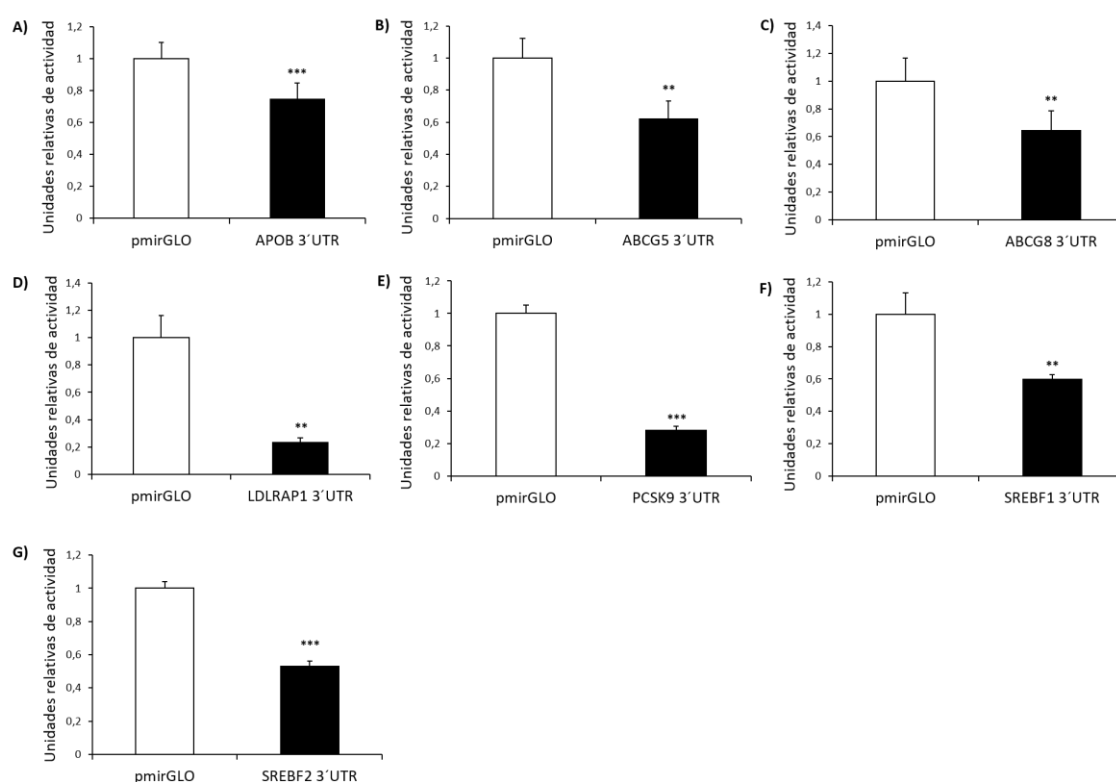


Fig.R1. Resultados de los experimentos de actividad luciferasa para las regiones 3'UTR de A) APOB, B) ABCG5, C) ABCG8, D) LDLRAP1, E) PCSK9, F) SREBF1 y G) SREBF2. Con un número de experimentos por duplicado de n=3 a n=6, dependiendo de la región 3'UTR estudiada, se muestran unas disminuciones de la actividad respecto al control (vector pmirGLO vacío) del 23% en APOB, 38% en ABCG5, 36% en ABCG8, 77% en LDLRAP1, 72% en PCSK9, 41% en SREBF1 y 47% en SREBF2. Todas las variaciones en la actividad luciferasa fueron estadísticamente significativas. **p<0,01, ***p<0,005.

Una vez elegidos los genes candidatos para el estudio se analizaron bioinformáticamente sus secuencias 3'UTR con los dos programas informáticos <http://www.targetscan.org/> y <http://www.mirbase.org>, comprobando que todos estos genes podrían estar *a priori* regulados por miRNAs. Tras los análisis bioinformáticos, se diseñaron cebadores específicos para aislar y amplificar por PCR las secuencias 3'UTR de

los diferentes genes utilizando como molde gDNA de la línea celular HepG2. Tras conseguir aislar las diferentes regiones 3'UTR, comprobando a continuación que las secuencias eran las correctas, se clonaron en el vector reportero luciferasa pmirGLO para realizar los análisis funcionales de estas secuencias reguladoras. Se transfectaron en células HepG2 los plásmidos que contenían las regiones 3'UTR de los siete genes de estudio y se realizaron los ensayos de actividad luciferasa 48 horas después de la transfección. Los resultados de los experimentos (Fig.R1) mostraron que todas las regiones 3'UTR estudiadas podrían estar sometidas a regulación negativa por miRNAs, ya que se observó una disminución de entre un 23% y un 77% en la actividad luciferasa de estas regiones relativa al valor del vector pmirGLO vacío como control.

4.2. ANÁLISIS FUNCIONAL DEL miRSNP rs12720763 LOCALIZADO EN LA REGIÓN 3'UTR DE APOB

Se halló un miRSNP, rs12720763, en la región 3'UTR de APOB a 180 pb del codón de stop, sin ningún análisis funcional ni estudio de asociación previos. Como punto de partida se realizó un análisis bioinformático para los dos alelos del SNP (Tabla R1) mediante el uso del programa <http://www.mirbase.org> con el objeto de saber si el SNP provocaba un cambio de afinidad de uno o varios miRNAs por la secuencia diana. Los datos bioinformáticos indicaban que el alelo T del SNP eliminaba el sitio de unión del miRNA miR-148a-5p en la región 3'UTR de APOB.

A)

Sequence search results
Matches for your nucleotide sequence

Accession	ID	Query start	Query end	Subject start	Subject end	Strand	Score	Evalue	Alignment
MIMAT0004549	hsa-miR-148a-5p	19	36	3	20	-	63	3.0	Align
MIMAT0004617	mmu-miR-148a-5p	19	36	3	20	-	63	3.0	Align
MIMAT0019065	hsa-miR-4526	5	21	1	17	+	58	7.9	Align
MIMAT0009852	tta-miR-1225-3p	8	22	1	15	-	57	9.5	Align

Alignment of Query to mature miRNAs

B)

Sequence search results
Matches for your nucleotide sequence

Accession	ID	Query start	Query end	Subject start	Subject end	Strand	Score	Evalue	Alignment
MIMAT0007651	gga-miR-1746	7	23	2	18	-	58	7.9	Align
MIMAT0019065	hsa-miR-4526	5	19	1	15	+	57	9.5	Align

Alignment of Query to mature miRNAs

Tabla R1. Resultados de los análisis bioinformáticos para el A) alelo G y B) alelo T, del SNP rs12720763, llevados a cabo con el programa bioinformático <http://www.mirbase.org>. Se predice que el alelo T del SNP elimina el sitio de unión de miR-148a-5p en la secuencia 3'UTR de APOB.

Para determinar si efectivamente el miRSNP rs12720763 provocaba cambios funcionales se recurrió a la técnica del ensayo luciferasa. Como primer paso para realizar el análisis funcional del SNP se obtuvo el alelo T, minoritario, por mutagénesis dirigida usando como molde el alelo G ya clonado anteriormente en el vector reportero pmirGLO. Los plásmidos con la región 3'UTR de APOB con ambos alelos del SNP se transfectaron en células HepG2 y se llevaron a cabo los ensayos de actividad luciferasa. Los resultados de dichos experimentos (Fig.R2) mostraron una disminución estadísticamente significativa del 10% en la actividad luciferasa del alelo T respecto al alelo G, en cinco experimentos independientes.

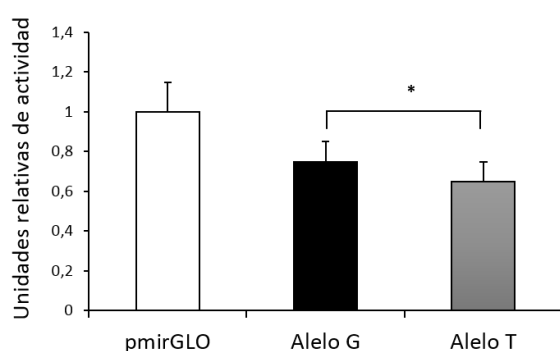


Fig.R2. Resultados de los experimentos de actividad de luciferasa para los dos alelos del SNP rs12720763. Con un número de experimentos por duplicado de $n=5$, el resultado promedio muestra que el alelo T induce una disminución de la actividad de un 10% con respecto al alelo G, utilizando como control la actividad luciferasa del vector pmirGLO vacío. * $p<0,05$.

De los resultados anteriores se dedujo que el miRSNP rs12720763 era un SNP funcional, aunque la actividad luciferasa del alelo T era menor que en el alelo G, lo que parecía ser contrario a la predicción bioinformática que predecía la pérdida del sitio de unión de miR-148a-5p en el alelo T, lo que haría aumentar teóricamente la actividad luciferasa. Para comprobar el efecto de los dos miRNAs maduros del miR-148a sobre los dos alelos del SNP en la región 3'UTR de APOB se cotransfectaron en células HepG2 sendos inhibidores para miR-148a-3p y miR-148a-5p de manera independiente junto con los plásmidos que contenían los dos alelos del SNP. Los resultados de los ensayos luciferasa determinaron que tanto la inhibición de miR-148a-3p (Fig.R3A) como la de miR-148a-5p (Fig.R3B) producían un aumento no estadísticamente significativo en la actividad luciferasa en ambos alelos del SNP. Por lo tanto, parecía ser que ambos miRNAs maduros tenían un ligero efecto inhibitorio en la región 3'UTR de APOB, pero este efecto era independiente del miRSNP rs12720763.

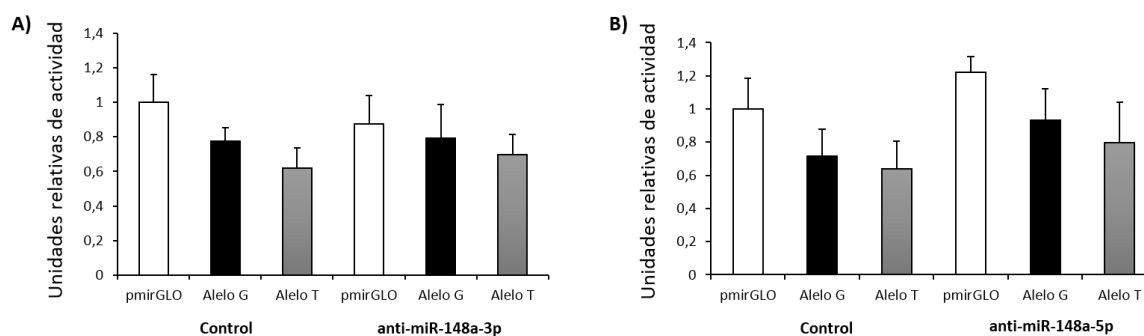


Fig.R3. Resultados de los experimentos de actividad luciferasa para ambos alelos del SNP rs12720763 con la inhibición de A) miR-148a-3p y B) miR-148a-5p en células HepG2. Se utilizó como control de la actividad de las regiones 3'UTR la actividad del vector pmirGLO vacío, y como control para los inhibidores de miRNAs un oligonucleótido *non-target* cotransfectado en las células HepG2. Los valores promedio de n=5 experimentos independientes, muestran un aumento de la actividad luciferasa, de 1,1 veces respecto al control para ambos alelos en el caso de la inhibición de miR-148a-3p, y un aumento de 1,3 veces respecto al control en la actividad para ambos alelos del SNP en el caso de la inhibición de miR-148a-5p. Estos cambios no son estadísticamente significativos.

4.3. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE miR-148a-3p Y miR-148a-5p SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE APOB

Visto el efecto producido por los inhibidores de los dos miRNAs en la región 3'UTR de *APOB* en los ensayos luciferasa, y con el objeto de conocer el efecto de la inhibición de miR-148a-3p y miR-148a-5p sobre la expresión génica de *APOB*, se transfectaron los inhibidores de ambos miRNAs antes utilizados, en células HepG2 para realizar experimentos de qPCR y ensayos de ELISA para APOB.

4.3.1. VALIDACIÓN DEL MODELO DE INHIBICIÓN DE miR-148a-3p Y miR-148a-5p EN CÉLULAS HepG2

Antes de medir la expresión de *APOB* por qPCR se llevó a cabo la validación del modelo de inhibición de miR-148a-3p y miR-148a-5p en células HepG2, para comprobar si realmente los inhibidores de miRNAs estaban resultando efectivos. Para ello, se transfectaron los inhibidores de miR-148a-3p y miR-148a-5p paralelamente en células HepG2 y se midió su expresión por qPCR 24 horas después de la transfección. Los resultados de los experimentos mostraron una inhibición estadísticamente significativa de la expresión de los dos miRNAs, un descenso de un 92% en el caso de miR-148a-3p (Fig.R4A) y de un 65% en el caso de miR-148a-5p (Fig.R4B).

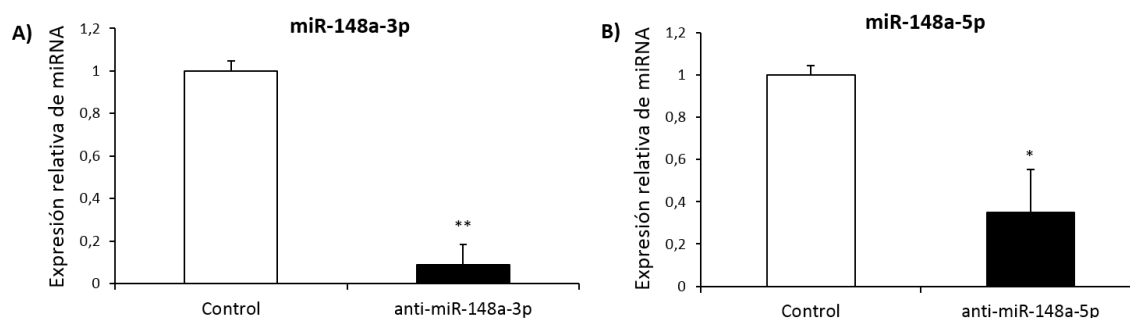


Fig.R4. Resultados de expresión por qPCR de A) miR-148a-3p y B) miR-148a-5p con sendos miRNAs inhibidos en células HepG2, como validación del modelo de inhibición. Los valores promedio de $n=3$ experimentos independientes muestran una disminución estadísticamente significativa del 92% en la expresión de miR-148a-3p cuando es inhibido, y del 65% en la expresión de miR-148a-5p cuando es inhibido. Como control se utilizó la expresión de los miRNAs en células HepG2 transfectadas con el oligonucleótido *non-target*. * $p<0,05$, ** $p<0,01$.

Asimismo, también se midió por qPCR la expresión relativa de ambos miRNAs maduros en las células HepG2 para conocer cuál de los dos era el miRNA mayoritario del dúplex. Los resultados de expresión (Fig.R5) determinaron que miR-148a-3p era 43 veces más abundante que miR-148a-5p en este modelo celular.

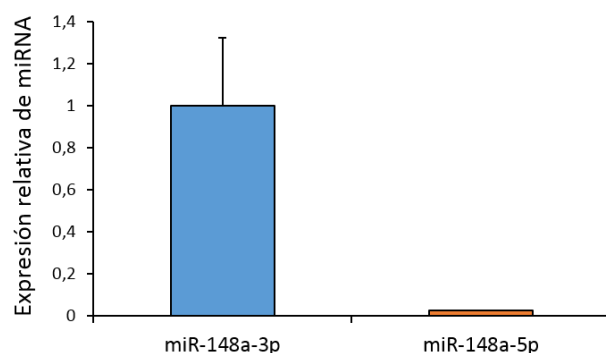


Fig.R5. Resultados de expresión relativa por qPCR de los dos miRNAs maduros miR-148a-3p y miR-148a-5p en células HepG2. Con un número de experimentos de $n=4$, los resultados promedio muestran una expresión 43 veces mayor de miR-148a-3p respecto a miR-148a-5p.

4.3.2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE *APOB*.

Una vez determinada la validez del modelo de inhibición de miR-148a-3p y miR-148a-5p en células HepG2, se llevó a cabo el estudio de la expresión de *APOB* mediante qPCR y ensayo de ELISA para comprobar si el efecto visto en los ensayos de actividad luciferasa con la inhibición de los dos miRNAs era el mismo o mayor si cabe sobre la expresión génica de *APOB*. Para ello se transfectaron los inhibidores tanto de miR-148a-3p como de miR-148a-5p de manera paralela en células HepG2, añadiendo ácido oleico 8 horas después de la transfección para estimular la síntesis de *APOB* y partículas VLDL. Otras 16 horas después de añadir el ácido oleico se extrajo el RNA y se realizó la qPCR y el ensayo de ELISA. Los resultados de la qPCR (Fig.R6A) demostraron un

aumento estadísticamente significativo de la expresión de *APOB* con la inhibición de ambos miRNAs, siendo mayor en el caso de la inhibición de miR-148a-5p. A su vez, los resultados de los ensayos de ELISA (Fig.R6B) para APOB con los que se midió también la síntesis de partículas VLDL, corroboraron los datos obtenidos con los experimentos de qPCR. Tanto la inhibición de miR-148a-3p como de miR-148a-5p estaban produciendo un aumento en la expresión de *APOB* en células HepG2.

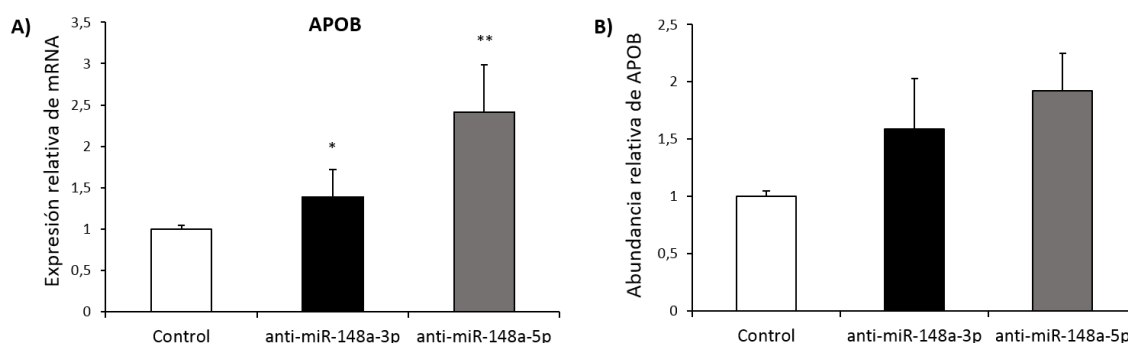


Fig.R6. A) Resultados de expresión de *APOB* por qPCR con el tratamiento de los inhibidores de miR-148a-3p y miR-148a-5p en células HepG2. En el promedio de n=4 experimentos independientes se observa un aumento estadísticamente significativo en la expresión de *APOB*, de 1,4 veces con miR-148a-3p inhibido y de 2,4 veces con miR-148a-5p inhibido, respecto al control (oligonucleótido *non-target*). * p<0,05, ** p<0,01. B) Resultados de los ensayos de ELISA para APOB. Se muestran los valores relativos de la proteína en el medio de células HepG2 tratadas con sendos inhibidores respecto al control (oligonucleótido *non-target*). Con un número de n=2 experimentos, los resultados, normalizados con la cantidad de proteína total, muestran un aumento en los niveles de APOB de 1,6 veces cuando miR-148a-3p es inhibido y de 1,9 veces cuando miR-148a-5p es inhibido, respecto al control.

4.4. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE miR-148a-3p SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE *PCSK9* Y *LDLR*

Tras analizar el efecto de la inhibición del miRNA más abundante del dúplex, miR-148a-3p, sobre la expresión de *APOB*, se quiso estudiar el efecto regulador de este miRNA sobre la expresión de los genes *PCSK9* y *LDLR* en células HepG2, debido a la importancia de ambos en el reciclaje de partículas LDL en el hígado. Para ello, se transfectó el inhibidor de miR-148a-3p en células HepG2, repitiendo las condiciones experimentales del análisis de expresión de *APOB*. Ocho horas después de la transfección se añadió a las células ácido oleico y transcurridas otras 16 horas se extrajo el RNA para realizar la qPCR, cuyo resultado (Fig.R7A) indicó un aumento estadísticamente significativo de 1,3 veces en la expresión de *PCSK9* en presencia del inhibidor del miRNA respecto al control. Determinado el aumento sobre la expresión de *PCSK9* y *APOB* en células HepG2 debido a

la inhibición de miR-148a-3p, se decidió analizar mediante qPCR el efecto producido en la expresión de *LDLR* en células HepG2. Los resultados de (Fig.R7B) no mostraron variación alguna en los niveles de expresión de *LDLR* en presencia del inhibidor de miR-148a-3p respecto al control en células HepG2.

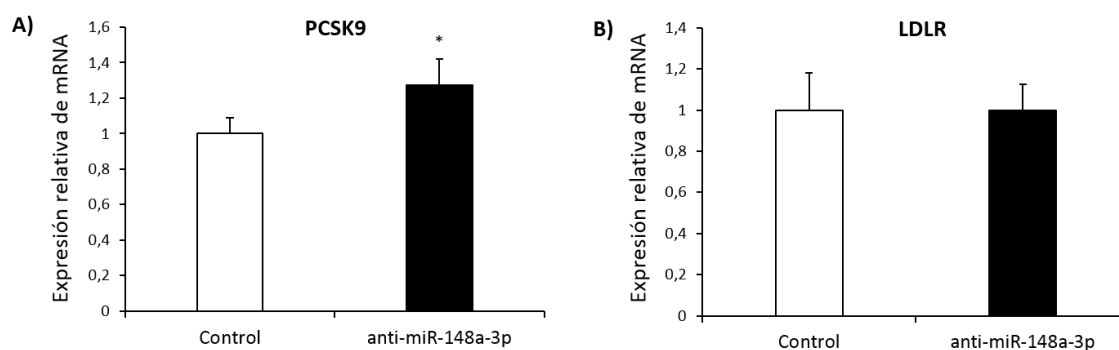


Fig.R7. Resultados de expresión por qPCR de los genes A) *PCSK9* y B) *LDLR* en células HepG2 transfectadas con el inhibidor miR-148a-3p respecto a las transfectadas con el control (oligonucleótido *non-target*). El valor promedio de n=4 experimentos independientes muestra un aumento estadísticamente significativo de 1,3 veces en la expresión de *PCSK9* cuando miR-148a-3p es inhibido respecto al control. En el caso de *LDLR* no se aprecian cambios en su expresión. * p<0,05

4.5. ESTUDIO DEL EFECTO DE miR-148a-3p EN LA DIFERENCIACIÓN DE ADIPOCITOS EN CÉLULAS 3T3-L1

Buscando en la bibliografía, se halló un trabajo en el que se demostraba que la expresión de miR-148a-3p aumentaba en células 3T3-L1 ya diferenciadas respecto a preadipocitos 3T3-L1 sin diferenciar (198). A la vista de esta información, se decidió analizar el efecto de miR-148a-3p sobre la diferenciación de adipocitos en el modelo de células 3T3-L1. Para abordar este estudio se llevó a cabo la inhibición de la expresión del miRNA en cuestión en este modelo celular.

4.5.1. VALIDACIÓN DEL MODELO DE INHIBICIÓN DE miR-148a-3p EN CÉLULAS 3T3-L1

Para inhibir la expresión de miR-148a-3p en células 3T3-L1 se utilizó un inhibidor específico para este miRNA, el cual se transfectó 24 horas antes de comenzar el proceso de diferenciación adipocítica. Como control se utilizaron células transfectadas con un oligonucleótido *non-target*, el cual no hibridaba con ninguna región del genoma. Se recogieron muestras de RNA en el día 0 y en el día 9 de la diferenciación de adipocitos, tanto de células 3T3-L1 transfectadas con el inhibidor como de células transfectadas con el control, y se analizó la expresión de miR-148a-3p por qPCR.

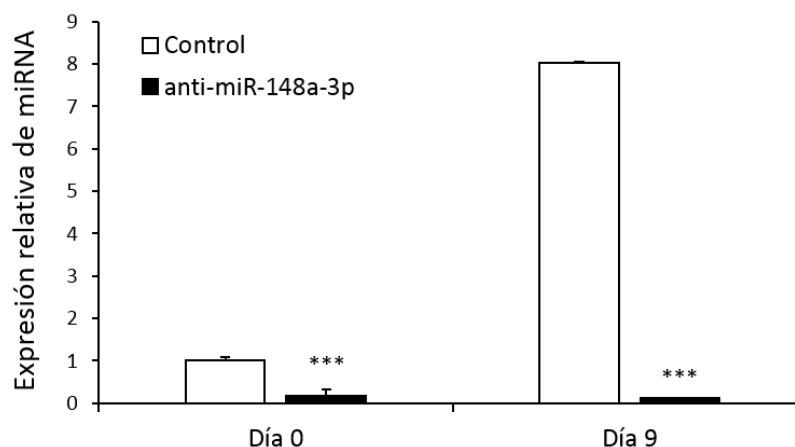


Fig.R8. Validación por qPCR del modelo de inhibición de miR-148a-3p en células 3T3-L1 sin diferenciar (Día 0) y diferenciadas durante 9 días (Día 9). Se muestran los valores de expresión en células transfectadas con el inhibidor de miR-148a-3p, relativos a la expresión en células transfectadas con el oligonucleótido *non-target* como control. Los valores promedio de n=4 experimentos independientes muestran una disminución estadísticamente significativa en la expresión de miR-148a-3p del 82% en células 3T3-L1 no diferenciadas y del 98% en células 3T3-L1 diferenciadas, cuando el miRNA es inhibido. También se puede observar el aumento de 8 veces en la expresión de miR-148a-3p en células 3T3-L1 diferenciadas respecto a células 3T3-L1 no diferenciadas. *** p<0,001.

Los resultados (Fig.R8) mostraron la validación del modelo de estudio en células 3T3-L1, ya que con una sola transfección de inhibidores en una concentración de 40 nM 24 horas antes de iniciar la diferenciación, se conseguía una inhibición de la expresión de miR-148a-3p del 82% respecto al control en preadipocitos 3T3-L1 (día 0 de la diferenciación) y del 98% respecto al control en adipocitos ya maduros (día 9 de la diferenciación).

Además de la validación del modelo de inhibición de miR-148a-3p en células 3T3-L1 diferenciadas y sin diferenciar o preadipocitos, se pudieron corroborar los resultados obtenidos en el trabajo anteriormente comentado (198), en los cuales la expresión del miR-148a-3p es mayor a medida que aumenta la diferenciación de adipocitos. En nuestro modelo de células 3T3-L1 (Fig.R8) se puede observar cómo la expresión del miRNA en adipocitos maduros (día 9 de la diferenciación) transfectados con el control *non-target* es 8 veces mayor que en preadipocitos (día 0 de la diferenciación) transfectados también con el control *non-target*.

4.5.2. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE miR-148a-3p EN CÉLULAS 3T3-L1 NO DIFERENCIADAS

Como punto de partida, para conocer el efecto de la inhibición de miR-148a-3p sobre la expresión génica en células 3T3-L1, se propuso realizar una secuenciación masiva de RNA (RNAseq) de preadipocitos 3T3-L1 sin diferenciar con la expresión del miRNA de estudio inhibido. Para ello, se realizó un análisis de la expresión diferencial mediante secuenciación de cuatro muestras con inhibición de miR-148a-3p frente a cuatro muestras control de células transfectadas con el oligonucleótido *non-target*. Se utilizó la plataforma *Illumina* (California, USA), la cual sintetiza una librería de fragmentos de 300 pb aproximadamente, que cuantifica la abundancia relativa de los RNAs.

	Control	anti-miR-148a-3p	Relación
Dkk1			835,58
Wnt5b			60,73
Wnt10b			168,31
Pck1			92,92
Wnt5a			0,92
Lrp5			1,029
Lrp6			0,87

Fig.R9. Resultados del secuenciado de RNA para los genes *Dkk1*, *Wnt5b*, *Wnt10b*, *Pck1*, *Wnt5a*, *Lrp5* y *Lrp6*. El mapa de calor muestra la expresión de los genes en preadipocitos 3T3-L1 trasfectados con el inhibidor de miR-148-3p y el oligonucleótido *non-target* como control. El color verde representa expresiones bajas y el rojo expresiones altas, siendo el negro el percentil 50 o mediana de los valores de expresión. Cuanto más intenso es el color verde o rojo la expresión génica es menor o mayor respectivamente. También se muestra una tabla con la relación o expresión relativa de los genes con el tratamiento del inhibidor respecto al control.

Los resultados de la secuenciación masiva de RNA expresados mediante un mapa de calor (Fig.R9) mostraron un aumento en la expresión génica de tres importantes genes de la ruta Wnt: *Dkk1*, *Wnt5b* y *Wnt10b*, cuando miR-148a-3p era inhibido. Asimismo, también se vio aumento en la expresión del gen de la fosfoenolpiruvatocarboxikinasa-1 (*Pck1*), de gran importancia en el metabolismo de adipocitos. Se eligieron tres genes de la ruta Wnt: *Wnt5a*, *Lrp5* y *Lrp6*, cuya expresión no variaba en los experimentos de secuenciación masiva de RNA, con el objeto de comprobar la validez de los resultados por qPCR.

Resultados

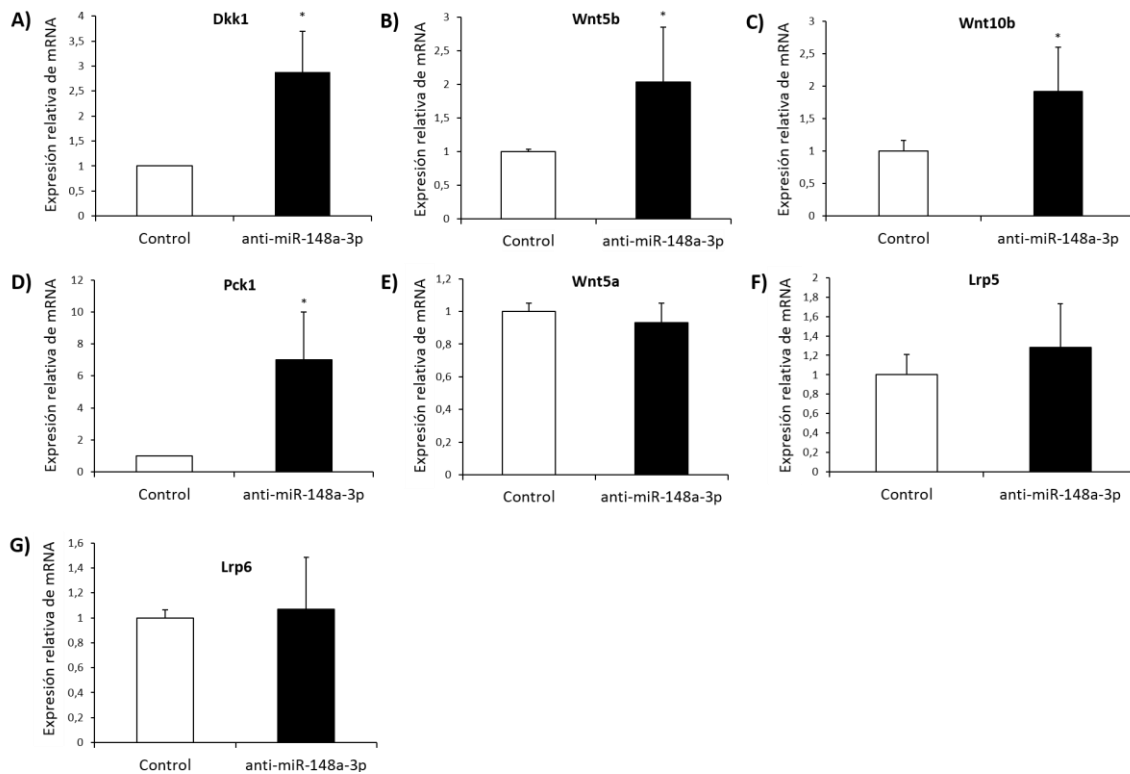


Fig.R10. Resultados de qPCR para los genes analizados en el secuenciado de RNA en preadipocitos 3T3-L1 con miR-148a-3p inhibido respecto al control de células transfectadas con el oligonucleótido *non-target*. Este experimento sirvió como validación de los resultados del secuenciado de RNA. Los valores promedio de n=4 experimentos independientes muestran un aumento estadísticamente significativo de 2,9 veces en la expresión de *Dkk1*, 2 veces en *Wnt5b*, 1,9 veces en *Wnt10b* y 7 veces en *Pck1*, respecto al control. En el caso de los genes *Wnt5a*, *Lrp5* y *Lrp6* no se observan variaciones de expresión estadísticamente significativas. * $p < 0,05$.

En la validación del experimento, llevada a cabo como se ha dicho anteriormente por qPCR, se utilizaron las mismas muestras de RNA que se emplearon en la secuenciación masiva, es decir, cuatro muestras de RNA de preadipocitos 3T3-L1 con miR-148a-3p inhibido y cuatro muestras de RNA control. Los resultados (Fig.R10) confirmaron los datos recogidos en la secuenciación masiva de RNA, si bien las variaciones en la expresión de los genes estudiados no fueron tan grandes como en el experimento de secuenciación. Se observó un aumento estadísticamente significativo en la expresión de *Dkk1*, *Wnt5b*, *Wnt10b* y *Pck1* de 2,9; 2; 1,9 y 7 veces respectivamente, cuando se inhibía la expresión de miR-148a-3p respecto al control. Asimismo, al igual que en la secuenciación masiva, no se vieron cambios significativos en la expresión de los genes *Wnt5a*, *Lrp5* y *Lrp6*. Dada la importancia que tiene sobre la diferenciación de adipocitos un aumento en la expresión de *Wnt5b* en preadipocitos (175, 176), se decidió corroborar el resultado analizando mediante un ensayo de ELISA los niveles de proteína Wnt5b en el medio de células

3T3-L1 tranfectadas con el inhibidor de miR-148a-3p respecto al control. Los resultados (Fig.R11) mostraron un aumento de 1,5 veces de Wnt5b cuando era inhibido el miRNA respecto al control, lo que corroboraba el resultado de qPCR.

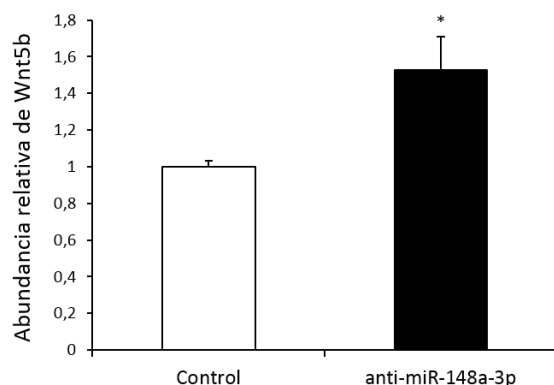


Fig.R11. Resultados de los ensayos de ELISA para Wnt5b. Se midieron los niveles relativos de la proteína Wnt5b en el medio de preadipocitos 3T3-L1 con miR-148a-3p inhibido respecto al control, consistente en medio de preadipocitos transfectados con el oligonucleótido *non-target*. Se muestran los valores promedio de dos experimentos independientes en los cuales se observa un aumento estadísticamente significativo de 1,5 veces en los niveles de Wnt5b con miR-148a-3p inhibido respecto al control. * $p < 0,05$.

Para comprobar si el aumento de la expresión de *Wnt10b* observado al inhibir miR-148a-3p era debido a la interacción directa del miRNA con la región 3'UTR del gen, como se había descrito previamente en la línea celular de cáncer uterino HeLa (204), se llevaron a cabo experimentos de actividad luciferasa. Se cotransfectaron células 3T3-L1 con el plásmido que contenía la región 3'UTR de *Wnt10b* murino clonada y el inhibidor de miR-148a-3p o el oligo *non-target* como control. Los resultados (Fig.R12) no mostraron cambios de actividad luciferasa en la región 3'UTR de *Wnt10b* con miR-148a-3p inhibido respecto al control, por lo que parece que miR-148a-3p no es diana directa de *Wnt10b* en células 3T3-L1.

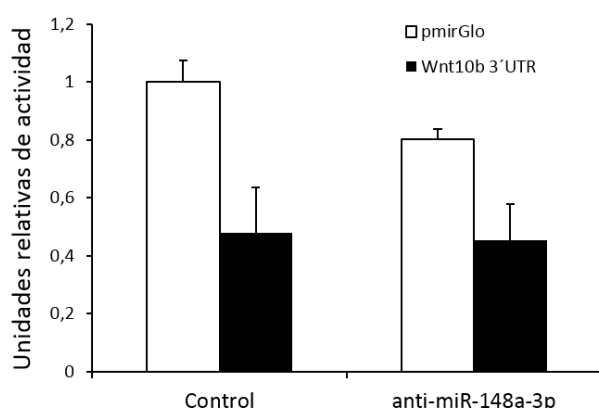


Fig.R12. Resultados de los experimentos de actividad luciferasa para la región 3'UTR de *Wnt10b* con miR-148a-3p inhibido en células 3T3-L1. En el promedio de $n=2$ experimentos independientes por duplicado no se observan cambios en la actividad de la región 3'UTR de *Wnt10b* cotransfectada con el inhibidor de miR-148a-3p respecto a la misma secuencia cotransfectada con el control (oligonucleótido *non-target*). Como control de la actividad luciferasa se utilizó la actividad del vector pmirGLO vacío.

A la vista del aumento de la expresión de genes de la ruta Wnt al inhibir miR-148a-3p en preadipocitos 3T3-L1, se planteó la posibilidad de que estos cambios de expresión pudieran estar afectando a la translocación de β -Catenina al núcleo y a su

función transcripcional. Para comprobar este efecto se empleó la técnica de western blot, utilizando las fracciones proteicas, tanto citoplasmáticas como nucleares, de preadipocitos 3T3-L1 transfectados con el inhibidor de miR-148a-3p por un lado y con el oligonucleótido *non-target* por otro lado como control. Los resultados (Fig.R13) mostraron una disminución en los niveles de β -Catenina nucleares cuando el miRNA era inhibido, por lo que se pudo concluir que los cambios en la expresión génica de los genes de la ruta Wnt mencionados anteriormente estaban afectando a la traslocación de β -Catenina al núcleo, disminuyéndola. Además, se midió la expresión de una diana conocida de β -Catenina, *Axin2*, cuando miR-148a-3p era inhibido en preadipocitos 3T3-L1, para confirmar que el descenso en los niveles nucleares de β -Catenina afectaba a su función como activador transcripcional. Los resultados de qPCR para *Axin2* (Fig.R14) mostraron un gran descenso en sus niveles de expresión.

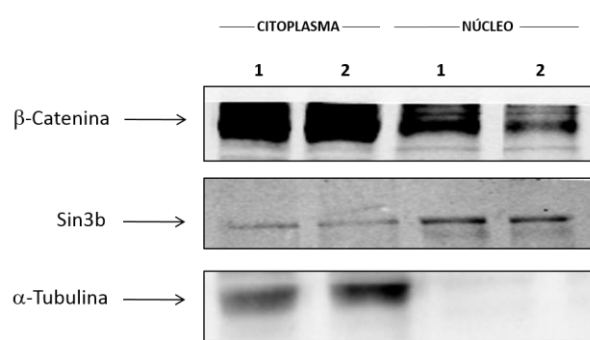


Fig.R13. Western blot para β -Catenina de las fracciones proteicas, tanto citoplasmáticas como nucleares, de preadipocitos 3T3-L1 transfectados con 1) el oligonucleótido *non-target* por un lado, y 2) el inhibidor de miR-148a-3p por otro lado. Como control de carga, en las fracciones citoplasmáticas se midieron los niveles de α -tubulina y en las fracciones nucleares los niveles de Sin3b. El experimento se realizó n=4 veces de manera independiente.

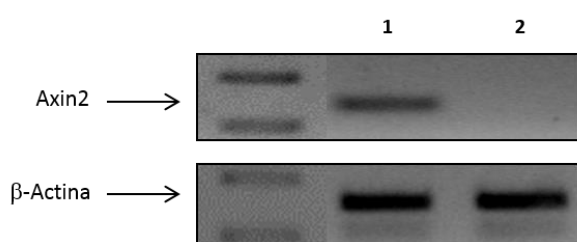


Fig.R14. Gel de agarosa con los resultados de la expresión por qPCR de *Axin2* en preadipocitos 3T3-L1 2) con miR-148a-3p inhibido, respecto al 1) control de células transfectadas con el oligonucleótido *non-target*. El experimento se realizó 3 veces de manera independiente, utilizando como control de carga la expresión de β -Actina (*Actb*).

4.5.3. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE miR-148a-3p EN LA DIFERENCIACIÓN DE ADIPOCITOS EN CÉLULAS 3T3-L1

A la vista de los resultados anteriores, en los que se observó una inhibición en la ruta canónica de Wnt y una disminución en la traslocación de β -Catenina al núcleo al inhibir la expresión de miR-148a-3p, se quiso averiguar de qué manera afectaban estos cambios a la diferenciación de adipocitos en células 3T3-L1. Para ello, se transfectó el inhibidor de miR-148a-3p en preadipocitos 3T3-L1 y 24 horas después se indujo la

diferenciación de estas células durante 9 días con el protocolo descrito en el apartado 3.1.2 de esta tesis doctoral.

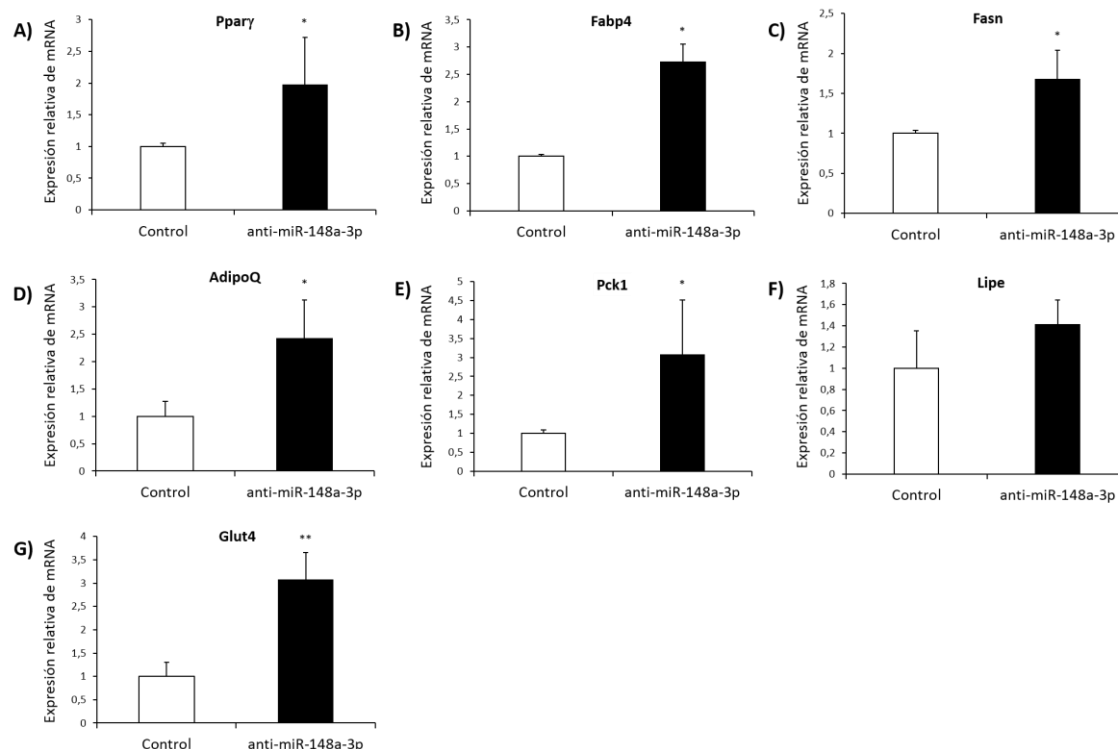


Fig.R15. Resultados de expresión por qPCR de los genes marcadores de diferenciación: A) *Pparγ*, B) *Fabp4*, C) *Fasn*, D) *Adipoq*, E) *Pck1*, F) *Lipe* y G) *Glut4* en adipocitos 3T3-L1 diferenciados durante 9 días con miR-148a-3p inhibido respecto al control de la expresión en adipocitos diferenciados 9 días y transfectados con el oligonucleótido *non-target*. Los valores promedio de n=4 experimentos independientes muestran un aumento de expresión de 2 veces en *Pparγ*, 2,7 veces en *Fabp4*, 1,6 veces en *Fasn*, 2,4 veces en *Adipoq*, 3,1 veces en *Pck1*, 1,4 veces en *Lipe* y 3,1 veces en *Glut4*, cuando miR-148a-3p es inhibido. Los cambios de expresión son estadísticamente significativos excepto en el caso de *Lipe*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Transcurridos los 9 días de diferenciación y una vez que las células 3T3-L1 fueron diferenciadas a adipocitos maduros se extrajo el RNA, tanto de las células con miR-148a-3p inhibido como de las transfectadas con el control. Con estas muestras se llevaron cabo experimentos de qPCR con el objeto de analizar la expresión relativa de los marcadores de diferenciación de adipocitos *Pparγ*, regulador maestro de la diferenciación de adipocitos, y *Fabp4*, implicado en transporte de ácidos grasos dentro del adipocito, así como de varios genes de importancia en el metabolismo adipocítico implicados en variados procesos como: la síntesis de ácidos grasos (*Fasn*), metabolismo de glucosa y ácidos grasos (*Adipoq*), gliceroneogénesis (*Pck1*), hidrólisis de triglicéridos (*Lipe*) o transporte de glucosa a los adipocitos (*Glut4*).

Los resultados de los experimentos de qPCR mostraron un aumento en los niveles de expresión de *Pparγ* (Fig.R15A) y *Fabp4* (Fig.R15B) relativos al control cuando miR-148a-3p era inhibido, de 2 y 2,7 veces respectivamente. Además, los resultados para algunos genes de importancia en el metabolismo lipídico de adipocitos también mostraron un aumento de expresión relativo cuando miR-148a-3p era inhibido, de 1,6 veces en el caso de la sintasa de ácidos grasos (*Fasn*) (Fig.R15C), de 2,4 veces en la adiponectina (*Adipoq*) (Fig.R15D), de 3,1 veces en la fosfoenolpiruvatocarboxikinasa-1 (*Pck1*) (Fig.R15E), de 1,4 veces en la lipasa sensible a hormonas (*Lipe*) (Fig.R15F), y de 3,1 veces en el transportador de glucosa específico de tejido adiposo y músculo (*Glut4*) (Fig.15G). Así pues, todos estos resultados de expresión por qPCR, estadísticamente significativos a excepción de los obtenidos con el gen *Lipe*, demostraron que la inhibición de miR-148a-3p en células 3T3-L1 diferenciadas producía un aumento de expresión en varios marcadores de diferenciación de adipocitos, todos ellos importantes en el metabolismo adipocítico.

4.5.4. EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE miR-148a-3p EN CÉLULAS 3T3-L1 Y LA DIFERENCIACIÓN DE ADIPOCITOS

A la vista de los resultados obtenidos con la inhibición de miR-148a-3p en células 3T3-L1, se decidió estudiar el efecto que tenía la sobreexpresión del miRNA. Para ello, se utilizó un *mimic* específico con la misma secuencia que miR-148a-3p, además del control ya utilizado anteriormente consistente en un oligonucleótido *non-target* que no hibrida con ninguna región del genoma. Como primer paso, se transfectaron en células 3T3-L1 40 nM del *mimic* por un lado y 40 nM del control por otro lado y se analizó la expresión relativa del miRNA de estudio, miR-148a-3p, por qPCR en células 3T3-L1 no diferenciadas y en adipocitos maduros diferenciados durante 9 días, para comprobar si el modelo de sobreexpresión estaba funcionando correctamente. Los resultados obtenidos en los experimentos de sobreexpresión tanto para células no diferenciadas como para adipocitos maduros (Fig.R16) mostraron un aumento en la expresión relativa del miRNA, de 3,8 veces y 2,2 veces respectivamente. De esta manera se pudo validar el modelo de sobreexpresión de miR-148a-3p en células 3T3-L1.

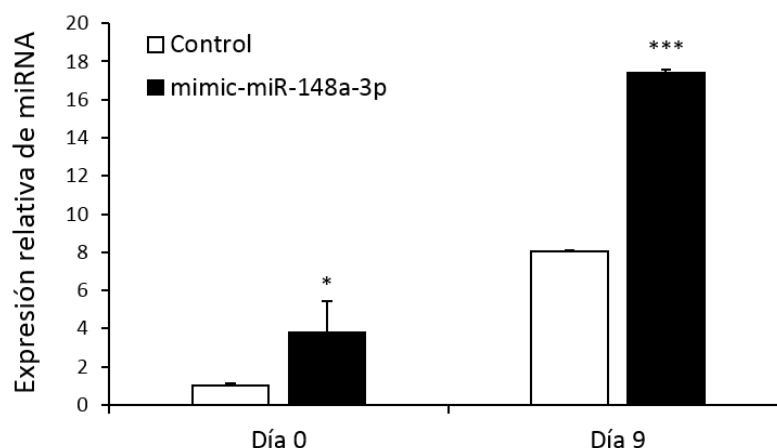


Fig.R16. Validación por qPCR del modelo de sobreexpresión de miR-148a-3p en células 3T3-L1 sin diferenciar (Día 0) y diferenciadas durante 9 días (Día 9). Se muestran los valores de expresión en células transfectadas con el *mimic* del miRNA, relativos a la expresión en células transfectadas con el oligonucleótido *non-target* como control. El promedio de n=3 experimentos independientes muestra un aumento de 3,8 veces en la expresión de miR-148a-3p en células no diferenciadas transfectadas con el *mimic* respecto al control, y un aumento de 2,2 veces en células diferenciadas respecto al control, siendo los cambios estadísticamente significativos en ambos casos. *p<0,05, ***p<0,001.

Tras validar el modelo de sobreexpresión de miR-148a-3p en células 3T3-L1, se quiso comprobar el efecto sobre la expresión génica de los genes de la ruta Wnt estudiados en el modelo de inhibición del miRNA: *Dkk1*, *Wnt5b* y *Wnt10b*. Al igual que anteriormente, se transfectó el *mimic* de miR-148a-3p por un lado y el control por otro lado, en una concentración de 40 nM en preadipocitos 3T3-L1, y 24 horas después se extrajeron los RNAs para el estudio de expresión por qPCR.

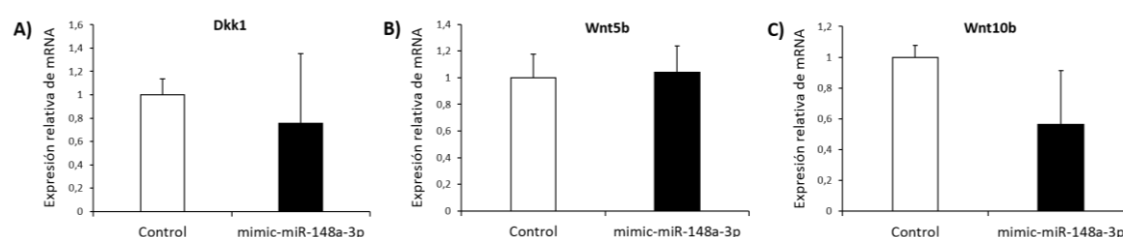


Fig.R17. Resultados de expresión por qPCR de los genes: A) *Dkk1*, B) *Wnt5b*, C) *Wnt10b*, en preadipocitos 3T3-L1 con miR-148a-3p sobreexpresado respecto a la expresión en células transfectadas con el oligonucleótido *non-target* como control. Los valores promedio de n=4 experimentos independientes muestran una disminución de la expresión de *Dkk1* y *Wnt10b* del 25% y el 44% respectivamente cuando miR-148a-3p es sobreexpresado, sin ser estos cambios estadísticamente significativos. En el caso de *Wnt5b* no se observan cambios de expresión.

Los resultados no mostraron cambios en la expresión génica relativa de *Wnt5b* (Fig.R17B) cuando miR-148a-3p era sobreexpresado, y en el caso de *Dkk1* (Fig.R17A) y

Wnt10b (Fig.17C) se vio una disminución de la expresión de un 25% y de un 44% respectivamente, sin ser estos resultados estadísticamente significativos.

Para finalizar el estudio de la sobreexpresión de miR-148a-3p en células 3T3-L1, se investigó el efecto sobre la diferenciación de adipocitos. Se transfectó el *mimic* y el control en paralelo, en la misma concentración que los anteriores experimentos, en preadipocitos 3T3-L1. 24 horas después se inició el proceso de diferenciación, que duró 9 días, tiempo en el cual las células 3T3-L1 eran ya adipocitos maduros. Tras esto se extrajeron los RNAs para estudiar la expresión relativa por qPCR de los genes marcadores de diferenciación *Ppar γ* y *Fabp4*. Los resultados para *Ppar γ* (Fig.R18A) y *Fabp4* (Fig.R18B) no mostraron cambios significativos en la expresión respecto al control de ninguno de los dos genes cuando miR-148a-3p era sobreexpresado.

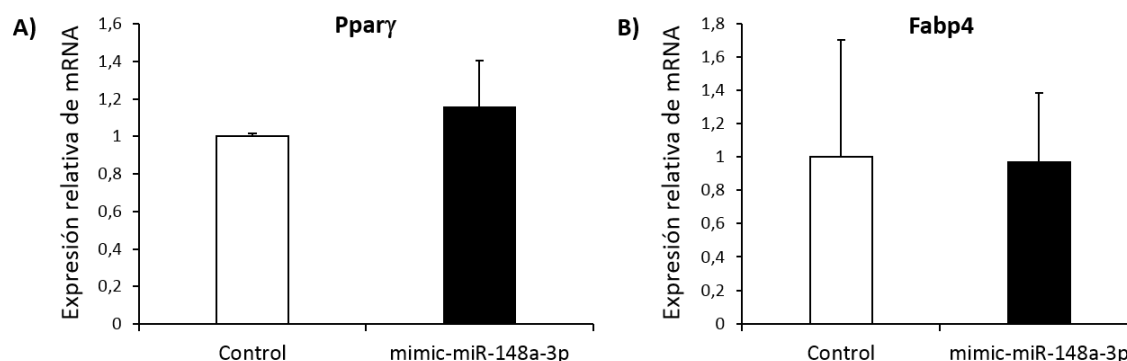


Fig.R18. Resultados de expresión por qPCR de los genes: A) *Ppar γ* y B) *Fabp4*, en células 3T3-L1 diferenciadas durante 9 días con miR-148a-3p sobreexpresado respecto al control de la expresión en adipocitos diferenciados 9 días y transfectados con el oligonucleótido *non-target*. Los valores promedio de n=4 experimentos independientes no muestran cambios estadísticamente significativos en la expresión de estos dos genes.

4.6. EFECTO DE Nr5a2 SOBRE LA EXPRESIÓN DE miR-148a-3p Y LA DIFERENCIACIÓN DE ADIPOCITOS EN CÉLULAS 3T3-L1

Se llevó a cabo un análisis del promotor de miR-148a para conocer qué TFs podrían estar uniéndose a esta secuencia. El análisis bioinformático se realizó con el programa <http://mapper.chip.org> para las secuencias humana y murina del promotor de miR-148a. Los resultados mostraron un posible sitio de unión para NR5A2 a -716 pb del inicio de transcripción en el promotor humano (Tabla R2A) y otro sitio con una caja *Fushi Tarazu* (Ftz), en la que podría unirse Nr5a2, a -1532 pb del inicio de transcripción en el promotor murino (Tabla R2B).

A)

Model	Name(s)	Strand	Start	End	Score	E-value
<u>T10265</u>	LRH-1	-	-704	-716	4.8	12

B)

Model	Name(s)	Strand	Start	End	Score	E-value
<u>M00020</u>	Ftz	-	-1520	-1532	4.9	22

Tabla R2. Resultados de los análisis bioinformáticos con el programa <http://mapper.chip.org/> para el promotor de miR-148a humano y murino. A) En el análisis del promotor humano se encontró un posible sitio de unión de NR5A2 a -716 pb del inicio de la transcripción. B) En el análisis del promotor murino se encontró un sitio con una caja Ftz, al que podría estar uniéndose Nr5a2, a -1532 pb del inicio de la transcripción.

Nr5a2 (Nuclear receptor family 5 group A member 2) o Lrh-1 (Liver Receptor Homolog-1) es un receptor nuclear huérfano de la familia Ftz-F1. Estudiado ampliamente por el Dr. Bolado en nuestro grupo de investigación, Nr5a2 tiene importantes funciones metabólicas entre las que cabe destacar: regulación y transporte de colesterol y derivados, síntesis de sales biliares y mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, además de su importante papel en la proliferación y diferenciación de tejidos derivados del endodermo.

4.6.1. EFECTO DE Nr5a2 SOBRE LA EXPRESIÓN DE miR-148a-3p EN CÉLULAS 3T3-L1

Como primer paso para conocer el efecto de Nr5a2 en la expresión de miR-148a-3p, se decidió comprobar el patrón de expresión de este receptor nuclear en células 3T3-L1 sin diferenciar y diferenciadas completamente, usando la técnica de qPCR. Los resultados de estos experimentos (Fig.R19) mostraron que había expresión de Nr5a2, aunque pequeña, en los preadipocitos, y que esta expresión desaparecía cuando las células se habían diferenciado completamente a adipocitos maduros.

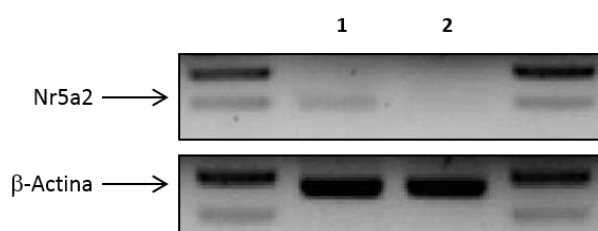


Fig.R19. Gel de agarosa con los resultados de expresión de Nr5a2 por qPCR. Se muestra la expresión del gen en 1) células 3T3-L1 no diferenciadas y 2) células 3T3-L1 diferenciadas durante 9 días. Como control de carga se utilizó la expresión de β-Actina (Actb).

Una vez comprobado el patrón de expresión de Nr5a2 en células 3T3-L1, se pasó al estudio del efecto de Nr5a2 sobre la expresión de miR-148a-3p en estos preadipocitos.

Resultados

Para ello, se utilizaron varios clones estables de dos líneas celulares construidas en nuestro laboratorio. Una de ellas, 3T3-L1 PCEFL-Nr5a2 que sobreexpresa Nr5a2, y otra 3T3-L1 shNr5a2 que tiene silenciada la expresión del receptor nuclear. Ambas líneas eran estables y se seleccionaron con geneticina y puromicina respectivamente. Como validación de ambos modelos, de sobreexpresión y silenciamiento de Nr5a2, se analizó la expresión del gen del receptor nuclear por qPCR, y western blot en el caso de la sobreexpresión. Los resultados obtenidos con los clones diferentes de estas líneas mostraron que tanto la sobreexpresión (Fig.R20A) como el silenciamiento (Fig.R20B) de Nr5a2 estaban funcionando en los modelos de 3T3-L1 utilizados.

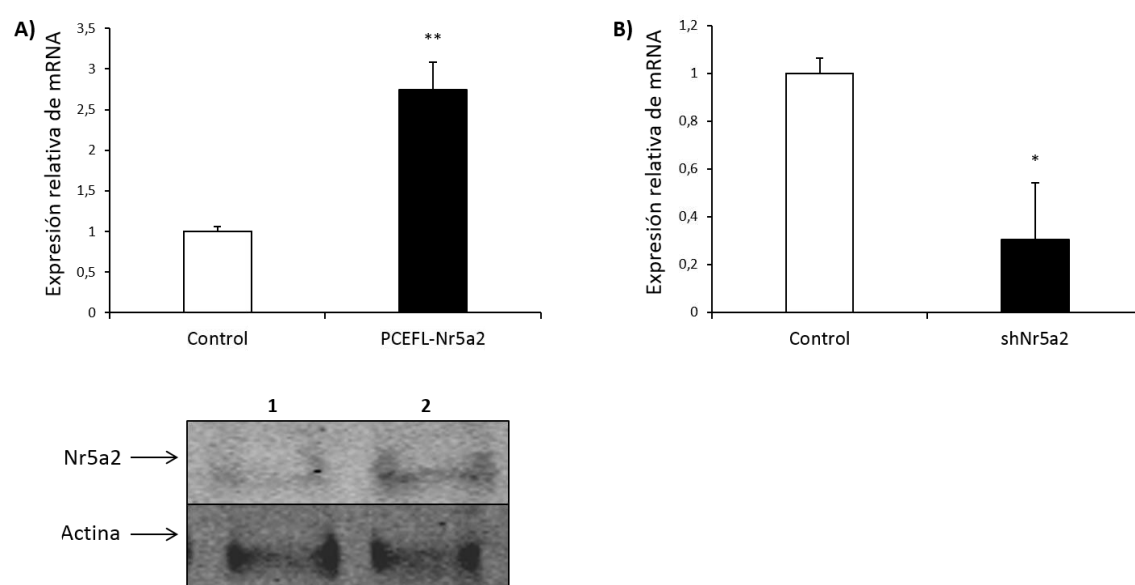


Fig.R20. Validación de las líneas de células 3T3-L1 con A) sobreexpresión de Nr5a2 y B) silenciamiento de Nr5a2. Los resultados de los experimentos de western blot muestran un aumento en los niveles de Nr5a2 en (2) preadipocitos 3T3-L1 con Nr5a2 sobreexpresado respecto al (1) control. Como control de carga se utilizó la medida de Actina. Los resultados de qPCR en n=3 experimentos independientes muestran un aumento estadísticamente significativo de 2,7 veces en la expresión de Nr5a2 respecto al control en el modelo de sobreexpresión, y una disminución estadísticamente significativa del 70% respecto al control en el modelo de silenciamiento. Como control se midió la expresión de Nr5a2 en células 3T3-L1 con el vector PCEFL vacío y el PLKO.1 vacío respectivamente. *p<0,05, **p<0,01.

Para analizar el efecto de Nr5a2 se midió por qPCR la expresión de miR-148a-3p en las líneas de preadipocitos 3T3-L1 antes mencionadas. Los experimentos se realizaron en células no diferenciadas porque es en ellas donde existe expresión de Nr5a2 (Fig.R19). Los resultados del efecto de la sobreexpresión de Nr5a2 (Fig.R21A) mostraron un aumento de 4,5 veces en la expresión del miRNA, mientras que en el caso del silenciamiento de Nr5a2 (Fig.R21B) se observó una disminución del 54% en la expresión del miRNA.

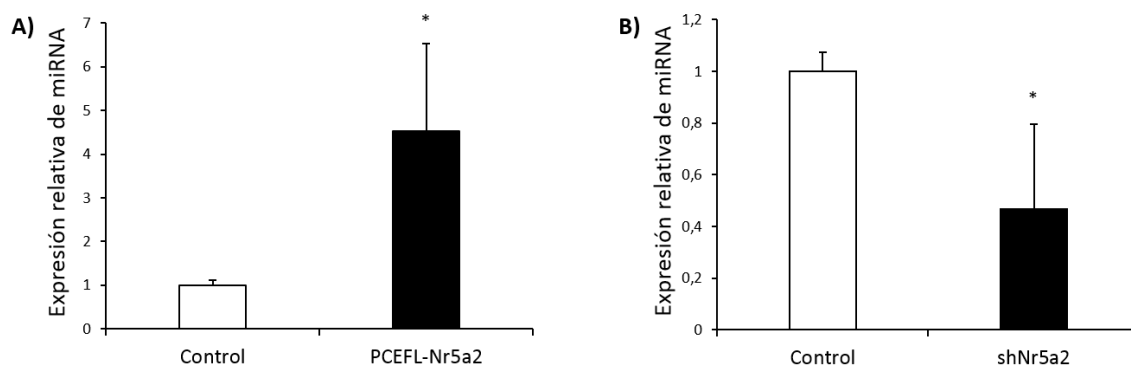


Fig.R21. Expresión de miR-148a-3p en preadipocitos 3T3-L1 con A) sobreexpresión de Nr5a2 y B) silenciamiento de Nr5a2. Como control se utilizó la expresión de Nr5a2 en células 3T3-L1, con el vector PCEFL vacío en el caso del estudio del efecto de la sobreexpresión de Nr5a2 y con el vector PLKO.1 vacío en el caso del estudio del efecto del silenciamiento de Nr5a2. La media de $n=4$ experimentos de qPCR independientes muestran un aumento de 4,5 veces en la expresión de miR-148a-3p respecto al control en el caso de la sobreexpresión de Nr5a2, y un descenso del 54% en el caso del silenciamiento de Nr5a2. Ambos cambios son estadísticamente significativos $*p<0,05$.

A continuación se quiso estudiar si el efecto observado de Nr5a2 sobre la expresión de miR-148a-3p era un efecto directo por la unión del receptor nuclear a la región promotora del miRNA. Como se indicó al principio de este apartado, en el estudio bioinformático con el programa <http://mapper.chip.org> se encontraron sendos hipotéticos sitios de unión para Nr5a2 en las regiones promotoras humana y murina (Tabla R2A y tabla R2B). Para comprobar experimentalmente estas predicciones bioinformáticas se recurrió a la técnica de superretardo en gel o *supershift*, con extractos nucleares de células HepG2 en el caso de la región promotora humana y de preadipocitos 3T3-L1 en el caso de la región promotora murina. Se diseñaron dos sondas marcadas fluorescentemente, para humano y ratón, ambas de 25 pb de la región promotora, que comprendían el sitio de unión canónico para Nr5a2 CAAGG y diez pares de bases de cada secuencia flanqueándolo. En los resultados de superretardo en gel con el sitio de unión del promotor humano (Fig.R22A) se observó un aumento en la intensidad de la banda específica cuando se utilizaron extractos nucleares de células HepG2 que sobreexpresaban NR5A2. Además, en presencia del anticuerpo específico para NR5A2 la intensidad de banda disminuía claramente. Por el contrario, en los resultados del superretardo en gel con el sitio de unión del promotor murino (Fig.R22B) no se observó ningún cambio en el patrón de bandas cuando se utilizaban extractos nucleares de preadipocitos 3T3-L1 que sobreexpresaban Nr5a2. Tampoco se pudo ver una disminución en la intensidad de banda o un superretardo en presencia del anticuerpo específico para Nr5a2.

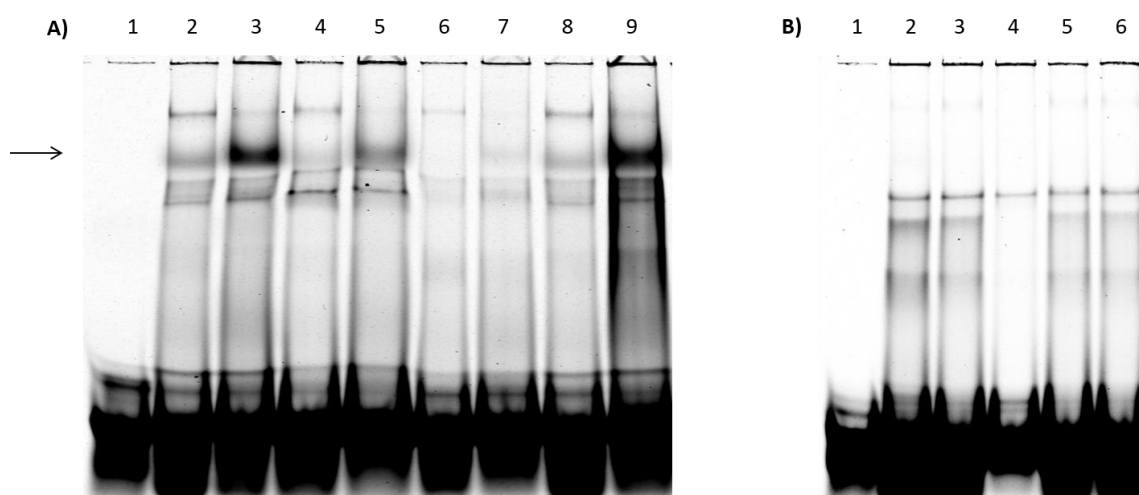


Fig.R22. A) Superretardo en gel para el estudio de la unión de NR5A2 en el promotor de miR-148a humano. 1: sin extractos nucleares; 2: calle con 20 µg de extractos nucleares de células HepG2; 3: calle con 20 µg de extractos nucleares de células HepG2 PCEFL-NR5A2; 4: calle con extractos nucleares de HepG2 y el anticuerpo para NR5A2; 5: calle con extractos nucleares de HepG2 PCEFL-NR5A2 y el anticuerpo para NR5A2; 6: calle con extractos nucleares de HepG2 y un exceso de sonda fría de 50 veces; 7: calle con extractos nucleares de HepG2 PCEFL-NR5A2 y un exceso de sonda fría de 50 veces; 8: calle con extractos nucleares de HepG2 y el anticuerpo para Actina; 9: calle con extractos nucleares de HepG2 PCEFL-NR5A2 y el anticuerpo para Actina. La flecha negra señala la banda específica. B) Superretardo en gel para el estudio de la unión de Nr5a2 en el promotor de miR-148a murino. 1: sin extractos nucleares; 2: calle con 20 µg de extractos nucleares de células 3T3-L1; 3: calle con 20 µg de extractos nucleares de células 3T3-L1 PCEFL-Nr5a2; 4: calle con extractos nucleares de 3T3-L1 PCEFL-Nr5a2 y un exceso de sonda fría de 50 veces; 5: calle con extractos nucleares de 3T3-L1 PCEFL-Nr5a2 y el anticuerpo para Nr5a2; 6: calle con extractos nucleares de 3T3-L1 PCEFL-Nr5a2 y el anticuerpo para Actina. En ambos superretardos, en todas las calles se utilizaron las sondas marcadas fluorescentemente con los fragmentos de los promotores humano y murino respectivamente. En el estudio del promotor humano se observa un aumento de la intensidad de banda en la calle con extractos nucleares de células que sobreexpresan NR5A2 (3), mientras que cuando se añade el anticuerpo específico la intensidad disminuye (5). En el caso del promotor murino no se aprecian diferencias en las calles.

Analizados los resultados de superretardo en gel, se decidió hacer experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con el sitio de unión de Nr5a2 en el promotor murino de miR-148a. De esta manera, se pretendía asegurar de que los resultados del superretardo en gel eran correctos, y que efectivamente no había una unión directa de Nr5a2 en el sitio del promotor del miRNA murino. Los experimentos de ChIP se realizaron con preadipocitos 3T3-L1 utilizando tres parejas de cebadores diferentes que flanqueaban la región de estudio. Los resultados (Fig.R23) mostraron que Nr5a2 no se estaba uniendo a dicha región promotora del miRNA. Como controles experimentales se midieron los enriquecimientos relativos de dos proteínas, Inmunoglobulina G (IgG) y RNA Polimerasa II (PolII), cuyas uniones a la secuencia de estudio eran inespecíficas. En resumen, tanto los estudios de superretardo en gel como los experimentos de ChIP parecían indicar que

existía un efecto directo de NR5A2 sobre el promotor de miR-148a humano, pero no sobre la región promotora de ratón estudiada.

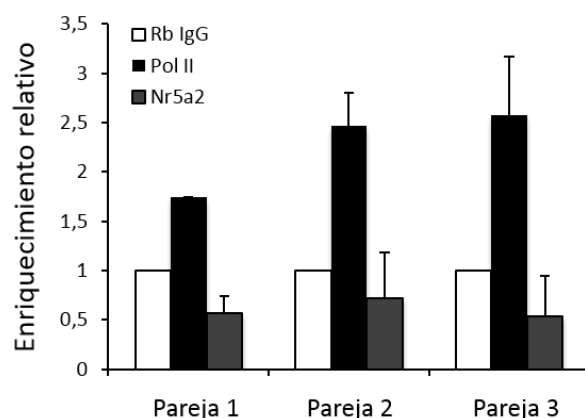


Fig.R23. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) para el estudio de la unión de Nr5a2 en el promotor de miR-148a murino. En los resultados se muestra el enriquecimiento relativo del hipotético sitio de unión de Nr5a2, utilizando como controles la unión de IgG y Pol II a esa región promotora. Se muestran los valores promedio de n=2 experimentos independientes. Los resultados muestran que no hay un enriquecimiento con Nr5a2 en la secuencia de estudio con ninguna de las tres parejas de cebadores utilizadas en los experimentos.

4.6.2. EFECTO DE Nr5a2 EN LA DIFERENCIACIÓN DE ADIPOCITOS EN CÉLULAS 3T3-L1

Una vez estudiada la implicación de Nr5a2 en la expresión de miR-148a-3p en células 3T3-L1, se planteó el estudio del efecto de dicho receptor nuclear en la diferenciación de adipocitos, utilizando los dos mismos modelos celulares utilizados anteriormente, de sobreexpresión y silenciamiento génico de Nr5a2. Como primer paso a seguir se quiso medir la expresión de los mismos genes de la ruta Wnt cuya expresión variaba con la inhibición de miR-148a-3p: *Dkk1*, *Wnt5b* y *Wnt10b*. Para ello se utilizó la técnica de qPCR con el objeto de medir el efecto sobre estos genes en preadipocitos 3T3-L1 con Nr5a2 sobreexpresado y silenciado. Los resultados en el caso de la sobreexpresión del receptor nuclear (Fig.R24A) mostraron una gran disminución de la expresión de los tres genes de estudio, del 71% en el caso de *Dkk1*, del 73% en el caso de *Wnt5b* y del 60% en el caso de *Wnt10b*, respecto al control de expresión de preadipocitos 3T3-L1 con el vector PCEFL vacío. En cuanto al efecto del silenciamiento de Nr5a2, los resultados (Fig.R24B) mostraron un aumento de la expresión de *Dkk1* y *Wnt10b* y una disminución de la expresión de *Wnt5b* en células con silenciamiento de Nr5a2 respecto a las células con el vector PLKO.1 vacío como control. Este aumento de la expresión fue de 1,7 veces en el caso de *Dkk1* y de 1,5 veces en el caso de *Wnt10b*. En el caso de *Wnt5b*, el silenciamiento de Nr5a2 provocó una disminución del 28% en su expresión respecto al control. Sin embargo, estas diferencias de expresión no fueron estadísticamente significativas en ninguno de los tres casos.

Resultados

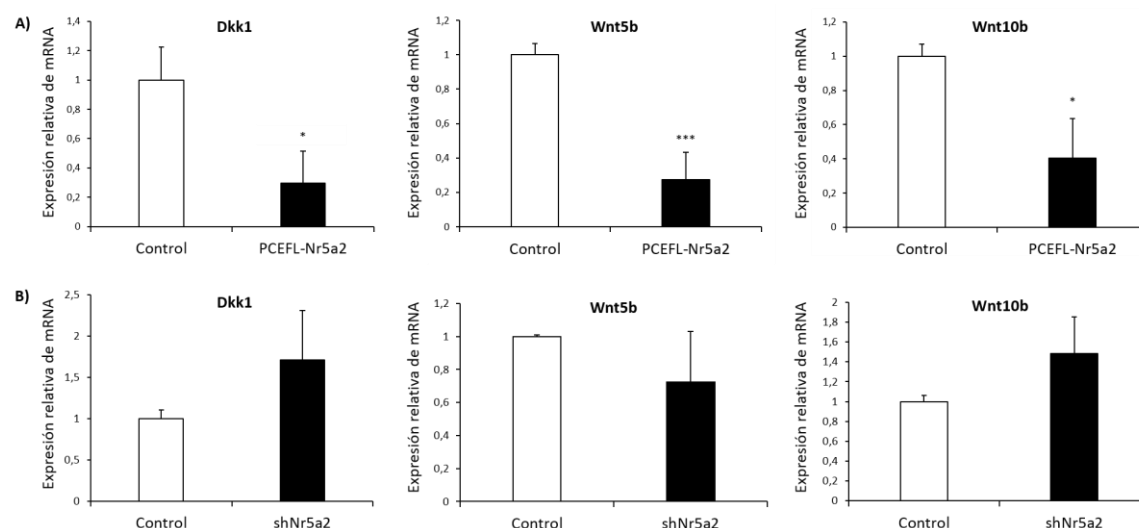


Fig.R24. Expresión de genes de la ruta Wnt en preadipocitos 3T3-L1 con A) sobreexpresión de Nr5a2 y B) silenciamiento de Nr5a2. Los resultados de qPCR muestran el promedio de n=4 experimentos independientes con los genes *Dkk1*, *Wnt5b* y *Wnt10b*. Como control se utilizó la expresión génica de preadipocitos 3T3-L1, con el vector PCEFL vacío para el estudio de la sobreexpresión de Nr5a2 y con el vector PLKO.1 vacío para el estudio del silenciamiento de Nr5a2. En el caso de la sobreexpresión de Nr5a2 se observa un descenso estadísticamente significativo de la expresión de *Dkk1*, *Wnt5b* y *Wnt10b* de un 71%, 73% y 60% respectivamente, respecto al control. Cuando Nr5a2 es silenciado se observa un aumento de la expresión de *Dkk1* y *Wnt10b* de 1,7 y 1,5 veces respectivamente, y un descenso de la expresión de *Wnt5b* del 28%, sin ser estos cambios estadísticamente significativos * p<0,05, *** p<0,001.

A la vista de los resultados de expresión de estos genes de la ruta Wnt, se decidió comprobar cómo estaba afectando la sobreexpresión y el silenciamiento de Nr5a2 a la traslocación de β -Catenina al núcleo en los dos modelos de preadipocitos 3T3-L1 utilizados, al igual que se hizo con el modelo de inhibición de miR-148a-3p. Para ello se recurrió a la técnica de western blot, utilizando las fracciones proteicas citoplasmáticas y nucleares de preadipocitos 3T3-L1 con sobreexpresión y silenciamiento de Nr5a2. Los resultados observados (Fig.R25) mostraron un aumento respecto al control en los niveles de β -Catenina, tanto en los niveles citoplasmáticos de la proteína como en los nucleares, cuando Nr5a2 era sobreexpresado. En el caso del silenciamiento de Nr5a2 se observó el efecto contrario en la abundancia de la proteína de estudio en la fracción citoplasmática, los niveles de β -Catenina disminuían. Sin embargo, en la fracción nuclear no se observaron cambios en los niveles de la proteína que indujeran a pensar que existía una menor traslocación de β -Catenina al núcleo en el caso del modelo de preadipocitos 3T3-L1 con silenciamiento de Nr5a2.

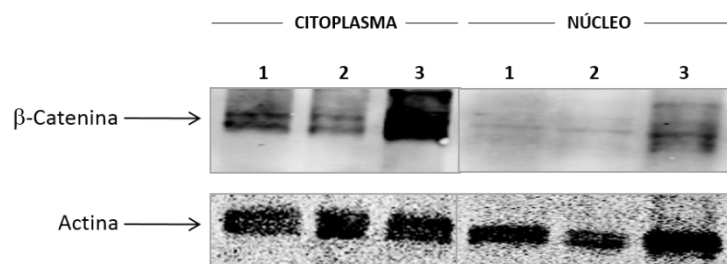


Fig.R25. Western blot para el estudio del efecto de Nr5a2 sobre los niveles de β -Catenina en las fracciones citoplasmáticas y nucleares de preadipocitos 3T3-L1. 1) Preadipocitos 3T3-L1 con el vector vacío PCEFL (Control); 2) Preadipocitos 3T3-L1

shNr5a2 con Nr5a2 silenciado; 3) Preadipocitos 3T3-L1 PCEFL-Nr5a2 con Nr5a2 sobreexpresado. Como control de carga se utilizó la medida de Actina. El experimento se realizó dos veces de manera independiente. Se observa un aumento en los niveles de β -Catenina tanto a nivel citoplasmático como nuclear cuando Nr5a2 es sobreexpresado. Sin embargo la disminución en los niveles de β -Catenina cuando Nr5a2 es silenciado sólo es apreciable en la fracción citoplasmática.

Para analizar el efecto final de Nr5a2 en la diferenciación a adipocitos se procedió al estudio de la diferenciación de los dos modelos de células 3T3-L1, con sobreexpresión y silenciamiento de Nr5a2, durante 9 días con el protocolo indicado anteriormente. Transcurrido este tiempo y una vez que las células 3T3-L1 se transformaron en adipocitos maduros se analizó la expresión por qPCR de dos marcadores de diferenciación: *Ppar γ* y *Fabp4*.

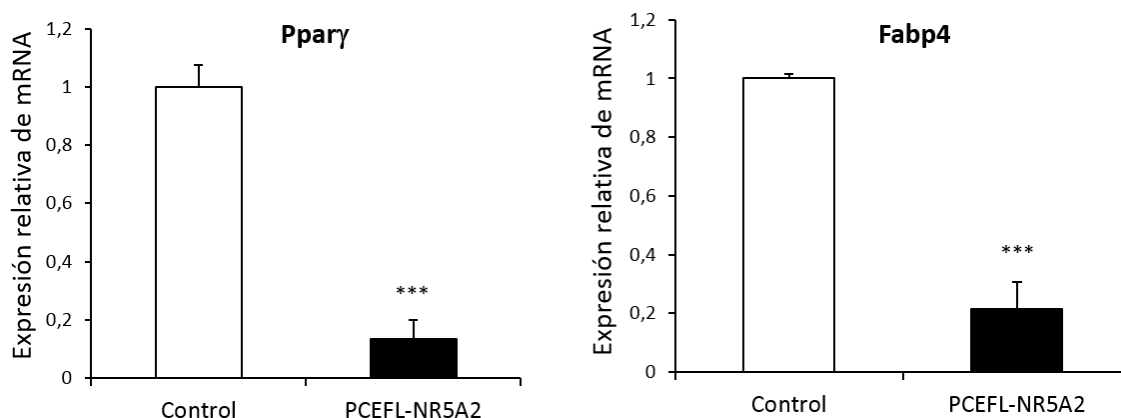


Fig.R26. Expresión de genes marcadores de diferenciación de adipocitos en células 3T3-L1 diferenciadas durante 9 días con sobreexpresión de Nr5a2. Los resultados de qPCR muestran el promedio de n=4 experimentos independientes para los genes *Ppar γ* y *Fabp4*. Como control se utilizó la expresión génica de células 3T3-L1 diferenciadas durante 9 días, con el vector PCEFL vacío transfectado. Cuando Nr5a2 es sobreexpresado se puede observar un descenso estadísticamente significativo de la expresión de *Ppar γ* y *Fabp4* de un 87% y 79% respectivamente, respecto al control. ***p<0,001.

Los resultados en el caso de la sobreexpresión de Nr5a2 (Fig.R26) mostraron una gran disminución en la expresión de ambos marcadores respecto a la expresión del control de células 3T3-L1 con el vector PCEFL vacío. La disminución relativa al control de *Ppar γ* fue de un 87% y la de *Fabp4* de un 79%. En cambio, en los resultados de expresión cuando Nr5a2 era silenciado no se apreciaron cambios significativos en los marcadores de

diferenciación (Fig.R27), lo que es consistente con que no se apreciaran tampoco cambios significativos en la traslocación de β -Catenina al núcleo en este modelo de estudio.

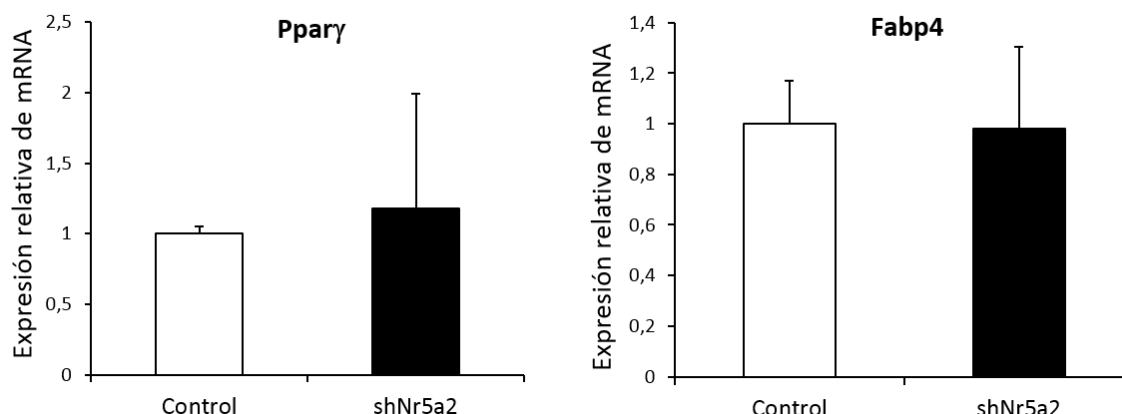


Fig.R27. Expresión de genes marcadores de diferenciación de adipocitos en células 3T3-L1 diferenciadas durante 9 días con silenciamiento de Nr5a2. Los resultados de qPCR muestran el promedio de n=4 experimentos independientes para la expresión de los genes *Pparγ* y *Fabp4*. Como control se utilizó la expresión génica de células 3T3-L1 diferenciadas durante 9 días con el vector PLKO.1 vacío transfectado. En el caso de las células con Nr5a2 silenciado no se aprecian cambios significativos en la expresión de *Pparγ* y *Fabp4*.

4.7. ANÁLISIS FUNCIONAL DEL SNP rs4722551 LOCALIZADO EN EL PROMOTOR DE miR-148a

Anteriormente a este estudio se encontró en la bibliografía un SNP en el promotor de miR-148a, rs4722551, el cual estaba asociado con ciertos fenotipos del trastorno de ansiedad o *panic disorder* (205). Esta patología psiquiátrica se ha visto relacionada con los niveles de triglicéridos, colesterol, apolipoproteína A y B en sangre (206). Por ello, nos pareció interesante hacer un estudio de asociación con dicho SNP. El estudio, realizado por el Dr. Riancho en una cohorte de mujeres de Cantabria, dio como resultado una gran asociación del SNP rs4722551 con el índice de masa corporal (IMC). Tras este resultado se decidió llevar a cabo el análisis funcional de este SNP.

Previamente al estudio funcional, se realizó un análisis bioinformático de ambos alelos del SNP rs4722551, situado a -2220 pb del inicio de la transcripción de miR-148a. Los resultados obtenidos con el programa <http://mapper.chip.org> (Tabla R3) mostraron la predicción de la pérdida del sitio de unión del receptor de andrógenos (AR) en el alelo T del SNP.

Alelo C	Model	Name(s)	Strand	Start	End	Score	E-value
	<u>MA0067</u>	Pax2	-	10	16	1.6	8.4
	<u>T00042</u>	AR	+	13	27	5.3	15
	<u>MA0071</u>	RORA_1	-	13	22	2.2	11
	<u>MA0098</u>	ETS1	+	30	34	0.7	18
	<u>M00649</u>	MAZ1	-	38	45	3.4	16

Alelo T	Model	Name(s)	Strand	Start	End	Score	E-value
	<u>MA0067</u>	Pax2	-	10	16	1.6	8.4
	<u>MA0071</u>	RORA_1	-	13	22	2.2	11
	<u>MA0045</u>	HMG-I/Y	-	21	35	2.9	5.2
	<u>MA0062</u>	GABPA	-	23	32	0.7	19
	<u>MA0098</u>	ETS1	+	26	30	0.7	18
	<u>M00649</u>	MAZ1	-	38	45	3.4	16

Tabla R3. Resultados de los análisis bioinformáticos con el programa <http://mapper.chip.org/> para los dos alelos del SNP rs4722551. El programa predice que el alelo T del SNP pierde el sitio de unión para el receptor de andrógenos (AR), y gana sitios de unión para HMG-I/Y y GABPA.

Como primer paso para el análisis funcional del SNP rs4722551, se llevaron a cabo experimentos de retardo en gel o EMSA con ambos alelos (C y T) del SNP.

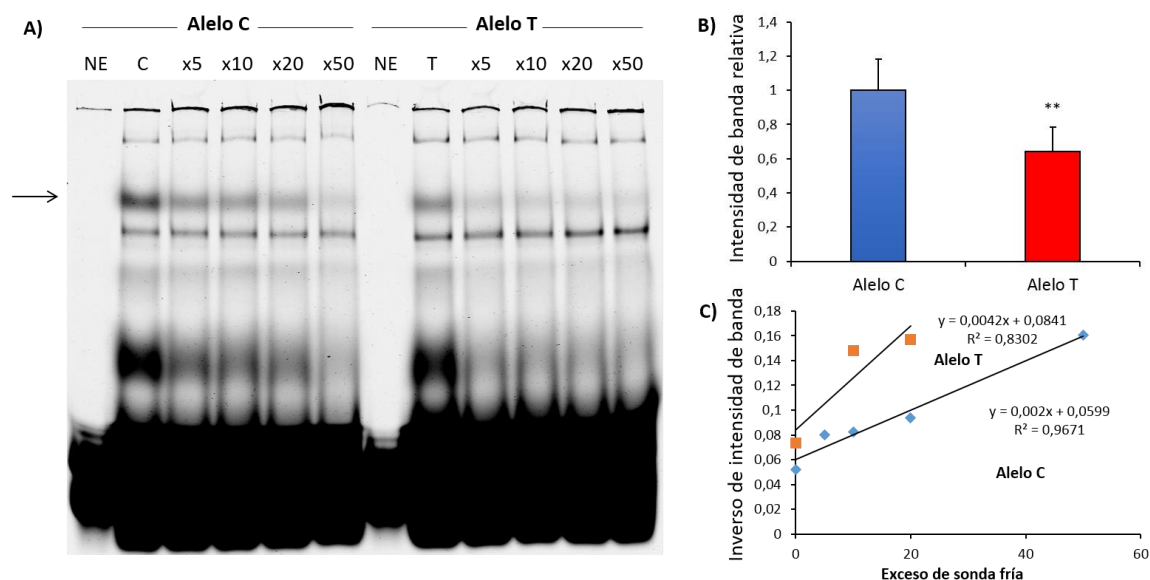
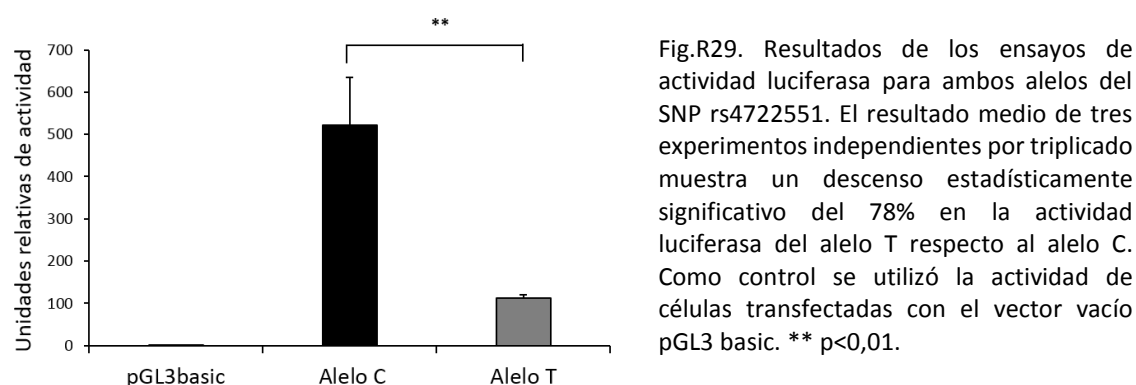


Fig.R28. EMSA del SNP rs4722551. A) Experimento de EMSA para los dos alelos del SNP. Se emplearon 20 µg de extractos nucleares de HepG2. NE: sin extractos nucleares; C/T: calle con la sonda del alelo C o T del SNP y extractos nucleares; x5, x10, x20, x50: calle con la sonda marcada para cada uno de los alelos, un exceso de sonda fría (no marcada) de 5, 10, 20 ó 50 veces y extractos nucleares. La flecha negra señala la banda específica. B) Análisis estadístico de la intensidad de banda para los dos alelos del SNP en los experimentos de EMSA. En n=4 experimentos independientes se muestra una disminución estadísticamente significativa del 36% en la capacidad de unión del alelo T respecto al alelo C. ** p<0,01. C) Representación gráfica de la competición con la sonda fría para cada alelo del SNP. Se representa como el inverso de la intensidad de banda respecto al exceso de sonda fría.

Los resultados (Fig.R28A) no mostraron cambios en el patrón de bandas en función del alelo del SNP. Sin embargo sí que se observó una disminución del 36% en la intensidad de banda del alelo T respecto al alelo C, en cuatro experimentos independientes (Fig.R28B). Además, en la representación gráfica de la competición de ambos alelos del SNP con la sonda fría o no marcada (Fig.R28C), se apreció una menor afinidad en la unión de las proteínas con la sonda del alelo T. Esto se puede determinar observando que la pendiente de la recta correspondiente al alelo T es mayor que la del alelo C.



Los resultados de los experimentos de retardo en gel sugerían que el SNP rs4722551 podría tener un efecto funcional. Para confirmar esto, se decidió subclonar los dos alelos de un fragmento del promotor de miR-148a que comprendía la región desde -2508 pb a +32 pb (siendo 0 pb el inicio de la transcripción), conteniendo dicho fragmento el SNP rs4722551. Una vez subclonados los dos alelos del fragmento e insertados en el vector reportero pGL3 basic, se llevaron a cabo los experimentos de actividad luciferasa. Los plásmidos fueron transfectados en células HepG2, que tienen una gran expresión de miR-148a, lo cual garantizaba que la línea expresara el gen luciferasa. Los resultados de tres experimentos independientes por triplicado (Fig.R29) mostraron una actividad luciferasa 78% menor del alelo T respecto al alelo C. Esto demostró definitivamente que el SNP rs4722551 era un SNP funcional.

Para comprobar si el efecto del SNP observado en los experimentos de EMSA era debido a la pérdida del sitio de unión del receptor de andrógenos (AR) en el alelo T, como mostraba el análisis bioinformático, se llevaron a cabo experimentos de superretardo en gel con un anticuerpo para AR y con extractos nucleares de células HepG2 tratadas con 100 nM de testosterona. Los resultados (Fig.R30) mostraron que el receptor de andrógenos no se estaba uniendo a ninguno de los dos alelos. Esto se pudo concluir ya

que con la presencia del anticuerpo no se observó ni un superretardo ni una disminución de la banda específica en el gel para ninguno de los dos alelos.

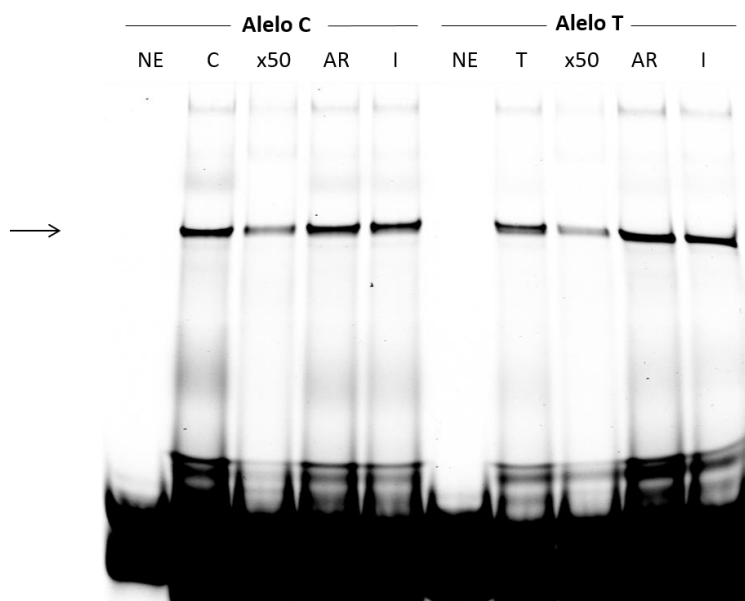


Fig.R30. Superretardo del SNP rs4722551 realizado con el anticuerpo del receptor de andrógenos (AR). Se emplearon 20 μ g de extractos nucleares de células HepG2 tratadas con 100 nM de testosterona 24 horas antes de la extracción. NE: sin extractos nucleares (control); C o T: calle con la sonda del alelo C o T y extractos nucleares; x50: calle con la sonda para cada uno de los alelos, un exceso de sonda fría de 50 veces y extractos nucleares; AR: calle con la sonda para cada uno de los dos

alelos, el anticuerpo contra AR y extractos nucleares; I: calle con la sonda para cada uno de los dos alelos, el anticuerpo inespecífico (contra Actina) y extractos nucleares. Este experimento se repitió tres veces de manera independiente.

DISCUSIÓN

"La creencia no es el principio, sino el fin de todo conocimiento".

Johann Wolfgang von Goethe

Los resultados del estudio de la actividad luciferasa en las regiones 3'UTR de genes relacionados con las hipercolesterolemias hereditarias (Fig.R1) demuestran que todas las regiones 3'UTR de los genes estudiados poseen menos expresión de luciferasa que el control, lo que indica que todos ellos podrían estar regulados negativamente en mayor o menor medida por miRNAs.

Dentro de la región 3'UTR de APOB se localiza el miRSNP rs12720763, del cual no se encontró en la bibliografía ningún estudio previo. Los resultados de actividad luciferasa con los dos alelos del SNP en la región 3'UTR de APOB (Fig.R2) indican que rs12720763 es un SNP funcional. Los análisis bioinformáticos realizados para predecir la unión de miRNAs en los diferentes alelos del SNP (Tabla R1) predicen la desaparición del sitio de unión de miR-148a-5p en el alelo T del miRSNP rs12720763.

miR-148a-5p es uno de los dos miRNAs maduros, junto a miR-148a-3p, que provienen del transcrito pre-miR-148a. El gen de miR-148a está situado en humanos en un *locus* no caracterizado del cromosoma 7, y forma parte de una familia de tres miRNAs junto a miR-148b y miR-152, con los que comparte homología en la secuencia de su región semilla (207). Se ha descrito la importancia de los niveles de expresión de miR-148a en el pronóstico de varios tumores, en los que puede actuar bien como oncogén por su elevada expresión o bien como supresor tumoral debido a su baja expresión. miR-148a se encuentra sobreexpresado en mieloma múltiple (208), en carcinoma hepatocelular asociado a hepatitis B (209) y en meduloblastomas asociados a la señalización por Wnt (210). En cuanto a los tumores con una baja expresión de miR-148a respecto a los tejidos normales cabe destacar el adenocarcinoma ductal pancreático (211) y el cáncer gástrico (212, 213). Uno de los motivos de la asociación entre el mal pronóstico de estos tumores y una baja expresión de miR-148a, podría ser la regulación directa de ROCK1, ya que esta proteína está implicada en la invasión celular y la metástasis en cáncer gástrico (213). Otros tumores fuera del sistema digestivo con baja expresión de miR-148a son: el cáncer de próstata hormonorefractario (214) y el cáncer de endometrio (204), en el cual el mal pronóstico de la enfermedad asociado a la baja expresión de miR-148a estaría mediado por la regulación directa de este miRNA sobre *WNT10B* en este tipo de tumor. En algunos tumores con una baja expresión de miR-148a, se ha sugerido la posibilidad de que exista un circuito de regulación negativa entre este miRNA y *DNMT1*, un gen que codifica para

una DNA metiltransferasa que es diana directa de miR-148a-3p. En este circuito de regulación, debido al bajo nivel de expresión de miR-148a, éste no puede regular negativamente a *DNMT1*, que ve aumentada su expresión, y en consecuencia se da un aumento en la metilación en el promotor del miRNA, lo que conlleva su silenciamiento y el mantenimiento de sus bajos niveles de expresión (215-218).

También se ha demostrado la importancia de miR-148a en la regulación de algunos procesos de diferenciación celular. Es un regulador positivo de la osteoclastogénesis mediante la inhibición de la expresión de *MAFB*, gen que codifica un TF del mismo nombre que inhibe dicho proceso (219). Además, se ha descrito su importancia en la osteoblastogénesis, ya que sus niveles de expresión son menores en los osteoblastos diferenciados que en las MSC de las que proceden (220). Durante la miogénesis, miR-148a aumenta sus niveles de expresión a medida que se diferencian los mioblastos, y regula positivamente este proceso de diferenciación por la inhibición de *ROCK1*, a cuya región 3'UTR se une directamente (221). Por último, recientemente se ha implicado a miR-148a en la regulación de la adipogénesis. Shi y cols. han descrito que regula positivamente este proceso en MSC mediante la inhibición de *WNT1*, lo que provoca una disminución en la señalización de la ruta Wnt canónica y un aumento en la diferenciación de adipocitos. También se ha descrito en este mismo trabajo que CREB, TF de gran importancia en los pasos iniciales de la diferenciación de adipocitos, se une al promotor de miR-148a activando su expresión (222). Por otro lado, Londoño-Gentile y cols. han descrito que miR-148a podría tener este efecto proadipogénico en células 3T3-L1 en parte también por la regulación directa de *DNMT1*, inhibiendo su expresión y provocando así una disminución en la metilación, lo que aceleraría la diferenciación de adipocitos (223).

Los resultados de los ensayos luciferasa con inhibidores de los dos miRNAs maduros de miR-148a, miR-148a-3p (Fig.R3A) y miR-148a-5p (Fig.R3B), para los dos alelos del miRSNP rs12720763 indican un ligero aumento, sin ser estadísticamente significativo, de la actividad luciferasa con sendos inhibidores. Estos resultados parecen indicar que el efecto de estos dos miRNAs sobre la región 3'UTR de *APOB* es independiente del SNP, ya que la inhibición de miR-148a-3p y miR-148a-5p afecta por igual a la actividad luciferasa de ambos alelos del miRSNP rs12720763. La inhibición de miR-148a-3p y miR-148a-5p en células HepG2 provoca un aumento en la expresión de *APOB* a nivel de mRNA (Fig.R6A) y

de proteína (Fig.R6B) en estas células con sendos inhibidores, siendo un efecto mayor que el observado en los experimentos de actividad luciferasa. Por otro lado, el efecto es mayor con el inhibidor de miR-148a-5p. Sin embargo, los resultados para la expresión relativa de los dos miRNAs maduros en células HepG2 (Fig.R5) indican que la expresión de miR-148a-5p es mucho menor que la de miR-148a-3p, lo que sugiere que miR-148a-5p podría ser el miRNA maduro del dúplex que tiene menor afinidad en la unión del miRISC. Sin embargo este miRNA podría tener funciones biológicas aunque su expresión sea mucho menor que la de miR-148a-3p (77, 224).

Los resultados de expresión de *PCSK9* en presencia del inhibidor de miR-148a-3p en células HepG2 (Fig.R7A) indican que este miRNA podría regular negativamente, pero en pequeña medida, los niveles de expresión de *PCSK9*. En cuanto a los resultados de expresión de *LDLR* en células HepG2 (Fig.R7B) indican que la inhibición de miR-148-3p no produce ningún efecto sobre la expresión de este gen.

Por tanto, a la vista de los resultados de expresión de *APOB* (Fig.R6A y R6B) y de expresión de *PCSK9* (Fig.R7A) al inhibir miR-148a-3p en células HepG2, este miRNA podría ser un regulador negativo de la expresión de *APOB* y *PCSK9* en este modelo hepático, sugiriendo que miR-148a-3p podría actuar provocando una disminución en la síntesis y secreción de VLDL e inhibiendo la destrucción de LDLR al disminuir los niveles de PCSK9, lo que conllevaría un aumento en la captación de partículas LDL en células HepG2. Esta hipotética disminución en la síntesis de partículas VLDL y aumento en la captación de partículas LDL, disminuiría los niveles de cLDL en plasma lo que podría reducir el riesgo de padecer aterosclerosis según este modelo (32, 35). Sin embargo, estos resultados son contrarios a lo descrito recientemente por Goedeke y cols. (225), que muestran que la inhibición de miR-148a-3p provoca una disminución de los niveles de cLDL, en parte por la regulación directa de este miRNA sobre *LDLR*. A pesar de esto, podría no ser descartable una hipotética regulación de miR-148a-3p en ambas direcciones, promoviendo un equilibrio en la regulación de los niveles de cLDL.

Los resultados de expresión de miR-148a-3p en células 3T3-L1 (Fig.R8) muestran un aumento en los niveles de este miRNA en adipocitos maduros respecto a preadipocitos. Estos resultados concuerdan con otros estudios (198, 222), en los que también se describe un aumento de expresión de miR-148a-3p a medida que aumenta la diferenciación de

adipocitos, lo que demuestra la importancia de este miRNA en este proceso biológico. A la vista del aumento de la expresión de miR-148a-3p en células 3T3-L1 diferenciadas (Fig.R8), cabría esperar un efecto proadipogénico de este miRNA en células 3T3-L1. Sin embargo, la inhibición de este miRNA podría actuar regulando positivamente la diferenciación de adipocitos a la vista de los resultados de expresión para los marcadores de diferenciación en este modelo de inhibición de miR-148a-3p en células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos maduros (Fig.R15), lo que podría estar indicando un efecto contrario al previsto.

Los resultados del secuenciado de RNA (Fig.R9) y los análisis de expresión por qPCR (Fig.R10) en preadipocitos 3T3-L1 muestran un aumento de expresión en tres genes de la ruta Wnt: *Dkk1*, *Wnt5b* y *Wnt10b*, cuando miR-148a-3p es inhibido. Se ha descrito que un aumento de expresión de *Dkk1* en preadipocitos 3T3-L1 conlleva la inhibición de la ruta canónica de Wnt así como un aumento en la diferenciación de adipocitos (179). De la misma forma, también se ha descrito el efecto proadipogénico e inhibitorio de la ruta canónica de Wnt, provocado por un aumento en la expresión de *Wnt5b* en preadipocitos 3T3-L1 (175, 176). De acuerdo con esto, nuestros resultados de inhibición de la ruta canónica de Wnt cuando miR-148a-3p es inhibido en preadipocitos 3T3-L1, observados por una disminución de la translocación de β -Catenina al núcleo (Fig.R13) y una disminución de la expresión de su diana *Axin2* (Fig.R14), podrían deberse al aumento en los niveles de expresión de *Dkk1* (Fig.R9 y Fig.R10) y *Wnt5b* (Fig.R9, Fig.R10 y Fig.R11). Del mismo modo, este aumento en la expresión de *Dkk1* y *Wnt5b* en preadipocitos 3T3-L1 al inhibir miR-148a-3p, podría ser responsable en parte del efecto proadipogénico observado en este modelo a la vista de los resultados de expresión de los marcadores de diferenciación en adipocitos maduros (Fig.R15).

A la vista del aumento de expresión de *Wnt10b* en preadipocitos 3T3-L1 con miR-148a-3p inhibido (Fig.R9 y Fig.R10), cabría esperar un efecto antiadipogénico como ha sido descrito en varios estudios (144, 146, 172-174, 226-228). Sin embargo, nuestros resultados de expresión de los marcadores de diferenciación en células 3T3-L1 diferenciadas (Fig.R15) sugieren lo contrario como se ha explicado anteriormente. Pese a haberse descrito *WNT10B* como una diana directa de miR-148a-3p en fibroblastos de endometrio (204), recientemente Shi y cols. demostraron que en células HEK293T este

miRNA no se unía directamente a la región 3'UTR de WNT10B (222), sugiriendo la posibilidad de que la interacción directa de miR-148a-3p con WNT10B podría depender del tipo celular. Esto mismo podría estar ocurriendo en células 3T3-L1 a la vista de nuestros resultados de actividad luciferasa en estas células (Fig.R12). En cualquier caso, a pesar del aumento de expresión de *Wnt10b*, el aumento de expresión de *Dkk1* y *Wnt5b* con miR-148a-3p inhibido en preadipocitos 3T3-L1 podría ser suficiente para inhibir la ruta canónica de Wnt, a la vista del descenso de la translocación de β -Catenina al núcleo (Fig.R13), y la disminución de la expresión de su diana *Axin2* (Fig.R14), lo que demuestra la disminución de la actividad transcripcional de β -Catenina (141). La inhibición de la ruta canónica de Wnt y la disminución de la traslocación de β -Catenina al núcleo tienen un efecto proadipogénico (144, 170, 172, 178, 228-231), lo que podría explicar ese mismo efecto observado en nuestro modelo de inhibición de miR-148a-3p en células 3T3-L1, a la vista de los resultados de expresión de los marcadores de diferenciación de adipocitos (Fig.R15).

La proteína PCK1 es regulada por PPAR γ y aumenta su expresión en adipocitos maduros. Es de gran importancia en el metabolismo adipocítico, siendo la enzima fundamental en la gliceroneogénesis, proceso por el cual se sintetiza glicerol-3-fosfato y TG a partir de sustratos entre los que no está la glucosa (157, 232-234). Los resultados de expresión de *Pck1* en preadipocitos 3T3-L1 (Fig.R9 y Fig.R10) y adipocitos diferenciados (Fig.R15) con miR-148a-3p inhibido muestran un aumento en la expresión de este gen, el cual podría ser responsable en parte del efecto proadipogénico observado al inhibir el miRNA.

En el trabajo de Londoño-Gentile y cols. se describe a miR-148a-3p como un miRNA proadipogénico, mostrando que su sobreexpresión promueve la diferenciación mientras que su inhibición la disminuye, en células 3T3-L1 y C3H10T1/2 (223). Estos resultados se contradicen con los nuestros de expresión de marcadores de diferenciación de adipocitos al inhibir miR-148a-3p (Fig.R15), que muestran que la inhibición de miRNA podría ser proadipogénica. En este trabajo de Londoño-Gentile y cols. atribuyen el efecto proadipogénico de miR-148a-3p a la inhibición de la expresión de *DNMT1* en células 3T3-L1. Asimismo, miden la expresión de marcadores de diferenciación de adipocitos en diferentes días tras la inducción, el segundo día cuando sobreexpresan miR-148a-3p y el

cuarto día cuando lo inhiben, en función del tiempo de expresión máxima de *DNMT1* y el tiempo en el que desciende la expresión de esta metiltransferasa respectivamente. En cambio, nuestros resultados de expresión de marcadores de diferenciación (Fig.R15) son en el día 9 tras la inducción, con lo que podrían no ser comparables con los obtenidos por Londoño-Gentile y cols.

Shi y cols. también describen en su trabajo a miR-148a-3p como un miRNA proadipogénico, mostrando que su sobreexpresión promueve la diferenciación de adipocitos y su silenciamiento la disminuye en MSC humanas (222). Los resultados de este trabajo también están en aparente contradicción con nuestros resultados de expresión de marcadores de diferenciación con miR-148a-3p inhibido (Fig.R15), si bien Shi y cols. utilizan en su estudio MSC humanas como modelo de estudio y nosotros preadipocitos 3T3-L1, que ya están comprometidos al linaje adipocítico. También demuestran la interacción directa de miR-148a-3p con la región 3'UTR de *WNT1* en MSC humanas, con lo que este miRNA regularía positivamente la adipogénesis en estas células en parte por la inhibición de la expresión de *WNT1* y la inhibición de la ruta canónica de Wnt, lo que iría en contradicción con nuestros resultados en células 3T3-L1 en los que es la inhibición de miR-148a-3p la que aumenta la expresión de *Dkk1* y *Wnt5b* (Fig.R9 y Fig.R10) y disminuye la translocación de β -Catenina al núcleo (Fig.R13), inhibiendo así la ruta canónica de Wnt. Las contradicciones de los resultados de Shi y cols. y los nuestros podrían explicarse en parte a los diferentes modelos celulares utilizados como se ha dicho anteriormente, y en parte también a los diferentes niveles de sobreexpresión y silenciamiento de miR-148a-3p alcanzados. Shi y cols. sobreexpresan 38 veces miR-148a-3p respecto al control y en nuestro caso apenas se llegó a las 4 veces (Fig.R16), mientras que ellos silencian un 60% de la expresión del miRNA y en nuestro caso se superó el 80% del silenciamiento (Fig.R8). Una insuficiente sobreexpresión podría explicar por qué no existen diferencias significativas en nuestro modelo de sobreexpresión de miR-148a-3p en células 3T3-L1, ni en la expresión de *Dkk1*, *Wnt5b* y *Wnt10b* (Fig.R17), ni en la expresión de los marcadores de diferenciación (Fig.R18).

Shi y cols. describen que la expresión de miR-148a aumenta en depósitos de grasa epididimales en ratones alimentados con una dieta rica en grasas, y también en depósitos de grasa visceral de humanos a medida que aumenta el IMC (222). Estos resultados

podrían contradecirse con el efecto proadipogénico de miR-148a-3p que observan en MSC, donde la sobreexpresión de miR-148a-3p en estas células aumenta la diferenciación, mientras que la inhibición de este miRNA la disminuye. Esta hipotética contradicción podría argumentarse en base a que se ha descrito la relación entre un elevado IMC y la obesidad hipertrófica con la disminución en la capacidad de diferenciación de los adipocitos (116, 118, 119), lo que estaría de acuerdo con nuestros resultados de expresión en los marcadores de diferenciación al inhibir miR-148a-3p en 3T3-L1 (Fig.R15). Un nivel de expresión bajo de este miRNA, que estaría correlacionado con un IMC bajo, aumentaría la diferenciación de adipocitos, al contrario de lo que describen Shi y cols. Así pues, en base a esto la inhibición de miR-148a-3p podría aumentar la diferenciación de adipocitos en individuos con obesidad hipertrófica, lo que mejoraría los problemas asociados como resistencia a insulina, DMT2, NAFLD y aterosclerosis (116, 121).

NR5A2 también llamado LRH-1 es un receptor nuclear huérfano de la familia Ftz-F1, que se expresa en tejidos derivados del endodermo y tiene importantes funciones metabólicas entre las que cabe destacar: regulación y transporte de colesterol y derivados, síntesis de sales biliares y mantenimiento de la homeostasis de la glucosa. Además NR5A2 juega un importante papel en la proliferación y diferenciación de tejidos derivados del endodermo (235).

Los resultados de los análisis bioinformáticos realizados para el estudio del promotor humano y murino de miR-148a (Tabla R2) mostraron la posibilidad de que NR5A2 estuviera uniéndose a ambas secuencias en las dos especies. Por un lado, los resultados de superretardo en gel para la hipotética secuencia de unión en el promotor humano (Fig.R22A) mostraron una mayor unión de las proteínas a la sonda cuando se sobreexpresaba NR5A2. Asimismo, pese a no haber superretardo, con la presencia del anticuerpo específico para NR5A2 existía una menor unión de las proteínas a la sonda. Estos resultados pusieron de manifiesto que NR5A2 podría estar uniéndose al promotor humano de miR-148a, o al menos provocaría un efecto por el cual otras proteínas se unirían con distinta afinidad a esta secuencia del promotor. Por otro lado, los experimentos de superretardo en gel para la hipotética secuencia de unión en el promotor murino (Fig.R22B) resultaron negativos para la unión de Nr5a2. Por ello, se recurrió a experimentos de CHIP con la secuencia de estudio del promotor murino de miR-148a

(Fig.R23) que también resultaron negativos. Así pues, parece existir un efecto directo de NR5A2 sobre el promotor de miR-148a humano, mientras que dicho efecto es inexistente en el promotor murino al menos con la secuencia estudiada.

Los resultados de expresión de Nr5a2 en células 3T3-L1 (Fig.R19) indican que este receptor nuclear se expresa en preadipocitos y no así en adipocitos maduros, como se había descrito con anterioridad (236, 237). A su vez, los resultados de expresión en preadipocitos 3T3-L1 sin diferenciar con sobreexpresión (Fig.R21A) y silenciamiento (Fig.R21B) de Nr5a2 indican que este receptor nuclear regula positivamente los niveles de expresión de miR-148a-3p en estas células.

Por otro lado, resulta interesante que la sobreexpresión de Nr5a2 en preadipocitos 3T3-L1 provoque una disminución en la expresión de los genes *Dkk1*, *Wnt5b* y *Wnt10b* (Fig.R24A). En cuanto al silenciamiento de Nr5a2 produce un aumento discreto de los niveles de expresión de *Dkk1* y *Wnt10b* (Fig.R24B), lo que podría deberse a que el nivel de silenciamiento obtenido en la expresión de Nr5a2 en preadipocitos 3T3-L1 (Fig.R20B) no es suficiente para observar un efecto claro sobre la expresión de estos genes. A su vez, los resultados de western blot (Fig.R25) indican que la sobreexpresión de Nr5a2 induce la expresión de β -Catenina y su traslocación al núcleo, lo que va acorde con la disminución radical de la expresión de los marcadores de diferenciación de adipocitos *Ppar γ* y *Fabp4* en adipocitos maduros (Fig.R26). En el caso del silenciamiento de Nr5a2 no se observa un cambio evidente en la translocación de β -Catenina al núcleo (Fig.R25) ni existe un cambio significativo en la expresión de los marcadores de diferenciación (Fig.R27).

Mrosek y cols. han demostrado el efecto antiadipogénico de Nr5a2 (237), si bien atribuyen este efecto al balance de expresión entre *Nr5a2* y su correpresor *Nr0b2* (Shp) y la regulación de *Cyp19a1* (Aromatasa) por Nr5a2 en preadipocitos. Nuestros resultados indican que el efecto en la regulación negativa de la diferenciación de adipocitos causado por la sobreexpresión de Nr5a2 (Fig.26) podría estar mediado en parte por la disminución de la expresión de *Dkk1* (179) y *Wnt5b* (175, 176) (Fig.R24A), así como por una mayor translocación nuclear de β -Catenina en preadipocitos 3T3-L1 (144, 170, 172, 178, 228-231) (Fig.R25), lo que implica una mayor activación de la ruta canónica de Wnt. Sin embargo, la disminución de la expresión de *Wnt10b* observada (Fig.R24A) no tiene un

efecto proadipogénico ni inhibitorio de la ruta canónica de Wnt como cabría esperar (144, 146, 172-174, 204, 226-228), lo que quizás podría explicarse por el balance entre diferentes proteínas Wnt que activan diferentes rutas. Esta explicación es comparable a la realizada anteriormente con los resultados de la inhibición de miR-148a-3p en preadipocitos 3T3-L1 pero con diferente efecto en la expresión de *Dkk1*, *Wnt5b* y *Wnt10b*, y por tanto con efecto adipogénico contrario. Está descrito que Nr5a2 actúa como coactivador de β -Catenina para la amplificación de su función transcripcional (238), lo que podría corroborar que la función de Nr5a2 como regulador negativo de la diferenciación de adipocitos en 3T3-L1 podría estar mediada por la activación de la ruta canónica de Wnt y la coactivación de β -Catenina. Por otra parte, la regulación positiva de Nr5a2 sobre los niveles de expresión de miR-148a-3p (Fig.R21) en preadipocitos 3T3-L1 podría indicar que la función de Nr5a2 sobre la diferenciación de adipocitos podría estar en parte mediada también por este miRNA a través de su función como posible regulador de la ruta canónica de Wnt. También cabe señalar que el grado de silenciamiento de Nr5a2 obtenido en estas células (Fig.R20B) podría ser insuficiente para lograr una expresión de miR-148a-3p lo suficientemente baja (Fig.R21B) como para observar los mismos resultados obtenidos en el estudio de la inhibición de miR-148a-3p para la expresión génica de *Dkk1*, *Wnt5b* y *Wnt10b* (Fig.R24B) y los marcadores de diferenciación de adipocitos (Fig.R27).

En un trabajo previo se demostró la asociación del SNP rs4722551, situado en el promotor de miR-148a, con la ansiedad o *panic disorder* (205). Más recientemente, se asoció dicho SNP con la alteración de los niveles de cLDL (239, 240). Estas dos asociaciones del SNP guardan relación ya que el trastorno de ansiedad y otras patologías psiquiátricas están estrechamente relacionadas con los niveles de TG, colesterol, apolipoproteína A y B en sangre (206, 241). Por otra parte, en un estudio se comprobó la asociación con IMC de un SNP situado en el *locus* donde se encuentra el gen de miR-148a a 39 Kb del mismo (242). Estos resultados en conjunto sugerían la posibilidad de que el SNP pudiera estar asociado con IMC. En un estudio realizado por el Dr. Riancho en una cohorte de mujeres de Cantabria, el SNP rs4722551 mostró asociación con IMC. Los resultados de retardo en gel (Fig.R28) indicaron que las proteínas se unen con mayor afinidad a la sonda portadora del alelo C del SNP, sin observarse cambio en el patrón de bandas entre las sondas con los diferentes alelos. A su vez, los resultados de los ensayos de actividad luciferasa (Fig.R29)

mostraron que el alelo C tiene más actividad luciferasa que el alelo T, por lo que se pudo concluir que el SNP rs4722551 es funcional y se encuentra en un sitio de regulación positiva.

Los resultados del análisis bioinformático (Tabla R3) muestran que el Receptor de Andrógenos (AR) podría estar uniéndose al alelo C del SNP rs4722551, mientras que esa unión se perdería para el alelo T. Estudios anteriores demuestran que el receptor nuclear AR, TF que se activa en respuesta a andrógenos como la testosterona y la dihidrotestosterona, inhibe la adipogénesis en parte por su papel favoreciendo la ruta canónica de Wnt por su unión a β -Catenina y TCF4 (243, 244). Sin embargo los resultados de los experimentos de superretardo en gel (Fig.R30) demostraron que el AR no se une a la región del promotor donde se encuentra el SNP.

Como resumen de nuestros resultados se puede decir que todas las regiones 3'UTR de genes relacionados con hipercolesterolemias hereditarias analizadas podrían estar reguladas por miRNAs a la vista de los resultados de ensayos luciferasa. Dentro de la región 3'UTR de uno de estos genes, *APOB*, se encontró el miRSNP rs12720763, el cual resultó ser funcional a la vista de los ensayos luciferasa realizados. Asimismo, los experimentos de inhibición de los dos miRNAs maduros de miR-148a en células HepG2 mostraron un aumento en la expresión de *APOB* cuando ambos miRNAs eran inhibidos, siendo mayor el efecto con la inhibición de miR-148a-5p, pese a ser éste el miRNA menos abundante de los dos. La inhibición de miR-148a-3p en estas células provoca también un ligero aumento en la expresión de *PCSK9*, lo que sugiere que miR-148a-3p podría regular positivamente la captación de cLDL en este modelo hepático.

Los resultados obtenidos en el modelo celular murino 3T3-L1 muestran que la expresión de miR-148a-3p es mayor en células diferenciadas a adipocitos maduros que en preadipocitos no diferenciados. El análisis de los marcadores de diferenciación al inhibir este miRNA en células 3T3-L1 diferenciadas muestra un aumento en la expresión génica de todos los marcadores analizados, sugiriendo que la inhibición de miR-148a-3p tiene un efecto proadipogénico. Este efecto proadipogénico podría estar mediado por la inhibición de la ruta canónica de Wnt dependiente de β -Catenina, a la vista de la disminución en la traslocación nuclear de esta proteína y su efecto sobre la expresión de *Axin2*. Según

nuestros resultados, esta inhibición observada en la ruta canónica sería el resultado de un aumento en la expresión de *Dkk1* y *Wnt5b* en los preadipocitos.

Nuestros resultados demuestran que el receptor nuclear Nr5a2 regula positivamente los niveles de expresión de miR-148a-3p en preadipocitos 3T3-L1, si bien no parece ser una regulación directa por unión al promotor de este miRNA, al menos no en ratón. Además se puede concluir que Nr5a2 tiene un efecto antiadipogénico a la vista de los resultados de expresión de marcadores de diferenciación en adipocitos maduros. Este efecto podría estar mediado en parte por miR-148a-3p y por un aumento en la activación de la ruta canónica de Wnt dependiente de β -Catenina, que se observa en el aumento de la traslocación de esta proteína cuando Nr5a2 es sobreexpresado. Este aumento de la activación de la ruta canónica va además acompañado de la disminución de la expresión de dos inhibidores de la misma: *Dkk1* y *Wnt5b*. Por último, se demostró que el SNP rs4722551, asociado con IMC, es un SNP funcional y se localiza en un sitio de regulación positiva.

CONCLUSIONES

"El cerebro no es un vaso por llenar,
sino una lámpara por encender".

Plutarco

- 1) El análisis de las regiones 3'UTR de genes relacionados con hipercolesterolemias hereditarias muestra que todas ellas están reguladas negativamente.
- 2) El SNP rs12720763, localizado en la región 3'UTR de *APOB*, es funcional.
- 3) La inhibición de miR-148a-3p y miR-148a-5p en células HepG2 aumenta la expresión de *APOB*, siendo mayor el efecto con la inhibición de miR-148a-5p.
- 4) La inhibición de miR-148a-3p produce un aumento en la expresión de *PCSK9* en células HepG2.
- 5) La expresión de miR-148a-3p es mucho mayor que la de miR-148a-5p en células HepG2.
- 6) La inhibición de miR-148a-3p en preadipocitos 3T3-L1 produce un aumento de expresión de *Dkk1*, *Wnt5b* y *Wnt10b* que conlleva una disminución de la traslocación de β -Catenina al núcleo y la inhibición de la ruta canónica de Wnt.
- 7) *Wnt10b* no es diana directa de miR-148a-3p en células 3T3-L1.
- 8) La inhibición de miR-148a-3p en preadipocitos 3T3-L1 produce un aumento en los niveles de expresión de los marcadores de diferenciación: *Ppar γ* , *Fabp4*, *Fasn*, *Adipoq*, *Pck1*, *Lipe* y *Glut4* cuando estas células se diferencian a adipocitos maduros.
- 9) Nr5a2 regula positivamente los niveles de expresión de miR-148a-3p en preadipocitos 3T3-L1.
- 10) La sobreexpresión de Nr5a2 inhibe la expresión de los genes de la ruta Wnt: *Dkk1*, *Wnt5b* y *Wnt10b* en preadipocitos 3T3-L1, y promueve la traslocación nuclear de β -Catenina.
- 11) La sobreexpresión de Nr5a2 en células 3T3-L1 conlleva una disminución en la expresión de los marcadores de diferenciación *Ppar γ* y *Fabp4* cuando las células son diferenciadas a adipocitos maduros.
- 12) El SNP rs4722551, localizado en la región promotora de miR-148a, está asociado con IMC, es un SNP funcional y se encuentra en un sitio de regulación positiva.

BIBLIOGRAFÍA

"Una mente necesita de los libros igual que una espada necesita de una piedra de amolar, para conservar el filo".

Tyrion Lannister

1. Buchanan AV, Weiss KM, Fullerton SM. Dissecting complex disease: the quest for the Philosopher's Stone? *Int J Epidemiol*. 2006;35(3):562-71.
2. Manolio TA, Brooks LD, Collins FS. A HapMap harvest of insights into the genetics of common disease. *J Clin Invest*. 2008;118(5):1590-605.
3. Gargalionis AN, Basdra EK. Insights in microRNAs biology. *Curr Top Med Chem*. 2013;13(13):1493-502.
4. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009;19(1):92-105.
5. Yamada Y, Matsuo H, Warita S, Watanabe S, Kato K, Oguri M, et al. Prediction of genetic risk for dyslipidemia. *Genomics*. 2007;90(5):551-8.
6. Klop B, Elte JW, Cabezas MC. Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. *Nutrients*. 2013;5(4):1218-40.
7. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2012;125(1):188-97.
8. Pan X, Hussain MM. Gut triglyceride production. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1821(5):727-35.
9. Klop B, Wouter Jukema J, Rabelink TJ, Castro Cabezas M. A physician's guide for the management of hypertriglyceridemia: the etiology of hypertriglyceridemia determines treatment strategy. *Panminerva Med*. 2012;54(2):91-103.
10. Innerarity TL, Young SG, Poksay KS, Mahley RW, Smith RS, Milne RW, et al. Structural relationship of human apolipoprotein B48 to apolipoprotein B100. *J Clin Invest*. 1987;80(6):1794-8.
11. Goldberg IJ, Eckel RH, Abumrad NA. Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways. *J Lipid Res*. 2009;50 Suppl:S86-90.
12. Karpe F, Dickmann JR, Frayn KN. Fatty acids, obesity, and insulin resistance: time for a reevaluation. *Diabetes*. 2011;60(10):2441-9.
13. Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(4):431-8.
14. Lambert G, Sjouke B, Choque B, Kastelein JJ, Hovingh GK. The PCSK9 decade. *J Lipid Res*. 2012;53(12):2515-24.
15. Goldberg IJ, Le NA, Paterniti JR, Jr., Ginsberg HN, Lindgren FT, Brown WV. Lipoprotein metabolism during acute inhibition of hepatic triglyceride lipase in the cynomolgus monkey. *J Clin Invest*. 1982;70(6):1184-92.
16. Raal F, Scott R, Somaratne R, Bridges I, Li G, Wasserman SM, et al. Low-density lipoprotein cholesterol-lowering effects of AMG 145, a monoclonal antibody to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 serine protease in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia: the Reduction of LDL-C with PCSK9 Inhibition in Heterozygous Familial Hypercholesterolemia Disorder (RUTHERFORD) randomized trial. *Circulation*. 2012;126(20):2408-17.

17. Abumrad NA, Davidson NO. Role of the gut in lipid homeostasis. *Physiol Rev.* 2012;92(3):1061-85.
18. Mousa SS, Block RC, Mousa SA. High Density Lipoprotein (HDL) Modulation Targets. *Drugs Future.* 2010;35(1):33-9.
19. Altmann SW, Davis HR, Jr., Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, et al. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science.* 2004;303(5661):1201-4.
20. Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell.* 1997;89(3):331-40.
21. Madrigal-Matute J, Rotllan N, Aranda JF, Fernandez-Hernando C. MicroRNAs and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2013;15(5):322.
22. Musunuru K. Atherogenic dyslipidemia: cardiovascular risk and dietary intervention. *Lipids.* 2010;45(10):907-14.
23. Kathiresan S, Willer CJ, Peloso GM, Demissie S, Musunuru K, Schadt EE, et al. Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. *Nat Genet.* 2009;41(1):56-65.
24. De Castro-Oros I, Pampin S, Bolado-Carrancio A, De Cubas A, Palacios L, Plana N, et al. Functional analysis of LDLR promoter and 5' UTR mutations in subjects with clinical diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat.* 2011;32(8):868-72.
25. De Castro-Oros I, Perez-Lopez J, Mateo-Gallego R, Rebollar S, Ledesma M, Leon M, et al. A genetic variant in the LDLR promoter is responsible for part of the LDL-cholesterol variability in primary hypercholesterolemia. *BMC Med Genomics.* 2014;7:17.
26. Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet.* 2003;34(2):154-6.
27. Bays H. Adiposopathy, "sick fat," Ockham's razor, and resolution of the obesity paradox. *Curr Atheroscler Rep.* 2014;16(5):409.
28. Yoo HJ, Choi KM. Adipokines as a novel link between obesity and atherosclerosis. *World J Diabetes.* 2014;5(3):357-63.
29. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000;407(6801):233-41.
30. Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med.* 2000;247(3):349-58.
31. Whayne TF, Jr. Atherosclerosis: current status of prevention and treatment. *Int J Angiol.* 2011;20(4):213-22.
32. Roy S. Atherosclerotic Cardiovascular Disease Risk and Evidence-based Management of Cholesterol. *N Am J Med Sci.* 2014;6(5):191-8.
33. Haffner SM, Lehto S, Ronnemaa T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med.* 1998;339(4):229-34.
34. Selvin E, Marinopoulos S, Berkenblit G, Rami T, Brancati FL, Powe NR, et al. Meta-analysis: glycosylated hemoglobin and cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Ann Intern Med.* 2004;141(6):421-31.

35. Upadhyay RK. Emerging risk biomarkers in cardiovascular diseases and disorders. *J Lipids*. 2015;2015:971453.
36. Sjouke B, Kusters DM, Kastelein JJ, Hovingh GK. Familial hypercholesterolemia: present and future management. *Curr Cardiol Rep*. 2011;13(6):527-36.
37. Brown MS, Goldstein JL. Expression of the familial hypercholesterolemia gene in heterozygotes: mechanism for a dominant disorder in man. *Science*. 1974;185(4145):61-3.
38. Rader DJ, Cohen J, Hobbs HH. Monogenic hypercholesterolemia: new insights in pathogenesis and treatment. *J Clin Invest*. 2003;111(12):1795-803.
39. Hovingh GK, Davidson MH, Kastelein JJ, O'Connor AM. Diagnosis and treatment of familial hypercholesterolaemia. *Eur Heart J*. 2013;34(13):962-71.
40. Soria LF, Ludwig EH, Clarke HR, Vega GL, Grundy SM, McCarthy BJ. Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(2):587-91.
41. Soutar AK. Unexpected roles for PCSK9 in lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2011;22(3):192-6.
42. Garcia CK, Wilund K, Arca M, Zuliani G, Fellin R, Maioli M, et al. Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein. *Science*. 2001;292(5520):1394-8.
43. Filigheddu F, Quagliarini F, Campagna F, Secci T, Degortes S, Zaninello R, et al. Prevalence and clinical features of heterozygous carriers of autosomal recessive hypercholesterolemia in Sardinia. *Atherosclerosis*. 2009;207(1):162-7.
44. Lee MH, Lu K, Patel SB. Genetic basis of sitosterolemia. *Curr Opin Lipidol*. 2001;12(2):141-9.
45. Teslovich TM, Musunuru K, Smith AV, Edmondson AC, Stylianou IM, Koseki M, et al. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature*. 2010;466(7307):707-13.
46. Shoulders CC, Jones EL, Naoumova RP. Genetics of familial combined hyperlipidemia and risk of coronary heart disease. *Hum Mol Genet*. 2004;13 Spec No 1:R149-60.
47. Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet*. 2003;33 Suppl:228-37.
48. Dean M. Approaches to identify genes for complex human diseases: lessons from Mendelian disorders. *Hum Mutat*. 2003;22(4):261-74.
49. Buckland PR. Allele-specific gene expression differences in humans. *Hum Mol Genet*. 2004;13 Spec No 2:R255-60.
50. Neel JV. Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *Am J Hum Genet*. 1962;14:353-62.

51. Chakravarthy MV, Booth FW. Eating, exercise, and "thrifty" genotypes: connecting the dots toward an evolutionary understanding of modern chronic diseases. *J Appl Physiol* (1985). 2004;96(1):3-10.
52. Prentice AM, Rayco-Solon P, Moore SE. Insights from the developing world: thrifty genotypes and thrifty phenotypes. *Proc Nutr Soc*. 2005;64(2):153-61.
53. Zhao Y, Clark WT, Mort M, Cooper DN, Radivojac P, Mooney SD. Prediction of functional regulatory SNPs in monogenic and complex disease. *Hum Mutat*. 2011;32(10):1183-90.
54. Kruglyak L, Nickerson DA. Variation is the spice of life. *Nat Genet*. 2001;27(3):234-6.
55. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*. 2001;409(6822):928-33.
56. Miller RD, Taillon-Miller P, Kwok PY. Regions of low single-nucleotide polymorphism incidence in human and orangutan xq: deserts and recent coalescences. *Genomics*. 2001;71(1):78-88.
57. Koboldt DC, Miller RD, Kwok PY. Distribution of human SNPs and its effect on high-throughput genotyping. *Hum Mutat*. 2006;27(3):249-54.
58. Buckland PR. The importance and identification of regulatory polymorphisms and their mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1762(1):17-28.
59. Guo Y, Jamison DC. The distribution of SNPs in human gene regulatory regions. *BMC Genomics*. 2005;6:140.
60. Freimer NB, Sabatti C. Human genetics: variants in common diseases. *Nature*. 2007;445(7130):828-30.
61. Wang Z, Moulton J. SNPs, protein structure, and disease. *Hum Mutat*. 2001;17(4):263-70.
62. Haas U, Sczakiel G, Laufer SD. MicroRNA-mediated regulation of gene expression is affected by disease-associated SNPs within the 3'-UTR via altered RNA structure. *RNA Biol*. 2012;9(6):924-37.
63. Acton S, Osgood D, Donoghue M, Corella D, Pocovi M, Cennaro A, et al. Association of polymorphisms at the SR-BI gene locus with plasma lipid levels and body mass index in a white population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19(7):1734-43.
64. Capon F, Allen MH, Ameen M, Burden AD, Tillman D, Barker JN, et al. A synonymous SNP of the corneodesmosin gene leads to increased mRNA stability and demonstrates association with psoriasis across diverse ethnic groups. *Hum Mol Genet*. 2004;13(20):2361-8.
65. Chen GL, Miller GM. Rhesus monkey tryptophan hydroxylase-2 coding region haplotypes affect mRNA stability. *Neuroscience*. 2008;155(2):485-91.
66. Faber K, Glatting KH, Mueller PJ, Risch A, Hotz-Wagenblatt A. Genome-wide prediction of splice-modifying SNPs in human genes using a new analysis pipeline called AASSites. *BMC Bioinformatics*. 2011;12 Suppl 4:S2.

67. De Gobbi M, Viprakasit V, Hughes JR, Fisher C, Buckle VJ, Ayyub H, et al. A regulatory SNP causes a human genetic disease by creating a new transcriptional promoter. *Science*. 2006;312(5777):1215-7.
68. Mishra PJ, Banerjee D, Bertino JR. MiRSNPs or MiR-polymorphisms, new players in microRNA mediated regulation of the cell: Introducing microRNA pharmacogenomics. *Cell Cycle*. 2008;7(7):853-8.
69. Sethupathy P, Collins FS. MicroRNA target site polymorphisms and human disease. *Trends Genet*. 2008;24(10):489-97.
70. Morley M, Molony CM, Weber TM, Devlin JL, Ewens KG, Spielman RS, et al. Genetic analysis of genome-wide variation in human gene expression. *Nature*. 2004;430(7001):743-7.
71. Borneman AR, Gianoulis TA, Zhang ZD, Yu H, Rozowsky J, Seringhaus MR, et al. Divergence of transcription factor binding sites across related yeast species. *Science*. 2007;317(5839):815-9.
72. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-97.
73. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009;136(2):215-33.
74. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-54.
75. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000;403(6772):901-6.
76. Sayed D, Abdellatif M. MicroRNAs in development and disease. *Physiol Rev*. 2011;91(3):827-87.
77. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009;136(4):642-55.
78. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, et al. A uniform system for microRNA annotation. *RNA*. 2003;9(3):277-9.
79. 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.
80. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*. 2010;56(11):1733-41.
81. Chen H, Lan HY, Roukos DH, Cho WC. Application of microRNAs in diabetes mellitus. *J Endocrinol*. 2014;222(1):R1-R10.
82. Macfarlane LA, Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics*. 2010;11(7):537-61.
83. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 2003;17(24):3011-6.

84. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000;404(6778):635-43.
85. Flegal KM, Graubard BI, Williamson DF, Gail MH. Excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity. *JAMA*. 2005;293(15):1861-7.
86. Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, McDowell MA, Tabak CJ, Flegal KM. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. *JAMA*. 2006;295(13):1549-55.
87. Kelishadi R, Azizi-Soleiman F. Controlling childhood obesity: A systematic review on strategies and challenges. *J Res Med Sci*. 2014;19(10):993-1008.
88. Qi L, Cho YA. Gene-environment interaction and obesity. *Nutr Rev*. 2008;66(12):684-94.
89. van Vliet-Ostaptchouk JV, Snieder H, Lagou V. Gene-Lifestyle Interactions in Obesity. *Curr Nutr Rep*. 2012;1:184-96.
90. Dinsa GD, Goryakin Y, Fumagalli E, Suhrcke M. Obesity and socioeconomic status in developing countries: a systematic review. *Obes Rev*. 2012;13(11):1067-79.
91. Roberts CK, Ng C, Hama S, Eliseo AJ, Barnard RJ. Effect of a short-term diet and exercise intervention on inflammatory/anti-inflammatory properties of HDL in overweight/obese men with cardiovascular risk factors. *J Appl Physiol* (1985). 2006;101(6):1727-32.
92. Mitchell NS, Catenacci VA, Wyatt HR, Hill JO. Obesity: overview of an epidemic. *Psychiatr Clin North Am*. 2011;34(4):717-32.
93. Bouchard C, Tremblay A, Despres JP, Nadeau A, Lupien PJ, Theriault G, et al. The response to long-term overfeeding in identical twins. *N Engl J Med*. 1990;322(21):1477-82.
94. Hinney A, Vogel CI, Hebebrand J. From monogenic to polygenic obesity: recent advances. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 2010;19(3):297-310.
95. Speakman JR. Obesity: the integrated roles of environment and genetics. *J Nutr*. 2004;134(8 Suppl):2090S-105S.
96. Day FR, Loos RJ. Developments in obesity genetics in the era of genome-wide association studies. *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 2011;4(4):222-38.
97. Mathes WF, Kelly SA, Pomp D. Advances in comparative genetics: influence of genetics on obesity. *Br J Nutr*. 2011;106 Suppl 1:S1-10.
98. Mutch DM, Clement K. Unraveling the genetics of human obesity. *PLoS Genet*. 2006;2(12):e188.
99. Dubern B, Clement K. Leptin and leptin receptor-related monogenic obesity. *Biochimie*. 2012;94(10):2111-5.
100. Vaisse C, Clement K, Guy-Grand B, Froguel P. A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nat Genet*. 1998;20(2):113-4.
101. Chen D, Garg A. Monogenic disorders of obesity and body fat distribution. *J Lipid Res*. 1999;40(10):1735-46.

102. Hunt SC, Stone S, Xin Y, Scherer CA, Magness CL, Iadonato SP, et al. Association of the FTO gene with BMI. *Obesity (Silver Spring)*. 2008;16(4):902-4.
103. Yang J, Loos RJ, Powell JE, Medland SE, Speliotes EK, Chasman DI, et al. FTO genotype is associated with phenotypic variability of body mass index. *Nature*. 2012;490(7419):267-72.
104. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, et al. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science*. 2007;316(5826):889-94.
105. Sarjeant K, Stephens JM. Adipogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(9):a008417.
106. Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell*. 2014;156(1-2):20-44.
107. Farmer SR. Molecular determinants of brown adipocyte formation and function. *Genes Dev*. 2008;22(10):1269-75.
108. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med*. 2009;360(15):1509-17.
109. Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, et al. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*. 2008;454(7207):961-7.
110. Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. 2012;150(2):366-76.
111. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(6):2548-56.
112. Tang QQ, Lane MD. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem*. 2012;81:715-36.
113. Lee MJ, Wu Y, Fried SK. Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Mol Aspects Med*. 2013;34(1):1-11.
114. Tchkonja T, Thomou T, Zhu Y, Karagiannides I, Pothoulakis C, Jensen MD, et al. Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots. *Cell Metab*. 2013;17(5):644-56.
115. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*. 2008;453(7196):783-7.
116. Gustafson B, Gogg S, Hedjazifar S, Jenndahl L, Hammarstedt A, Smith U. Inflammation and impaired adipogenesis in hypertrophic obesity in man. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;297(5):E999-E1003.
117. Stefan N, Kantartzis K, Machann J, Schick F, Thamer C, Rittig K, et al. Identification and characterization of metabolically benign obesity in humans. *Arch Intern Med*. 2008;168(15):1609-16.

- 118.** Isakson P, Hammarstedt A, Gustafson B, Smith U. Impaired preadipocyte differentiation in human abdominal obesity: role of Wnt, tumor necrosis factor- α , and inflammation. *Diabetes*. 2009;58(7):1550-7.
- 119.** Permana PA, Nair S, Lee YH, Luczy-Bachman G, Vozarova De Courten B, Tataranni PA. Subcutaneous abdominal preadipocyte differentiation in vitro inversely correlates with central obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004;286(6):E958-62.
- 120.** Tchoukalova Y, Koutsari C, Jensen M. Committed subcutaneous preadipocytes are reduced in human obesity. *Diabetologia*. 2007;50(1):151-7.
- 121.** Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(5):367-77.
- 122.** Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1796-808.
- 123.** Zhang B, Berger J, Hu E, Szalkowski D, White-Carrington S, Spiegelman BM, et al. Negative regulation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ gene expression contributes to the antiadipogenic effects of tumor necrosis factor- α . *Mol Endocrinol*. 1996;10(11):1457-66.
- 124.** Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7.
- 125.** Green H, Kehinde O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell*. 1975;5(1):19-27.
- 126.** Shepherd PR, Gnudi L, Tozzo E, Yang H, Leach F, Kahn BB. Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue. *J Biol Chem*. 1993;268(30):22243-6.
- 127.** Huang H, Song TJ, Li X, Hu L, He Q, Liu M, et al. BMP signaling pathway is required for commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(31):12670-5.
- 128.** Tang QQ, Otto TC, Lane MD. Commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(26):9607-11.
- 129.** Bowers RR, Lane MD. A role for bone morphogenetic protein-4 in adipocyte development. *Cell Cycle*. 2007;6(4):385-9.
- 130.** Huang HY, Hu LL, Song TJ, Li X, He Q, Sun X, et al. Involvement of cytoskeleton-associated proteins in the commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to adipocyte lineage induced by BMP2/4. *Mol Cell Proteomics*. 2011;10(1):M110 002691.
- 131.** Cohen MM, Jr. The hedgehog signaling network. *Am J Med Genet A*. 2003;123A(1):5-28.
- 132.** Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev*. 2008;22(18):2454-72.

133. James AW, Leucht P, Levi B, Carre AL, Xu Y, Helms JA, et al. Sonic Hedgehog influences the balance of osteogenesis and adipogenesis in mouse adipose-derived stromal cells. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(8):2605-16.
134. Calo E, Quintero-Estades JA, Danielian PS, Nedelcu S, Berman SD, Lees JA. Rb regulates fate choice and lineage commitment in vivo. *Nature*. 2010;466(7310):1110-4.
135. Fajas L, Landsberg RL, Huss-Garcia Y, Sardet C, Lees JA, Auwerx J. E2Fs regulate adipocyte differentiation. *Dev Cell*. 2002;3(1):39-49.
136. Burkhart DL, Sage J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(9):671-82.
137. Fajas L, Egler V, Reiter R, Hansen J, Kristiansen K, Debril MB, et al. The retinoblastoma-histone deacetylase 3 complex inhibits PPARgamma and adipocyte differentiation. *Dev Cell*. 2002;3(6):903-10.
138. Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*. 2008;4(2):68-75.
139. Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev*. 1997;11(24):3286-305.
140. Gordon MD, Nusse R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem*. 2006;281(32):22429-33.
141. Jho EH, Zhang T, Domon C, Joo CK, Freund JN, Costantini F. Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol Cell Biol*. 2002;22(4):1172-83.
142. Kohn AD, Moon RT. Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. *Cell Calcium*. 2005;38(3-4):439-46.
143. Bowers RR, Lane MD. Wnt signaling and adipocyte lineage commitment. *Cell Cycle*. 2008;7(9):1191-6.
144. Christodoulides C, Lagathu C, Sethi JK, Vidal-Puig A. Adipogenesis and WNT signalling. *Trends Endocrinol Metab*. 2009;20(1):16-24.
145. Bennett CN, Longo KA, Wright WS, Suva LJ, Lane TF, Hankenson KD, et al. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(9):3324-9.
146. Vertino AM, Taylor-Jones JM, Longo KA, Bearden ED, Lane TF, McGehee RE, Jr., et al. Wnt10b deficiency promotes coexpression of myogenic and adipogenic programs in myoblasts. *Mol Biol Cell*. 2005;16(4):2039-48.
147. Student AK, Hsu RY, Lane MD. Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem*. 1980;255(10):4745-50.
148. Zhang JW, Tang QQ, Vinson C, Lane MD. Dominant-negative C/EBP disrupts mitotic clonal expansion and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(1):43-7.

149. Zhang JW, Klemm DJ, Vinson C, Lane MD. Role of CREB in transcriptional regulation of CCAAT/enhancer-binding protein beta gene during adipogenesis. *J Biol Chem.* 2004;279(6):4471-8.
150. Tang QQ, Otto TC, Lane MD. Mitotic clonal expansion: a synchronous process required for adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(1):44-9.
151. Tang QQ, Gronborg M, Huang H, Kim JW, Otto TC, Pandey A, et al. Sequential phosphorylation of CCAAT enhancer-binding protein beta by MAPK and glycogen synthase kinase 3beta is required for adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(28):9766-71.
152. Elberg G, Gimble JM, Tsai SY. Modulation of the murine peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 promoter activity by CCAAT/enhancer-binding proteins. *J Biol Chem.* 2000;275(36):27815-22.
153. Christy RJ, Kaestner KH, Geiman DE, Lane MD. CCAAT/enhancer binding protein gene promoter: binding of nuclear factors during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(6):2593-7.
154. Tang QQ, Lane MD. Activation and centromeric localization of CCAAT/enhancer-binding proteins during the mitotic clonal expansion of adipocyte differentiation. *Genes Dev.* 1999;13(17):2231-41.
155. Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J. PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett.* 1998;438(1-2):55-60.
156. Tontonoz P, Spiegelman BM. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu Rev Biochem.* 2008;77:289-312.
157. Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale EG, Spiegelman BM. PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol.* 1995;15(1):351-7.
158. Kim JB, Spiegelman BM. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev.* 1996;10(9):1096-107.
159. Horton JD. Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochem Soc Trans.* 2002;30(Pt 6):1091-5.
160. Distel RJ, Ro HS, Rosen BS, Groves DL, Spiegelman BM. Nucleoprotein complexes that regulate gene expression in adipocyte differentiation: direct participation of c-fos. *Cell.* 1987;49(6):835-44.
161. Moitra J, Mason MM, Olive M, Krylov D, Gavriloova O, Marcus-Samuels B, et al. Life without white fat: a transgenic mouse. *Genes Dev.* 1998;12(20):3168-81.
162. Oishi Y, Manabe I, Tobe K, Tsushima K, Shindo T, Fujiu K, et al. Kruppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation. *Cell Metab.* 2005;1(1):27-39.
163. Gray S, Feinberg MW, Hull S, Kuo CT, Watanabe M, Sen-Banerjee S, et al. The Kruppel-like factor KLF15 regulates the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4. *J Biol Chem.* 2002;277(37):34322-8.

164. Banerjee SS, Feinberg MW, Watanabe M, Gray S, Haspel RL, Denkinger DJ, et al. The Kruppel-like factor KLF2 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression and adipogenesis. *J Biol Chem*. 2003;278(4):2581-4.
165. Deng J, Hua K, Lesser SS, Harp JB. Activation of signal transducer and activator of transcription-3 during proliferative phases of 3T3-L1 adipogenesis. *Endocrinology*. 2000;141(7):2370-6.
166. Wang D, Zhou Y, Lei W, Zhang K, Shi J, Hu Y, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) regulates adipocyte differentiation via peroxisome-proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma). *Biol Cell*. 2010;102(1):1-12.
167. Kawai M, Namba N, Mushiake S, Etani Y, Nishimura R, Makishima M, et al. Growth hormone stimulates adipogenesis of 3T3-L1 cells through activation of the Stat5A/5B-PPARgamma pathway. *J Mol Endocrinol*. 2007;38(1-2):19-34.
168. Tong Q, Dalgin G, Xu H, Ting CN, Leiden JM, Hotamisligil GS. Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition. *Science*. 2000;290(5489):134-8.
169. Tong Q, Tsai J, Tan G, Dalgin G, Hotamisligil GS. Interaction between GATA and the C/EBP family of transcription factors is critical in GATA-mediated suppression of adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol*. 2005;25(2):706-15.
170. Moldes M, Zuo Y, Morrison RF, Silva D, Park BH, Liu J, et al. Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma suppresses Wnt/beta-catenin signalling during adipogenesis. *Biochem J*. 2003;376(Pt 3):607-13.
171. Liu J, Wang H, Zuo Y, Farmer SR. Functional interaction between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and beta-catenin. *Mol Cell Biol*. 2006;26(15):5827-37.
172. Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC, Erickson RL, et al. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science*. 2000;289(5481):950-3.
173. Cawthorn WP, Bree AJ, Yao Y, Du B, Hemati N, Martinez-Santibanez G, et al. Wnt6, Wnt10a and Wnt10b inhibit adipogenesis and stimulate osteoblastogenesis through a beta-catenin-dependent mechanism. *Bone*. 2012;50(2):477-89.
174. Longo KA, Wright WS, Kang S, Gerin I, Chiang SH, Lucas PC, et al. Wnt10b inhibits development of white and brown adipose tissues. *J Biol Chem*. 2004;279(34):35503-9.
175. Kanazawa A, Tsukada S, Kamiyama M, Yanagimoto T, Nakajima M, Maeda S. Wnt5b partially inhibits canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway and promotes adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;330(2):505-10.
176. van Tienen FH, Laeremans H, van der Kallen CJ, Smeets HJ. Wnt5b stimulates adipogenesis by activating PPARgamma, and inhibiting the beta-catenin dependent Wnt signaling pathway together with Wnt5a. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;387(1):207-11.
177. Nishizuka M, Koyanagi A, Osada S, Imagawa M. Wnt4 and Wnt5a promote adipocyte differentiation. *FEBS Lett*. 2008;582(21-22):3201-5.

- 178.** Kennell JA, MacDougald OA. Wnt signaling inhibits adipogenesis through beta-catenin-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem.* 2005;280(25):24004-10.
- 179.** Christodoulides C, Laudes M, Cawthorn WP, Schinner S, Soos M, O'Rahilly S, et al. The Wnt antagonist Dickkopf-1 and its receptors are coordinately regulated during early human adipogenesis. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 12):2613-20.
- 180.** Bodine PV, Zhao W, Kharode YP, Bex FJ, Lambert AJ, Goad MB, et al. The Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 is a negative regulator of trabecular bone formation in adult mice. *Mol Endocrinol.* 2004;18(5):1222-37.
- 181.** Li FQ, Singh AM, Mofunanya A, Love D, Terada N, Moon RT, et al. Chibby promotes adipocyte differentiation through inhibition of beta-catenin signaling. *Mol Cell Biol.* 2007;27(12):4347-54.
- 182.** Son YH, Ka S, Kim AY, Kim JB. Regulation of Adipocyte Differentiation via MicroRNAs. *Endocrinol Metab (Seoul).* 2014;29(2):122-35.
- 183.** McGregor RA, Choi MS. microRNAs in the regulation of adipogenesis and obesity. *Curr Mol Med.* 2011;11(4):304-16.
- 184.** Qadir AS, Woo KM, Ryoo HM, Baek JH. Insulin suppresses distal-less homeobox 5 expression through the up-regulation of microRNA-124 in 3T3-L1 cells. *Exp Cell Res.* 2013;319(14):2125-34.
- 185.** Huang J, Zhao L, Xing L, Chen D. MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation. *Stem Cells.* 2010;28(2):357-64.
- 186.** Wang Q, Li YC, Wang J, Kong J, Qi Y, Quigg RJ, et al. miR-17-92 cluster accelerates adipocyte differentiation by negatively regulating tumor-suppressor Rb2/p130. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(8):2889-94.
- 187.** Chen L, Cui J, Hou J, Long J, Li C, Liu L. A novel negative regulator of adipogenesis: microRNA-363. *Stem Cells.* 2014;32(2):510-20.
- 188.** Lee YS, Dutta A. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev.* 2007;21(9):1025-30.
- 189.** Kim SY, Kim AY, Lee HW, Son YH, Lee GY, Lee JW, et al. miR-27a is a negative regulator of adipocyte differentiation via suppressing PPARgamma expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;392(3):323-8.
- 190.** Karbiener M, Fischer C, Nowitsch S, Opriessnig P, Papak C, Ailhaud G, et al. microRNA miR-27b impairs human adipocyte differentiation and targets PPARgamma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;390(2):247-51.
- 191.** Lee EK, Lee MJ, Abdelmohsen K, Kim W, Kim MM, Srikantan S, et al. miR-130 suppresses adipogenesis by inhibiting peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression. *Mol Cell Biol.* 2011;31(4):626-38.
- 192.** Kinoshita M, Ono K, Horie T, Nagao K, Nishi H, Kuwabara Y, et al. Regulation of adipocyte differentiation by activation of serotonin (5-HT) receptors 5-HT2AR and 5-HT2CR and involvement of microRNA-448-mediated repression of KLF5. *Mol Endocrinol.* 2010;24(10):1978-87.

193. Liu S, Yang Y, Wu J. TNFalpha-induced up-regulation of miR-155 inhibits adipogenesis by down-regulating early adipogenic transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;414(3):618-24.
194. Peng Y, Xiang H, Chen C, Zheng R, Chai J, Peng J, et al. MiR-224 impairs adipocyte early differentiation and regulates fatty acid metabolism. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45(8):1585-93.
195. Yang Z, Bian C, Zhou H, Huang S, Wang S, Liao L, et al. MicroRNA hsa-miR-138 inhibits adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells through adenovirus EID-1. *Stem Cells Dev.* 2011;20(2):259-67.
196. Esau C, Kang X, Peralta E, Hanson E, Marcusson EG, Ravichandran LV, et al. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem.* 2004;279(50):52361-5.
197. Ahn J, Lee H, Jung CH, Jeon TI, Ha TY. MicroRNA-146b promotes adipogenesis by suppressing the SIRT1-FOXO1 cascade. *EMBO Mol Med.* 2013;5(10):1602-12.
198. Qin L, Chen Y, Niu Y, Chen W, Wang Q, Xiao S, et al. A deep investigation into the adipogenesis mechanism: profile of microRNAs regulating adipogenesis by modulating the canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway. *BMC Genomics.* 2010;11:320.
199. Kennell JA, Gerin I, MacDougald OA, Cadigan KM. The microRNA miR-8 is a conserved negative regulator of Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(40):15417-22.
200. Wilfred BR, Wang WX, Nelson PT. Energizing miRNA research: a review of the role of miRNAs in lipid metabolism, with a prediction that miR-103/107 regulates human metabolic pathways. *Mol Genet Metab.* 2007;91(3):209-17.
201. Heneghan HM, Miller N, McAnena OJ, O'Brien T, Kerin MJ. Differential miRNA expression in omental adipose tissue and in the circulation of obese patients identifies novel metabolic biomarkers. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(5):E846-50.
202. Buratowski S, Chodosh LA. Mobility shift DNA-binding assay using gel electrophoresis. *Curr Protoc Mol Biol.* 2001;Chapter 12:Unit 12 2.
203. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988;239(4839):487-91.
204. Aprelikova O, Palla J, Hibler B, Yu X, Greer YE, Yi M, et al. Silencing of miR-148a in cancer-associated fibroblasts results in WNT10B-mediated stimulation of tumor cell motility. *Oncogene.* 2013;32(27):3246-53.
205. Muinos-Gimeno M, Espinosa-Parrilla Y, Guidi M, Kagerbauer B, Sipila T, Maron E, et al. Human microRNAs miR-22, miR-138-2, miR-148a, and miR-488 are associated with panic disorder and regulate several anxiety candidate genes and related pathways. *Biol Psychiatry.* 2011;69(6):526-33.
206. Pistorio E, Luca M, Luca A, Messina V, Calandra C. Autonomic nervous system and lipid metabolism: findings in anxious-depressive spectrum and eating disorders. *Lipids Health Dis.* 2011;10:192.

- 207.** Chen Y, Song YX, Wang ZN. The microRNA-148/152 family: multi-faceted players. *Mol Cancer*. 2013;12:43.
- 208.** Huang JJ, Yu J, Li JY, Liu YT, Zhong RQ. Circulating microRNA expression is associated with genetic subtype and survival of multiple myeloma. *Med Oncol*. 2012;29(4):2402-8.
- 209.** Yuan K, Lian Z, Sun B, Clayton MM, Ng IO, Feitelson MA. Role of miR-148a in hepatitis B associated hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2012;7(4):e35331.
- 210.** Gokhale A, Kunder R, Goel A, Sarin R, Moiyadi A, Shenoy A, et al. Distinctive microRNA signature of medulloblastomas associated with the WNT signaling pathway. *J Cancer Res Ther*. 2010;6(4):521-9.
- 211.** Liffers ST, Munding JB, Vogt M, Kuhlmann JD, Verdoodt B, Nambiar S, et al. MicroRNA-148a is down-regulated in human pancreatic ductal adenocarcinomas and regulates cell survival by targeting CDC25B. *Lab Invest*. 2011;91(10):1472-9.
- 212.** Chen Y, Song Y, Wang Z, Yue Z, Xu H, Xing C, et al. Altered expression of MiR-148a and MiR-152 in gastrointestinal cancers and its clinical significance. *J Gastrointest Surg*. 2010;14(7):1170-9.
- 213.** Zheng B, Liang L, Wang C, Huang S, Cao X, Zha R, et al. MicroRNA-148a suppresses tumor cell invasion and metastasis by downregulating ROCK1 in gastric cancer. *Clin Cancer Res*. 2011;17(24):7574-83.
- 214.** Fujita Y, Kojima K, Ohhashi R, Hamada N, Nozawa Y, Kitamoto A, et al. MiR-148a attenuates paclitaxel resistance of hormone-refractory, drug-resistant prostate cancer PC3 cells by regulating MSK1 expression. *J Biol Chem*. 2010;285(25):19076-84.
- 215.** Zhu A, Xia J, Zuo J, Jin S, Zhou H, Yao L, et al. MicroRNA-148a is silenced by hypermethylation and interacts with DNA methyltransferase 1 in gastric cancer. *Med Oncol*. 2012;29(4):2701-9.
- 216.** Xu Q, Jiang Y, Yin Y, Li Q, He J, Jing Y, et al. A regulatory circuit of miR-148a/152 and DNMT1 in modulating cell transformation and tumor angiogenesis through IGF-IR and IRS1. *J Mol Cell Biol*. 2013;5(1):3-13.
- 217.** Braconi C, Huang N, Patel T. MicroRNA-dependent regulation of DNA methyltransferase-1 and tumor suppressor gene expression by interleukin-6 in human malignant cholangiocytes. *Hepatology*. 2010;51(3):881-90.
- 218.** Long XR, He Y, Huang C, Li J. MicroRNA-148a is silenced by hypermethylation and interacts with DNA methyltransferase 1 in hepatocellular carcinogenesis. *Int J Oncol*. 2014;44(6):1915-22.
- 219.** Cheng P, Chen C, He HB, Hu R, Zhou HD, Xie H, et al. miR-148a regulates osteoclastogenesis by targeting V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B. *J Bone Miner Res*. 2013;28(5):1180-90.
- 220.** Gao J, Yang T, Han J, Yan K, Qiu X, Zhou Y, et al. MicroRNA expression during osteogenic differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells from bone marrow. *J Cell Biochem*. 2011;112(7):1844-56.

221. Zhang J, Ying ZZ, Tang ZL, Long LQ, Li K. MicroRNA-148a promotes myogenic differentiation by targeting the ROCK1 gene. *J Biol Chem*. 2012;287(25):21093-101.
222. Shi C, Zhang M, Tong M, Yang L, Pang L, Chen L, et al. miR-148a is Associated with Obesity and Modulates Adipocyte Differentiation of Mesenchymal Stem Cells through Wnt Signaling. *Sci Rep*. 2015;5:9930.
223. Londono Gentile T, Lu C, Lodato PM, Tse S, Olejniczak SH, Witze ES, et al. DNMT1 is regulated by ATP-citrate lyase and maintains methylation patterns during adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol*. 2013;33(19):3864-78.
224. Okamura K, Phillips MD, Tyler DM, Duan H, Chou YT, Lai EC. The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. *Nat Struct Mol Biol*. 2008;15(4):354-63.
225. Goedeke L, Rotllan N, Canfran-Duque A, Aranda JF, Ramirez CM, Araldi E, et al. MicroRNA-148a regulates LDL receptor and ABCA1 expression to control circulating lipoprotein levels. *Nat Med*. 2015;21(11):1280-9.
226. Wright WS, Longo KA, Dolinsky VW, Gerin I, Kang S, Bennett CN, et al. Wnt10b inhibits obesity in ob/ob and agouti mice. *Diabetes*. 2007;56(2):295-303.
227. Kang S, Bennett CN, Gerin I, Rapp LA, Hankenson KD, Macdougald OA. Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem*. 2007;282(19):14515-24.
228. Bennett CN, Ross SE, Longo KA, Bajnok L, Hemati N, Johnson KW, et al. Regulation of Wnt signaling during adipogenesis. *J Biol Chem*. 2002;277(34):30998-1004.
229. Arango NA, Szotek PP, Manganaro TF, Oliva E, Donahoe PK, Teixeira J. Conditional deletion of beta-catenin in the mesenchyme of the developing mouse uterus results in a switch to adipogenesis in the myometrium. *Dev Biol*. 2005;288(1):276-83.
230. Papkoff J, Aikawa M. WNT-1 and HGF regulate GSK3 beta activity and beta-catenin signaling in mammary epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;247(3):851-8.
231. Liu J, Farmer SR. Regulating the balance between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and beta-catenin signaling during adipogenesis. A glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation-defective mutant of beta-catenin inhibits expression of a subset of adipogenic genes. *J Biol Chem*. 2004;279(43):45020-7.
232. Reshef L, Hanson RW, Ballard FJ. Glyceride-glycerol synthesis from pyruvate. Adaptive changes in phosphoenolpyruvate carboxykinase and pyruvate carboxylase in adipose tissue and liver. *J Biol Chem*. 1969;244(8):1994-2001.
233. Beale EG, Tishler EJ. Expression and regulation of cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;189(2):925-30.
234. Antras-Ferry J, Robin P, Robin D, Forest C. Fatty acids and fibrates are potent inducers of transcription of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in adipocytes. *Eur J Biochem*. 1995;234(2):390-6.

- 235.** Fayard E, Auwerx J, Schoonjans K. LRH-1: an orphan nuclear receptor involved in development, metabolism and steroidogenesis. *Trends Cell Biol.* 2004;14(5):250-60.
- 236.** Clyne CD, Speed CJ, Zhou J, Simpson ER. Liver receptor homologue-1 (LRH-1) regulates expression of aromatase in preadipocytes. *J Biol Chem.* 2002;277(23):20591-7.
- 237.** Mrosek N, Meissburger B, Matakı C, Roeder E, Ukropec J, Klimes I, et al. Transcriptional regulation of adipocyte formation by the liver receptor homologue 1 (Lrh1)-Small hetero-dimerization partner (Shp) network. *Mol Metab.* 2013;2(3):314-23.
- 238.** Botrugno OA, Fayard E, Annicotte JS, Haby C, Brennan T, Wendling O, et al. Synergy between LRH-1 and beta-catenin induces G1 cyclin-mediated cell proliferation. *Mol Cell.* 2004;15(4):499-509.
- 239.** Do R, Willer CJ, Schmidt EM, Sengupta S, Gao C, Peloso GM, et al. Common variants associated with plasma triglycerides and risk for coronary artery disease. *Nat Genet.* 2013;45(11):1345-52.
- 240.** Willer CJ, Schmidt EM, Sengupta S, Peloso GM, Gustafsson S, Kanoni S, et al. Discovery and refinement of loci associated with lipid levels. *Nat Genet.* 2013;45(11):1274-83.
- 241.** Hayward C, Taylor CB, Roth WT, King R, Agras WS. Plasma lipid levels in patients with panic disorder or agoraphobia. *Am J Psychiatry.* 1989;146(7):917-9.
- 242.** Monda KL, Chen GK, Taylor KC, Palmer C, Edwards TL, Lange LA, et al. A meta-analysis identifies new loci associated with body mass index in individuals of African ancestry. *Nat Genet.* 2013;45(6):690-6.
- 243.** Huang CK, Lai KP, Luo J, Tsai MY, Kang HY, Chen Y, et al. Loss of androgen receptor promotes adipogenesis but suppresses osteogenesis in bone marrow stromal cells. *Stem Cell Res.* 2013;11(2):938-50.
- 244.** Singh R, Artaza JN, Taylor WE, Braga M, Yuan X, Gonzalez-Cadavid NF, et al. Testosterone inhibits adipogenic differentiation in 3T3-L1 cells: nuclear translocation of androgen receptor complex with beta-catenin and T-cell factor 4 may bypass canonical Wnt signaling to down-regulate adipogenic transcription factors. *Endocrinology.* 2006;147(1):141-54.

ANEXOS

8.1. TABLAS SUPLEMENTARIAS

miRNA	Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
miR-148a-3p	<i>Mimic</i>	UCAGUGCACUACAGAACUUUGU
miR-148a-3p	Inhibidor	ACAAAGUUCUGUAGUGCACUGA
miR-148a-5p	Inhibidor	AGUCGGAGUGUCUCAGAACUUU

Tabla S1. Secuencias del *mimic* y los inhibidores utilizados.

Gen	Cebador Fw (5'-3')	Cebador Re (5'-3')	(Fw/Re) (nM)	Tª fusión (°C)
<i>APOB</i>	TTCTGTCAGCGCAACCTATG	GAGGATTGTTCCGAGGTCAA	200/200	57
<i>PCSK9</i>	ACCCTCATAGGCTGGAGTT	GAGTAGAGGCAGGCATCGTC	200/200	57
<i>LDLR</i>	CACTTCCCAATCTTGTCGT	ACGTGTTAGCCAGGATGGTC	200/200	57
<i>RPS14</i>	CCGGGATAGCTGTCCTGTTA	TCCCTGCAAGCTCAATAGGT	200/200	55/57

Gen	Cebador Fw (5'-3')	Cebador Re (5'-3')	(Fw/Re) (nM)	Tª fusión (°C)
<i>Dkk1</i>	CAGCTCAATCCCAAGGATGT	CAGGGGAGTTCCATCAAGAA	200/200	57
<i>Wnt5b</i>	GGTTCCACTGGTGTGCTTT	AGACTTTTGTGAGGCGGAGA	200/200	57
<i>Wnt10b</i>	GGAAGGGTAGTGGTGAGCAA	CTCTCCGAAGTCCATGTCGT	200/200	57
<i>Pck1</i>	CTGGCACCTCAGTGAAGACA	TCGATGCCTTCCAGTAAAC	200/200	57
<i>Wnt5a</i>	ATGCAGTACATTGGAGAAGGTG	CGTCTCTCGGCTGCCTATTT	200/200	57
<i>Lrp5</i>	ACGTCCCCTAAGGTTCTCTTC	GCCAGTAAATGTCGGAGTCTAC	200/200	57
<i>Lrp6</i>	GGCTGGCATGTGATTGGCT	GCTCTGGGTTGATCCAACCTCT	200/200	57
<i>Axin2</i>	TAGGCGGAATGAAGATGGAC	CTGGTCACCCAACAAGGAGT	200/200	57
<i>Pparγ</i>	TTTTCAAGGGTGCCAGTTTC	AATCCTTGCCCTCTGAGAT	200/200	55/57
<i>Fabp4</i>	TCACCTGGAAGACAGCTCCT	AATCCCCATTTACGCTGATG	200/200	57
<i>Fasn</i>	TGGGTTCTAGCCAGCAGAGT	ACCACCAGAGACCGTTATGC	200/200	57
<i>Adipoq</i>	GTTGCAAGCTCTCCTGTTCC	TCTCCAGGAGTGCCATCTCT	200/200	57
<i>Lipe</i>	AGACACCAGCCAACGGATAC	GGGCATAGTAGGCCATAGCA	200/200	57
<i>Glut4</i>	ACTCATTCTTGGACGGTTCCTC	CACCCCGAAGATGAGTGCGG	200/200	57
<i>Nr5a2 (exógeno)</i>	CAGAACTGCCAGATCGACAA	CTGCCGCCTCTCATTCTATC	200/200	55
<i>Nr5a2</i>	AAAACGGGCAGTAACCCTCT	TCAGCAACAGCAGCAGAAGT	200/200	55
<i>Actb</i>	AGCCATGTACGTCGCCATCC	CTCTCAGCTGTGGTGAA	200/200	55/57

Tablas S2 y S3. Secuencias de los cebadores empleados para la detección de la expresión de genes humanos en células HepG2 y murinos en células 3T3-L1, respectivamente. Se muestran las condiciones de concentración de los cebadores así como su temperatura de fusión.

Proteína	Nombre Anticuerpo	Casa comercial	Concentración (mg/ml)	Dilución empleada
β-Catenina	ab6302	Abcam	1-10	1:4000
Sin3b	(H-4) sc-13145	Santa Cruz Biotechnology	0,2	1:1000
α-Tubulina	(H-300) sc-5546	Santa Cruz Biotechnology	0,2	1:1000
Nr5a2	ab18293	Abcam	1,25	1:500
Actina	(I-19) sc-1616	Santa Cruz Biotechnology	0,1	1:1000

Tabla S4. Anticuerpos primarios utilizados en los experimentos de western blot. Se muestran las proteínas específicas que reconocen así como su nombre, casa comercial, concentración y dilución empleada.

Sitio de unión	Oligonucleótido Fw (5'-3')	Oligonucleótido Re (5'-3')
NR5A2 en promotor de miR-148a humano	ACTGTGTGCAAGTTGTGCGGAAC	GTTGCGCACAACCTTGACACAGT
Nr5a2 en promotor de miR-148a murino	GTGTCCTCCTCAAGGTTTCATTTC	GAAATGGAAACCTTGAGGAGGACAC
SNP rs4722551 Alelo C	CCAGGATGTCCTCCTTCCTTC	GAAGGAAGGAGGACATCCTGG
SNP rs4722551 Alelo T	CCAGGATGCTTCCTTCCTTC	GAAGGAAGGAGGACATCCTGG

Tabla S5. Secuencias de los oligonucleótidos empleados para las sondas utilizadas en los experimentos de EMSA.

Gen	Cebador Fw (5'-3')	Cebador Re (5'-3')	Enzima 5'	Enzima 3'	Tamaño (pb)	Fw/Re (nM)	Tª fusión (°C)	t elongación (min)
<i>APOB</i>	GCTAGCTTCTGATATACATCACGGAG	GTGACACACTATGTGTTCTAGAGGT	NheI	Sall	495	300/300	55	1
<i>ABCG5</i>	GCTAGCAAGGGATCATCTCATTAGCA	GTGACAGGTTTGTCTGGTGTGCTTT	NheI	Sall	691	300/300	55	1
<i>ABCG8</i>	CTCGAGGGTGGCTTCATGGTCCTGTA	CCTGCAGGTACCTCAAGGGATTGTCC	XhoI	SbfI	673	300/300	55	1
<i>LDLRAP1</i>	CTCGAGCAGGATGACCTCTTCA	CCTGCAGGTCTACTCCACCTGAT	XhoI	SbfI	1943	150/150	57	2
<i>PCSK9</i>	CTCGAGACTACAGGCAGCACCA	GTGACCATCACCTAGGCAGT	XhoI	Sall	1309	150/150	55	1,5
<i>SREBF1</i>	GCTAGCACCACTGCTACTTCCAGC	GTGACCACTAGTCAGCACATCCATC	NheI	Sall	608	300/300	55	1
<i>SREBF2</i>	GCTAGCAGCAGATGATTGTTAAGC	GTGACGAGTGGGAAGGAACA	NheI	Sall	782	300/300	55	1
<i>Wnt10b</i>	AAGCTAGCAGGTGAGCCTCGCCTA	GGGTCGACTCCAGTAGTTCAG	NheI	Sall	724	150/150	50	1

Tabla S6. Secuencias de los cebadores empleados en el clonado de las secuencias 3'UTR. Se muestran también las enzimas de restricción utilizadas, los tamaños de los fragmentos clonados, las concentraciones de los cebadores, las temperaturas de fusión de los mismos y los tiempos de elongación en las diferentes reacciones de PCR.

Mutación	Cebador Fw (5'-3')	Cebador Re (5'-3')	Fw/Re (nM)	Tª fusión (°C)	t elongación (min)
<i>APOB</i> SNP rs12720763 (Alelo T)	AGGGCTCTGAAGGTCTCTGA	TCAGAGACCTTCAGAGCCCT	300/300	55	1

Tabla S7. Secuencias de los cebadores empleados en el experimento de mutagénesis dirigida. Se muestran también las concentraciones de los cebadores, la temperatura de fusión de los mismos y el tiempo de elongación en la reacción de PCR.

Pareja de cebadores	Cebador Fw (5'-3')	Cebador Re (5'-3')	Fw/Re (nM)
1ª Pareja	TAGGTGGCAGCCTCGTCTT	GTGCAAGACGCTGAACACAG	200/200
2ª Pareja	GGTTCCATTTCTACTCTGCT	GTTCTGGGTCTGGGTCTCTG	200/200
3ª Pareja	GGTAGCTGTTGGCCTTTTCTT	CATCAAAGTAAAAAGCCATCCTT	200/200

Tabla S8. Secuencias de los cebadores empleados en los experimentos de ChIP. Se muestran también las condiciones de concentración de los cebadores.

