



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

T E S I S

**“Efecto de la ingesta crónica de fructosa sobre los niveles plasmáticos de
microRNAs relacionados con la adipogénesis en ratas Wistar”**

Para obtener el grado de Doctor en Biología Experimental

P R E S E N T A:

M. en C. Adrián Hernández Díaz Couder

Comité de Tutores:

Directores:

Dr. Julio César Almanza Pérez

Dr. Fausto Sánchez Muñoz

Asesor:

Dr. Eduardo Martínez Martínez

25 de marzo del 2022



Efecto de la ingesta crónica de fructosa sobre los niveles plasmáticos de microRNAs relacionados con la adipogénesis en ratas Wistar

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 25 del mes de marzo del año 2022 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. FRANCISCO JAVIER ALARCON AGUILAR
- DRA. ROXANA CARBO ZABALA
- DRA. FENGYANG HUANG
- DR. EDUARDO MARTINEZ MARTINEZ



ADRIAN HERNANDEZ DIAZ COUDER
ALUMNO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL
DE: ADRIAN HERNANDEZ DIAZ COUDER

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MITRA ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. FRANCISCO JAVIER ALARCON AGUILAR

VOCAL

DRA. ROXANA CARBO ZABALA

VOCAL

DRA. FENGYANG HUANG

SECRETARIO

DR. EDUARDO MARTINEZ MARTINEZ

Declaración de originalidad

El que suscribe **Adrián Hernández Díaz Couder**, alumno del posgrado **Doctorado en Biología Experimental**, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor(a) de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: **"Efecto de la ingesta crónica de fructosa sobre los niveles plasmáticos de microRNAs relacionados con la adipogénesis en ratas Wistar"**,

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el H. Jurado para la obtención del grado de Doctor en Biología Experimental es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 25 de marzo del 2022.

Atentamente



Adrián Hernández Díaz Couder


CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

Ciudad de México, a 25 de marzo del 2022

Comisión Académica del Posgrado
Doctorado en Biología Experimental
Presente

El que suscribe Adrián Hernández Díaz Couder alumno con número de matrícula 2173801586, del posgrado Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), manifiesto mi compromiso de mantener de forma confidencial y de no utilizar, divulgar o difundir por ningún medio, en beneficio propio o de terceros, la información, la documentación y datos de toda índole a los que tenga acceso y reciba con motivo del proyecto de investigación "Efecto de la ingesta crónica de fructosa sobre los niveles plasmáticos de microRNAs relacionados con la adipogénesis en ratas Wistar" a desarrollar en el Posgrado en Biología Experimental, lo anterior en términos del artículo 6, fracción V, de los Lineamientos para el Acceso a la Información de la Universidad Autónoma Metropolitana. Esta obligación subsistirá incluso después de haber obtenido el grado.

En caso de que contravenga este compromiso, la Universidad se reserva el derecho de ejercer las acciones civiles y penales que procedan y, en consecuencia, asumo cualquier responsabilidad por el manejo indebido o sin la previa autorización expresa de la UAM-I de la referida información o resultados, así como por los eventuales perjuicios que pudiese ocasionarse a esta Casa de Estudios.



Adrián Hernández Díaz Couder

El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020. El presente trabajo se realizó gracias al apoyo proporcionado por el CONACyT a través de la beca otorgada al alumno Adrián Hernández Díaz Couder con el Número de Becario 570655.

Miembros del jurado

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada **“Efecto de la ingesta crónica de fructosa sobre los niveles plasmáticos de microRNAs relacionados con la adipogénesis en ratas Wistar”**, con fecha de presentación para obtener el grado de doctorado el día 25 de marzo del 2022.

Jurado:

Jurado:

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar
Laboratorio de Farmacología
Departamento de Ciencias de la Salud D.C.B.S.
Universidad Autónoma Metropolitana -
Iztapalapa
aaaf@xanum.uam.mx



Presidente

Dr. Eduardo Martínez Martínez
Laboratorio de Vesículas Extracelulares y
Comunicación Celular
Instituto Nacional de Medicina Genómica
emartinez@inmegen.gob.mx



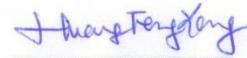
Secretario

Dra. Roxana Carbó Zabala
Departamento de Biomedicina Cardiovascular
Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez
roxcarbo@gmail.com



Vocal

Dra. Fengyang Huang
Laboratorio de Investigación en Farmacología
Hospital Infantil de México Federico Gómez
f_y_huang@yahoo.com



Vocal

Dedicatorias y agradecimientos

A mi familia fuente de apoyo constante e incondicional en toda mi vida y más aún en mis duros años de formación académica.

Madre

Para mi has sido una fuente de inspiración. A través de tus acciones me has enseñado a nunca rendirme y siempre dar lo mejor de mí. Te agradezco todo el apoyo y el amor que me has brindado desde el primer día de mi vida. Te amo con todo mi corazón.

Tías

Les agradezco su apoyo incondicional y el amor que me han brindado durante toda mi vida. Gracias a su apoyo en esos días tan difíciles me ayudaron a no desistir en mi proyecto de vida. Por ello y muchas razones más. Las amo con todo mi corazón.

Diego

Mi hermano mayor, que desde que era niño te admiré por tus virtudes y tu valentía ante los tiempos adversos. Hasta la fecha sigo aprendiendo de ti a través de tus acciones, me has enseñado que si quiero algo tengo que esforzarme por ello y no quejarme. Te amo canijo.

Mariana y Fernando

Mis hermanos menores, que he visto su esfuerzo y dedicación para seguir adelante, lo cual me motiva a ser cada vez mejor para ser un ejemplo a seguir para ustedes dos. Les agradezco mucho por siempre estar en los momentos cuando más los necesité. Los amo por igual.

Mis chaparritas

Mis mujercitas, les agradezco de todo corazón el apoyo y amor incondicional en esos días oscuros, que me ayudaron a ver que todo tiene solución. Daniela, mi amor, gracias por todos los consejos que me ayudaron a salir adelante y no olvidando los apapachos jejeje... y sí ¡todo salió muy bien! Te amo mucho amor mío. Melissa, mi chaparrita, con tu simple inocencia y amor desinteresado me ayudó a terminar este proyecto de vida. Ambas son el motor de mi vida. Las amo muchísimo.

Comité Tutorial

Dr. Fausto Sánchez Muñoz

Por la orientación y apoyo que me brindó para la realización de este proyecto. También quiero agradecerle por su confianza y amistad, las cuales han sido fundamentales para mi desarrollo académico, profesional y personal.

Dr. Julio César Almanza Pérez

Por la orientación, apoyo y confianza en la realización de este proyecto. Asimismo, le agradezco su amistad y consejos que me brindó para desarrollarme de mejor manera en lo académico, profesional y personal.

Dr. Eduardo Martínez Martínez

Por el apoyo, orientación y colaboración que han sido muy importantes en el desarrollo de este trabajo.

A mis amigos

Yaneli

Te agradezco por estar presente a lo largo de toda mi formación académica. Por todos los consejos, risas, preocupaciones, nervios, miedos, éxitos y fracasos que hemos compartido a lo largo de todo este camino llamado posgrado.

Mauricio

Te agradezco por todos los consejos y apoyo que me ayudaron en la culminación de esta tesis, además de todos los buenos momentos que pasamos juntos.

Mario

Te agradezco por las pláticas que tuvimos en el laboratorio, proporcionándome energías para seguir adelante.

COMITÉ TUTORAL

Director

Dr. Julio Cesar Almanza Pérez.

Profesor titular C.

Departamento de Ciencias de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

jcap@xanum.uam.mx

Director

Dr. Fausto Sánchez Muñoz.

Investigador en Ciencias Médicas “D”

Departamento de Inmunología

Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez

fausto22@yahoo.com

Asesor

Dr. Eduardo Martínez Martínez.

Investigador en Ciencias Médicas “C”

Laboratorio de Vesículas Extracelulares y Comunicación Celular

Instituto Nacional de Medicina Genómica

emartinez@inmegen.gob.mx

Abreviaturas

ABC	Área bajo la curva
ABCA1	Casete de unión ATP Subfamilia A Miembro 1
AdipoR	Receptor de adiponectina
AGEs	Productos finales de glicación avanzada
AGO	Proteína argonauta
Akt	Proteína serina/treonina cinasa
AMP	Adenosín monofosfato
AMPc	Adenosín monofosfato ciclico
AMPK	Proteína cinasa activada por AMP
ANXA2	Anexina A2
APCs	Células precursoras de adipocitos
ApoE	Apolipoproteína E
ARF6	Factor de ribosilación de ADP 6
ATP	Adenosina trifosfato
C/EBP	Proteína de unión al potenciador de CCAAT
CHC	Cetohexocinasa
CMVs	Cuerpos multivesiculares
CREB	proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc
CtBP2	Proteína de unión al carbono terminal 2
DGCR	Región crítica del síndrome de DiGeorge
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
DNMT1	DNA metiltransferasa 1
ECV	Enfermedades cardiovasculares

EPAC	Proteína de intercambio activada por AMPc
ERK	Cinasa regulada por señal extracelular
ESCRT	Complejo de clasificación endosomal requerido para la maquinaria de transporte
EVL	Tipo homólogo habilitado para proteínas (Enah)/ Fosfoproteína estimulada por vasodilatadores Vasp
FASN	Sintasa de ácidos grasos
FGF21	Factor de crecimiento fibroblástico 21
FOXO1	Caja de horquilla O1
FSB	Fracción estromal vascular
G6Pasa	Glucosa 6-fosfatasa
GLUT	Transportador de glucosa
hASC	Células madre derivadas de tejido adiposo humano
HDL	Lipoproteína de alta densidad
Hepa 1-6	Células de hepatoma 1-6
HepG2	Células de hepatoma G2
HIF-1α	Factor inducible por hipoxia 1 α
HK2	Hexocinasa 2
HL-7702	Células de hígado humano 7702
HMGCR	3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa
HOMA-IR	Modelo de homeostasis Resistencia a la insulina
HPRT	Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa
HRS	Factor de crecimiento de hepatocitos
HUVEC	Células endoteliales de la vena umbilical humana
IGF-1R	Receptor del factor de crecimiento tipo insulina
IL	Interleucina
IMC	índice de masa corporal

IP-10	Proteína inducida por interferón γ
IRAK1	Cinasa 1 asociada al receptor de interleucina 1
JMAF	Jarabe de maíz de alta fructosa
LDHA	Lactato deshidrogenasa A
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LDLR	Receptor de LDL
LEPRb	Receptor de Leptina b
LPL	Lipoproteína lipasa
LPS	Lipopolisacárido
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos 1
MEG3	Gen expresado por vía materna 3
MG	Metilglioxal
MHC-I	Complejo mayor de histocompatibilidad I
MIP-1α	Proteína inflamatoria de macrófagos 1 α
MIR143HG	Gen huésped MIR143
miRNA	MicroRNA
MLCK	Cinasa de cadena ligera de miosina
MSC	Células madre mesenquimales
MT1MMP	Metaloproteinasa de matriz de tipo 1 de membrana
MV	Microvesículas
MyD88	Diferenciación mieloide 88
NFI-A	Factor nuclear I A
NF-κB	Factor nuclear κ B
NLRP3	Receptor similar al dominio de oligomerización de unión a nucleótidos que contiene dominio de pirina
NRF2	Factor nuclear relacionado con el factor eritroide 2

nSMases	Esfingomielinasa neutra putativa
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORP8	Proteína de unión a oxisterol 8
Ox-LDL	LDL oxidadas
PACT	Proteína cinasa inducida por interferón
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxicinasa
PGC1α	Coactivador 1 α de PPAR γ
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinasa
PKB	Proteína cinasa B
PKM2	Isoenzima M2 del músculo piruvato cinasa
PLD	Fosfolipasa D
PPAR	Receptor activado por el proliferador de peroxisomas
Pref-1	Factor de preadipocitos 1
PU.1	PU-box 1
RANTES	Célula T normal expresada y presumiblemente secretada
RFX7	Factor regulador X7
RI	Resistencia a la insulina
RICTOR	Acompañante insensible a la rapamicina de mTOR
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDF-1	Factor-1 derivado de células estromales
SIRT	Sirtuina
SPRY2	Sprouty 2
SREBP1c	Proteína de unión a elementos reguladores de esterol 1c
STAT3	Transductor de señal y activador de transcripción 3
TA	Tejido adiposo
TAB	Tejido adiposo blanco

TAM	Tejido adiposo marrón
TARBP	Proteína de unión al RNA TAR
TAS	Tejido adiposo subcutáneo
TAV	Tejido adiposo visceral
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
TLR-4	Receptor tipo toll 4
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
TRAF6	Factor asociado al receptor TNF 6
TSG101	Proteína del gen 101 de susceptibilidad tumoral
UCP1	Proteína desacoplante 1
VAMP3	Proteína de membrana asociada a vesículas 3
VEs	Vesículas extracelulares
VMP1	Proteína de membrana de vacuola 1
WISP2	Proteína 2 de la vía de señalización inducible de WNT1
Wnt	Sitio de integración tipo sin alas 1
YBX1	Proteína de unión a caja Y 1
3T3-L1	Células de la subcepa L1 continua de la cepa 3T3 de ratón suizo albino
3' UTR	Región 3' no codificante

Resumen

La alta ingesta de fructosa a través de las bebidas azucaradas induce cambios metabólicos y endocrinos en el tejido adiposo (TA). Se ha sugerido que los microRNAs (miRNAs) contenidos en vesículas extracelulares (VEs) son algunas de las señales endocrinas secretadas por los adipocitos, las cuales pueden regular diversos procesos celulares, incluyendo la adipogénesis y el metabolismo. Sin embargo, el efecto de la exposición a fructosa sobre la secreción de algunos miRNAs por tejidos y células está poco estudiada. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la exposición a crónica de fructosa sobre la secreción de algunos miRNAs seleccionados en VEs en plasma y TA epididimal de ratas Wistar y en sobrenadante y adipocitos de la línea celular 3T3-L1. Para este estudio se utilizaron 20 ratas Wistar macho, con un peso de 100-120 g, expuestas a 20% (p/v) de fructosa en el agua de beber por ocho semanas. El perfil bioquímico y los niveles de adipocinas fueron evaluados. El número y tamaño de VEs se determinaron mediante el método de análisis de seguimiento de nanopartículas. Los niveles del miR-21-5p, miR-140-5p, miR-143-5p, miR-146b-5p, miR-148a-5p, miR-223-3p, miR-342-3p y miR-450a-5 se determinaron en VEs del plasma y TA mediante RT-qPCR. Las células 3T3-L1 fueron cultivadas en presencia de 550 μ M de fructosa y/o medio estándar del día dos al seis de diferenciación. El número y tamaño de VEs se determinaron mediante el método de análisis de seguimiento de nanopartículas. Los marcadores de VEs (CD63, ANXA2 y CD81) se evaluaron mediante Western blot. Los niveles del miR-21-5p, miR-140-5p, miR-143-5p, miR-146b-5p, miR-148a-5p, miR-223-3p, miR-342-3p y miR-450a-5 se

determinaron en VEs de sobrenadantes y células mediante RT-qPCR. En los experimentos realizados en ratas, la ingesta de fructosa durante ocho semanas indujo un aumento en los niveles de glucosa, HOMA-IR, insulina, triglicéridos y una disminución del colesterol HDL, junto con un incremento de los niveles de adiponectina, leptina e IL-1 β . Además, en el plasma, se observó que la ingesta de fructosa promovió el aumento en los niveles del miR-143-5p en VEs, mientras que los niveles del miR-223-3p y del miR-342-3p disminuyeron. También, en el TA de estos animales se observó un aumento del área de los adipocitos junto con el incremento de la expresión del miR-143-5p y disminuyó el miR-223-3p y miR-342-3p. Por otro lado, en las células 3T3-L1 expuestas a fructosa se indujo el aumento en los niveles del miR-143-5p en VEs del sobrenadante, mientras que el miR-223-3p disminuyó. Asimismo, la exposición a fructosa promovió el aumento en la expresión del miR-140-5p, miR-143-5p, miR-146b-5p, miR-148a-5p, miR-223-3p y miR-342-3p en las células 3T3-L1. Cuando se hizo la inhibición del miR-143-5p (oligonucleótidos antisentido) en células 3T3-L1 expuestas a fructosa se redujo la acumulación de lípidos, sin disminuir la expresión de *Pparg*, *Cebpa* y *Glut4*, mientras que la expresión de *Lpl* aumentó. En conclusión, este trabajo demuestra que la fructosa regula los niveles de miRNAs en VEs tanto *in vivo* como *in vitro*. En particular, la exposición a la fructosa modificó los miRNAs adipogénicos miR-143-5p, miR-223-3p y el miR-342-3p en ratas y en células 3T3-L1. Por lo que, la fructosa puede generar señales proadipogénicas mediadas por miRNAs en VEs provenientes de los adipocitos, de esta manera, podrían participar en el desarrollo de la obesidad.

Abstract

High fructose intake through sugar-sweetened beverages induces metabolic and endocrine changes in adipose tissue (AT). It has been suggested that microRNAs (miRNAs) contained in extracellular vesicles (EVs) are some of the endocrine signals secreted by adipocytes, which can regulate diverse cellular processes, including adipocyte differentiation and metabolism. However, the effect of fructose exposure on the secretion of some miRNAs by tissues and cells has been poorly studied. This study aimed to evaluate the effect of chronic fructose exposure on the secretion of some selected miRNAs in VEs in plasma and epididymal TA of Wistar rats and supernatant and adipocytes of the 3T3-L1 cell line. Twenty male Wistar rats, weighing 100-120 g, exposed to 20% (w/v) fructose in drinking water for eight weeks were used for this study. The biochemical profile and the levels of adipokines were evaluated. The number and size of VEs were determined using the nanoparticle tracking analysis method. The levels of miR-21-5p, miR-140-5p, miR-143-5p, miR-146b-5p, miR-148a-5p, miR-223-3p, miR-342-3p, and miR-450a-5 were determined in plasma VEs and TA by RT-qPCR. 3T3-L1 cells were cultured in 550 μ M fructose and/or standard medium from days two to six of differentiation. The number and size of VEs were determined using the nanoparticle tracking analysis method. VEs markers (CD63, ANXA2, and CD81) were evaluated by Western blot. The levels of miR-21-5p, miR-140-5p, miR-143-5p, miR-146b-5p, miR-148a-5p, miR-223-3p, miR-342-3p, and miR-450a-5 were determined in VEs of supernatants and cells by RT-qPCR. In experiments carried out on rats, fructose intake for eight weeks In experiments carried out on rats, fructose

intake for eight weeks induced an increase in glucose levels, HOMA-IR, insulin, triglycerides, and a decrease in HDL cholesterol, together with an increase in the levels of adiponectin, leptin, and IL-1 β . Furthermore, fructose ingestion increased miR-143-5p levels in VEs, while miR-223-3p and miR-342-3p levels decreased. Likewise, in TA of rats with fructose ingestion, the area of adipocytes increased along with the increased expression of miR-143-5p and decreased miR-223-3p and miR-342-3p. On the other hand, in 3T3-L1 cells, fructose exposure induced an increase in miR143-5p levels in supernatant VEs, while miR-223-3p decreased. Likewise, exposure to fructose promoted an increase in the expression of miR-140-5p, miR-143-5p, miR-146b-5p, miR-148a-5p, miR-223-3p and miR-342-3p in the 3T3-L1 cells. Furthermore, antagonism of miR-143-5p (antisense oligonucleotides) in 3T3-L1 cells exposed to fructose reduced lipid accumulation, without decreasing the expression of Pparg, Cebpa and Glut4, while the expression of Lpl increased. In conclusion, this work demonstrates that fructose regulates the levels of miRNAs in VEs both in vivo and in vitro. In particular, fructose exposure modified the adipogenic miRNAs miR-143-5p, miR-223-3p, and miR-342-3p in rats and 3T3-L1 cells. Therefore, fructose can generate proadipogenic signals mediated by miRNAs in EVs from adipocytes; thus, they could participate in the development of obesity.

Índice

	Página
1. Introducción	1
1.1. Fructosa	1
1.2. Bebidas azucaradas	2
1.3. Absorción y metabolismo de la fructosa	3
1.4. Alteraciones metabólicas por el alto consumo de fructosa	5
2. Obesidad	7
2.1. Tejido adiposo	8
2.2. Tejido adiposo como órgano endocrino	10
3. Vesículas extracelulares	13
3.1. Cuerpos apoptóticos	14
3.2. Microvesículas	15
3.3. Exosomas	16
3.4. Vesículas extracelulares secretadas por adipocitos	18
4. MicroRNAs	20
4.1. Biogénesis de microRNAs	20
4.2. MicroRNAs relacionados con el metabolismo y la adipogénesis.	24
4.3. miR-21-5p	24
4.4. miR-140-5p	26
4.5. miR-143-5p	28
4.6. miR146b-5p	30
4.7. miR-148a-5p	32
4.8. miR-223-3p	34
4.9. miR-342-3p	36
4.10. miR-450a-5p	38
5. Justificación	38
6. Hipótesis	39
7. Objetivo General	39
7.1. Objetivos Particulares	40
8. Material y métodos	40
8.1. Animales	40
8.2. Determinación de parámetros bioquímicos en plasma	41
8.3. Medición de tamaño de los adipocitos	42
8.4. Determinación de adipocinas en plasma	42
8.5. Cultivo celular de células 3T3-L1	43
8.6. Tinción de rojo oleoso O	44

8.7.	Estimación del tamaño y número de vesículas extracelulares	44
8.8.	Aislamiento de RNA total de vesículas extracelulares	45
8.9.	Aislamiento de RNA total del tejido adiposo y de células 3T3-L1	47
8.10.	Síntesis de DNA complementario	48
8.11.	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR)	50
8.12.	Western blot	51
8.13.	Transfección del inhibidor del miR-143-5p	53
8.14.	Análisis estadístico	53
9.	Resultados	54
9.1.	Consumo de fructosa y alimento en ratas Wistar durante ocho semanas	54
9.2.	Efecto de la alta ingesta de fructosa sobre el perfil metabólico en ratas Wistar	56
9.3.	Efecto de la alta ingesta de fructosa sobre la secreción de vesículas extracelulares en plasma	56
9.4.	Efecto de la alta ingesta de fructosa sobre los miRNAs relacionados con la adipogénesis en vesículas extracelulares del plasma	57
9.5.	Efecto de la alta ingesta de fructosa sobre la expresión de miRNAs relacionados con la adipogénesis en el tejido adiposo epididimal	60
9.6.	Efecto de la exposición a fructosa sobre la diferenciación en células 3T3-L1	62
9.7.	Secreción de vesículas extracelulares en el sobrenadante de células 3T3-L1 expuestas a fructosa	64
9.8.	Efecto de la exposición a fructosa sobre los miRNAs relacionados con la adipogénesis en vesículas extracelulares del sobrenadante de células 3T3-L1	66
9.9.	Efecto de la exposición a fructosa sobre la expresión de miRNAs relacionados con la adipogénesis en células 3T3-L	68
9.10.	Efecto del antagonismo del miR-143-5p en células 3T3-L1 expuestas a fructosa	70
10.	Discusión	73
11.	Conclusión	83
12.	Perspectivas	84
13.	Referencias	86

1. Introducción

1.1. Fructosa

La fructosa es uno de los tres principales monosacáridos consumidos por los humanos, y su metabolismo aporta la misma energía que la glucosa, 4 Kcal/g [1]. Químicamente, la fructosa es un isómero de la glucosa con fórmula molecular $C_6H_{12}O_6$, el cual difiere de la glucosa por la presencia de un grupo ceto unido al carbono 2 de la molécula, en tanto la glucosa presenta un grupo aldehído en el carbono 1. La fructosa se encuentra en forma natural en frutas, verduras y en la miel [1]. Sin embargo, en la actualidad, el jarabe de maíz de alta fructosa (JMAF) (45% de glucosa y 55% de fructosa) es la principal fuente de fructosa en la dieta y es considerado uno de los principales edulcorantes que componen la azúcar añadida. El JMAF es el más utilizados en casi todos los alimentos industrializados como refrescos, pasteles, pan de caja, galletas, chocolates, jugos industrializados, barritas, cereales, miel (de maple, agave o de abeja industrializada) y algunos yogures, entre otros [2,3]. Lo anterior, es debido a que su producción es un 20% más barata comparado con la sacarosa, y es 1.8 veces más dulce a pesar de tener el mismo contenido calórico [2,3].

Existen numerosos estudios clínicos, experimentales y epidemiológicos que demuestran que la fructosa es un factor importante que contribuye al desarrollo de enfermedades metabólicas crónicas, como la obesidad, la resistencia a la insulina (RI), la hipertrigliceridemia, diabetes tipo 2 (DT2) y algunos tipos de cáncer [1,4–7]. Sin embargo, todos los mecanismos de cómo la fructosa participa en el desarrollo de la obesidad aún no están del todo claro.

1.2. Bebidas azucaradas

Los azúcares añadidos son aquellos edulcorantes, incluyendo el JMAF, que son agregados durante el procesamiento de los alimentos. Entre los alimentos procesados, las bebidas azucaradas son una fuente importante de azúcar añadida en la dieta. En las últimas dos décadas se incrementó drásticamente el consumo de azúcar añadida a través de las bebidas azucaradas entre niños y adultos [10]. En el 2015, en México, Alemania y Japón, el consumo de bebidas azucaradas anual per cápita estaba por encima de los 100 litros (167, 150 y 144 litros, respectivamente). Lo anterior implica un consumo medio diario de cerca de 0.3 a 0.4 L por habitante [11]. Por otro lado, en EE. UU., se encontró que el consumo de bebidas azucaradas representó el 7.3% (143 kcal) y el 6.5% (145 kcal) de la ingesta energética diaria total per cápita en niños de 1 a 19 años y adultos ≥ 20 años, respectivamente [12]. En cambio, en México, siendo líder mundial en el consumo de bebidas azucaradas [13,14], se encontró que la ingesta de bebidas azucaradas representó el 17.5% (325 Kcal) y el 19.0% (382 Kcal) de la ingesta energética total per cápita en niños de 1 a 19 años y en adultos mayores a 20 años, respectivamente [15], lo que representa el 70% de la ingesta de azúcares añadidos en la dieta [16].

La Organización Mundial de la Salud (OMS) advierte que el consumo elevado de azúcar añadida contribuye al desarrollo de la obesidad, por lo que recomienda limitar la ingesta de azúcar añadida al 10% de la ingesta energética total [17], además, de implementar impuestos para incrementar el costo de las bebidas azucaradas [18]. En enero del 2014, el gobierno mexicano implementó un impuesto del 10% a las

bebidas industrializadas para disminuir el consumo de azúcar añadida, como una estrategia para frenar la epidemia de la obesidad y DMT2. Lo anterior promovió que en dos años disminuyera en 6.1% el consumo de bebidas azucaradas en México [19]. Además, en octubre del 2019, el gobierno mexicano aprobó nuevas etiquetas de advertencia para alimentos envasados y bebidas no alcohólicas con el fin de disminuir el consumo de alimentos no esenciales altamente calóricos. Esta implementación estimó que podría disminuir 10.5% de la ingesta de bebidas azucaradas [20]. A pesar de las estrategias implementadas, el consumo de fructosa en forma de bebidas azucaradas en México sigue siendo elevado y, por consiguiente, un problema de salud.

1.3. Absorción y metabolismo de la fructosa

La fructosa en su forma libre es absorbida directamente en la luz intestinal mediante el transportador de glucosa 5 (GLUT5/SLC2A5) en el lado del lumen y el GLUT2/SLC2A2 en el lado basolateral de los enterocitos [8]. En la circulación porta la fructosa es transportada al hígado a través del GLUT2/SLC2A2 [8]; se ha demostrado que el GLUT8/SLC2A8 también media el transporte de fructosa a los hepatocitos [9]. Por otro lado, la absorción extrahepática de la fructosa también tiene lugar, ya que el GLUT5/SLC2A5 también se expresa ampliamente en el tejido adiposo, riñón, tejido muscular esquelético, testículos y cerebro [8]. Sin embargo, a diferencia de la glucosa, solo una pequeña fracción de la fructosa ingerida alcanza la circulación sistémica. Un estudio demostró que en adultos sanos que ingirieron 30.4 g de fructosa, el 14.5% de fructosa alcanzaron la circulación sistémica. Otro estudio encontró que la ingesta de

M. en C. Adrián Hernández Díaz Couder. Tesis Doctorado en Biología Experimental.

una bebida endulzada con JMAF (que contiene 39.2 g de fructosa y 28.8 g de glucosa) aumentó la concentración de 5.4 μM a 363.4 μM en circulación periférica. En ratas, la administración de 2 g/Kg de una solución rica en fructosa promovió que se alcanzaran concentraciones de 20 μM en circulación arterial y 146 μM en circulación de todo el cuerpo (circulación periférica). Por lo tanto, la evidencia sugiere que la ingesta de fructosa puede alcanzar diversos órganos metabólicamente activos.

Por otro lado, en humanos se demostró que cerca del 70% de la fructosa ingerida es directamente metabolizada por el hígado [10]. En el hígado, la cetohecoquinasa (CHC), también conocida como fructocinasa, cataliza la primera reacción de fosforilación para producir fructosa-1-fosfato (fructosa-1-P), iniciando el catabolismo de la fructosa [11]. Esta vía pasa por alto el principal punto de regulación glucolítica (fosfofructocinasa) [12]. La lisis de la fructosa-1-P catalizada por la aldolasa B genera dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y gliceraldehído. Ambas triosas se convierten en glucosa siguiendo la gluconeogénesis [11]. También, el DHAP y el gliceraldehído se pueden convertir en lactato, el cual es liberado a la circulación [11].

El gliceraldehído también se puede convertir en acetil-CoA (producido consecutivamente por gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, fosfoglicerato quinasa, fosfoglicerato mutasa, enolasa, piruvato quinasa y piruvato deshidrogenasa) para producir ácidos grasos o triacilgliceroles [13]. También, el gliceraldehído puede metabolizarse a glicerol-3-fosfato (glicerol-3-P) mediante la actividad del gliceraldehído cinasa [13]. El glicerol-3-P es convertido a metilglioxal (MG) mediante la actividad de la MG sintasa, el cual es un potente productor de productos finales de glicación

avanzada (AGEs), donde la glicación es un término que describe la modificación postraducciona permanente de los grupos amino de las proteína por la acción de azúcares reductos [14], dicho compuesto es secretado a la circulación [13]. Además, el glicerol-3-P también puede formar ácidos grasos y triacilgliceroles a través de la lipogénesis de novo [13]. Por otro lado, la rápida fosforilación de la fructosa por medio de la CHC, conduce a un alto nivel de estrés metabólico a través de la depleción de ATP, aumentando la degradación del AMP para aumentar el ácido úrico en el hígado, lo que finalmente resulta en una elevación de ácido úrico en sangre [13]. Así, la evidencia sugiere que la ingesta de altas cantidades de fructosa es absorbida y metabolizada por el hígado para acumularse en forma de lípidos.

1.4. Alteraciones metabólicas por el alto consumo de fructosa

Estudios observacionales y ensayos clínicos muestran que el consumo de fructosa a través de bebidas azucaradas, además de la que proviene de los alimentos procesados, tiene un impacto significativo en la prevalencia del sobrepeso y obesidad, tanto en niños como en adultos. En particular, aproximadamente el consumo de 240 mL/día de bebidas azucaradas se asocia con un mayor riesgo de peso no saludable [4]. Además, el consumo de bebidas azucaradas contribuye al desarrollo de enfermedades no transmisibles, como DM2, enfermedades cardiovasculares (ECV), y enfermedad de hígado graso no alcohólico [5,6]. En un estudio transversal con 3671 adolescentes (edad media de 13.2 ± 1.7 años) se encontró que el consumo de bebidas ricas en fructosa aumenta la probabilidad de padecer sobrepeso (RM:1.27; 95% M. en C. Adrián Hernández Díaz Couder. Tesis Doctorado en Biología Experimental.

CI:1.01-1.59) y obesidad (RM: 1.61; 95% IC:1.01-2.57), particularmente en los individuos con alto consumo de bebidas energéticas. Además, la probabilidad de padecer obesidad abdominal fue dos veces más alta entre los adolescentes que bebían ≥ 1 taza/día de bebidas deportivas (que contienen 8 g de fructosa 4 de glucosa y 3 g de sacarosa), en comparación con aquellos que bebieron < 1 taza/día [7]. En un estudio prospectivo con una cohorte de 115,315 maestras mexicanas se encontró que el consumo de refresco ≥ 1 porción por semana (que contiene 17 g de fructosa, 16 g de glucosa y 4 g de sacarosa) se asoció con un aumento de peso de 0.3 Kg (95% IC: 0.2-0.5), entre el 2006 y el 2008. Además, un incremento de 1 porción por día de refresco se asoció con un aumento de peso de 1.0 Kg (95% IC: 0.7-1.2; $P < 0.001$) [15]. En otro estudio realizado en una cohorte de maestras de California, se encontró que existe un mayor riesgo de ECV en mujeres que consumieron ≥ 1 ración por día de bebidas de frutas (CR: 1.42; 95% IC: 1.00-2.01; $P= 0.021$) y para refrescos (que contiene 36 g de fructosa y 24 g de glucosa) (CR: 1.23; 95% IC: 1.05-1.44; $P= 0.0002$) en comparación con las consumidoras raras/nunca [16]. En un prospectivo de adultos mexicanos (20 a 85 años), que incluyó 1,268 trabajadores de la salud, se mostró que en un año, el aumento en la ingesta de refrescos de una porción por día (que contiene 17 g de fructosa, 16 g de glucosa y 4 g de sacarosa) se asoció con un aumento de peso de 0.10 Kg (95% IC: 0.00-0.19) por año [17]. Además, en adultos el 12% del total de las muertes relacionadas con la diabetes, las enfermedades cardiovasculares y los cánceres relacionados con la obesidad en México en el 2010 se atribuyeron a la ingesta de bebidas azucaradas [18]. Por lo tanto, la evidencia sugiere que el consumo de 1 \geq bebida azucarada que contiene aproximadamente 20 g de fructosa al día, junto

M. en C. Adrián Hernández Díaz Couder. Tesis Doctorado en Biología Experimental.

con una mala alimentación y una pobre actividad física, aumentan el riesgo de padecer sobrepeso y obesidad.

2. Obesidad

El desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético promueve el exceso de acumulación de lípidos en el TA, que conlleva al desarrollo de sobrepeso y obesidad, así como la lipotoxicidad producida en el hígado y otros órganos, también como la autofagia en el musculo esquelético.[19]. La OMS define a la obesidad como la acumulación anormal o excesiva del TA que puede ser perjudicial para la salud [20]. Desde 1975, la obesidad se ha triplicado y en determinadas poblaciones este aumento es más pronunciado. Por ejemplo, de 1975 a 2016, la prevalencia de sobrepeso y obesidad en niños y adolescente de 5 a 19 años aumentó cuatro veces del 4% al 18% a nivel mundial, y en adultos, la prevalencia de sobrepeso y obesidad fue de 39% y 13%, respectivamente en el 2016. En EE. UU., según los datos de la NHANES del 2016, el 39.8% de los adultos y el 18.5% de los niños son obesos. En México, la prevalencia de la obesidad ha aumentado sustancialmente desde la década de 1980 [21] y, actualmente, el 36.1% de la población adulta padece obesidad (índice de masa corporal (IMC) ≥ 30 kg/m²). Además, la obesidad central (≥ 94 cm hombres y ≥ 80 cm en mujeres) se presentó en el 81.6% de los adultos y la obesidad mórbida incrementó en un 96.5% entre el 2000 y el 2018 (1.8% a 3.6%) [22]. Así, la evidencia sugiere que el aumento de la prevalencia de la obesidad incrementa el riesgo de padecer RI, inflamación de bajo grado, DMT2 [23], enfermedades cardiovasculares (ECV) [24],

M. en C. Adrián Hernández Díaz Couder. Tesis Doctorado en Biología Experimental.

enfermedades neurodegenerativas [25] y algunos tipos de cáncer [26], las cuales están vinculadas con la desregulación del TA.

2.1. Tejido adiposo

El TA juega un papel importante en el control de la homeostasis energética. Este tejido está compuesto principalmente por adipocitos (Figura 1), los cuales actúan para almacenar energía, censan las demandas energéticas y tienen la capacidad de secretar factores paracrinos y endocrinos para regular el metabolismo [27].

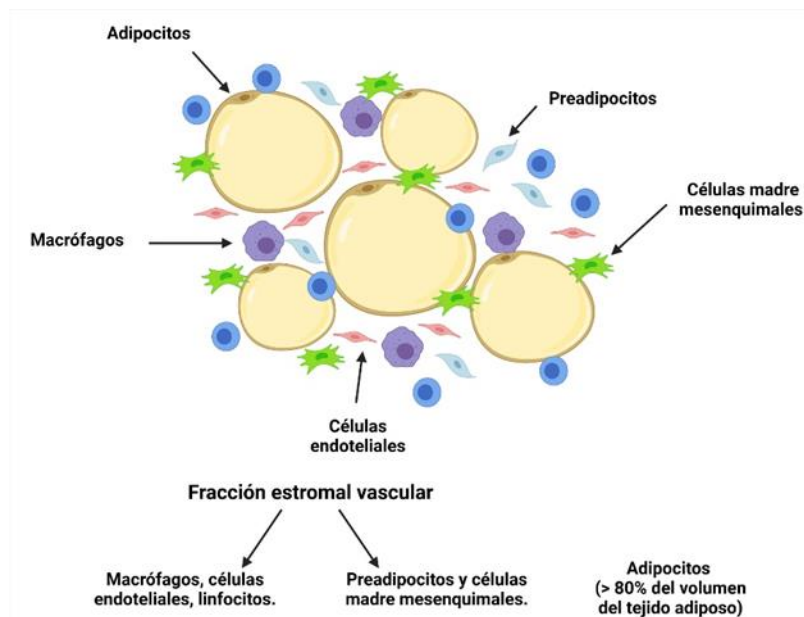


Figura 1. Composición celular del TA. El TA está compuesto por diversos tipos celulares, los cuales se dividen en la fracción estromal vascular (FSV) y en adipocitos. La FSV está compuesta por macrófagos, células endoteliales, linfocitos y células madre mesenquimales. En cambio, los adipocitos son el tipo celular predominante en el TA, el cual compone más del > 80% del volumen del TA.

M. en C. Adrián Hernández Díaz Couder. Tesis Doctorado en Biología Experimental.

En el organismo, el TA existe principalmente como TA marrón (TAM) y TA blanco (TAB), los cuales pueden ser diferenciados por su morfología y su función. El TAB se encuentra en las regiones cervical-supraclavicular, perirrenal y paravertebral, el cual representa cerca del 1 al 2% del TA [27,28]. Además, el TAM está compuesto principalmente por adipocitos marrones, que se caracterizan por contener gotas multiloculares de lípidos y una alta densidad mitocondrial con alta capacidad de oxidación de lípidos [28]. Lo anterior, permite que el TAM consuma energía al producir calor (termogénesis) mediante el desacoplamiento de la actividad de la cadena de transporte de electrones mitocondrial por la actividad de la proteína desacoplante 1 (UCP1) [28]. En cambio, el TAB está especializado en el almacenamiento de energía, el cual comprende más del 95% del TA. Los adipocitos del TAB se caracterizan por contener una gran gota de lípido unilocular, bajo número de mitocondrias y un pequeño espacio citoplasmático [27]. En la mayoría de las especies, el TAB está distribuido y organizado anatómicamente en distintos depósitos, los cuales pueden dividirse en TA subcutáneo (TAS) y el TA visceral (TAV). El TAS se encuentra en los depósitos craneal, facial, abdominal, femoral y la zona del glúteo. Además, el TAS puede almacenar cerca del 80% de la grasa corporal total del cuerpo. El TAV se encuentra rodeando el corazón (epicárdico/pericárdico) y los órganos intraabdominales (mesentérico, omental, perigonadal, perirrenal y retroperitoneal) [28].

Por otro lado, otros estudios han encontrado que la regulación metabólica es diferente entre el TAS y el TAV. La acumulación de triglicéridos en el TAV (obesidad central) se asocia con la RI y a un mayor riesgo de enfermedades metabólicas,

mientras que la acumulación de triglicéridos en el TAS (obesidad periférica) puede incluso proteger del síndrome metabólico. Lo anterior fue demostrado en experimentos con roedores al trasplantar TAS en la región del TAV, lo que resultó en la mejora del metabolismo de la glucosa. Lo anterior indica que el efecto está mediado por las diferencias autónomas de las células, no simplemente por la posición anatómica [29]. Además, se ha encontrado que los preadipocitos del TAS tienen mayores tasas de proliferación y acumulación de lípidos [30], mientras que los adipocitos TAV tienen mayores tasas de lipólisis y mayor susceptibilidad a la apoptosis [31].

2.2. Tejido adiposo como órgano endocrino

El TAB es un órgano dinámico con la capacidad de responder de manera diferencial a las señales fisiológicas o al estrés metabólico liberando factores endocrinos que regulan diversos procesos, como el gasto energético, el control del apetito, la homeostasis de la glucosa, la sensibilidad a la insulina, la inflamación y la reparación tisular [32]. Hasta la fecha se han identificado más de 600 moléculas bioactivas secretadas por los adipocitos, incluyendo citocinas, reactantes de fase aguda, mediadores inflamatorios, hormonas y otros mensajeros químicos, también denominadas adipocinas [33]. Estas moléculas afectan las funciones de los adipocitos de manera autocrina y paracrina y permiten que el TA se comunique con el cerebro, hígado, músculos, páncreas y otros órganos de manera endocrina [34]. Además, se ha demostrado que la ingesta de fructosa induce la desregulación en la secreción de adipocinas [35,36]. En sujetos obesos los cambios en la concentración de las

M. en C. Adrián Hernández Díaz Couder. Tesis Doctorado en Biología Experimental.

adipocinas puede ser indicadores de la disfunción del TA [37]. Cambios en la secreción de adipocinas, incluyendo la leptina, adiponectina, citocinas proinflamatorias, entre otras, contribuyen en el desarrollo de la RI, esteatosis hepática, DMT2 y ECV [37].

Entre las adipocinas se encuentra la leptina, la cual es expresada y secretada exclusivamente por el TA. La leptina es una hormona peptídica no glucosilada de 16 kDa que se sintetiza principalmente en los adipocitos, la cual regula el control del peso a través de la isoforma larga del receptor de leptina b (LEPRb) en el hipotálamo para suprimir la alimentación y aumentar el gasto energético [38]. La leptina tiene un papel importante en diversos procesos celulares, incluida la función reproductiva, la fertilidad, la pubertad, la actividad, el gasto energético, la aterogénesis, el crecimiento fetal y el apetito [39]. En estudios se ha reportado que los niveles de leptina circulante son proporcionales a la masa de grasa corporal [40]. Concentraciones elevadas en circulación se considera un marcador de la obesidad [41]. Además, se ha demostrado que el consumo elevado de fructosa promueve el aumento en los niveles de leptina en circulación, así como la resistencia a la leptina [42–44]. La deficiencia de leptina y/o la resistencia a la leptina induce una RI grave [45]. La leptina estimula la oxidación de ácidos grasos y reduce la acumulación de grasa corporal al activar la proteína cinasa activada por adenosín monofosfato (AMP) (AMPK) en los tejidos no adiposos, promoviendo la mejora de la sensibilidad a la insulina [46].

Por otro lado, la adiponectina es otra adipocina secretada por el TA. La adiponectina es una de las adipocinas más abundantes y es altamente expresada en

el TA, la cual tiene efectos antiobesidad, antiaterogénicos y antidiabéticos [47]. La adiponectina es una proteína de 30 kDa que se secreta en tres complejos homoméricos diferentes: trímeros (bajo peso molecular), hexámeros (peso molecular medio) y multímeros (alto peso molecular). La forma de alto peso molecular contribuye a los efectos metabólicos benéficos de la adiponectina relacionados con la tolerancia a la glucosa, la sensibilidad a la insulina y la pérdida de peso. A nivel celular, la adiponectina inhibe la muerte celular y la inflamación mediante la unión a sus receptores (AdipoR) 1 y AdipoR2 [48,49]. AdipoR1 se expresa en diversos tejidos como el músculo esquelético, corazón, bazo, riñón e hígado, mientras que el AdipoR2 se expresa principalmente en el hígado [50]. AdipoR1 está asociado con la activación de AMPK y la supresión de la expresión génica gluconeogénica y lipogénica [51]. AdipoR2 activa al receptor activado por el proliferador de peroxisomas α (PPAR α), que promueve la absorción de glucosa, oxidación de ácidos grasos y sensibilidad a la insulina [51]. En las células β pancreáticas, la adiponectina aumenta la secreción de insulina a través de la activación de AMPK y la proliferación de estas células [52]. En el hígado, la adiponectina mejora la esteatosis, la fibrosis y la inflamación [44]. Además, la adiponectina actúa en el sistema nervioso central estimulando el apetito, reduce el gasto energético y afecta la neurodegeneración. Por otro lado, se ha encontrado que la fructosa induce la disminución de los niveles de adiponectina en circulación [35,36]. Además, los niveles de adiponectina circulantes correlacionan inversamente con la obesidad, DMT2 y con enfermedades relacionadas con la obesidad [53,54]. Por otro lado, se ha encontrado que la síntesis y secreción de adipocinas es más activa en el TAV que en el TAS [55].

El exceso de TA se sabe que produce un estado inflamatorio crónico de bajo grado. Por ejemplo, la expresión de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-1 β , proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), regulado sobre la activación, célula T normal expresada y presumiblemente secretada (RANTES), proteína inflamatoria de macrófagos 1 α (MIP-1 α) e inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) es mayor en el TAV, mientras que la expresión de leptina e IP-10 es mayor en TAS. Además, en el TAV de sujetos con DMT2 el perfil de secreción de citocinas proinflamatorias es mucho más marcado que en el TAS. En este sentido, la disfunción metabólica presente en la obesidad puede explicarse por la sobreproducción de adipocinas proinflamatorias y la disminución de adipocinas antiinflamatorias en el TAV.

3. Vesículas extracelulares

Todas las células, incluyendo a los adipocitos, son capaces de secretar moléculas al espacio extracelular. Una un mecanismo de hacerlo, es a través de diversos tipos de vesículas, denominadas VEs [56]. Las VEs son estructuras membranosas subcelulares formadas por bicapas lipídicas y con componentes citoplasmáticos, las cuales son formadas y liberadas al espacio extracelular por el desprendimiento de la membrana celular [56]. Las VEs son importantes elementos de la comunicación intercelular por su capacidad de modular diversos procesos celulares al transferir diversas moléculas, como proteínas, lípidos bioactivos y ácidos nucleicos (DNA, RNA no codificante como los microRNAs), así como la eliminación de desechos. Estas VEs se han encontrado presentes en fluidos corporales como la sangre, saliva,

M. en C. Adrián Hernández Díaz Couder. Tesis Doctorado en Biología Experimental.

orina y leche materna [57]. Las VEs se pueden clasificar en tres principales categorías: cuerpos apoptóticos, microvesículas y exosomas (Figura 2).

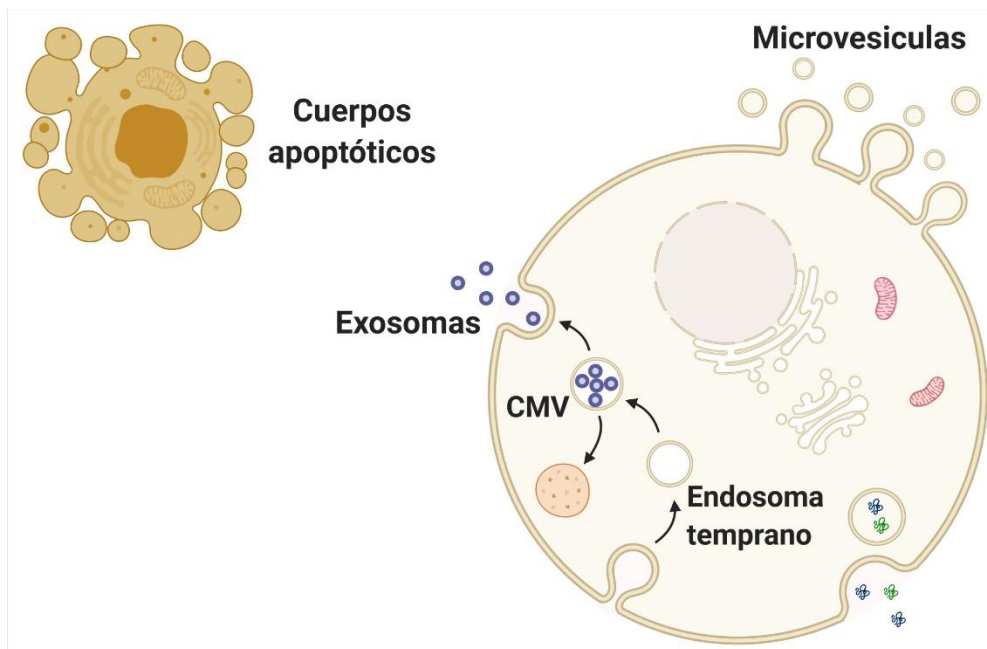


Figura 2. Tipos de VEs. Las VEs se clasifican según su tamaño y biogénesis. Los cuerpos apoptóticos son VEs de diámetro de 50 a 5,000 nm, formadas por la separación de la membrana celular del citoesqueleto. Las MVs son VEs de diámetro de 100 a 1,000 nm, generadas por la gemación y fisión de la membrana plasmática. En cambio, los exosomas son VEs de diámetro de 30 a 200 nm, generados por vía endocítica.

3.1. Cuerpos apoptóticos

Los cuerpos apoptóticos son liberados al espacio extracelular por las células cuando están muriendo. El tamaño de los cuerpos apoptóticos varía desde 50 nm hasta 5000 nm de diámetro, y el tamaño de la mayoría de los cuerpos apoptóticos

tiende a ser más grande comparadas con los exosomas y microvesículas [58]. Estas vesículas son generadas por la separación de la membrana plasmática del citoesqueleto como resultado del aumento de la presión hidrostática después de que la célula se contrae. Además, la composición de los cuerpos apoptóticos está formada por orgánulos intactos, cromatina y pequeñas cantidades de proteínas glucosiladas [56].

3.2. Microvesículas

Las microvesículas (MVs) son un subtipo vesículas de membrana con tamaños de 100 nm hasta 1,000 nm de diámetro y son generadas por la gemación y fisión de la membrana plasmática y por la posterior liberación al espacio extracelular. En detalle, la formación de las MVs se regula por el factor de ribosilación de ADP 6 (ARF6), el cual inicia una cascada que activa la fosfolipasa D (PLD). A continuación, la cinasa regulada por señal extracelular (ERK) se recluta en la membrana plasmática, donde fosforila y activa la quinasa de cadena ligera de miosina (MLCK). Finalmente, la fosforilación y activación de la cadena ligera de miosina por MLCK desencadenan la liberación de las MV. Además, estas MVs contienen ARF6, complejo mayor de histocompatibilidad I (MHC-I), integrina β 1, proteína de membrana asociada a vesículas 3 (VAMP3) y metaloproteínasa de matriz de tipo 1 de membrana (MT1MMP) [59].

3.3. Exosomas

Los exosomas, también conocidos como vesículas intraluminales, son un subtipo de VEs con un tamaño aproximado de 30 nm a 200 nm de diámetro, los cuales son generados por vía endocítica. Su biogénesis inicia al ocurrir la invaginación de los receptores de transferrina en la superficie celular promoviendo la formación de endosomas en su etapa temprana. Posteriormente, el plegamiento de la membrana celular conduce a la maduración del endosoma temprano a formar el endosoma tardío, así como la encapsulación de moléculas como RNA, DNA, proteínas citosólicas y lípidos bioactivos. En los endosomas tardíos, también conocidos como cuerpos multivesiculares (CMVs,) ocurre una invaginación en la membrana limitante, lo que conduce a la creación de vesículas intraluminales, precursoras de exosomas en la luz de los CMVs.

Hasta la fecha, se han identificado tres mecanismos moleculares que están involucrados en el ensamblaje y la carga de las VEs, incluyendo el complejo de clasificación endosomal requerido para la maquinaria de transporte (ESCRT, por sus siglas en inglés), tetraspaninas y ceramida esfingolípidica [60]. La familia de proteínas de ESCRT están compuestas aproximadamente de 30 proteínas, que forman 4 complejos (ESCRT 0, ESCRT I, ESCRT II y ESCRT III), los cuales controlan la formación de CMVs y exosomas [60]. En la vía de ESCRT para la formación de exosomas, los complejos ESCRT son reclutados de manera escalonada del lado citosólico de la membrana endosomal para la clasificación de las proteínas seleccionadas [60]. Primero, el fosfatidilinositol-3-fosfato (abundante en las

membranas endosomales) recluta el complejo ESCRT 0 a los endosomas tempranos a través de su subunidad sustrato de tirosina cinasa regulado por factor de crecimiento de hepatocitos (HRS), la cual recluta a clatrina. Después, el complejo ESCRT 0 recluta al complejo ESCRT I a las membranas endosomales por la interacción directa de HRS con la proteína del gen 101 de susceptibilidad tumoral (TSG101) (subunidad de ESCRT I) [60,61]. Posterior a ello, el complejo ESCRT I se une a las proteínas cargo ubiquitinadas y activa el complejo ESCRT II. Así, los complejos ESCRT I y ESCRT II son responsables de la formación de la invaginación de la membrana endosomal [61]. Además, ESCRT II inicia la oligomerización y formación de complejo ESCRT III. Finalmente, el complejo ESCRT III forma una constricción en el cuello de la invaginación [61]. La escisión del cuello de la invaginación es facilitada por el complejo de clasificación de proteínas vacuolar 4, lo que conduce a la formación de la fisión de la membrana catalizada por ESCRT III [60,61].

Por otro lado, se ha encontrado que los mecanismos independientes de ESCRT también participan en la formación de exosomas, debido a que la inhibición de los complejos de ESCRT no reducen la formación de los CMVs [62]. Otros mecanismos descritos son el mecanismo dependiente de tetraspaninas como CD9, CD63 y CD81, la formación y liberación de exosomas dependientes de lípidos y Anexina A2 (ANXA2A). En el caso del mecanismo dependiente de tetraspaninas, se encontró que la tetraspanina CD63 es necesaria para la formación de exosomas y la posterior liberación de VEs [63]. Además, la clasificación de la carga de los exosomas se ha relacionado con dominios ricos en CD81, mientras que el decaimiento del CD9 resulta

en una disminución en la liberación de exosomas [64]. También se ha demostrado que los lípidos también contribuyen a la clasificación de la carga en exosomas. El colesterol, se encuentra dentro del lumen de los CMVs y se ha implicado en la clasificación del contenido exosómico [65]. También se ha demostrado que la vía de biogénesis del exosoma es dependiente de ceramidas. La ceramida se sintetiza mediante la acción catalítica de esfingomielinasa neutra putativa (nSMases) a partir de esfingomielina. Las ceramidas pueden permitir la generación de subdominios de membrana que imponen una curvatura negativa en las membranas. Alternativamente, la ceramida podría ser metabolizada a esfingosina 1-fosfato para activar al receptor de esfingosina 1 fosfato acoplado a proteína Gi que parece ser esencial para la clasificación de la carga de los exosomas [66]. Finalmente, ANXA2 es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de Ca^{2+} asociada con la membrana plasmática y el sistema endosómico [67]. Además, se ha demostrado que la reducción de ANXA2 en los endosomas promovió la inhibición de la formación de los CMV [68], indicando que juega un papel importante en la biogénesis de CMV.

3.4. Vesículas extracelulares secretadas por adipocitos

En la actualidad, la evidencia indica que los adipocitos tienen la capacidad de regular procesos celulares mediante la transferencia de diversos factores mediante exosomas. Por ejemplo, los adipocitos tienen la capacidad de secretar lípidos a través de exosomas [69]. Los exosomas provenientes de los adipocitos pueden viajar al hígado, mejorando la tolerancia a la glucosa y reducen la expresión de FGF21 hepático

M. en C. Adrián Hernández Díaz Couder. Tesis Doctorado en Biología Experimental.

[70]. Además, la activación de AMPK en adipocitos reduce la secreción de VEs por la inhibición de TSG101 [71], y se ha observado que la alta ingesta de fructosa (47.43 g/100 g dieta de fructosa) durante ocho semanas disminuye la fosforilación de AMPK α 1 en el TA de ratones [72]. Así, los adipocitos en respuesta a la exposición a fructosa podrían ser un factor que aumente la secreción de VEs.

Por otro lado, se ha demostrado que los miRNAs en VEs secretados por los adipocitos pueden regular diversas funciones celulares [70]. Por ejemplo, la transferencia del miR-450a-5p mediante exosomas del TA induce la diferenciación de las células madre del mismo a adipocitos maduros [73]. Los adipocitos mediante la secreción del miR-34a en exosomas inhiben la polarización de macrófagos M2 para promover el estado inflamatorio inducido por la obesidad [74]. Se ha observado que el miR-21 contenido en exosomas derivados del TA promueven la angiogénesis al incrementar la expresión del factor inducible por hipoxia 1 α (HIF-1 α), proteína cinasa B (PKB), ERK y el factor-1 derivado de células estromales (SDF-1) [75], indicando que el miR-21 puede promover la vascularización favoreciendo la regeneración del tejido.

Por otra parte, la alta ingesta de sacarosa 30% (p/v) en el agua de beber durante 6 meses modificó la abundancia de miRNAs relacionados con la respuesta inflamatoria contenidos en VEs del plasma de ratas [76]. Por lo que, la evidencia indica que el TA juega un papel importante en la regulación de diversos procesos biológicos mediante la transferencia de miRNAs en VEs y que la exposición a fructosa puede modificar su abundancia.

4. MicroRNAs

Los miRNAs son moléculas de RNA no codificantes de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud, los cuales regulan la expresión génica a nivel postranscripcional, al reconocer la región 3' no codificante (3' UTR) del RNAm blanco para inducir la inhibición de la traducción o la degradación del mismo [77]. Se estima que los miRNAs representan del 1 al 5% de genoma humano. El repositorio de miRNA "miRBase" actualmente enumera 1917 precursores de miRNAs (pre-miRNA) y 2654 miRNA maduros en *Homo sapiens* [78], y pueden regular alrededor del 30-80% de los genes codificados en el genoma humano. Los miRNAs están involucrados en todos los procesos celulares, incluyendo la adipogénesis y su desregulación está asociada con numerosas enfermedades.

4.1. Biogénesis de microRNAs

La biogénesis de los miRNAs es un proceso que contempla diversos pasos. Los miRNAs se transcriben principalmente por la RNA polimerasa II como miRNA primarios (pri-miRNA), que son procesados a precursores de miRNAs (pre-miRNA) y finalmente en dúplex de miRNA maduro [79] (Figura 3). La horquilla del pri-miRNA es escindida en el núcleo por el complejo microprocesador, el cual está compuesto por la enzima Rnasa III Drosha y la proteína de la región crítica del síndrome de DiGeorge 8 (DGCR8). Drosha reconoce la unión del RNA bicatenario o del RNA monocatenario en la base de la horquilla, mientras que dos proteínas DGCR8 se unen al tallo y aseguran

una escisión correcta [79]. Los pre-miRNA son horquillas de aproximadamente 70 nucleótidos de longitud. Además, el extremo del pre-miRNA es escalonado, el cual presenta dos nucleótidos despareados en el extremo 3', un fosfato 5' y un hidroxilo 3', que son típicos productos de la Rnasa III. La proteína Exportina 5 reconoce el extremo escalonado y transporta el pre-miRNA al citoplasma [80]. En el citoplasma, la enzima Rnasa III Dicer se une al pre-miRNA reconociendo al fosfato 5', el extremo escalonado 3' y la estructura de bucle. En vertebrados, la escisión por Dicer es modulada por la proteína de unión al RNA TAR (TARBP) y por el activador de la proteína de la proteína cinasa inducida por interferón (PACT). Una hebra del miRNA madura (hebra guía) se carga en la proteína argonauta (AGO), mientras que la otra hebra (hebra pasajera) se descarta. Además, se da preferencia la hebra del miRNA maduro que posee el extremo 5' menos estable. También se informó que AGO2 prefiere una Adenina o Uracilo como nucleótido 5' terminal [80].

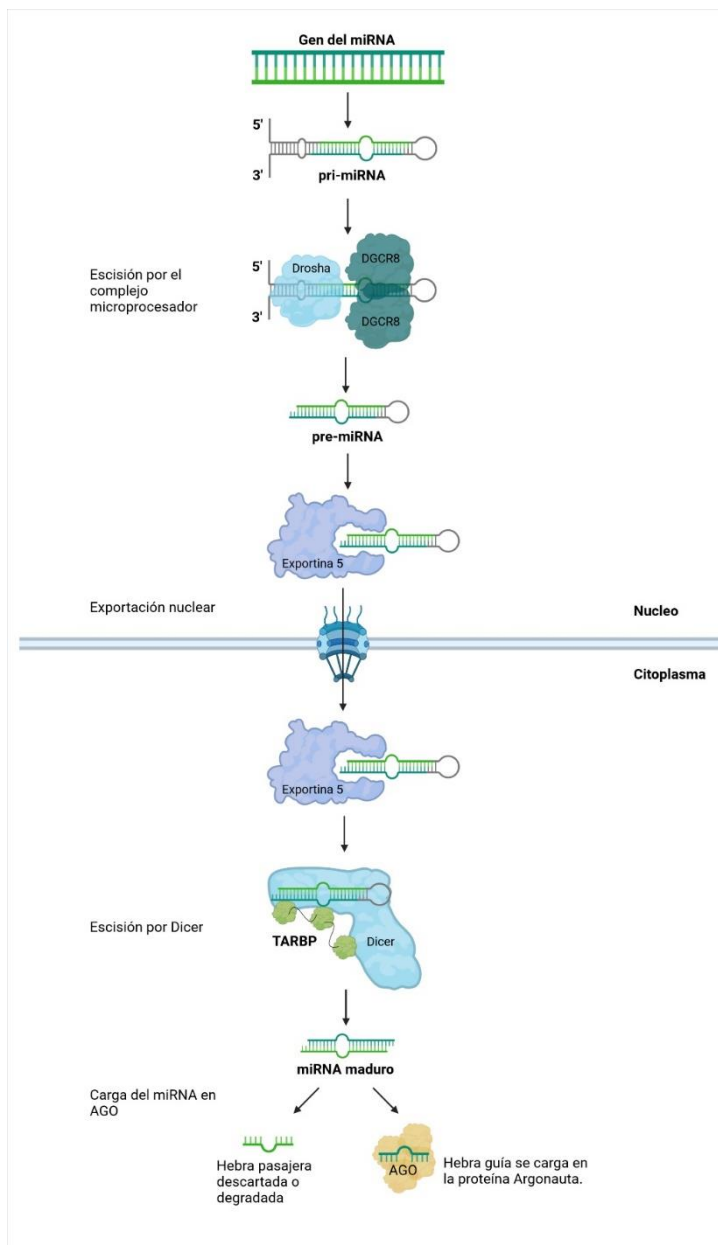


Figura 3. Biogénesis de miRNAs. La RNA polimerasa II (principalmente) transcribe un miRNA primario (pri-miRNA) en el núcleo. Luego, el pri-miRNA es procesado en el precursor de miRNAs (pre-miRNAs) por el complejo microprocesador, que está estructurado por la enzima Rnasa III Drosha y la proteína DGCR8. Los pre-miRNA son horquillas de ~70 nt, que son reconocidos y transportados al citoplasma por Exportin 5. En el citoplasma, el pre-miRNA es escindido por la enzima Dicer de Rnasa III, que produce un dúplex de miRNA maduro. M. en C. Adrián Hernández Díaz Couder. Tesis Doctorado en Biología Experimental.

Finalmente, la hebra guía del miRNA maduro se carga dentro de la proteína AGO y la hebra pasajera es descartada o degradada. Tomado de Gebert LFR y col. [79].

Los miRNAs desempeñan funciones importantes en numerosos procesos fisiológicos, como la proliferación celular, apoptosis, y la diferenciación de tejidos, y su desregulación se ha visto involucrada en procesos patológicos [81].

Recientemente se ha descubierto que varios miRNAs pueden regular la biología del tejido adiposo, incluyendo la adipogénesis y su metabolismo, por lo tanto, su desequilibrio puede desempeñar un papel en el desarrollo de la obesidad y las complicaciones metabólicas relacionadas [82]. Por ejemplo, la alta ingesta de fructosa 60% (p/p) durante cuatro semanas alteró la expresión de diversos miRNAs relacionados con el metabolismo de carbohidratos y lípidos (regulados positivamente miR-223-3p, miR-33-5p, miR-128-3p, miR-125b-5p, miR-145a-3p y regulados negativamente miR-101a-3p, miR-30a-5p, miR-378a-3p, miR-19b-3p y miR-582-3p) en el hígado de ratones [83], así como la ingesta alta de fructosa durante 20 semanas incrementó la expresión de diversos miRNAs relacionados con el metabolismo de lípidos (miR-335, miR-221, miR-27a, miR-33a, miR-17, miR-18a, miR-21, miR-143, miR-34a y miR-125b) en el TA de ratones obesos [84]. Por lo tanto, la evidencia indica que la ingesta de fructosa puede alterar la biología del TA mediante la desregulación de la expresión de los miRNAs, potenciando la respuesta inflamatoria, estrés oxidativo y la sobreacumulación de lípidos.

4.2. MicroRNAs relacionados con el metabolismo y la adipogénesis.

Diversos estudios se han descrito que varios miRNAs como el miR-143-5p, miR-223-3p, miR-140-5p, miR-148a-5p, miR146b-5p, miR-342-3p, miR-21-5p y miR-450a-5p participan en la activación del proceso adipogénico, así como la regulación del metabolismo, los cuales se muestran en la Tabla anexa I.

4.3. miR-21-5p

El gen del miR-21 en humanos se encuentra dentro del locus de la proteína de membrana de vacuola 1 (VMP1) en el cromosoma 17 [85], y juega un papel importante en la regulación del metabolismo. Por ejemplo, la sobreexpresión del miR-21-5p disminuye la expresión de fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK) y la glucosa 6-fosfato (G6Pasa) resultando en la inhibición de la producción de glucosa en hepatocitos primarios de ratón [86]. Además, se encontró que el miR-21-5p disminuye la acumulación de triglicéridos, colesterol libre y el colesterol total en células de hepatoma G2 (HepG2) tratadas con ácido palmítico y ácido oleico [87], y en células de hepatoma 1-6 (Hepa 1-6) tratadas con ácido esteárico [88]. En células de cáncer de ovario, el miR-21-5p induce la expresión de enzimas de la glucólisis incluyendo a la HK2, isoenzima M2 del músculo piruvato quinasa (PKM2) y lactato deshidrogenasa A (LDHA) mediante el incremento de la fosforilación de la proteína serina/treonina cinasa (Akt) [89]. Por otro lado, la inhibición del miR-21-5p mejora la RI y la alteración del metabolismo de lípidos al reducir los niveles de glucosa, triglicéridos, colesterol total, LDL y aumenta los niveles de HDL en ratas con DMT2 [90].

Por otro lado, estudios han demostrado que el miR-21-5p juega un papel importante en la biología del TA. Por ejemplo, en el TA de ratones obesos inducidos por dieta alta en grasa incrementó la expresión del miR-21-5p y correlacionó positivamente con el aumento en el número de adipocitos [91]. Además, se demostró que la inhibición del miR-21-5p reduce el peso corporal, así como el tamaño de los adipocitos y triglicéridos séricos en ratones genéticamente obesos [92]. A nivel celular, el miR-21-5p inhibe la proliferación de las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo humano mediante la regulación del transductor de señal y activador de transcripción 3 (STAT3) [91]. Además, este miRNA induce la diferenciación adipogénica a través de la modulación de la señalización de TGF- β en hASC [93] y en células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea de porcinos [94]. También, el miR-21-5p regula la diferenciación del adipocito mediante la modulación de la vía de señalización de ERK- Proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) a través de la regulación de la expresión de sprouty2 (SPRY2) en células madre mesenquimales humanas [95], lo cual favorece la acumulación del TA.

En pacientes con síndrome metabólico se encontraron niveles elevados del miR-21-5p en el plasma total [96]. En pacientes obesos y en pacientes diabéticos se encontraron niveles bajos del miR-21-5p, el cual correlacionó con el índice de masa corporal, circunferencia de la cintura, insulina y niveles de HOMA-IR [97]. Además, pacientes con enfermedad de hígado graso no alcohólico presentaron niveles elevados del miR-21-5p en el plasma total y correlacionó con la severidad de la esteatosis hepática [98]. Por otro lado, en modelos animales se ha encontrado que el consumo

de fructosa promovió un aumento en los niveles plasmáticos del miR-21-5p, tanto en ratones delgados y obesos [84], como en la ingesta crónica de sacarosa en ratas [76]. Por lo que, la evidencia indica que el miR-21-5p pudiera ser un miRNA protector para el desarrollo de alteraciones metabólicas inducidas por la alta ingesta de fructosa.

4.4. miR-140-5p

El miR-140-5p es un miRNA involucrado en la respuesta inflamatoria y en la diferenciación del adipocito. Por ejemplo, la disminución de la expresión del miR-140-5p incrementó los niveles de proteína de TLR4, respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MyD88) y el factor nuclear (NF)-κB en células A549 de pulmón humano [99], y su sobreexpresión redujo los niveles de inflamación mediante la supresión de la vía de la señalización TLR4/MyD88/NF-κB [99]. Además, otro estudio reportó que el miR-140-5p se sobreexpresa en vasos sanguíneos de ratones con aterosclerosis [100]. En el mismo estudio se encontró que en células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC), el miR-140-5p promueve un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de la regulación de la expresión del factor nuclear relacionado con el factor eritroide 2 (NRF2), sirtuina 2 (SIRT2) [100]. También se encontró que el miR-140-5p participa en la inhibición del estrés oxidante inducido por lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas (ox-LDL) y la apoptosis celular mediante la regulación del TLR4 en la aterosclerosis inducida por ox-LDL mediada por macrófagos [101]. Por otro lado, en células humanas HepG2 y en células de hígado humano 7702 (HL-7702) se encontró que la sobreexpresión del miR-140-5p regula negativamente al receptor M.

M. en C. Adrián Hernández Díaz Couder. Tesis Doctorado en Biología Experimental.

de LDL (LDLR), lo que condujo a la disminución de la captación de LDL [102]. En ratones apolipoproteína E^{-/-} (apoE^{-/-}), el miR-140-5p inhibe la expresión de ABCA1 mediante la regulación de factor regulador X7 (RFX7) para impedir el transporte inverso de colesterol y agravar la aterosclerosis [103].

Además de su participación en procesos inflamatorios, el mir-140-5p juega un papel en la diferenciación del adipocito. Por ejemplo, se demostró que la expresión del miR-140-5p es inducida por el factor de transcripción C/EBP α , un factor de transcripción importante en la diferenciación terminal del adipocito [104]. En células de la subcepa L1 continua de la cepa 3T3 de ratón suizo albino (3T3-L1), el miR-140-5p induce la adipogénesis mediante la regulación de la señalización del TGF- β [104]. Además, MEG3, un RNA largo no codificante, inhibe la adipogénesis mediante la regulación del miR-140-5p en células madre derivadas del TA de humanos [105].

Por otro lado, los niveles plasmáticos del miR-140-5p disminuyeron en ratones obesos inducido por dieta alta en grasa [106] y en un modelo genético de obesidad en ratas [107], mientras que en pacientes con obesidad mórbida presentaron niveles elevados del miR-140-5p en el plasma [108]. En el mismo estudio se encontró que la pérdida de peso inducida por la cirugía condujo a una disminución marcada de miR-140-5p [108]. Adolescentes con sobrepeso y obesidad mórbida presentaron niveles elevados del miR-140-5p en el plasma [109]. Además, los niveles del miR-140-5p correlacionaron con leptina y adiponectina, y también correlacionó con el índice de masa corporal, insulina, HOMA-IR, triglicéridos, HDL y LDL [109]. Asimismo, en pacientes con DMT2 se encontró niveles elevados del miR-140-5p en el plasma [110]

y en pacientes obesos con diabetes gestacional [111]. Por lo tanto, la evidencia indica que el miR-140-5p participa activamente en el desarrollo de alteraciones metabólicas. Debido a que las alteraciones metabólicas inducidas por el consumo excesivo de fructosa, como la obesidad y RI, y dado que este miRNA está relacionado con la inflamación, diferenciación del adipocito y con el metabolismo lípidos, podría jugar un papel importante en el desarrollo de estas patologías.

4.5. miR-143-5p

El miR-143 es un miRNA altamente conservado en vertebrados y se encuentra en el cromosoma (chr5 q33.1) y está agrupado junto con el miR-145. El grupo de miRNA-143/145 está ubicado en el gen huésped *MIR143* no codificante de proteínas (*MIR143HG*). En diversos estudios se ha demostrado que el miR-143 juega un papel importante en la modulación de diversos procesos celulares, incluyendo el metabolismo. Por ejemplo, El miR-143 regula negativamente a la hexocinasa 2 (HK2), la primera enzima limitante de la glucólisis, resultando en la reducción del metabolismo de la glucosa [112]. En otro estudio se encontró que, la sobreexpresión del miR-143 altera la activación de PKB y la homeostasis de la glucosa mediante la regulación negativa de la proteína relacionada con la proteína de unión a oxisterol 8 (ORP8), en hepatocitos, afectando la capacidad de la insulina para inducir la activación de Akt, siendo un objetivo potencial para el tratamiento de la diabetes asociada a la obesidad [113]. Asimismo, se demostró que los ratones con deficiencia del gen *MIR143HG* están protegidos contra el desarrollo de RI asociada a la obesidad [113]. Además, esta

M. en C. Adrián Hernández Díaz Couder. Tesis Doctorado en Biología Experimental.

deficiencia protege contra la progresión de la aterosclerosis y mejora el perfil lipídico en ratones knock-out para el receptor LDL (*Ldlr*^{-/-}) [114].

Por otro lado, en estudios con mujeres normales se encontró que los niveles del miR-143-5p en el plasma total incrementaron después de la ingesta de una dieta alta en grasa [115], así como en sujetos con síndrome metabólico [116]. Sin embargo, en niños obesos se encontró una disminución en los niveles del miR-143-5p en el plasma total [117]. Los niveles del miR-143-5p en el plasma total disminuyeron en un modelo de restricción calórica en monos *Rhesus* [118]. Además, en modelos murinos se encontró que los niveles del miR-143-5p en el plasma total no fueron modificados por la ingesta de una dieta alta sacarosa y alta en grasa [119].

El miR-143-5p juega un papel importante en la fisiología del adipocito. En preadipocitos, el miR-143-5p acelera la diferenciación a adipocitos a través de la regulación negativa de ERK5 [120]. Además, se observó que la sobreexpresión de este miRNA promueve mayor acumulación de triglicéridos en adipocitos porcinos [121] y acelera la acumulación de lípidos en una etapa temprana de la adipogénesis [122]. En células precursoras de adipocitos (APCs, por sus siglas en inglés), la sobreexpresión del miR-143-5p durante la expansión clonal (2 días después de la inducción de la diferenciación) inhibe la proliferación celular y la adipogénesis, mientras que durante la etapa de detención del crecimiento y en la etapa de diferenciación terminal (los días siguientes), la sobreexpresión del miR-143 promueve la adipogénesis [123]. En otro estudio se encontró que el miR-143-5p induce la adipogénesis en células 3T3-L1 al regular negativamente el factor de preadipocitos 1

(Pref-1, por sus siglas en inglés), un inhibidor de la adipogénesis [124]. De acuerdo con lo anterior, se encontró que el miR-143-5p correlaciona con los niveles de expresión del PPAR γ en el TA de ratones obesos inducido por dieta alta en grasa [125]. En otro estudio con adipocitos murinos, el tratamiento con TNF- α induce la disminución de los niveles de miR-143 [126]. Por lo anterior, la evidencia indica que el miR-143-5p participa en la regulación del metabolismo de lípidos y en el proceso de diferenciación de adipocitos. Entonces, el miR-143-5p en VEs y en TA podría desempeñar un papel importante en el desarrollo de la obesidad mediante la inducción de mecanismos como la adipogénesis y lipogénesis. Sin embargo, no se conoce el efecto de la exposición a altas concentraciones de fructosa sobre la expresión del miR-143-5p en VEs y TA.

4.6. miR-146b-5p

El gen *MIR146B* que codifica para el miR-146b está localizado en el cromosoma 10 en humanos. El miR-146b-5p actúa como regulador negativo del proceso inflamatorio debido a su capacidad de regular negativamente a cinasa 1 asociada al receptor de interleucina 1 (IRAK1), factor asociado al receptor TNF 6 (TRAF6) y la señalización NF- κ B, promoviendo la inhibición de la señalización de citocinas proinflamatorias [127]. Además, el tratamiento con IL-6 y TNF- α induce la expresión del miR-146b-5p en adipocitos [128], y es secretado por los adipocitos por la estimulación de un medio condicionado de macrófagos estimulados con LPS [129].

Además de participar en la respuesta inflamatoria, el miR-146b-5p juega un papel importante en el metabolismo. Por ejemplo, el miR-146b-5p disminuye la captación de glucosa por la disminución de la expresión de GLUT4 mediante regulación negativa de IRS1 en adipocitos porcinos primarios [130]. También, promueve la disminución en la acumulación de lípidos mediante la regulación negativa de IRAK1 y TRAF6 en células HepG2 tratadas con ácido oleico [131]. Por otro lado, en ratones con dieta alta en grasa se encontró que el tratamiento con miR-146b-5p indujo una reducción en el peso corporal, así como la disminución en la acumulación de lípidos en el hígado y en el TA [131]. En cambio, en el TA de ratones con dieta alta en grasa, aumentó la expresión del miR-146b-5p y el tratamiento con zerumbone, un sesquiterpeno cíclico, promovió la regulación negativa de este miRNA, lo que resultó en el incremento de la expresión de SIRT1. La consecuente deacetilación de caja de horquilla O1 (FOXO1) y PGC1- α promovió la inhibición de la adipogénesis y la reducción en la ganancia de peso [132]. Además, la exposición a frío (6 °C) promovió la disminución de la masa del TA junto con la disminución de la expresión del miR-146b-5p [133]. Lo anterior, pudiera ser debido a que el miR-146b-5p promueve la adipogénesis mediante la regulación negativa de SIRT1, lo que resulta en el incremento de la acetilación de FOXO1 en células 3T3-L1 [134]. Además, la expresión del miR-146b-5p se encuentra elevada en el TA de ratones obesos inducidos por dieta alta en grasa [135]. Asimismo, en el TAV y TAS de sujetos obesos, se encontró que el miR-146b-5p se encuentra regulado positivamente [136], mientras que en sujetos con DMT2 solo se encontró aumentado en el TAV [137]. Además del aumento en la expresión del miR-146b-5p en el TAS de sujetos resistentes a la insulina, la expresión

M. en C. Adrián Hernández Díaz Couder. Tesis Doctorado en Biología Experimental.

de este miRNA correlaciona positivamente con el porcentaje de masa grasa, IMC y negativamente con el índice de la sensibilidad a la insulina [138].

Por otro lado, en estudios se ha demostrado que el miR-146b-5p se encuentra en circulación. En pacientes con enfermedad de hígado graso no alcohólico se encontró que los niveles del miR-146b-5p en suero fueron bajos [139]. En cambio, en niños obesos, los niveles del este miRNA en suero fueron elevados y correlacionaron positivamente con el IMC y con el índice de masa grasa abdominal [140]. También, el miR-146b-5p está elevado en suero de sujetos con DMT2 y se encontró que participa en la supresión de la secreción de insulina por alta concentración de glucosa [140]. Así, el miR-146b-5p participa en la regulación de la respuesta inflamatoria y en el metabolismo. Debido a lo anterior, la fructosa podría regular este miRNA como un mecanismo que induce alteraciones en el metabolismo de carbohidratos y lípidos en hígado y en el TA. Sin embargo, no se ha evaluado el efecto de la exposición a fructosa sobre la expresión del miR-146b-5p en VEs y en el TA.

4.7. miR-148a-5p

El miR-148a está codificado dentro de una región intergénica del cromosoma 7 en humanos y es altamente conservado entre las especies de vertebrados [141]. Estudios demostraron que el factor de transcripción proteína de unión a elementos reguladores de esterol 1c (SREBP1c), PPAR γ y proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc (CREB) inducen la expresión del miR-148a [141,142]. El miR-148a-

5p se ha implicado en diversos procesos celulares, incluyendo el metabolismo y la diferenciación del adipocito [143,144]. Por ejemplo, en células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano (hASC) la sobreexpresión del miR-148a-5p promovió la adipogénesis al regular negativamente al sitio de integración tipo sin alas 1 (Wnt1), un inhibidor de la adipogénesis [142]. También, se encontró que el miR-148a-5p promueve la adipogénesis a través de la regulación negativa de Wnt10b, un inhibidor de la adipogénesis, en células 3T3-L1 [145]. Sin embargo, en hASC tratadas con IL-6, TNF α , leptina y resistina promovieron la disminución del miR-148a y su promotor, indicando que el miR-148a puede estar involucrado en las complicaciones de la obesidad a través de su propio mecanismo transcripcional subyacente [146]. Además, los niveles de expresión de miR-148a-5p aumentaron en el TA de sujetos obesos y en ratones alimentados con una dieta alta en grasa [142].

Por otro lado, el miR-148a-5p es regulado por los lípidos de la dieta y es altamente expresado en el hígado [141]. Además, este miRNA disminuye la captación de colesterol en hepatocitos al regular negativamente LDLR. Asimismo, en ratones Knock down para miR-148a se encontró un incremento en la expresión del LDLR, lo que resultó en una disminución en los niveles plasmáticos de LDL y un aumento en los niveles de HDL [141]. Otro estudio demostró que el miR-148a-5p regula negativamente la expresión del coactivador 1 alfa de PPAR γ (PGC1 α), Sirtuína 7 (SIRT7) y 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa (HMGCR), proteína de unión a caja Y 1 (YBX1), los cuales participan en metabolismo de los lípidos induciendo la síntesis de ácidos grasos

[147]. Así, la delección del miR-148a-5p promueve la esteatosis hepática por el incremento de la acumulación de lípidos en el hígado de ratones [147].

Por otro lado, en sujetos con síndrome metabólico presentaron niveles elevados del miR-148a-5p [96] y en sujetos con obesidad mórbida [148]. También se encontró que niveles elevados del miR-148a-5p en el plasma de sujetos obesos se relacionó con la disminución de la expresión de DNA metiltransferasa 1 (DNMT1), regulador de los niveles de adiponectina, lo cual se relacionó con estados insensibles a la adiponectina [149]. Por lo tanto, la evidencia indica que el miR-148a-5p juega un papel importante en el desarrollo de alteraciones metabólicas como la obesidad y RI y se sabe que la alta ingesta de fructosa es un potente inductor de éstas enfermedad. Así, la fructosa podría inducir estas alteraciones al modular la expresión del miR-148a-5p, tanto en VEs como en TA.

4.8. miR-223-3p

El gen que codifica miR-223 se encuentra en el cromosoma X, y se relacionó originalmente con la hematopoyesis y la función de los granulocitos [150]. Algunos estudios han identificado que los factores de transcripción, como el factor de transcripción a PU-box 1 (PU.1), C/EBP- α y C/EBP- β , y el factor nuclear IA (NFI-A) regulan la expresión de miR-223 [151,152].

Por otro lado, en mujeres con RI se encontró que el miR-223-3p se sobreexpresa en el TAB y correlaciona positivamente con el índice HOMA-IR. Además, el mismo estudio demostró que la sobreexpresión del miR-223-3p redujo los niveles

M. en C. Adrián Hernández Díaz Couder. Tesis Doctorado en Biología Experimental.

de la proteína del GLUT4, resultando en la disminución de la captación de glucosa estimulada por insulina en adipocitos humanos [153]. En sujetos con obesidad mórbida se encontró que el miR-223-3p fue regulado positivamente en el TAV [154]. Recientemente se encontró que la expresión del miR-223-3p en el TAV y TAS fue regulado negativamente, junto con el incremento de la expresión del GLUT4 y del inflammasoma receptor similar al dominio de oligomerización de unión a nucleótidos que contiene dominio de pirina (NLRP3) después de la pérdida de peso por la cirugía bypass en sujetos obesos [155]. En otro estudio se encontró que los niveles del miR-223-3p en el plasma total y en exosomas [156] incrementan en sujetos con DMT2 [157].

En estudios *in vitro* se demostró que la sobreexpresión del miR-223-3p altera el metabolismo de la glucosa mediante la disminución de los niveles de proteína de GLUT4 y de lípidos a través de la regulación de genes relacionados con la lipogénesis en la células 3T3-L1 [158]. Además, el miR-223-3p disminuye la expresión del receptor tipo toll 4 (TLR-4) en cultivo primario de macrófagos del TA [154]. En otros estudios recientes se encontró que el tratamiento con TNF- α en células 3T3-L1 inhibió la secreción de miR-223-3p, mientras que promovió su acumulación intracelular [158]. Así, la acumulación del miR-223-3p en adipocitos apoya la noción de que este miRNA es retenido durante la desregulación metabólica del adipocito.

Por otro lado, se demostró que en respuesta a la ingesta de fructosa disminuye la expresión del miR-223-3p en el hígado de ratones [83], mientras que una dieta alta en grasa incrementa la expresión del miR-223-3p en hamsters [159]. Así, la evidencia

indica que el miR-223-3p puede ser regulado por dieta. Por todo lo anterior, la alta ingesta de fructosa podría modular los niveles de expresión del miR-223-3p en VEs y en TA, el cual podría participar en la inducción de alteraciones metabólicas, como la RI en hígado y músculo. Sin embargo, no se conoce del todo el efecto de la exposición a altas concentraciones de fructosa sobre la expresión del miR-223-3p en VEs y en el TA.

4.9. miR-342-3p

El miR-342 es un miRNA codificado en el tercer intrón del gen EVL, el cual es suprimido en el cáncer colorrectal humano, teniendo un papel importante en el desarrollo de cáncer [160]. Este miRNA se ha reportado que juega un papel importante en el metabolismo de lípidos. Por ejemplo, en células T reguladores expuesta a dexametasona, un potente antiinflamatorio, se encontró que el miR-342-3p regula al acompañante insensible a la rapamicina de mTOR (RICTOR), componente clave del complejo de mTOR2, lo que promueve la oxidación de ácidos grasos y fosforilación oxidativa en estas células [161]. En la línea celular THP-1, la sobreexpresión del miR-342-3p inhibe la acumulación de lípidos y la inflamación desencadenada por la estimulación con ox-LDL [162]. Además, el miR-342-3p suprime la glucólisis aeróbica al regular la vía de señalización fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K)/PKB/GLUT1 mediada por el receptor del factor de crecimiento tipo insulina (IGF-1R) en el cáncer de hígado [163]. También, el miR-342-3p reduce la expresión de sintasa de ácidos grasos (FASN)

y HMGCR, genes involucrados en la lipogénesis, al inhibir la expresión de SREBP en células no adipocitarias [164].

Por otro lado, el miR-342-3p juega un papel importante en la fisiología del TA. Un estudio reportó que este miRNA disminuye en el TA de ratones obesos inducidos por dieta alta en grasa [165]. Además, en el TA de ratones expuestos a frío también disminuye su expresión [133]. Se ha reportado que el miR-342-3p es más expresado en adipocitos que en la fracción vascular estromal del TA [166], e induce la diferenciación del adipocito al inhibir a la proteína de unión al carbono terminal 2 (CtBP2), un regulador de C/EBP α , en hASC [167]. En un estudio se encontró que el miR-342-3p incrementó su expresión seis veces en adipocitos tratados con el medio condicionado de macrófagos estimulados con lipopolisacárido (LPS) [168].

Además, este miRNA se ha encontrado en circulación. En niños obesos se reportó una disminución de los niveles del miR-342-3p en plasma total [169], así como en sujetos con DT2 [170,171]. Dado que el miR-342-3p juega un importante papel en el metabolismo de lípidos, así como la adipogénesis, por lo que este miRNA podrá estar involucrado en el mecanismo molecular de la alteración del metabolismo de lípidos inducido por la alta ingesta de fructosa. Sin embargo, no existe evidencia de la modulación de este miRNA por la exposición a fructosa, el cual es considerado un potente inductor lipogénico, adipogénico y un potente anticancerígeno [172].

4.10. miR-450a-5p

El miR-450a es un miRNA intragénico que se encuentra ubicado en la región cromosómica Xq26.3 [173]. En los últimos años, a través de la secuenciación de siguiente generación y microarreglos de miRNAs se encontró que el miR-450a-5p tiene una expresión anormal en diversos tipos de cánceres y afecta la tumorigénesis de los tumores malignos [174]. Además, existen estudios en donde se ha demostrado que este miRNA también participa en la regulación del metabolismo y en la diferenciación adipogénica. La expresión del miR-450a-5p incrementa la captación de glucosa en células de cáncer de ovario, resultando en la glucólisis eficientemente para la producción de energía [175]. Además, el miR-450a-5p revierte la RI inducida por la exposición de MG mediante la regulación de CREB en células HUVEC [176]. También se ha observado que el miR-450a-5p modula la acumulación de lípidos a través de la regulación de la adipogénesis mediante la inhibición de la expresión de WISP2 en células 3T3-L1 [73] y se ha encontrado que es uno de los miRNAs más abundantes en exosomas derivados del TA [73].

5. Justificación

El consumo elevado de bebidas azucaradas ha incrementado la ingesta de fructosa durante las últimas cuatro décadas. La ingesta de fructosa se ha considerado un factor de riesgo para padecer enfermedades metabólicas como la obesidad, ECV, RI y diabetes. En estas enfermedades existe un desequilibrio en la producción y

secreción de moléculas por el TA que están involucradas en el desarrollo de enfermedades metabólicas.

Recientemente, se ha encontrado que los miRNAs contenidos en VEs participan en la regulación de diversas funciones celulares de manera endocrina. En particular, algunos miRNAs que participan en la regulación de la adipogénesis pueden ser secretados por los adipocitos, sin embargo, se desconoce su regulación en condiciones de exposición a fructosa.

Por tal motivo, se requiere analizar los niveles del miR-21-5p, miR-140-5p, miR-143-5p, miR-146b-5p, miR-148a-5p, miR-223-3p, miR-342-3p y el miR-450a-5p en VEs del plasma de ratas con ingesta crónica de fructosa y en el sobrenadante de células 3T3-L1 expuestas a fructosa. El presente trabajo de investigación permitirá conocer la participación de los miRNAs que se encuentran en VEs, los cuales se han asociado con la adipogénesis inducida por fructosa; lo cual, a su vez, contribuirá a la elucidación de los mecanismos endocrinos asociados con la generación de obesidad.

6. Hipótesis

La ingesta crónica de fructosa activa mecanismos endócrino pro-adipogénicos que implican incrementos en el contenido de miRNAs en vesículas extracelulares.

7. Objetivo General

- Evaluar el efecto de la exposición a fructosa sobre la secreción de miRNAs seleccionados en VEs del plasma y TA de ratas Wistar y en células 3T3-L1.

7.1. Objetivos Particulares

- Determinar la distribución de las VEs del plasma de ratas con ingesta crónica de fructosa.
- Analizar el efecto de la ingesta crónica de fructosa sobre el perfil de miRNAs seleccionados en VEs en plasma de ratas Wistar.
- Correlacionar los niveles de los miRNAs contenidos en VEs con la expresión de los miRNAs en TA y células 3T3-L1.
- Evaluar el efecto de la inhibición de los miRNAs sobre el efecto de la fructosa en células 3T3-L1.

8. Material y métodos

8.1. Animales

Las ratas utilizadas en el presente trabajo se criaron en el bioterio del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez y se manipularon siguiendo las disposiciones de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. Se utilizaron 20 ratas Wistar macho de 8-10 semanas de edad con un peso de 100-120 g, los cuales fueron asignados en dos grupos aleatoriamente (grupo Control y grupo Fructosa). Todos los animales fueron mantenidos en el bioterio del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez bajo ciclos artificiales de luz/obscuridad de 12 horas y a una temperatura de 22°C. Los animales del grupo Control tenían acceso a agua *ad libitum* y los animales del grupo Fructosa tenían acceso a una solución de fructosa al 20% (p/v) como única fuente de

agua [177]. Además, los animales de ambos grupos tuvieron acceso *ad libitum* una dieta estándar para roedores (Dieta para roedores de laboratorio 5001: proteína 28.5%, grasa 13.4%, carbohidratos 57.9%; sacarosa 3.7%, fructosa 0.3%, glucosa 0.2%, para Nutrition International, Brentwood, MO) durante ocho semanas. La ingesta de alimento y líquido se determinó semanalmente. Los animales fueron manipulados siguiendo las regulaciones de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. El SICUAL del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” aprobó el protocolo y todos los procedimientos experimentales (18-1070).

8.2. Determinación de parámetros bioquímicos en plasma

Al término de la octava semana, todos los animales fueron sometidos a ayuno por seis horas; se pesaron y se les extrajo una muestra sanguínea bajo anestesia terminal, siguiendo la técnica de la punción cardiaca, usando K+EDTA como anticoagulante. Al final, a los animales se les realizó eutanasia utilizando pentobarbital sódico (60 mg/Kg) por vía intraperitoneal. Los niveles de glucosa en sangre se determinaron utilizando el método de glucosa oxidasa. El tejido adiposo epididimal se recolectó, pesó y congeló inmediatamente en nitrógeno líquido, y se almacenó a -70°C para su posterior uso. El plasma fue obtenido de las muestras sanguíneas por centrifugación (2000 x g por 15 minutos a 4°C) y se almacenó a -70°C para su posterior uso. Para la determinación de los niveles colesterol total, triglicéridos y HDL-C se utilizaron procedimientos enzimáticos estándar (SPINREACT colesterol-LQ y

M. en C. Adrián Hernández Díaz Couder. Tesis Doctorado en Biología Experimental.

triglicéridos-LQ; Spinreact SA Girona, España y el Analizador Hitachi 902: Hitachi LTD, Tokio, Japón). La exactitud y precisión de todas las mediciones bioquímicas se proporcionan en un estudio anterior [76]. La estimación de la RI se realizó utilizando el método de evaluación del modelo de homeostásis (HOMA). Se calculó utilizando la siguiente fórmula: Niveles de glucosa en plasma en ayunas (mg/dL) x niveles de Insulina en plasma en ayunas (mUI/L) dividido por 405 [178,179].

8.3. Medición del tamaño de los adipocitos.

Para la tinción con hematoxilina y eosina se utilizó tejido adiposo epididimal fijado en formalina al 10% (Sigma-Aldrich; MO, EE. UU.). El área de adipocitos del tejido adiposo del epidídimo se analizó utilizando el software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE. UU.), a partir de secciones de tejido adiposo teñidas con hematoxilina y eosina. La superficie media de los adipocitos se calculó a partir de 500 células por rata.

8.4. Determinación de adipocinas en plasma

Los niveles de leptina, insulina e IL-1 β en plasma se determinaron utilizando un kit de panel de perlas magnéticas de adipocinas de rata Milliplex MAP (Millipore; Billerica, MA), siguiendo las indicaciones del proveedor. El ensayo anterior se analizó utilizando un sistema Luminex MAGPIX (Luminex Corporation; Houston, TX) con el software Milliplex Analyst (Millipore; St. Charles, MO). Los niveles de adiponectina en

plasma se determinaron utilizando un kit de ELISA para adiponectina para rata (Millipore; Billerica, MA) siguiendo las indicaciones de proveedor.

8.5. Cultivo celular de células 3T3-L1

Las células 3T3-L1 son una línea celular de preadipocitos que se adquirieron de ATCC (Manassas, Virginia, Estados Unidos). Las células se cultivaron en placas de seis pozos (8×10^4 células por pozo) con medio Eagles modificado de Dulbecco (DMEM, Gibco, Grand Island, NY, EE. UU.). El medio DMEM se suplementó con L-glutamina 0.1 mM, piruvato sódico 1 mM, aminoácidos no esenciales 0.1 mM, gentamicina al 1% y suero bovino fetal (SFB) al 10%, hasta que alcanzaron la confluencia. Para los experimentos de recolección de VEs, primero el SFB se ultracentrifugó a $118,000 \times g$ durante 18 h (rotor de 45 Ti, Beckman Coulter) para eliminar la contaminación de VEs de origen bovinos [180]. Después de alcanzar la confluencia celular, se llevó a cabo la diferenciación con un cóctel de diferenciación: 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) 0.5 mM, dexametasona 0.25 μM e insulina bovina 0.8 μM en DMEM con SFB limpio al 10%. Dos días después, se cambió el medio de cultivo sin coctel de diferenciación, SFB sin VEs y se complementó con 550 μM de fructosa (Sigma-Aldrich; MO, EE. UU.). Un estudio anterior demostró que 550 μM de fructosa promueve la adipogénesis en las células 3T3-L1 [181]. Posteriormente, el medio de cultivo se reemplazó cada dos días hasta el cuarto día, cuando se recuperó el medio de cultivo y se recolectaron las células. Todos los cultivos se mantuvieron en condiciones de humidificación y se incubaron a 5% de CO_2 y 37°C .

8.6. Tinción de Rojo Oleoso O

Para determinar el contenido de lípidos en las células 3T3-L1, S se utilizó la tinción con rojo oleoso. Las células se fijaron con 1 mL de paraformaldehído al 10% (p/v) durante 30 min. Después, las células se lavaron tres veces con 1 mL de PBS. Posteriormente, se tiñeron con 500 μ L de una solución de tinción de Rojo Oleoso O (1.2 mg/ml de colorante rojo oleoso O/solución de isopropanol al 60%) (Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos) durante diez minutos a temperatura ambiente. Por último, las células se lavaron con etanol y PBS para eliminar el exceso de colorante rojo oleoso O y se fotografiaron con un aumento de 10X. Para cuantificar el contenido de lípidos intracelulares, los lípidos totales se extrajeron con alcohol isopropílico y se evaluaron mediante espectrometría a 510 nm. Los datos se normalizaron al control de acuerdo con la técnica informada previamente [182].

8.7. Estimación del tamaño y número de vesículas extracelulares

Se utilizó el NanoSight NS300 para determinar el tamaño y la concentración de las vesículas (Malvern Instruments Ltd; Malvern, Reino Unido). Previamente, se centrifugó el sobrenadante o el plasma (10000 x g durante 30 min a 4°C) para eliminar los restos celulares y se recuperó el sobrenadante. Brevemente, las muestras se diluyeron 4.5:500 en PBS y cada muestra se inyectó en la cámara del NanoSight. La ganancia de la cámara se estableció en un valor constante de 10 y el valor umbral para la detección de vesículas se estableció en 5.

8.8. Aislamiento de RNA total de vesículas extracelulares

A partir de 600 μ L de plasma y de sobrenadante del cultivo celular se aisló el RNA total de las VEs utilizando el kit exomiRNeasy suero/plasma (Qiagen®). Al inicio del aislamiento del RNA, se centrifugó las muestras a 12,000 x *g* durante 30 min a 4°C para enriquecer la muestra de VEs. Posterior a ello, se recuperó el sobrenadante en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se desechó el pellet. Después, se adicionaron 600 μ L de buffer XBP a la muestra, obteniendo un volumen final de 1.2 mL; se mezcló por inversión suave y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Enseguida, se adicionó 1.2 mL de la mezcla (buffer XBP/muestra) a la columna ExoRNeasy, se centrifugó 500 x *g* por un minuto a temperatura ambiente y se descartó el flujo del tubo colector. Posteriormente, se adicionó 3.5 mL de buffer XWP a la columna ExoRNeasy, se centrifugó a 500 x *g* por 8 minutos a temperatura ambiente y se descartó el flujo junto con el tubo colector. La columna ExoRNeasy se transfirió a un nuevo tubo colector, se adicionó 700 μ L de Qiazol a la columna ExoRNeasy y se centrifugó a 5,000 x *g* por 8 minutos a temperatura ambiente. Al término de la centrifugación, se recuperó el lisado del tubo colector, se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se agitó vigorosamente y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Al terminar la incubación, se adicionó 3.5 μ L de control Spike-In miRNeasy Serum/Plasma que contiene 1.6×10^8 copias/ μ L de *cel*-miR-39 y 90 μ L de cloroformo al lisado, se agitó vigorosamente durante 10 segundos, se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 x *g* durante 15 minutos a 4 °C. Al término de la

centrifugación, se recuperó 400 μ L de la fase acuosa superior a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 mL, se agregó 600 μ L de etanol absoluto y se mezcló por pipeteo.

Después, se transfirieron 700 μ L de la mezcla a la columna spin RNeasy MinElute, se centrifugó a 8,000 x *g* durante un minuto a temperatura ambiente y se descartó el líquido resultante del tubo colector. Este paso se repitió con el remanente de la mezcla. Posterior a ello, se agregaron 700 μ L de buffer RWT a la columna RNeasy MinElute, se centrifugó a 8,000 x *g* durante un minuto a temperatura ambiente y se descartó el líquido resultante del tubo colector. Después, se agregó 500 μ L de buffer RPE en la columna RNeasy MinElute, se centrifugó a 8,000 x *g* durante un minuto a temperatura ambiente y se descartó el líquido resultante del tubo colector. Se agregó nuevamente 500 μ L de buffer RPE a la columna RNeasy MinElute, se centrifugó 8,000 x *g* durante 2 minutos a temperatura ambiente y se descartó el líquido resultante junto con el tubo colector. Después se colocó un nuevo tubo colector a la columna RNeasy MinElute, se centrifugó a 12,000 x *g* por 5 minutos a temperatura ambiente y se descartó el líquido junto con el tubo colector. Por último, se colocó un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 mL a la columna RNeasy MinElute, se adicionó 14 μ L de H₂O grado PCR, se incubó por un minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 x *g* durante un minuto a temperatura ambiente para eluir el RNA. Se desechó la columna RNeasy MinElute y se resguardó el RNA a -70°C para su posterior uso.

8.9. Aislamiento de RNA total del tejido adiposo y de células 3T3-L1

Para el aislamiento de RNA total se utilizó 100 mg de tejido adiposo epididimal y 8.0×10^4 células 3T3-L1. En un tubo Eppendorf de 1.5 mL, el tejido adiposo se disgregó en 1 mL de Trizol (Roche®) utilizando un homogenizador. Después, el homogeneizado se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Posterior a ello, se adicionaron 200 μ L de cloroformo, se agitó vigorosamente utilizando un vortex por 15 segundos y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. En seguida, se centrifugó a $12,000 \times g$ por 15 minutos a 4°C para separar la fase acuosa, la cual contiene el RNA total y de la fase orgánica. Se recuperó la fase acuosa en un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 mL, se adicionaron 500 μ L de isopropanol y se incubó por 30 minutos a 4°C para precipitar el RNA total. Al terminar la incubación, se centrifugó a $12,000 \times g$ por 15 minutos a 4°C . Posteriormente, se recuperó el pellet de RNA al decantar el sobrenadante. Para lavar el pellet de los solventes anteriormente utilizados, se adicionó 1 mL de etanol al 70%, se agitó vigorosamente por 15 segundos utilizando un vortex y se centrifugó a $12,000 \times g$ por 8 minutos a 4°C (el procedimiento de lavado se repitió dos veces). Por último, se decantó el exceso de etanol al 70% y el pellet se dejó secar durante 20 minutos. Una vez que se encontró seco el pellet de RNA, se adicionó 25 μ L de H_2O grado PCR. Después se resguardó a -70°C para su posterior uso.

8.10. Síntesis de DNA complementario

Para realizar la síntesis de DNA complementario (cDNA) específico para miRNAs, se utilizó el kit de transcripción inversa para microRNA TaqMan™ (Applied biosystem, California, Estados Unidos). A partir de 15 ng de RNA se realizó la síntesis de cDNA. Para cada muestra de RNA se utilizó la siguiente mezcla de reacción indicada en la Tabla 1.

Tabla 1. Componentes para la reacción de síntesis de cDNA específico de miRNAs

Reactivos	Volumen
dNTPs (100mM)	0.10 µL
Transcriptasa inversa (50 U/µL)	0.60 µL
Buffer de Transcriptasa Reversa 10x	1.00 µL
Inhibidor de RNAsas (20 U/µL)	0.12 µL
Sonda microRNA específico	2.00 µL
RNA	1.50 µL
H ₂ O grado PCR	4.68 µL
Volumen Total	10.0 µL

Los primers específicos para microRNAs (Applied biosystem) fueron los siguientes: miR-143-5p (ID del ensayo: 463509_mat), miR-140-5p (ID del ensayo: 001187), miR-148a-5p (ID del ensayo: 473012_mat), miR-450a-5p (ID del ensayo: 462729_mat), miR-21-5p (ID del ensayo: 000397), miR-146b-5p (ID del ensayo: 002755), miR-342-3p (ID del ensayo: 002260) y miR-223-3p (ID del ensayo: 07896_mat) (ThermoFisher, Massachusetts, Estados Unidos). Para la síntesis de cDNA, se utilizaron las condiciones de reacción indicados en la Tabla 2. Al término de la reacción, el cDNA se resguardó a -20°C para su posterior uso.

Tabla 2. Condiciones de reacción para la síntesis de cDNA

Pasos	Condiciones de reacción
Transcripción inversa	16°C por 30 min 42°C por 30 min
Paro de reacción	85°C por 5 min
Enfriamiento	4°C por 15 min

Para realizar la síntesis de cDNA convencional, se utilizó el kit de transcripción inversa Quantitech (Qiagen). A partir de 200 ng de RNA se realizó la síntesis de cDNA. Para eliminar posible contaminación de DNA genómico (DNAg), se utilizó la siguiente mezcla de reacción para cada muestra de RNA indicada en la Tabla 3.

Tabla 3. Componentes de reacción para eliminación de DNAg

Reactivo	Volumen
Buffer de eliminación de DNAg (7x)	1 µL
H2O grado PCR	4 µL
Muestra de RNA (200 ng)	2 µL
Volumen Total	7 µL

Para la eliminación del DNAg, las muestras se incubaron a 42°C por 2 minutos. Al término de la incubación, las muestras de RNA se colocaron inmediatamente a 4°C. Posterior a ello, se realizó utilizó la siguiente mezcla de reacción para la síntesis de cDNA convencional indicada en la Tabla 4.

Tabla 4. Componentes de reacción para síntesis de cDNA convencional

Reactivos	Volumen
Transcriptasa Reversa	0.5 µL
Buffer de Reacción (5x)	2.0 µL
Mix de Primers RT	0.5 µL
Volumen Total	7.0 µL

Por último, la mezcla de reacción se incubó a 42°C por 15 minutos. Al término de la reacción, el cDNA se resguardó a -20°C para su posterior uso.

8.11. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR)

Para la realizar la qPCR, se utilizó una mezcla de reacción para cada miRNA y gen analizado. La mezcla de reacción se realizó con los siguientes reactivos indicados en la Tabla 5.

Tabla 5. Componentes de reacción para la qPCR

Reactivo	Volumen
QuantiNova Probe PCR Máster Mix 2x	5.0 µL
Primers y Sonda específico	0.6 µL
H ₂ O grado PCR	2.9 µL
Volumen Total	8.5 µL

La amplificación se llevó a cabo utilizando 1.5 µL de cDNA, obteniendo un volumen final de 10 µL de reacción. Se utilizaron las condiciones de reacción indicadas en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de reacción para qPCR

	Condición de reacción
Desnaturalización	95°C por 5 minutos
45 ciclos	
Desnaturalización	95°C por 10 segundos
Hibridación	60°C por 40 segundos
Extensión	72°C por 5 segundos

Las concentraciones relativas de los miRNA se normalizaron con valores de Ct del *cel-miR-39*. Todos los valores de Ct para *cel-miR-39* variaron de 20 a 22 ciclos, tanto para el plasma total como para los aislamientos de RNA de VEs. Las concentraciones relativas para los genes se normalizaron con los valores de Ct del *Gapdh*. Los valores se calcularon utilizando la fórmula $2^{-\Delta(\text{Ct gen referencia} - \text{Ct gen de interés})}$.

8.12. Western Blot

Del cultivo celular, después del cuarto día de tratamiento con fructosa, se recuperó el sobrenadante de cultivo celular y se centrifugó a 400 x g durante 10 minutos para eliminar las células. El sobrenadante se volvió centrifugar a 2000 x g durante 20 min para eliminar los restos celulares y finalmente el sobrenadante resultante se almacenó a -70°C hasta su uso posterior. Las muestras se descongelaron a 4°C. Se agregaron 2 mL de una solución de PEG 8000 (50% p/v) por cada 10 ml de muestra y se incubaron durante la noche a 4°C. Las muestras se centrifugaron a 1500

M. en C. Adrián Hernández Díaz Couder. Tesis Doctorado en Biología Experimental.

x g y el sedimento se resuspendió en 2,7 mL de PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM). La muestra se pipeteó en tubos de 13 x 51 mm para ultracentrifugación (Optima MAX, Beckman Coulter) a 118,000 x g (53.000 rpm, factor k 56,7) a 4 ° C en un rotor de ángulo fijo (TLA 100.3, Beckman Coulter; CA, EE.) durante 39 minutos. El sedimento resultante se resuspendió en 50 µl de tampón RIPA suplementado con coctel de inhibidores de proteasa 1x y EDTA 1x (coctel de uso único inhibidor de proteasa Halt, Thermo Scientific; MA, EE. UU.).

Se utilizó el método SDS-PAGE para separar proteínas. Después de la transferencia, las membranas se incubaron durante la noche con anti-ANXA2 de conejo (Abcam, ab178677) a 1: 5,000, anti-CD63 de conejo (Abcam, ab193349) a 1: 2,000 y anti-CD81 de conejo (Abcam, ab21929) a 1:2,000.

Para el caso de las células, las células 3T3-L1 se homogenizaron en buffer de lisis (10 mM HEPES, 0,2% Triton X-100, 50 mM NaCl, 0,5 mM sacarosa, 0,1 mM EDTA, inhibidores de proteasa y fosfatasa), Posterior a ello, el homogenizado se centrifugó a 8,000 x g por 10 minutos a 4°C. Se utilizó el método SDS-PAGE para separar proteínas. Después de la transferencia, las membranas se incubaron durante la noche con anticuerpo transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4): sc-7273 E-8 (dilución 1:1000); Anticuerpo del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PPARγ): SC-7273 (dilución 1:1000).

8.13. Transfección del inhibidor del miR-143-5p

Se realizó la transfección de las células 3T3-L1 usando miR-143-5p miRCURY LNA™ Power Inhibitor (Exiqon Inc, Woburn, MA) con Lipofectamina 2000 (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. En primer lugar, las células se cultivaron en placas de seis pozos (8×10^4 células por pozo) con medio Eagles modificado de Dulbecco (DMEM, Gibco, Grand Island, NY, EE. UU.). El medio DMEM se suplementó con L-glutamina 0,1 mM, piruvato sódico 1 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, gentamicina al 1% y suero bovino fetal (SFB) al 10% hasta que alcanzaron la confluencia. Después, se preparó el reactivo de transfección diluyendo 40 pmol de anti-miR-143-5p en 6 mL de medio Opti-MEM® (Gibco, Paisley, UK) y 30 μ L de lipofectamina 2000 en 6 mL de medio Opti-MEM® (Gibco, Paisley, UK). Ambas soluciones se mezclaron por inversión, obteniendo un volumen final de 12 mL y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después, las células 3T3-L1 se transfectaron con la solución de transfección del anti-miR-143-5p. Veinticuatro horas más tarde, las células transfectadas se estimularon con 550 μ M de fructosa, y el medio se cambió cada dos días hasta el cuarto día, cuando se recolectaron las células.

8.14. Análisis estadístico

Los datos se presentan como medias y errores estándar. Los datos se probaron para determinar la normalidad y las varianzas iguales. Las diferencias entre los

grupos se evaluaron mediante la prueba *U* de Mann-Whitney para datos no apareados ($p < 0,05$) utilizando el software Graph Pad Prism versión 8.

9. Resultados

9.1. Consumo de fructosa y alimento en ratas Wistar durante ocho semanas

El consumo de 20% (p/v) de fructosa en el agua de beber redujo el consumo de alimento por día (16 g de alimento/rata/día), comparado con el grupo Control (30 g de alimento/rata/día) ($p < 0.05$) (Tabla 7). Además, el consumo de líquido fue menor en el grupo de Fructosa (30 mL agua/rata/día) comparado con el grupo Control (47 mL de agua/rata/día) ($p < 0.05$). Las ratas que recibieron fructosa consumieron 5.38 g/rata/día de fructosa. Sin embargo, el consumo de calorías fue similar en ambos grupos (Tabla 8).

Tabla 7. Parámetros de consumo de alimento, zoométricos y bioquímicos de los animales.

	Control (n=6)	Fructosa (n=14)	Valor P
Alimento (g/rata/día)	29.57 ± 1.359	16.17 ± 0.861*	0.0006
Líquido (mL/rata/día)	47.14 ± 2.745	30.70 ± 3.34*	0.002
Fructosa (g/rata/día)	0.581 ± 0.027	5.38 ± 0.24*	<0.0001
Kcalorías (Kcal/rata/día)	55.71 ± 3.74	55.67 ± 2.66	0.730
Peso corporal (g)	350.20 ± 15.21	341.9 ± 5.92	0.792
Peso tejido adiposo epididimal (g)	2.51 ± 0.19	2.95 ± 0.14	0.148
Promedio del área de adipocitos (µm²)	1620 ± 52.29	2090 ± 105.6*	0.039
Glucosa (mg/dL)	160.70 ± 8.95	232.50 ± 17.89*	0.001
Insulina (pg/mL)	16.49 ± 2.42	44.9 ± 4.65*	0.007
HOMA-IR	0.270 ± 0.04	0.870 ± 0.15*	0.007
Colesterol Total (mg/dL)	47.98 ± 1.67	48.92 ± 1.29	0.920
Triglicéridos (mg/dL)	53.83 ± 7.56	125.30 ± 16.1*5	0.001
HDL-Colesterol (mg/dL)	38.98 ± 1.87	33.88 ± 1.51*	0.042
Leptina (pg/mL)	902.70 ± 208.5	1751 ± 160.2*	0.012
Adiponectina (ng/mL)	52.42 ± 3.08	72.17 ± 4.12*	0.017
IL-1β (pg/mL)	19.59 ± 10.27	107.70 ± 29.59*	0.033

Los datos se presentan como medias ± error estándar. Las diferencias significativas fueron calculadas mediante la prueba U de Mann-Whitney, P ≤ 0.05.

9.2. Efecto de la alta ingesta de fructosa sobre el perfil metabólico en ratas Wistar

La ingesta del 20% (p/v) de fructosa en el agua de beber durante 8 semanas no modificó el peso corporal en el grupo Fructosa, comparado con el grupo Control (Tabla 1). Además, no se encontraron cambios en el peso del TA en el grupo Fructosa comparado con el grupo Control (Tabla 7), pero se observó un aumento en el área de los adipocitos del grupo Fructosa comparado con el grupo Control ($p < 0.05$) (Tabla 1). Por otro lado, los niveles de glucosa, triglicéridos e insulina en el plasma fueron mayores en el grupo Fructosa comparado con el grupo control ($p < 0.05$) (Tabla 1), mientras que los niveles de HDL-C fueron menores en el grupo Fructosa ($p < 0.05$). Para determinar si la ingesta de fructosa produjo RI, se calculó el índice de HOMA-IR. El índice de HOMA-IR fue mayor en el grupo de Fructosa comparado con el grupo Control ($p < 0.05$) (Tabla 7). Por otra parte, los niveles de las adipocinas como leptina, adiponectina e IL-1 β fueron mayores en el grupo Fructosa comparado con el grupo control ($p < 0.05$) (Tabla 7).

9.3. Efecto de la alta ingesta de fructosa sobre la secreción de vesículas extracelulares en plasma

En el plasma de ratas con ingesta de fructosa no se encontraron cambios en el número total de VEs comparado con el grupo Control (Figura 1). Sin embargo, si

incrementó el tamaño de las VEs (203.6 nm) comparado con las VEs del grupo Control (187.5 nm) ($p < 0.05$) (Figura 1).

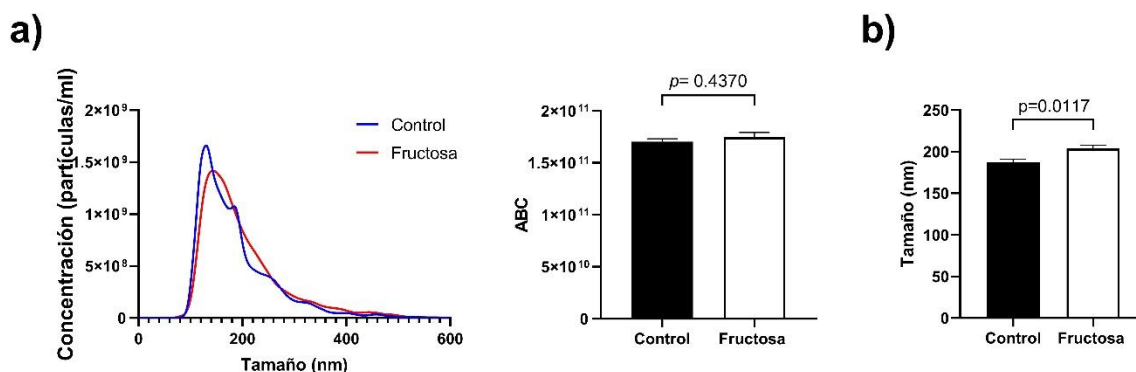


Figura 1. Determinación del número de partículas y tamaño de VEs derivadas del plasma de ratas alimentadas con fructosa durante ocho semanas. **a)** La distribución del tamaño y la concentración media de las partículas de plasma se determinaron mediante análisis de seguimiento de nanopartículas. **b)** El tamaño medio de las VEs se determinaron mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (Control $n=6$; Fructosa $n=14$). Los datos se presentan como medias \pm error estándar. Las diferencias significativas fueron calculadas mediante la prueba *U* de Mann-Whitney, $P \leq 0.05$. ABC (Área bajo la curva).

9.4. Efecto de la alta ingesta de fructosa sobre los miRNAs relacionados con la adipogénesis en vesículas extracelulares del plasma.

La ingesta de fructosa durante 8 semanas aumentó 10.14 veces los niveles del miR-143-5p en VEs del plasma ($p < 0.05$), mientras que el miR-140-5p, miR-223-3p y miR-342-5p disminuyeron 4.65, 3.87 y 9.47 veces, respectivamente con respecto al grupo Control ($p < 0.05$) (Figura 2). Por otro lado, no se encontraron cambios

M. en C. Adrián Hernández Díaz Couder. Tesis Doctorado en Biología Experimental.

estadísticamente significativos en los niveles del miR-146b-5p, miR-148a-5p, miR-450a-5p y el miR-21-5p en VEs (Figura 2). En conjunto, la fructosa modificó selectivamente la abundancia del miR-140-5p, miR-143-5p, miR-223-3p y miR-342-3p. Por lo que, la secreción de estos miRNAs podría ser de respuesta a la ingesta de fructosa. Los resultados de la expresión de los miRNAs en VEs del plasma se encuentran resumidos en la Tabla anexa II.

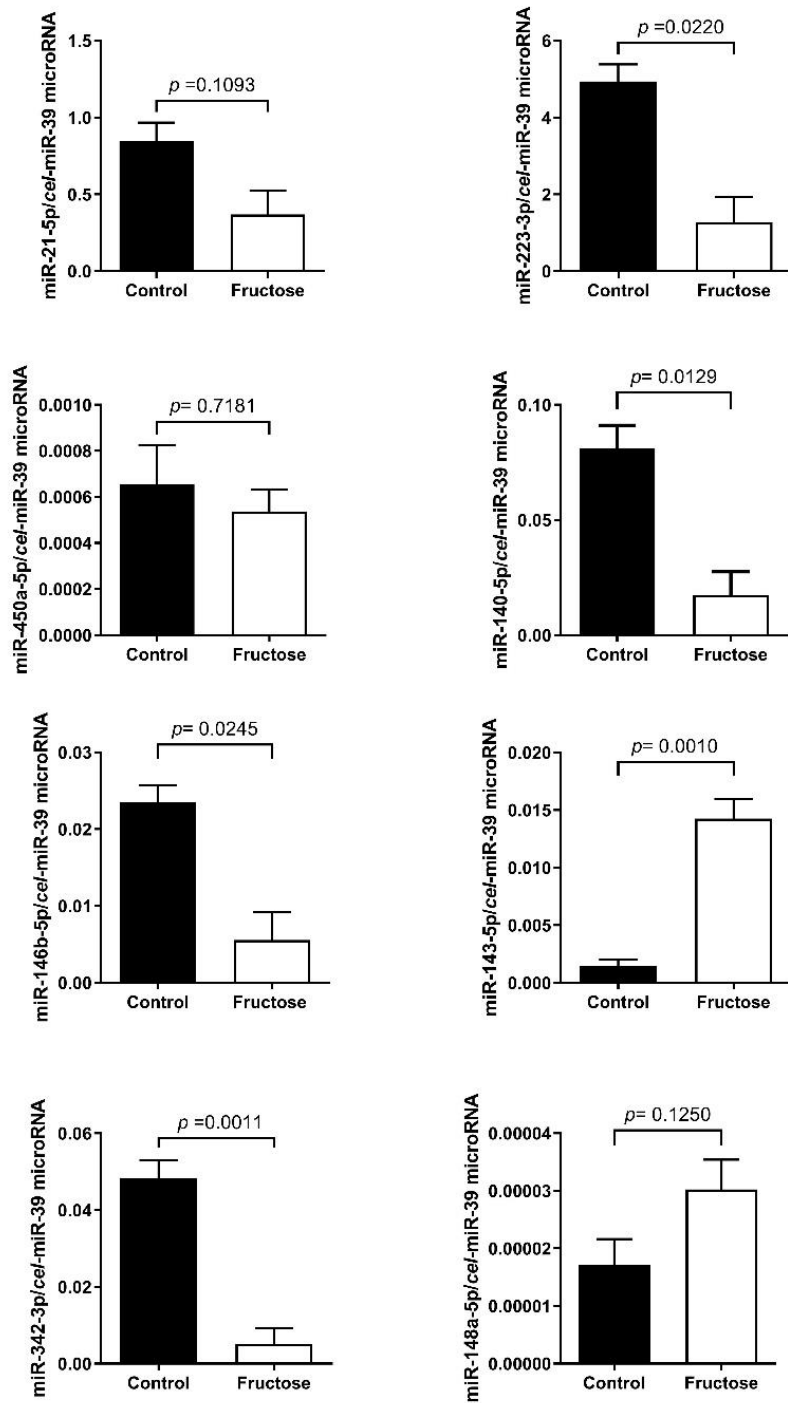


Figura 2. Niveles de miRNAs en VEs del plasma de ratas con ingesta de fructosa durante ocho semanas. Se determinó la expresión del miR-21-5p, miR-223-3p, miR-450a-5p, miR-140-5p,

miR-146b-5p, miR-143-5p, miR-342-3p y miR-148a-5p en el grupo Control (n=6) y grupo con Fructosa (n=16) mediante RT-qPCR usando *ce/-miR-39* como referencia para el método $2^{-\Delta Ct}$. Los datos se presentan como medias \pm error estándar. Las diferencias significativas fueron calculadas mediante la prueba *U* de Mann-Whitney, $P \leq 0.05$.

9.5. Efecto de la alta ingesta de fructosa sobre la expresión de miRNAs relacionados con la adipogénesis en el tejido adiposo epididimal.

La ingesta de fructosa durante 8 semanas incrementó la expresión 1.81 veces el miR-143-5p en TA epididimal comparado con el grupo Control ($p < 0.05$) (Figura 3), mientras que las expresiones del miR-223-3p y miR-342-3p disminuyeron 1.29 y 1.30 veces, respectivamente en el grupo Fructosa con respecto al grupo Control ($p < 0.05$) (Figura 3). Sin embargo, no se encontraron cambios en la expresión del miR-140-5p, miR-146b-5p, miR-148a-5p, miR-450a-5p y el miR-21-5p en el TA epididimal de ratas con ingesta de fructosa (Figura 3). Resultando que, la fructosa induce cambios en la expresión de estos miRNAs lo que pudiera favorecer los cambios metabólicos presentes en el TA. Los resultados de la expresión de los miRNAs en el TA se encuentran resumidos en la Tabla anexa II.

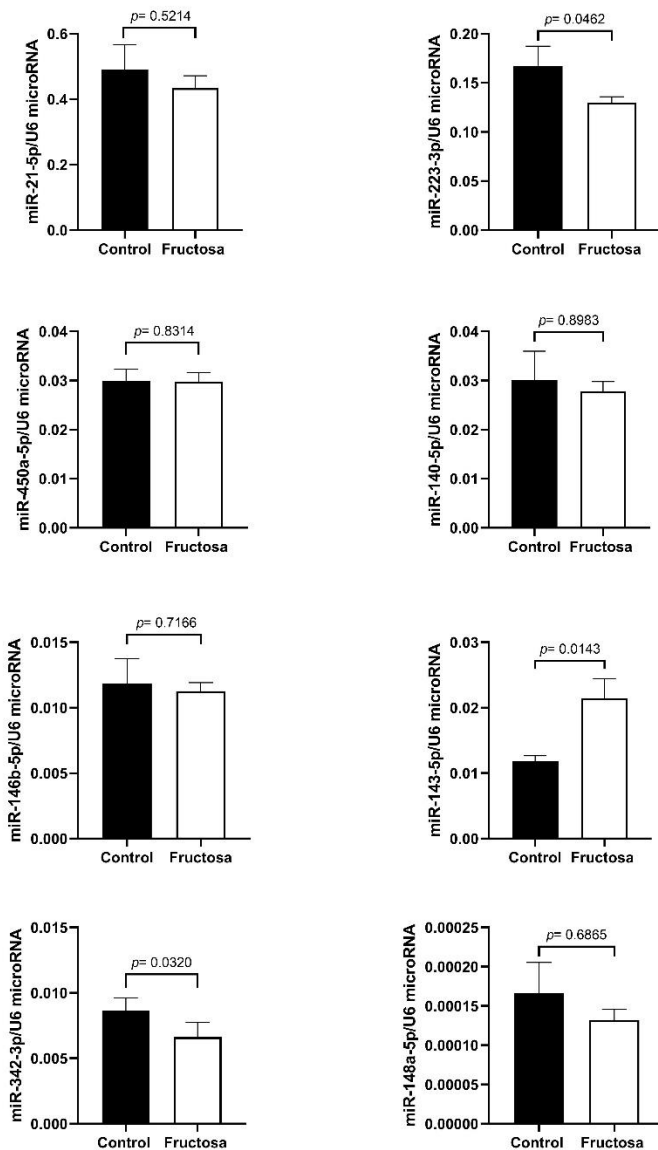


Figura 3. Expresión de miRNAs en el TA epididimal de ratas con ingesta de fructosa durante ocho semanas. Se aisló RNA del TA epididimal del grupo Control (n=6) y grupo Fructosa (n=16) y se determinó la expresión del miR-21-5p, miR-223-3p, miR-450a-5p, miR-140-5p, miR-146b-5p, miR-143-5p, miR-342-3p y miR-148a-5p mediante RT-qPCR usando *U6* como referencia para el método $2^{-\Delta Ct}$. Los datos se presentan como medias \pm error estándar. Las diferencias significativas fueron calculadas mediante la prueba *U* de Mann-Whitney, $P \leq 0.05$.

9.6. Efecto de la exposición a fructosa sobre la diferenciación en células 3T3-L1

La exposición de 550 μM de fructosa en células 3T3-L1 durante cuatro días promovió mayor acumulación de lípidos comparado con aquellas células no diferenciadas y en células Control ($p < 0.05$) (Figura 4a). Asimismo, la exposición a 550 μM de fructosa aumentó la expresión del RNAm de *Glut4* comparado con las células no diferenciadas ($p < 0.05$) (Figura 4b). Además, la expresión del RNAm de *Glut4* incrementó en las células expuestas a fructosa comparado con el grupo Control ($p < 0.05$) (Figura 4b). En el caso de la expresión del RNAm de *Pparg* y *Cebpa* se observó un incremento en su expresión en las células Control y en las células expuestas a fructosa comparándolas con las células no diferenciadas ($p < 0.05$) (Figura 4b). Sin embargo, no se encontraron cambios en la expresión de *Pparg* y *Cebpa* entre las células Control y en las células expuestas a fructosa (Figura 4b). Los niveles de proteína de PPAR γ y GLUT4 incrementaron en las células Control y en las células expuestas a fructosa con respecto a las células no diferenciadas ($p < 0.05$) (Figura 4c). Sin embargo, no se encontraron cambios de la proteína de PPAR γ y GLUT4 entre las células Control y en las células expuestas a fructosa (Figura 4c).

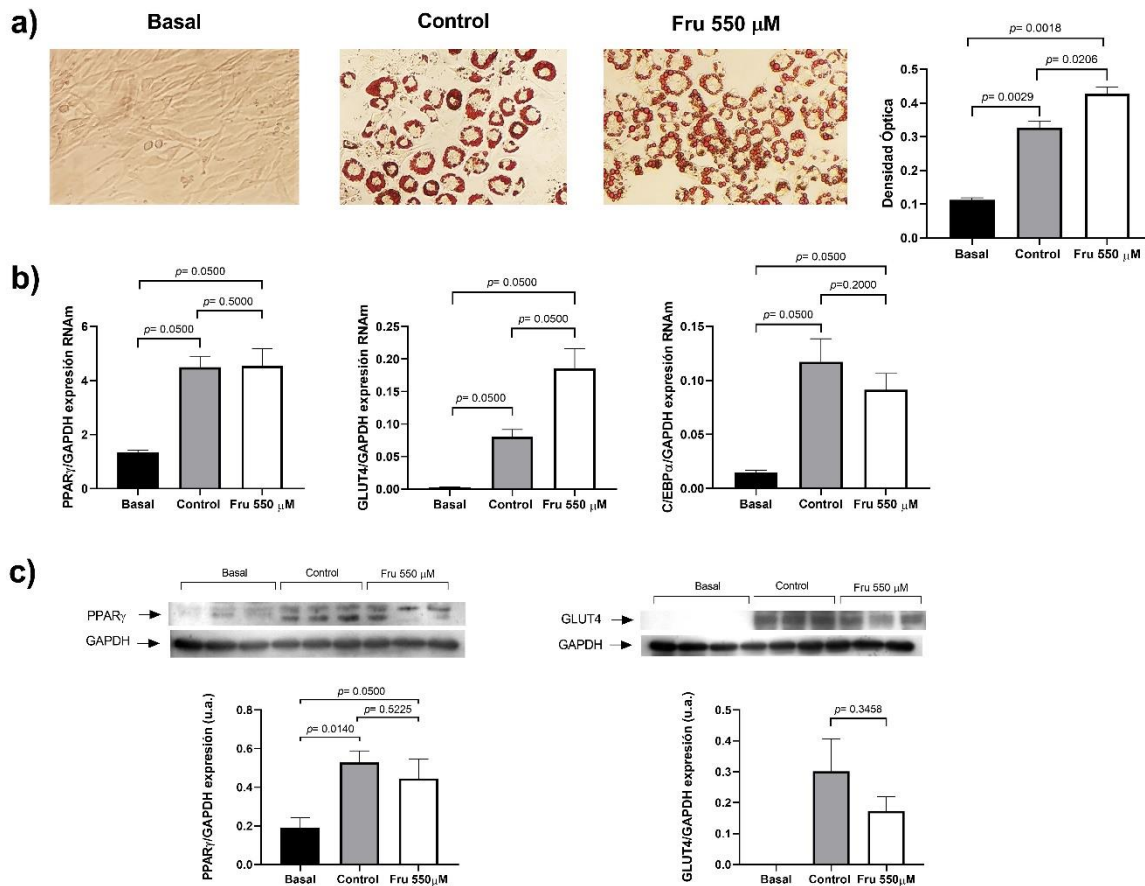


Figura 4. La exposición a la fructosa promueve la diferenciación de las células 3T3-L1.

a) Las gotas de lípidos en adipocitos fueron determinadas mediante la tinción de rojo oleoso O. Imágenes (10x) de las gotas de lípidos en adipocitos. El contenido de lípidos se determinó a una densidad óptica (DO) de 510 nm en las células Basales (n=6), células Control (n=6) y en células Fru 550 μM (n=6). **b)** La expresión del RNAm de *Pparg*, *Glut4* y *Cebpa* se determinaron mediante RT-qPCR, utilizando *Gapdh* como gen de referencia para el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. **c)** Western blot representativo de PPAR γ y GLUT4. Las proteínas se analizaron mediante la técnica de Western Blot, se cuantificaron por densitometría y se normalizaron con GAPDH. Los datos se presentan como medias \pm error estándar. Las diferencias significativas fueron calculadas mediante la prueba *U* de Mann-Whitney, $P \leq 0.05$.

9.7. Secreción de vesículas extracelulares en el sobrenadante de células 3T3-L1 expuestas a fructosa.

Para evaluar que los adipocitos secretan VEs, se determinaron los marcadores de VEs cómo son CD63, CD81 y ANXA2. Como era de esperarse, se encontró la presencia de estas proteínas en las VEs del sobrenadante de células 3T3-L1 en condiciones estándar y en células expuestas a fructosa (Figura 5c). De acuerdo con el análisis del área bajo la curva, se encontró que la exposición a 550 μ M de fructosa en células 3T3-L1 durante cuatro días aumentó 2.11 veces la secreción de VEs en el sobrenadante comparado con aquellas células en condiciones estándar ($p < 0.05$) (Figura 5a). Sin embargo, el tamaño de las VEs no se encontraron cambios estadísticamente significativos en el sobrenadante de las células 3T3-L1 expuestas a 550 μ M de fructosa (214.40 ± 9.62 nm) comparadas con aquellas células en condiciones estándar (287.3 ± 47.76 nm) (Figura 5b). Por lo tanto, la exposición a fructosa induce el aumento en la secreción de VEs sin cambiar su tamaño.

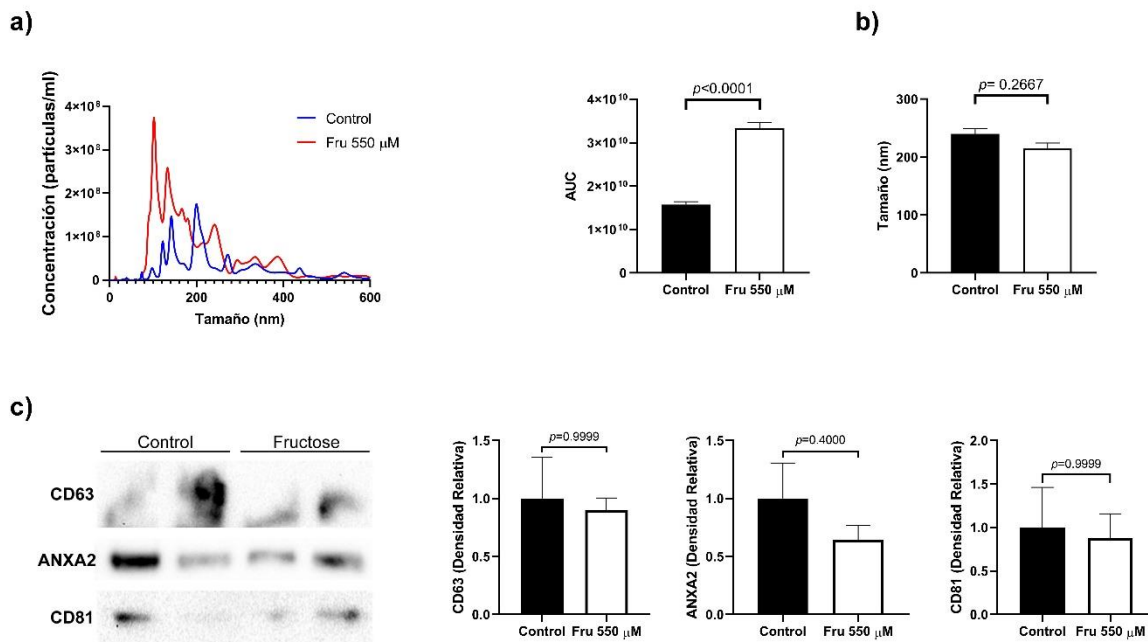


Figura 5. Cuantificación del número de partículas y tamaño de VEs derivadas del sobrenadante de células 3T3-L1 expuestas a fructosa. **a)** La distribución del tamaño y la concentración media de las partículas del sobrenadante se determinaron mediante análisis de seguimiento de nanopartículas. **b)** El tamaño medio de las VEs se determinaron mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (grupo Control n=6; grupo Fru 550 μ M n=6). **c)** Western blot para CD63, ANXA2 y CD81 en EVs de sobrenadantes de células 3T3-L1. Los datos se presentan como medias \pm error estándar. Las diferencias significativas fueron calculadas mediante la prueba *U* de Mann-Whitney, $P \leq 0.05$.

9.8. Efecto de la exposición a fructosa sobre los miRNAs relacionados con la adipogénesis en vesículas extracelulares del sobrenadante de células 3T3-L1

La exposición a 550 μ M de fructosa en células 3T3-L1 durante cuatro días incrementó 3.77 veces los niveles del miR-143-5p en VEs del sobrenadante comparado contra las células en condiciones estándar ($p < 0.05$) (Figura 6), mientras que los niveles del miR-223-3p disminuyeron 6 veces con respecto a las células en condiciones estándar ($p < 0.05$) (Figura 6). Sin embargo, no se encontraron cambios en los niveles del miR-21-5p, miR-146b-5p, miR-140-5p, miR-342-3p, miR-450a-5p y miR-148a-5p en VEs del sobrenadante de células 3T3-L1 expuestas a 550 μ M de fructosa (Figura 6). Por lo que, en conjunto con los resultados de VEs de plasma de ratas con ingesta de fructosa, podría sugerirse que los adipocitos participan con el aumento de los niveles del miR-143-5p y la disminución del miR-223-3p. Los resultados de la expresión de los miRNAs en VEs del sobrenadante se encuentran resumidos en la Tabla anexa III.

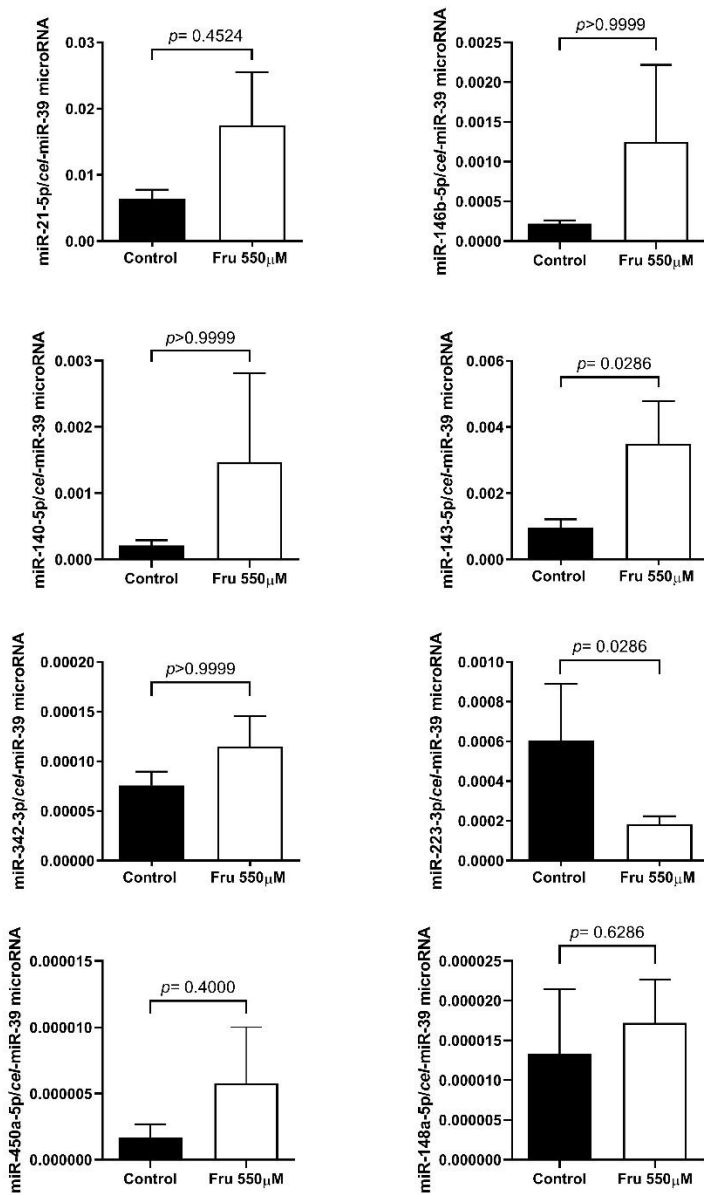


Figura 6. Expresión miRNAs en VEs del sobrenadante de células 3T3-L1 expuestas a 550 μM de fructosa. Se determinó la expresión del miR-21-5p, miR-146b-5p, miR-140-5p, miR-143-5p, miR-342-3p, miR-223-3p, miR-450a-5p y miR-148a-5p mediante RT-qPCR usando *cel-miR-39* como un miRNA de referencia para el método $2^{-\Delta Ct}$ (grupo Control n=6; grupo Fru 550 μM n=6).

Los datos se presentan como medias \pm error estándar. Las diferencias significativas fueron calculadas mediante la prueba *U* de Mann-Whitney, $P \leq 0.05$.

9.9. Efecto de la exposición a fructosa sobre la expresión de miRNAs relacionados con la adipogénesis en células 3T3-L1

La exposición de 550 μ M de fructosa en células 3T3-L1 aumentó la expresión del miR-143-5p (1.35 veces), miR-140-5p (1.42 veces), miR-223-3p (2.28 veces), miR-342-3p (1.72 veces) y miR-146b-5p (1.25 veces) ($p < 0.05$) (Figura 7). Sin embargo, no se encontraron cambios en la expresión del miR-148a-5p, miR-450a-5p y miR-21-5p. Los resultados en conjunto sugieren que la inducción de la adipogénesis mediante la exposición a fructosa induce la expresión del miR-140-5p, miR-143-5p, miR-146b-5p, miR-223-3p y miR-342-3p. Los resultados de la expresión de los miRNAs en células 3T3-L1 se encuentran resumidos en la Tabla anexa III.

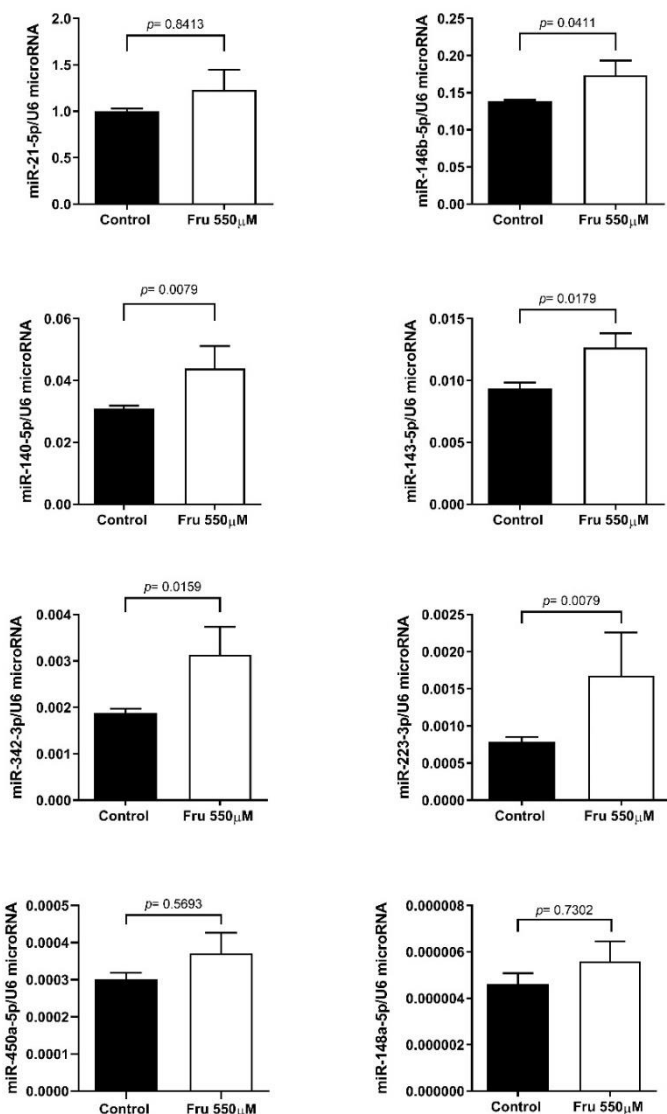


Figura 7. Expresión de miRNAs en las células 3T3-L1 expuestas a fructosa. Se determinó la expresión del miR-21-5p, miR-223-3p, miR-450a-5p, miR-140-5p, miR-146b-5p, miR-143-5p, miR-342-3p y miR-148a-5p mediante RT-qPCR usando *U6* como un gen de referencia para el método $2^{-\Delta Ct}$ (grupo Control n=6; grupo Fru 550 μ M n=6). Los datos se presentan como medias \pm error estándar. Las diferencias significativas fueron calculadas mediante la prueba *U* de Mann-Whitney, $P \leq 0.05$.

9.10. Efecto de la inhibición del miR-143-5p en células 3T3-L1 expuestas a fructosa

La inhibición de la función del miR-143-5p mediante antagomiRs resultó en la disminución en la acumulación de lípidos en los grupos antimiR-143-5p y antimiR-143-5p + Fru 550 μ M comparado con las células Control y con fructosa ($p < 0.05$) (Figura 8a). Los resultados sugieren que el miR-143-5p juega un papel importante en la acumulación de lípidos en adipocitos.

Por otro lado, se evaluaron los niveles de expresión del RNAm de marcadores adipogénicos para determinar si la disminución de la acumulación de lípidos fue debido a la inhibición de la adipogénesis. Se encontró un aumento en la expresión del RNAm de *Pparg*, *Glut4* y *Cebpa*, tanto en el grupo de células expuestas a fructosa como en los grupos con inhibición del miR-143-5p, comparados con el grupo control ($p < 0.05$) (Figura 8b). Los resultados anteriores sugieren que la inhibición del miR-143-3p disminuyó la acumulación de lípidos sin afectar la diferenciación de los adipocitos.

Por último, se estudió la expresión de genes relacionados con la lipogénesis y lipólisis para evaluar si la inhibición del miR-143-5p afectó la expresión del RNAm de *Fasn*, *Pnpla*, y *Lpl*. En el caso del RNAm de *Fasn* (lipogénico), en los grupos de células con la inhibición del miR-143-5p (antimiR-143-5p y antimiR-143-5p + Fru 550 μ M) se observó una disminución en la expresión del RNAm de *Fasn* con respecto a las células expuestas a fructosa ($p < 0.05$) (Figura 8c). Sin embargo, no se observaron cambios significativos en los grupos con la inhibición del miR-143-5p con respecto a las células Control (Figura 8c). Además, se observó un incremento en la expresión del RNAm de M. en C. Adrián Hernández Díaz Couder. Tesis Doctorado en Biología Experimental.

Fasn en las células expuestas a fructosa en comparación con las células Control ($p < 0.05$) (Figura 8c). En el caso de los genes relacionados con la lipólisis (*Pnpla* y *Lpl*), se observó un incremento significativo en la expresión de *Pnpla* en ambos grupos con la inhibición del miR-143-5p con respecto a las células Control ($p < 0.05$) (Figura 8c), mientras que no se encontraron cambios significativos en la expresión de *Pnpla* en las células expuestas a fructosa (Figura 8c). En el caso de la expresión del RNAm de *Lpl*, se encontró un incremento en la expresión de *Lpl* en ambos grupos con la inhibición del miR-143-5p con respecto a las células Control ($p < 0.05$) (Figura 8c), mientras que las células con exposición a fructosa solo presentaron un cambio significativo con el grupo anti-miR-143-5p + Fru 550 μ M ($p < 0.05$) (Figura 8c). Los resultados, en conjunto, sugieren que el miR-143-5p regula la acumulación de lípidos a través de la regulación de la expresión de genes relacionados con la lipogénesis y lipólisis en condiciones de exposición a fructosa.

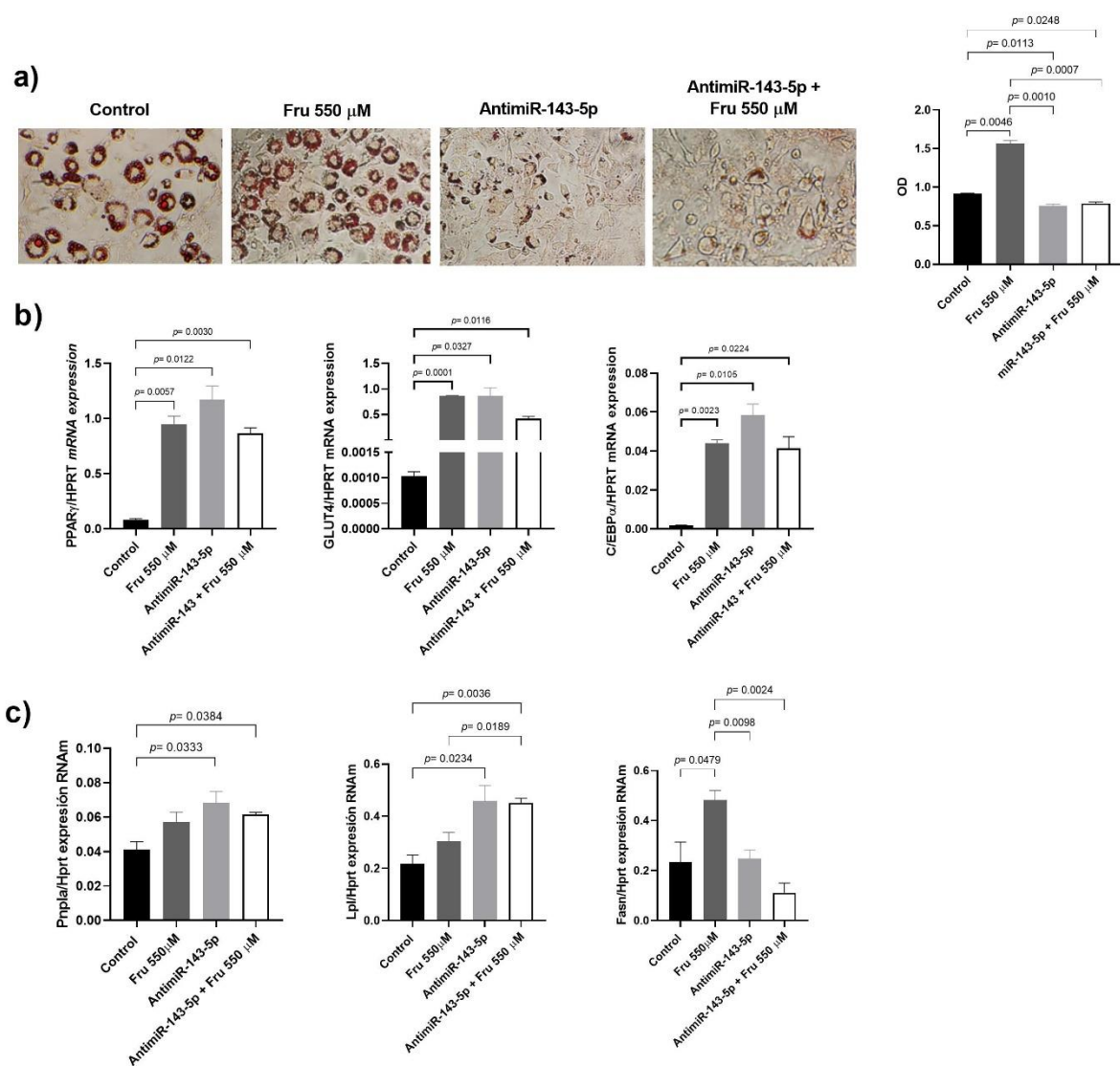


Figura 8. Efecto de la inhibición del miR-143-5p en células 3T3-L1 expuestas a fructosa. **a)** Las gotas de lípidos en adipocitos se determinaron mediante la tinción Rojo Oleoso O. Imágenes (10x) de las gotas de lípidos en adipocitos. El contenido de lípidos se cuantificó a una densidad óptica (DO) de 510 nm (grupo Control n=3; grupo Fru 550 μ M n=3; grupo AntimiR-143-5p n=3; grupo AntimiR-143-5p + Fru 550 μ M). **b) y c)** La expresión de *Pparg*, *Glut4*, *Cebpa*, *Pnpla*, *Lpl* y *Fasn* se determinó mediante RT-qPCR utilizando hipoxantina-M. en C. Adrián Hernández Díaz Couder. Tesis Doctorado en Biología Experimental.

guanina fosforribosiltransferasa (*Hprt*) como un gen de referencia para el método $2^{-\Delta Ct}$. Los datos se presentan como medias \pm error estándar. Las diferencias significativas fueron calculadas mediante la prueba *U* de Mann-Whitney, $P \leq 0.05$.

10. Discusión

La alta ingesta de fructosa se ha relacionado con el desarrollo de enfermedades metabólicas, como la obesidad. En condiciones de obesidad, el TA presenta un desequilibrio en la producción y secreción de adipocinas, así como los miRNAs en VEs, los cuales pueden participar en la regulación de diversas funciones celulares de manera endocrina. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la exposición a fructosa sobre la secreción de VEs con miRNAs relacionados con la adipogénesis y el metabolismo en plasma de ratas Wistar y en células 3T3-L1 diferenciadas.

Inicialmente, se encontró que el consumo de una solución de fructosa al 20% (p/v) en el agua de beber durante ocho semanas no cambió el peso corporal en ratas Wistar, pero aumentó el promedio del área de adipocitos sin cambiar el peso total del TA. Estos resultados, junto con el aumento de los niveles de glucosa, insulina, triglicéridos y la disminución de los niveles de HDL-C, sugieren que el consumo de fructosa al 20% durante 8 semanas promueve la aparición de componentes del síndrome metabólico. En estudios previos se han encontrado resultados similares en ratas Wistar alimentadas con fructosa [183,184]. La concentración de fructosa al 20% se eligió para que se pareciera a la ingesta de los mayores consumidores de azúcares

M. en C. Adrián Hernández Díaz Couder. Tesis Doctorado en Biología Experimental.

añadidos en los EE. UU., que representa el 20-25% de la ingesta calórica diaria [185]. Sin embargo, en experimentos en animales experimentales, como ratones y ratas, la concentración de fructosa en el agua para beber varía entre el 10-30%, y la duración de estos experimentos también es variable [186]. Así, no existe un consenso sobre una concentración experimental particular de ingesta de fructosa. Estudios en humanos sanos mostraron que la ingesta de una solución de fructosa al 20% aumenta las concentraciones plasmáticas de triglicéridos y glucosa [187,188]. Con base en esta información, se eligió una concentración de fructosa al 20% en el agua de beber para asegurar la inducción de trastornos metabólicos.

Por otro lado, nuestros resultados muestran un aumento del área promedio de adipocitos sugiere que la exposición de fructosa al 20% induce hipertrofia de los adipocitos. Este efecto puede explicarse debido a que las ratas alimentadas con fructosa desarrollaron hiperleptinemia y una mayor acumulación de grasa. En estudios se ha informado que la hiperleptinemia y la resistencia a la leptina en el tejido adiposo inducida por la ingesta crónica de fructosa favorece la hipertrofia de los adipocitos [42]. Además, se ha observado que los adipocitos hipertróficos pueden liberar factores paracrinos, incluidos los VEs, que promueven el reclutamiento de preadipocitos e inducen su diferenciación en adipocitos maduros.

Estudios actuales han demostrado que los VEs son señales celulares que regulan diversos procesos celulares y se pueden liberar bajo diferentes estímulos [189,190]. Por ejemplo, se ha observado que las células 3T3-L1 liberan VEs a través de la estimulación de cAMP/dependiente de la proteína de intercambio activada por

AMPC (EPAC), y esta liberación aumenta con una combinación de Ca^{2+} y ATP [191]. Además, el ácido docosahexaenoico del ácido graso omega-3 de cadena larga promueve el aumento de la liberación de VEs en las células 3T3-L1 [192]. De manera interesante, en nuestro estudio la exposición a la fructosa promovió el aumento en la liberación de VEs de los sobrenadantes de las células 3T3-L1, pero la cantidad de VEs no cambió en el plasma de las ratas alimentadas con fructosa. Es posible que la mayor cantidad de VEs liberados de los cultivos celulares resulte de la exposición directa a una alta concentración de fructosa (550 μM). Por el contrario, algunos estudios han informado que después de la ingestión de bebidas endulzadas, la concentración sistémica de fructosa es de 363.4 μM [193]. De manera similar, las ratas que tuvieron acceso a una solución rica en fructosa (2 g/kg) presentaron una concentración de 146 μM de fructosa en sangre periférica [194]. Por tanto, es posible que el TA *in vivo* esté expuesto a concentraciones bajas de fructosa. Además, el efecto de la fructosa sobre la secreción VEs provenientes de los adipocitos podría ser enmascarado debido que el TA corresponde a una combinación compleja de diferentes tipos celulares. En el futuro, sería necesario aislar específicamente los VEs del TA de las ratas expuestas a altas concentraciones de fructosa.

En un estudio reciente, se demostró que los adipocitos liberan dos tipos de VEs: VEs pequeños (por debajo de 100 nm) y VEs grandes (100-200 nm) [190]. En el presente estudio se encontró que la exposición a la fructosa promovió la liberación de VEs entre 100-200 nm. Por lo tanto, los resultados sugieren que la fructosa induce la liberación de VEs grandes en las células 3T3-L1, las cuales pueden estar enriquecidas

con proteínas de señalización adipogénica y marcadores mitocondriales [190]. Se necesitan más estudios para dilucidar si la fructosa promueve la liberación de VEs del TA al plasma debido a su un papel metabólico. Por otro lado, los hallazgos actuales han demostrado que las proteínas de unión a RNA (RBP) están involucradas en el proceso de clasificación de miRNA en VEs [195]. Entre estas proteínas, se encontró que la proteína de unión a caja Y 1 promueve el reclutamiento del miR-223-3p en VEs de células HEK293T [196]. Debido a que la exposición a la fructosa modificó los niveles de miRNA en los VEs de los adipocitos, es probable que la fructosa regule las RBPs involucradas en el proceso de clasificación en VEs. Sin embargo, se necesitan más estudios para dilucidar el efecto de la fructosa en la clasificación de miRNA en VEs mediante la regulación de las RBPs.

En el presente estudio, se encontró que la alta exposición a fructosa modificó la abundancia de miRNAs relacionados con adipogénesis en VEs derivados del plasma y TA de rata Wistar y del sobrenadante de células 3T3-L1, así como en las células. En particular, la fructosa promovió la secreción de VEs de gran tamaño y aumentó los niveles de miR-143-5p en VEs del plasma, reduciendo los niveles de miR-223-3p, miR-140-5p y miR-342-3p en ratas. En el sobrenadante de células 3T3-L1, la exposición a la fructosa solo aumentó los niveles de miR-143-5p y disminuyó los niveles de miR-223-3p en las VEs.

La fructosa aumentó los niveles del miR-143-5p en las VEs del plasma de ratas Wistar y en las VEs de células 3T3-L1, así como en el TA y en el cultivo de células 3T3-L1. El miR-143 es conservado entre ratas y humanos, y se ha demostrado que

este miRNA tiene un papel importante en el metabolismo de los lípidos, adipogénesis y RI. En estudios se encontró que el miR-143-5p se encuentra sobre expresado en modelos in vitro de adipogénesis [197]. Además, este miRNA induce la adipogénesis al promover la síntesis de triglicéridos [198] y acelera la acumulación de lípidos [122]. En el presente estudio se demostró que la fructosa induce un aumento en los niveles de miR-143-5p en los VEs derivados del plasma de rata y de las células 3T3-L1, lo que respalda un papel metabólico activo de las VEs en procesos metabólicos. De acuerdo con esta idea, encontramos una correlación positiva entre los niveles de miR-143-5p en VEs de ratas alimentadas con fructosa y triglicéridos, y una correlación negativa con HDL-C. Además, sujetos obesos y sujetos sanos con una dieta alta en grasas también presentaron niveles elevados de miR-143-5p en el plasma total [115,199]. Estudios recientes mostraron que miR-143-5p permanece sin cambios en el plasma total de ratones alimentados con sacarosa durante 20 semanas [84] y en ratas alimentadas con sacarosa durante 4 semanas [119]. La exposición a fructosa aumentó diez veces la abundancia de miR-143-5p en los VEs. Además, en nuestros resultados encontramos que la inhibición del miR-143-5p en células 3T3-L1 expuestas a fructosa redujo la acumulación de lípidos sin alterar la diferenciación del adipocito. Por lo que, los resultados de este estudio apoyan la idea de que la fructosa puede inducir el metabolismo de los lípidos mediante mecanismos endocrinos, incluida la liberación de VEs que contienen miR-143-5p.

Por otro lado, la exposición a la fructosa redujo los niveles de miR-223-3p en VEs, tanto de los sobrenadantes celulares como del plasma de rata. Se encontraron

resultados opuestos en los VEs de ratas alimentadas con sacarosa durante un período de tiempo más largo (seis meses) [76]. Esta diferencia podría deberse a la fuente de fructosa (sacarosa). Estudios anteriores demostraron que la sacarosa y la mezcla de monosacáridos (fructosa + glucosa) tienen diferentes efectos sobre el metabolismo de lípidos y glucosa en ratas y humanos [200–202]. Por lo tanto, los niveles bajos de miR-223-3p en los VEs del plasma de rata podrían ser un efecto de la exposición solo a fructosa. El miR-223-3p es un miRNA es conservado entre ratas y humanos y se ha encontrado disminuido en el plasma total de sujetos obesos [203,204] y pacientes con DMT2 [205]. La función de miR-223-3p se ha relacionado con la respuesta inflamatoria y la diferenciación de adipocitos y otros estudios demostraron que miR-223-3p promueve la adipogénesis en células madre mesenquimales [206] y en adipocitos humanos [207].

En el presente estudio la exposición a fructosa aumentó la expresión de miR-223-3p en las células 3T3-L1, mientras que se redujo en el TA de rata. La expresión diferencial del miR-223-3p entre cultivo celular y tejido podría deberse a la complejidad celular del tejido adiposo [208]. Por ejemplo, en el TAV de pacientes obesos, el miR-223-3p se incrementó específicamente en las células vasculares del estroma, mientras que en los adipocitos, este miRNA no se modificó [154]. Además, la regulación positiva de miR-223-3p conduce a la regulación negativa de GLUT4 en adipocitos humanos [209]. Por otro lado, en el TA de ratones, el miR-223-3p suprime la activación proinflamatoria de los macrófagos [210] y regula la producción de NLRP3 e IL-1 β [211]. Aunque se sugiere un papel de miR-223-3p en la adipogénesis por su aumento en las

células 3T3-L1 tratadas con fructosa. En todo el TA, la fructosa puede inducir una respuesta inflamatoria mediada por IL-1 β debido a la regulación a la baja de miR-223-3p. Sin embargo, se necesitan estudios adicionales para comprobar si la regulación a la baja, sistémica y local de miR-223-3p en VEs, participa en la producción sistémica de IL-1 β u otras citocinas proinflamatorias.

Nuestro estudio mostró que la fructosa redujo los niveles de miR-342-3p en VEs de plasma de ratas Wistar. Y este efecto similar se ha observado en el plasma total de niños obesos [212] y en sujetos resistentes a la insulina [170,171]. El miR-342-3p es un miRNA también conservado entre ratas y humanos, y está implicado en el metabolismo de lípidos y el proceso adipogénico. En estudios en hASC se encontró que el miR-342-3p induce la adipogénesis [167]. Además, estudios previos en células no adipocitarias se encontró que el miR-342-3p reduce la lipogénesis al inhibir la expresión de SREBP1c [164]. Curiosamente, en el presente estudio se encontró una correlación negativa entre los niveles del miR-342-3p en VEs del plasma de ratas alimentadas con fructosa y los niveles de triglicéridos. A pesar de que la abundancia del miR-342-3p en VEs es media, la exposición a la fructosa indujo una disminución de nueve veces de este miRNA. Por lo tanto, nuestros hallazgos se suman a la noción de que la fructosa puede inducir lipogénesis mediante la reducción del miR-342-3p en VEs.

Además, se encontró que la fructosa aumenta la expresión de este miRNA en células 3T3-L1 y disminuye en el TA de ratas Wistar (Figura 2). Debido a que nuestros resultados muestran que la exposición a la fructosa está relacionada con un aumento

en la expresión del miR-342-3p en células 3T3-L1, y que la ingesta crónica de fructosa en ratas Wistar disminuye el miR-342-3p en el TA y en los VEs del plasma, se puede sugerir que este miRNA se expresa más en adipocitos que en la fracción vascular estromal del TA [166], por lo que otros tipos celulares pueden estar contribuyendo a la secreción del miR-342-3p.

Por otro lado, la fructosa redujo los niveles del miR-140-5p en VEs del plasma de ratas Wistar. En otro estudio se encontró una tendencia similar en el plasma total de pacientes obesos [170]. Sin embargo, otros estudios en sujetos con obesidad mórbida y en sujetos con DMT2 mostraron niveles elevados del miR-140-5p en el plasma total [108,110]. En este estudio se encontró que la exposición a la fructosa aumentó la expresión del miR-140-5p en las células 3T3-L1, lo que respalda la idea de que este miRNA está relacionado con la adipogénesis [213]. La abundancia del miR-140-5p es media en VEs, en adipocitos y en el TA, y la exposición a fructosa indujo una reducción de cuatro veces de la abundancia del miR-140-5p en VEs del plasma de ratas Wistar. Nuestros resultados sugieren que el miR-140-5p puede estar implicado en las alteraciones metabólicas desarrolladas en ratas con ingesta crónica de fructosa. Sin embargo, son necesarios futuros experimentos con exposiciones más prolongadas de fructosa para determinar si la estimulación crónica modifica los niveles del miR-140-5p en EVs.

El presente estudio demostró que la exposición a la fructosa reduce los niveles del miR-146b-5p en VEs del plasma de ratas Wistar. El miR-146b-5p es un miRNA conservado entre ratas y humanos. Un estudio en niños obesos y en adultos con DMT2

mostró que los niveles del miR-146b-5p se encontraban elevados en el plasma total; además, se encontró que este miRNA participa en la supresión de la secreción de la insulina pancreática inducida por la alta concentración de glucosa [140,214]. Curiosamente, en nuestro estudio se encontró una correlación negativa entre los niveles del miR-146b-5p en VEs del plasma de ratas con ingesta crónica de fructosa y los niveles de leptina en plasma. Lo anterior pudiera ser debido a que se ha reportado que el RNAm de leptina es un blanco del miR-146b-5p [215]. Además, en nuestros resultados mostramos que la abundancia del miR-146b-5p en VEs es media, y que la exposición a la fructosa promovió una reducción de cuatro veces de este miRNA en VEs. Si la reducción de los niveles del miR-146b-5p puede participar en la hiperleptinemia encontrada en las ratas alimentadas con fructosa, debe estudiarse más a fondo.

Por otro lado, se encontró que la exposición a fructosa aumentó la expresión del miR-146b-5p solo en las células 3T3-L1. En estudios previos se ha demostrado que el miR-146b-5p está relacionado con la respuesta inflamatoria y la adipogénesis. En este contexto, en estudios previos se reportó que el miR-146b-5p indujo adipogénesis en preadipocitos humanos [136]. En el mismo estudio se encontró que la expresión de este miRNA aumentó en el TA de ratones obesos inducida por dieta [136]. Además, el tratamiento con TNF- α indujo la expresión del miR-146b-5p en adipocitos; también se encontró que este miRNA regula la homeostasis de la glucosa en preadipocitos porcinos primarios, mediante la regulación del sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1, por sus siglas en inglés) [130]. Por lo tanto, nuestros resultados

en las células 3T3-L1 sugieren que la fructosa puede promover la adipogénesis al aumentar la expresión del miR-146b-5p.

Por último, se ha demostrado que los miRNAs miR-450a-5p, miR-148a-5p y miR-21-5p participan en el proceso de diferenciación del adipocito. Por ejemplo, Zhang y colaboradores (2017) demostraron que el miR-450a-5p induce la adipogénesis a través de la transferencia de este miRNA por VEs a células madre derivadas del TA [73]. Sin embargo, en este estudio se encontró que la abundancia de este miRNA en VEs es baja y no se encontraron cambios tanto en células como en ratas. Además, un estudio reciente mostró que el incremento en la expresión de este miRNA disminuye la RI en células no adipocitarias [176].

Por otro lado, también se encontró que la abundancia del miR-21-5p en VEs es alta; sin embargo, no se encontró cambios en el plasma, pero este miRNA si se ve elevado en el sobrenadante y una clara tendencia a estar más abundantemente en las células. En algunos estudios se encontró que la expresión del miR-21-5p está involucrada en la proliferación y diferenciación de precursores de adipocitos [91,216]. Además, se demostró que el miR-148a-5p se expresa altamente en las hASC durante la adipogénesis [217]. En el presente estudio se mostró que la abundancia de miR-148a-5p es baja en VEs y la exposición a la fructosa no cambió la expresión de este miRNA, tanto en células como en ratas, por lo que se puede concluir que no tuvo participación. Sin embargo, se encontró una correlación positiva entre los niveles de miR-148a en VEs y glucosa. Este hallazgo sugiere que miR-148a-5p está asociado con alteraciones en el metabolismo de la glucosa. Además, nuestros resultados

sugieren que la fructosa también puede utilizar otros mecanismos que no implican cambios en la expresión de miR-450a-5p, miR-148a-5p y miR-21-5p.

En el presente trabajo se encontró que la exposición a la fructosa modifica la abundancia del miR-143-5p y del miR-223-3p en VEs de ratas y adipocitos. Dado que las VEs se han considerado importantes mediadores de la comunicación intercelular, los hallazgos de la presente investigación sugieren que la fructosa puede generar señales proadipogénicas mediadas por miRNAs en VEs provenientes de los adipocitos, de esta manera, podrían participar en el desarrollo de la obesidad.

11. Conclusión

- La alta ingesta de fructosa induce un aumento en los niveles del miR-143-5p y una disminución del miR-223-3p y miR-342-3p, tanto en VEs de plasma como en el TA de ratas Wistar.
- En adipocitos expuestos a fructosa se promueve un aumento en la secreción de VEs en el sobrenadante con niveles elevados del miR-143-5p y niveles reducidos del miR-223-3p.
- La fructosa induce un aumento en la expresión del miR-143-5p, miR-223-3p, miR-140-5p, miR-342-3p y el miR-146b-5p en los adipocitos.
- La inhibición del miR-143-5p induce una disminución en la acumulación de lípidos en adipocitos

12. Perspectivas

- Estudiar el efecto de la transferencia de VEs enriquecidas con el miR-143-5p de ratas con ingesta de fructosa a ratas Wistar control.
- Investigar mediante bioinformática un gene blanco relacionado con mecanismos de acumulación de lípidos en adipocitos y verificar si es un gen blanco directo en adipocitos.
- Evaluar si el miR-143-5p y el miR-223-3p en VEs podrían ser miRNAs de respuesta a exposición a la fructosa.

Tabla anexa I. Funciones de los miRNAs seleccionados

microRNA	Regulado positivamente	Regulado negativamente
<i>miR-21-5p</i>	<ul style="list-style-type: none">• Disminuye producción de glucosa.• Disminuye la acumulación de lípidos.• Induce la adipogénesis.• Incrementa el estrés oxidativo.	<ul style="list-style-type: none">• Correlación con IMC e índice HOMA-IR
<i>miR-140-5p</i>	<ul style="list-style-type: none">• Disminución de la captación de LDL.• Relacionado con la progresión de la aterosclerosis.• Induce la adipogénesis.• Reduce el metabolismo de la glucosa.	<ul style="list-style-type: none">• Incrementa la respuesta inflamatoria.
<i>miR-143-5p</i>	<ul style="list-style-type: none">• Aumenta la acumulación de lípidos.• Induce la adipogénesis.• Disminuye la captación de la glucosa.	<ul style="list-style-type: none">• Aumenta la sensibilidad a la insulina.• Mejora el perfil lipídico.
<i>miR-146b-5p</i>	<ul style="list-style-type: none">• Disminuye la acumulación de lípidos.• Disminuye secreción de insulina.• Inhibe la respuesta inflamatoria.• Induce la adipogénesis.• Disminuye la captación de LDL.	<ul style="list-style-type: none">• Disminución del TA.
<i>miR-148a-5p</i>	<ul style="list-style-type: none">• Acumulación del TA.• Induce la adipogénesis.• Reduce la captación de glucosa.• Correlaciona con el índice HOMA-IR.	<ul style="list-style-type: none">• Aumenta la acumulación de lípidos.
<i>miR-223-3p</i>	<ul style="list-style-type: none">• Induce la adipogénesis.• Disminuye la producción de IL-1β• Aumenta la oxidación de ácidos grasos.	<ul style="list-style-type: none">• Aumenta captación de glucosa.
<i>miR-342-3p</i>	<ul style="list-style-type: none">• Disminuye la acumulación de lípidos.• Induce la adipogénesis.• Reduce la resistencia a la insulina.	<ul style="list-style-type: none">• Incrementa la acumulación de lípidos.
<i>miR-450a-5p</i>	<ul style="list-style-type: none">• Aumenta la captación de glucosa.• Induce la adipogénesis.	

Tabla anexa II. Resumen de Expresión de miRNAs en vesículas extracelulares del plasma y en tejido adiposo de ratas

miRNA	Vesículas Extracelulares			Tejido adiposo		
	Control	Fructosa	Valor de P	Control	Fructosa	Valor de P
<i>miR-143-5p</i>	0.0014 ± 0.0005	0.0142 ± 0.0017	0.0010	0.0118 ± 0.0008	0.0214 ± 0.0030	0.0143
<i>miR-223-3p</i>	4.9440 ± 0.4456	1.2750 ± 0.6552	0.0220	0.1674 ± 0.0200	0.1297 ± 0.0061	0.0462
<i>miR-140-5p</i>	0.0810 ± 0.0099	0.0174 ± 0.0100	0.0129	0.0301 ± 0.0058	0.0278 ± 0.0019	0.8983
<i>miR-148a-5p</i>	1.714e ⁻⁵ ± 4.490e ⁻⁶	3.024e ⁻⁵ ± 5.187e ⁻⁶	0.1250	0.0001 ± 3.925e ⁻⁵	0.0001 ± 1.369e ⁻⁵	0.6865
<i>miR-146b-5p</i>	0.0235 ± 0.0021	0.0055 ± 0.0036	0.0245	0.0118 ± 0.0019	0.0112 ± 0.0006	0.7166
<i>miR-342-3p</i>	0.0483 ± 0.0046	0.0051 ± 0.0041	0.0011	0.0086 ± 0.0009	0.0066 ± 0.0011	0.0320
<i>miR-21-5p</i>	0.8459 ± 0.1206	0.3688 ± 0.1570	0.1093	0.4912 ± 0.0749	0.4342 ± 0.0378	0.5214
<i>miR-450a-5p</i>	0.0006 ± 0.0001	0.0005 ± 9.632e ⁻⁵	0.7181	0.0299 ± 0.0024	0.0297 ± 0.0018	0.8314

Los datos se presentan como medias ± error estándar. Las diferencias significativas fueron calculadas mediante la prueba U de Mann-Whitney, P ≤ 0.05.

Tabla anexa III. Resumen de Expresión de miRNAs en vesículas extracelulares del sobrenadante y en células 3T3-L1

miRNA	Vesículas Extracelulares			Células 3T3-L1		
	Control	Fructosa	Valor de P	Control	Fructosa	Valor de P
<i>miR-143-5p</i>	0.0009 ± 0.0002	0.0034 ± 0.0012	0.0286	0.0093 ± 0.0004	0.0126 ± 0.0011	0.0179
<i>miR-223-3p</i>	0.0006 ± 0.0002	0.0001 ± 4.14e ⁻⁵	0.0286	0.0007 ± 6.16e ⁻⁵	0.0016 ± 0.0005	0.0079
<i>miR-140-5p</i>	0.0002 ± 7.88e ⁻⁵	0.0014 ± 0.0013	0.8571	0.0308 ± 0.0010	0.0438 ± 0.0072	0.0079
<i>miR-148a-5p</i>	1.33e ⁻⁵ ± 8.08e ⁻⁶	1.72e ⁻⁵ ± 5.39e ⁻⁶	0.4000	4.60e ⁻⁶ ± 4.78e ⁻⁷	5.59e ⁻⁶ ± 8.58e ⁻⁷	0.7302
<i>miR-146b-5p</i>	0.0002 ± 4.21e ⁻⁵	0.0012 ± 0.0009	0.6286	0.1386 ± 0.0016	0.1736 ± 0.0198	0.0411
<i>miR-342-3p</i>	7.57e ⁻⁵ ± 1.37e ⁻⁵	0.0001 ± 3.04e ⁻⁵	0.6286	0.0018 ± 9.95e ⁻⁵	0.0031 ± 0.0006	0.0159
<i>miR-21-5p</i>	0.0063 ± 0.0014	0.0175 ± 0.0079	0.2857	1.0000 ± 0.0281	1.2290 ± 0.2199	0.8413
<i>miR-450a-5p</i>	1.66e ⁻⁶ ± 1.01e ⁻⁶	5.75e ⁻⁶ ± 4.25e ⁻⁶	0.4000	0.0003 ± 1.71e ⁻⁵	0.0003 ± 6.69e ⁻⁵	0.8889

Los datos se presentan como medias ± error estándar. Las diferencias significativas fueron calculadas mediante la prueba U de Mann-Whitney, P ≤ 0.05.

Referencias

1. Zhang D-M, Jiao R-Q, Kong L-D. High Dietary Fructose: Direct Or Indirect Dangerous Factors Disturbing Tissue And Organ Functions. *Nutrients*. 2017 Mar 29;9(4):335.
2. Hanover LM, White JS. Manufacturing, Composition, And Applications Of Fructose. *Am J Clin Nutr*. 1993 Nov 1;58(5):724S-732S.
3. Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. Consumption Of High-Fructose Corn Syrup In M. en C. Adrián Hernández Díaz Couder. Tesis Doctorado en Biología Experimental.

Beverages May Play A Role In The Epidemic Of Obesity. Vol. 79, American Journal of Clinical Nutrition. American Society for Nutrition; 2004. p. 537–43.

4. Morenga L Te, Mallard S, Mann J. Dietary Sugars And Body Weight: Systematic Review And Meta-Analyses Of Randomised Controlled Trials And Cohort Studies. *BMJ*. 2013 Jan 15;346(7891).
5. Braverman-Bronstein A, Camacho-García-Formentí D, Zepeda-Tello R, Cudhea F, Singh GM, Mozaffarian D, et al. Mortality Attributable To Sugar Sweetened Beverages Consumption In Mexico: An Update. *Int J Obes*. 2020 Jun 1;44(6):1341–9.
6. Malik VS, Li Y, Pan A, De Koning L, Schernhammer E, Willett WC, et al. Long-Term Consumption Of Sugar-Sweetened And Artificially Sweetened Beverages And Risk Of Mortality In US Adults. *Circulation*. 2019 Apr 30;139(18):2113–25.
7. Hardy LL, Bell J, Bauman A, Mihrshahi S. Association Between Adolescents' Consumption Of Total And Different Types Of Sugar-Sweetened Beverages With Oral Health Impacts And Weight Status. *Aust N Z J Public Health*. 2018 Feb 1;42(1):22–6.
8. Jones HF, Butler RN, Brooks DA. Intestinal Fructose Transport And Malabsorption In Humans. *Am J Physiol Liver Physiol*. 2011 Feb;300(2):G202–6.
9. DeBosch BJ, Chen Z, Saben JL, Finck BN, Moley KH. Glucose Transporter 8 (GLUT8) Mediates Fructose-Induced De Novo Lipogenesis And

Macrosteatosis. *J Biol Chem.* 2014 Apr 18;289(16):10989–98.

10. Jang C, Hui S, Lu W, Cowan AJ, Morscher RJ, Lee G, et al. The Small Intestine Converts Dietary Fructose Into Glucose And Organic Acids. *Cell Metab.* 2018 Feb 6;27(2):351-361.e3.
11. Campbell E, Schlappal A, Geller E, Castonguay TW. Fructose-Induced Hypertriglyceridemia: A Review. *Nutr Prev Treat Abdom Obes.* 2014 Jan 1;197–205.
12. Diggle CP, Shires M, Leitch D, Brooke D, Carr IM, Markham AF, et al. Kethexokinase: Expression And Localization Of The Principal Fructose-Metabolizing Enzyme: <http://dx.doi.org/101369/jhc2009953190>. 2009 Apr 13;57(8):763–74.
13. He L, Babar GS, Redel JM, Young SL, Chagas CE, Moore W V., et al. Fructose Intake: Metabolism And Role In Diseases. *Sugar Intake - Risks Benefits Glob Diabetes Epidemic.* 2021 Feb 3;
14. Schalkwijk CG, Stehouwer CDA. Methylglyoxal, A Highly Reactive Dicarbonyl Compound, In Diabetes, Its Vascular Complications, And Other Age-Related Diseases. *Physiol Rev.* 2020;100(1):407–61.
15. Stern D, Middaugh N, Rice MS, Laden F, López-Ridaura R, Rosner B, et al. Changes In Sugar-Sweetened Soda Consumption, Weight, And Waist Circumference: 2-Year Cohort Of Mexican Women. *Am J Public Health.* 2017 Nov 1;107(11):1801–8.

16. Pacheco LS, Lacey J V., Martinez ME, Lemus H, Araneta MRG, Sears DD, et al. Sugar-Sweetened Beverage Intake And Cardiovascular Disease Risk In The California Teachers Study. *J Am Heart Assoc.* 2020 May 18;9(10):14883.
17. González-Morales R, Canto-Osorio F, Stern D, Sánchez-Romero LM, Torres-Ibarra L, Hernández-López R, et al. Soft Drink Intake Is Associated With Weight Gain, Regardless Of Physical Activity Levels: The Health Workers Cohort Study. *Int J Behav Nutr Phys Act.* 2020 May 12;17(1).
18. Singh GM, Micha R, Khatibzadeh S, Lim S, Ezzati M, Mozaffarian D. Estimated Global, Regional, And National Disease Burdens Related To Sugar-Sweetened Beverage Consumption In 2010. *Circulation.* 2015 Aug 25;132(8):639–66.
19. De Stefanis D, Mastrocola R, Nigro D, Costelli P, Aragno M. Effects Of Chronic Sugar Consumption On Lipid Accumulation And Autophagy In The Skeletal Muscle. *Eur J Nutr.* 2017;56(1):363–73.
20. WHO. Obesity And Overweight [Internet]. 2021 [cited 2021 Jul 19]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
21. Rtveldze K, Marsh T, Barquera S, Sanchez Romero LM ari., Levy D, Melendez G, et al. Obesity Prevalence In Mexico: Impact On Health And Economic Burden. *Public Health Nutr.* 2014 Jan 1;17(1):233–9.
22. Barquera S, Rivera JA. Obesity In Mexico: Rapid Epidemiological Transition And Food Industry Interference In Health Policies. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2020 Sep 1;8(9):746–7.

23. Al-Goblan AS, Al-Alfi MA, Khan MZ. Mechanism Linking Diabetes Mellitus And Obesity. *Diabetes, Metab Syndr Obes Targets Ther.* 2014;7:587–91.
24. Powell-Wiley TM, Poirier P, Burke LE, Després JP, Gordon-Larsen P, Lavie CJ, et al. Obesity And Cardiovascular Disease: A Scientific Statement From The American Heart Association. *Circulation.* 2021;E984–1010.
25. Alford S, Patel D, Perakakis N, Mantzoros CS. Obesity As A Risk Factor For Alzheimer’s Disease: Weighing The Evidence. *Obes Rev.* 2018;19(2):269–80.
26. Avgerinos KI, Spyrou N, Mantzoros CS, Dalamaga M. Obesity And Cancer Risk: Emerging Biological Mechanisms And Perspectives. *Metabolism.* 2019;92:121–35.
27. Richard AJ, White U, Elks CM, Stephens JM. Adipose Tissue: Physiology To Metabolic Dysfunction. *Endotext.* 2020 Apr 4;
28. Chait A, den Hartigh LJ. Adipose Tissue Distribution, Inflammation And Its Metabolic Consequences, Including Diabetes And Cardiovascular Disease. *Front Cardiovasc Med.* 2020 Feb 25;0:22.
29. Tran TT, Yamamoto Y, Gesta S, Kahn CR. Beneficial Effects Of Subcutaneous Fat Transplantation On Metabolism. *Cell Metab.* 2008 May 7;7(5):410.
30. Macotela Y, Emanuelli B, Mori MA, Gesta S, Schulz TJ, Tseng Y-H, et al. Intrinsic Differences In Adipocyte Precursor Cells From Different White Fat Depots. *Diabetes.* 2012 Jul 1;61(7):1691–9.

31. Lafontan M, Girard J. Impact Of Visceral Adipose Tissue On Liver Metabolism. Part I: Heterogeneity Of Adipose Tissue And Functional Properties Of Visceral Adipose Tissue. Vol. 34, Diabetes and Metabolism. Diabetes Metab; 2008. p. 317–27.
32. Scheja L, Heeren J. The Endocrine Function Of Adipose Tissues In Health And Cardiometabolic Disease. Vol. 15, Nature Reviews Endocrinology. Nature Publishing Group; 2019. p. 507–24.
33. Zhu Q, Scherer PE. Immunologic And Endocrine Functions Of Adipose Tissue: Implications For Kidney Disease. Vol. 14, Nature Reviews Nephrology. Nature Publishing Group; 2018. p. 105–20.
34. Oh KJ, Lee DS, Kim WK, Han BS, Lee SC, Bae KH. Metabolic Adaptation In Obesity And Type II Diabetes: Myokines, Adipokines And Hepatokines. Int J Mol Sci. 2017 Jan 1;18(1).
35. Rodrigues DF, Henriques MC do C, Oliveira MC, Menezes-Garcia Z, Marques PE, Souza D da G, et al. Acute Intake Of A High-Fructose Diet Alters The Balance Of Adipokine Concentrations And Induces Neutrophil Influx In The Liver. J Nutr Biochem. 2014 Apr 1;25(4):388–94.
36. Marek G, Pannu V, Shanmugham P, Pancione B, Mascia D, Crosson S, et al. Adiponectin Resistance And Proinflammatory Changes In The Visceral Adipose Tissue Induced By Fructose Consumption Via Ketohexokinase-Dependent Pathway. Diabetes. 2015;64(2):508–18.

37. Khan M, Joseph F. Adipose Tissue And Adipokines: The Association With And Application Of Adipokines In Obesity. *Scientifica (Cairo)*. 2014;2014:1–7.
38. Münzberg H, Morrison CD. Structure, Production And Signaling Of Leptin. Vol. 64, *Metabolism: Clinical and Experimental*. W.B. Saunders; 2015. p. 13–23.
39. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, et al. Dynamics Of Fat Cell Turnover In Humans. *Nature*. 2008 Jun 5;453(7196):783–7.
40. Considine R V., Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, et al. Serum Immunoreactive-Leptin Concentrations In Normal-Weight And Obese Humans. *N Engl J Med*. 1996 Feb;334(5):292–5.
41. Santos-Alvarez J, Goberna R, Sánchez-Margalet V. Human Leptin Stimulates Proliferation And Activation Of Human Circulating Monocytes. *Cell Immunol*. 1999 May 25;194(1):6–11.
42. Sangüesa G, Roglans N, Montañés JC, Baena M, Velázquez AM, Sánchez RM, et al. Chronic Liquid Fructose, But Not Glucose, Supplementation Selectively Induces Visceral Adipose Tissue Leptin Resistance And Hypertrophy In Female Sprague-Dawley Rats. *Mol Nutr Food Res*. 2018 Nov 1;62(22):1800777.
43. Bursać BN, Vasiljević AD, Nestorović NM, Veličković NA, Vojnović Milutinović DD, Matic GM, et al. High-Fructose Diet Leads To Visceral Adiposity And Hypothalamic Leptin Resistance In Male Rats - Do Glucocorticoids Play A

- Role? *J Nutr Biochem*. 2014;25(4):446–55.
44. Lozano I, Van Der Werf R, Bietiger W, Seyfritz E, Peronet C, Pinget M, et al. High-Fructose And High-Fat Diet-Induced Disorders In Rats: Impact On Diabetes Risk, Hepatic And Vascular Complications. *Nutr Metab*. 2016 Feb 25;13(1).
 45. Amitani M, Asakawa A, Amitani H, Inui A. The Role Of Leptin In The Control Of Insulin-Glucose Axis. *Front Neurosci*. 2013;7(7 APR).
 46. Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LGD, Müller C, Carling D, et al. Leptin Stimulates Fatty-Acid Oxidation By Activating AMP-Activated Protein Kinase. *Nature*. 2002 Jan 17;415(6869):339–43.
 47. Ohashi K, Ouchi N, Matsuzawa Y. Anti-Inflammatory And Anti-Atherogenic Properties Of Adiponectin. Vol. 94, *Biochimie*. Biochimie; 2012. p. 2137–42.
 48. Oh DK, Ciaraldi T, Henry RR. Adiponectin In Health And Disease. Vol. 9, *Diabetes, Obesity and Metabolism*. Blackwell Publishing Ltd; 2007. p. 282–9.
 49. Stern JH, Rutkowski JM, Scherer PE. Adiponectin, Leptin, And Fatty Acids In The Maintenance Of Metabolic Homeostasis Through Adipose Tissue Crosstalk. Vol. 23, *Cell Metabolism*. Cell Press; 2016. p. 770–84.
 50. Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin And Adiponectin Receptors. *Endocr Rev*. 2005 May 1;26(3):439–51.
 51. Yamauchi T, Nio Y, Maki T, Kobayashi M, Takazawa T, Iwabu M, et al.

- Targeted Disruption Of AdipoR1 And AdipoR2 Causes Abrogation Of Adiponectin Binding And Metabolic Actions. *Nat Med.* 2007 Mar 1;13(3):332–9.
52. Brown JEP, Conner AC, Digby JE, Ward KL, Ramanjaneya M, Randeve HS, et al. Regulation Of Beta-Cell Viability And Gene Expression By Distinct Agonist Fragments Of Adiponectin. *Peptides.* 2010 May 1;31(5):944–9.
53. Meilleur KG, Doumatey A, Huang H, Charles B, Chen G, Zhou J, et al. Circulating Adiponectin Is Associated With Obesity And Serum Lipids In West Africans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(7):3517–21.
54. Yamamoto S, Matsushita Y, Nakagawa T, Hayashi T, Noda M, Mizoue T. Circulating Adiponectin Levels And Risk Of Type 2 Diabetes In The Japanese. *Nutr Diabetes.* 2014;4(AUG).
55. Spoto B, Di Betta E, Mattace-Raso F, Sijbrands E, Vilardi A, Parlongo RM, et al. Pro- And Anti-Inflammatory Cytokine Gene Expression In Subcutaneous And Visceral Fat In Severe Obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2014 Oct 1;24(10):1137–43.
56. Doyle LM, Wang MZ. Overview Of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, And Methods For Exosome Isolation And Analysis. *Cells.* 2019 Jul 15;8(7):727.
57. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding Light On The Cell Biology Of Extracellular Vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018 Jan 17;
58. Wickman G, Julian L, Olson MF. How Apoptotic Cells Aid In The Removal Of M. en C. Adrián Hernández Díaz Couder. Tesis Doctorado en Biología Experimental.
-

- Their Own Cold Dead Bodies. *Cell Death Differ.* 2012 May;19(5):735–42.
59. Muralidharan-Chari V, Clancy J, Plou C, Romao M, Chavrier P, Raposo G, et al. ARF6-Regulated Shedding Of Tumor Cell-Derived Plasma Membrane Microvesicles. *Curr Biol.* 2009 Dec 1;19(22):1875–85.
60. Abels ER, Breakefield XO. Introduction To Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, And Uptake. *Cell Mol Neurobiol.* 2016 Apr 1;36(3):301.
61. Teng F, Fussenegger M. Shedding Light On Extracellular Vesicle Biogenesis And Bioengineering. *Adv Sci.* 2021 Jan 1;8(1):2003505.
62. Stuffers S, Sem Wegner C, Stenmark H, Brech A. Multivesicular Endosome Biogenesis In The Absence Of ESCRTs. *Traffic.* 2009 Jul;10(7):925–37.
63. van Niel G, Charrin S, Simoes S, Romao M, Rochin L, Saftig P, et al. The Tetraspanin CD63 Regulates ESCRT-Independent And -Dependent Endosomal Sorting During Melanogenesis. *Dev Cell.* 2011 Oct 18;21(4):708–21.
64. Chairoungdua A, Smith DL, Pochard P, Hull M, Caplan MJ. Exosome Release Of β -Catenin: A Novel Mechanism That Antagonizes Wnt Signaling. *J Cell Biol.* 2010 Sep 20;190(6):1079–91.
65. Möbius W, Ohno-Iwashita Y, Donselaar EG van, Oorschot VMJ, Shimada Y, Fujimoto T, et al. Immunoelectron Microscopic Localization Of Cholesterol Using Biotinylated And Non-Cytolytic Perfringolysin O. *J Histochem Cytochem.* 2002 Jan 26;50(1):43–55.

66. Kajimoto T, Okada T, Miya S, Zhang L, Nakamura S. Ongoing Activation Of Sphingosine 1-Phosphate Receptors Mediates Maturation Of Exosomal Multivesicular Endosomes. *Nat Commun.* 2013 Dec 15;4(1):2712.
67. Valapala M, Vishwanatha JK. Lipid Raft Endocytosis And Exosomal Transport Facilitate Extracellular Trafficking Of Annexin A2. *J Biol Chem.* 2011 Sep 2;286(35):30911–25.
68. Mayran N, Parton RG, Gruenberg J. Annexin II Regulates Multivesicular Endosome Biogenesis In The Degradation Pathway Of Animal Cells. *EMBO J.* 2003 Jul 1;22(13):3242.
69. Flaherty SE, Grijalva A, Xu X, Ables E, Nomani A, Ferrante AW. A Lipase-Independent Pathway Of Lipid Release And Immune Modulation By Adipocytes. *Science (80-).* 2019 Mar 1;363(6430):989–93.
70. Thomou T, Mori MA, Dreyfuss JM, Konishi M, Sakaguchi M, Wolfrum C, et al. Adipose-Derived Circulating miRNAs Regulate Gene Expression In Other Tissues. *Nature.* 2017 Feb 23;542(7642):450–5.
71. Yan C, Tian X, Li J, Liu D, Ye D, Xie Z, et al. A High-Fat Diet Attenuates AMPK A1 In Adipocytes To Induce Exosome Shedding And Nonalcoholic Fatty Liver Development In Vivo. *Diabetes.* 2021 Feb 1;70(2):577–88.
72. Bargut TCL, Santos LP, Machado DGL, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Eicosapentaenoic Acid (EPA) Vs. Docosahexaenoic Acid (DHA): Effects In Epididymal White Adipose Tissue Of Mice Fed A High-Fructose Diet.

Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids. 2017 Aug 1;123:14–24.

73. Zhang Y, Yu M, Dai M, Chen C, Tang Q, Jing W, et al. MiR-450a-5p Within Rat Adipose Tissue Exosome-Like Vesicles Promotes Adipogenic Differentiation By Targeting WISP2. *J Cell Sci.* 2017 Mar 15;130(6):1158–68.
74. Pan Y, Hui X, Chong Hoo RL, Ye D, Cheung Chan CY, Feng T, et al. Adipocyte-Secreted Exosomal MicroRNA-34a Inhibits M2 Macrophage Polarization To Promote Obesity-Induced Adipose Inflammation. *J Clin Invest.* 2019 Feb 1;129(2):834–49.
75. An Y, Zhao J, Nie F, Qin Z, Xue H, Wang G, et al. Exosomes From Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs) Overexpressing MiR-21 Promote Vascularization Of Endothelial Cells. *Sci Rep.* 2019 Dec 1;9(1):1–10.
76. Brianza-Padilla M, Carbó R, Arana JC, Vázquez-Palacios G, Ballinas-Verdugo MA, Cardoso-Saldaña GC, et al. Inflammation Related MicroRNAs Are Modulated In Total Plasma And In Extracellular Vesicles From Rats With Chronic Ingestion Of Sucrose. *Biomed Res Int.* 2016;2016:1–7.
77. Bátiz LF, Castro MA, Burgos P V., Velásquez ZD, Muñoz RI, Lafourcade CA, et al. Exosomes As Novel Regulators Of Adult Neurogenic Niches. *Front Cell Neurosci.* 2016 Jan 19;9:501.
78. Kozomara A, Griffiths-Jones S. MiRBase: Annotating High Confidence MicroRNAs Using Deep Sequencing Data. *Nucleic Acids Res.* 2014 Jan 1;42(D1).

79. Gebert LFR, MacRae IJ. Regulation Of MicroRNA Function In animals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019 Jan 14;20(1):21–37.
 80. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview Of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms Of Actions, And Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018 Aug 3;0(AUG):402.
 81. Bushati N, Cohen SM. MicroRNA Functions. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007;23:175–205.
 82. Landrier JF, Derghal A, Mounien L. MicroRNAs In Obesity And Related Metabolic Disorders. *Cells.* 2019 Aug 9;8(8).
 83. Sud N, Zhang H, Pan K, Cheng X, Cui J, Su Q. Aberrant Expression Of MicroRNA Induced By High-Fructose Diet: Implications In The Pathogenesis Of Hyperlipidemia And Hepatic Insulin Resistance. *J Nutr Biochem.* 2017;43(December):125–31.
 84. Hanousková B, Neprašová B, Skálová L, Maletínská L, Zemanová K, Ambrož M, et al. High-Fructose Drinks Affect MicroRNAs Expression Differently In Lean And Obese Mice. *J Nutr Biochem.* 2019;68:42–50.
 85. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification Of Novel Genes Coding For Small Expressed RNAs. *Science (80-).* 2001 Oct 26;294(5543):853–8.
 86. Luo A, Yan H, Liang J, Du C, Zhao X, Sun L, et al. MicroRNA-21 Regulates Hepatic Glucose Metabolism By Targeting FOXO1. *Gene.* 2017 Sep
- M. en C. Adrián Hernández Díaz Couder. Tesis Doctorado en Biología Experimental.
-

5;627:194–201.

87. Sun C, Huang F, Liu X, Xiao X, Yang M, Hu G, et al. MiR-21 Regulates Triglyceride And Cholesterol Metabolism In Non-Alcoholic Fatty Liver Disease By Targeting HMGCR. *Int J Mol Med*. 2015 Mar 1;35(3):847–53.
88. Ahn J, Lee H, Jung CH, Ha T. Lycopene Inhibits Hepatic Steatosis Via MicroRNA-21-Induced Downregulation Of Fatty Acid-Binding Protein 7 In Mice Fed A High-Fat Diet. *Mol Nutr Food Res*. 2012 Nov 1;56(11):1665–74.
89. Guo N-L, zhang J-X, Wu J-P, Xu Y-H. Isoflurane Promotes Glucose Metabolism Through Up-Regulation Of MiR-21 And Suppresses Mitochondrial Oxidative Phosphorylation In Ovarian Cancer Cells. *Biosci Rep*. 2017 Dec 22;37(6).
90. Wang Y, Yang L-Z, Yang D-G, Zhang Q-Y, Deng Z-N, Wang K, et al. MiR-21 Antagomir Improves Insulin Resistance And Lipid Metabolism Disorder In Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetes Mellitus Rats. *Ann Palliat Med*. 2020 Mar 1;9(2):394–404.
91. Kim YJ, Hwang SH, Cho HH, Shin KK, Bae YC, Jung JS. MicroRNA 21 Regulates The Proliferation Of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells And High-Fat Diet-Induced Obesity Alters MicroRNA 21 Expression In White Adipose Tissues. *J Cell Physiol*. 2012 Jan;227(1):183–93.
92. Seeger T, Fischer A, Muhly-Reinholz M, Zeiher AM, Dimmeler S. Long-Term Inhibition Of MiR-21 Leads To Reduction Of Obesity In Db/Db Mice. *Obesity*. 2014 Nov 1;22(11):2352–60.

93. Kim YJ, Hwang SJ, Bae YC, Jung JS. MiR-21 Regulates Adipogenic Differentiation Through The Modulation Of TGF- β Signaling In Mesenchymal Stem Cells Derived From Human Adipose Tissue. *Stem Cells*. 2009 Dec;27(12):N/A-N/A.
94. An X, Ma K, Zhang Z, Zhao T, Zhang X, Tang B, et al. MiR-17, MiR-21, And MiR-143 Enhance Adipogenic Differentiation From Porcine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *DNA Cell Biol*. 2016;35(8):410–6.
95. Mei Y, Bian C, Li J, Du Z, Zhou H, Yang Z, et al. MiR-21 Modulates The ERK-MAPK Signaling Pathway By Regulating SPRY2 Expression During Human Mesenchymal Stem Cell Differentiation. *J Cell Biochem*. 2013 Jun 1;114(6):1374–84.
96. Doghish AS, Elsis AM, Amin AI, Abulsoud AI. Circulating MiR-148a-5p And MiR-21-5p As Novel Diagnostic Biomarkers In Adult Egyptian Male Patients With Metabolic Syndrome. *Can J Diabetes*. 2021 Jan 5;
97. Ghorbani S, Mahdavi R, Alipoor B, Panahi G, Esfahani EN, Razi F, et al. Decreased Serum MicroRNA-21 Level Is Associated With Obesity In Healthy And Type 2 Diabetic Subjects. <https://doi.org/10.1080/1381345520171396349>. 2017 Aug 8;124(4):300–5.
98. Yamada H, Suzuki K, Ichino N, Ando Y, Sawada A, Osakabe K, et al. Associations Between Circulating MicroRNAs (MiR-21, MiR-34a, MiR-122 And MiR-451) And Non-Alcoholic Fatty Liver. *Clin Chim Acta*. 2013 Sep 23;424:99–

- 103.
99. Yang Y, Liu D, Xi Y, Li J, Liu B, Li J. Upregulation Of MiRNA-140-5p Inhibits Inflammatory Cytokines In Acute Lung Injury Through The MyD88/Nf-KB Signaling Pathway By Targeting TLR4. *Exp Ther Med*. 2018 Nov 1;16(5):3913–20.
100. Liu QQ, Ren K, Liu SH, Li WM, Huang CJ, Yang XH. MicroRNA-140-5p Aggravates Hypertension And Oxidative Stress Of Atherosclerosis Via Targeting Nrf2 And Sirt2. *Int J Mol Med*. 2019 Feb 1;43(2):839–49.
101. Liu H, Mao Z, Zhu J, Shen M, Chen F. MiR-140-5p Inhibits Oxidized Low-Density Lipoprotein-Induced Oxidative Stress And Cell Apoptosis Via Targeting Toll-Like Receptor 4. *Gene Ther*. 2020 Mar 12;1–9.
102. Xu Y, Gao J, Gong Y, Chen M, Chen J, Zhao W, et al. Hsa-MiR-140-5p Down-Regulates LDL Receptor And Attenuates LDL-C Uptake In Human Hepatocytes. *Atherosclerosis*. 2020 Mar 1;297:111–9.
103. Zhao Z-W, Zhang M, Liao L-X, Zou J, Wang G, Wan X-J, et al. Long Non-Coding RNA PCA3 Inhibits Lipid Accumulation And Atherosclerosis Through The MiR-140-5p/RFX7/ABCA1 Axis. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2021 Feb 1;1866(5):158904.
104. Zhang X, Chang A, Li Y, Gao Y, Wang H, Ma Z, et al. MiR-140-5p Regulates Adipocyte Differentiation By Targeting Transforming Growth Factor- β Signaling. *Sci Rep*. 2015 Dec 11;5(1):18118.

105. Li Z, Jin C, Chen S, Zheng Y, Huang Y, Jia L, et al. Long Non-Coding RNA MEG3 Inhibits Adipogenesis And Promotes Osteogenesis Of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Via MiR-140-5p. *Mol Cell Biochem.* 2017 Sep 1;433(1–2):51–60.
106. Copier CU, León L, Fernández M, Contador D, Calligaris SD. Circulating MiR-19b And MiR-181b Are Potential Biomarkers For Diabetic Cardiomyopathy. *Sci Rep.* 2017 Dec 1;7(1):1–11.
107. Delic D, Eisele C, Schmid R, Luippold G, Mayoux E, Grempler R. Characterization Of Micro-RNA Changes During The Progression Of Type 2 Diabetes In Zucker Diabetic Fatty Rats. *Int J Mol Sci.* 2016 May 3;17(5):665.
108. Ortega FJ, Mercader JM, Catalán V, Moreno-Navarrete JM, Pueyo N, Sabater M, et al. Targeting The Circulating MicroRNA Signature Of Obesity. *Clin Chem.* 2013;59(5):781–92.
109. Al-Rawaf HA. Circulating MicroRNAs And Adipokines As Markers Of Metabolic Syndrome In Adolescents With Obesity. *Clin Nutr.* 2019 Oct 1;38(5):2231–8.
110. Ortega FJ, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, Rovira O, Guerra E, Esteve E, et al. Profiling Of Circulating MicroRNAs Reveals Common MicroRNAs Linked To Type 2 Diabetes That Change With Insulin Sensitization. *Diabetes Care.* 2014;37(5):1375–83.
111. Zhao C, Zhao C, Zhao H. Defective Insulin Receptor Signaling In Patients With Gestational Diabetes Is Related To Dysregulated MiR-140 Which Can Be

Improved By Naringenin. *Int J Biochem Cell Biol.* 2020 Nov 1;128:105824.

112. Fang R, Xiao T, Fang Z, Sun Y, Li F, Gao Y, et al. MicroRNA-143 (MiR-143) Regulates Cancer Glycolysis Via Targeting Hexokinase 2 Gene. *J Biol Chem.* 2012 Jun 29;287(27):23227–35.
113. Jordan SD, Krüger M, Willmes DM, Redemann N, Wunderlich FT, Brönneke HS, et al. Obesity-Induced Overexpression Of MiRNA-143 Inhibits Insulin-Stimulated AKT Activation And Impairs Glucose Metabolism. *Nat Cell Biol.* 2011;13(4):434–48.
114. Sala F, Aranda JF, Rotllan N, Ramírez CM, Aryal B, Elia L, et al. MiR-143/145 Deficiency Attenuates The Progression Of Atherosclerosis In Ldlr^{-/-} Mice. *Thromb Haemost.* 2014;112(4):796–802.
115. Quintanilha BJ, Pinto Ferreira LR, Ferreira FM, Neto EC, Sampaio GR, Rogero MM. Circulating Plasma MicroRNAs Dysregulation And Metabolic Endotoxemia Induced By A High-Fat High-Saturated Diet. *Clin Nutr.* 2020 Feb 1;39(2):554–62.
116. Ramzan F, D'Souza RF, Durainayagam BR, Milan AM, Markworth JF, Miranda-Soberanis V, et al. Circulatory MiRNA Biomarkers Of Metabolic Syndrome. *Acta Diabetol.* 2019;(0123456789).
117. Can U, Buyukinan M, Yerlikaya FH. The Investigation Of Circulating MicroRNAs Associated With Lipid Metabolism In Childhood Obesity. *Pediatr Obes.* 2016 Jun;11(3):228–34.

118. Schneider A, Dhahbi JM, Atamna H, Clark JP, Colman RJ, Anderson RM. Caloric Restriction Impacts Plasma MicroRNAs In Rhesus Monkeys. *Aging Cell*. 2017 Oct 1;16(5):1200–3.
119. Yerlikaya FH, Öz M. Aberrant Expression Of MiRNA Profiles In High-Fat And High-Sucrose Fed Rats. *Clin Nutr Exp*. 2019 Oct 1;27:1–8.
120. Takanabe R, Ono K, Abe Y, Takaya T, Horie T, Wada H, et al. Up-Regulated Expression Of MicroRNA-143 In Association With Obesity In Adipose Tissue Of Mice Fed High-Fat Diet. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Nov 28;376(4):728–32.
121. Wang T, Li M, Guan J, Li P, Wang H, Guo Y, et al. MicroRNAs MiR-27a And MiR-143 Regulate Porcine Adipocyte Lipid Metabolism. *Int J Mol Sci*. 2011;12(11):7950–9.
122. Xie H, Lim B, Lodish HF. MicroRNAs Induced During Adipogenesis That Accelerate Fat Cell Development Are Downregulated In Obesity. *Diabetes*. 2009 May 1;58(5):1050–7.
123. Chen L, Hou J, Ye L, Chen Y, Cui J, Tian W, et al. MicroRNA-143 Regulates Adipogenesis By Modulating The MAP2K5–ERK5 Signaling. *Sci Rep*. 2015 May 22;4(1):3819.
124. Kim YJ, Min TS, Seo KS, Kim SH. Expression Of Pref-1/Dlk-1 Is Regulated By MicroRNA-143 In 3T3-L1 Cells. *Mol Biol Rep*. 2015 Mar 1;42(3):617–24.
125. Takanabe R, Ono K, Abe Y, Takaya T, Horie T, Wada H, et al. Up-Regulated M. en C. Adrián Hernández Díaz Couder. Tesis Doctorado en Biología Experimental.

- Expression Of MicroRNA-143 In Association With Obesity In Adipose Tissue Of Mice Fed High-Fat Diet. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;376(4):728–32.
126. Kim C, Lee H, Cho YM, Kwon OJ, Kim W, Lee EK. TNF α -Induced MiR-130 Resulted In Adipocyte Dysfunction During Obesity-Related Inflammation. *FEBS Lett*. 2013 Nov 29;587(23):3853–8.
127. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-KB-Dependent Induction Of MicroRNA MiR-146, An Inhibitor Targeted To Signaling Proteins Of Innate Immune Responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(33):12481–6.
128. Shi C, Zhu L, Chen X, Gu N, Chen L, Zhu L, et al. IL-6 And TNF- α Induced Obesity-Related Inflammatory Response Through Transcriptional Regulation Of MiR-146b. *J Interf Cytokine Res*. 2014 May 1;34(5):342–8.
129. Ortega FJ, Moreno M, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, Fuentes-Batllevell N, Sabater M, et al. Inflammation Triggers Specific MicroRNA Profiles In Human Adipocytes And Macrophages And In Their Supernatants. *Clin Epigenetics*. 2015;7(1):1–10.
130. Zhu Y-L, Chen T, Xiong J-L, Wu D, Xi Q-Y, Luo J-Y, et al. MiR-146b Inhibits Glucose Consumption By Targeting IRS1 Gene In Porcine Primary Adipocytes. *Int J Mol Sci*. 2018 Mar 9;19(3):783.
131. Jiang W, Liu J, Dai Y, Zhou N, Ji C, Li X. MiR-146b Attenuates High-Fat Diet-Induced Non-Alcoholic Steatohepatitis In Mice. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015 May 1;30(5):933–43.

132. Ahn J, Lee H, Jung CH, Choi WH, Ha TY. Zerumbone Ameliorates High-Fat Diet-Induced Adiposity By Restoring AMPK-Regulated Lipogenesis And MicroRNA-146b/ SIRT1-Mediated Adipogenesis. *Oncotarget*. 2017;8(23):36984–95.
133. Tao C, Huang S, Wang Y, Wei G, Zhang Y, Qi D, et al. Changes In White And Brown Adipose Tissue MicroRNA Expression In Cold-Induced Mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Jun 14;463(3):193–9.
134. Ahn J, Lee H, Jung CH, Jeon T II, Ha TY. MicroRNA-146b Promotes Adipogenesis By Suppressing The SIRT1-FOXO1 Cascade. *EMBO Mol Med*. 2013 Oct;5(10):1602–12.
135. Chartoumpakis D V., Zaravinos A, Ziros PG, Iskrenova RP, Psyrogiannis AI, Kyriazopoulou VE, et al. Differential Expression Of MicroRNAs In Adipose Tissue After Long-Term High-Fat Diet-Induced Obesity In Mice. Zhou Z, editor. *PLoS One*. 2012 Apr 4;7(4):e34872.
136. Chen L, Dai Y-M, Ji C-B, Yang L, Shi C-M, Xu G-F, et al. MiR-146b Is A Regulator Of Human Visceral Preadipocyte Proliferation And Differentiation And Its Expression Is Altered In Human Obesity. *Mol Cell Endocrinol*. 2014 Aug 5;393(1–2):65–74.
137. Strycharz J, Wróblewski A, Zieleniak A, Świdarska E, Matyjas T, Rucińska M, et al. Visceral Adipose Tissue Of Prediabetic And Diabetic Females Shares A Set Of Similarly Upregulated Micrnas Functionally Annotated To Inflammation,

- Oxidative Stress And Insulin Signaling. *Antioxidants*. 2021 Jan 1;10(1):1–25.
138. Sharma N, Varma V, Ma L, Hasstedt S, Das S. Obesity Associated Modulation Of MiRNA And Co-Regulated Target Transcripts In Human Adipose Tissue Of Non-Diabetic Subjects. *MicroRNA*. 2016 Jan 8;4(3):194–204.
139. Celikbilek M, Baskol M, Taheri S, Deniz K, Dogan S, Zararsiz G, et al. Circulating MicroRNAs In Patients With Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *World J Hepatol*. 2014;6(8):613–20.
140. Cui X, You L, Zhu L, Wang X, Zhou Y, Li Y, et al. Change In Circulating MicroRNA Profile Of Obese Children Indicates Future Risk Of Adult Diabetes. *Metabolism*. 2018 Jan 1;78:95–105.
141. Goedeke L, Rotllan N, Canfrán-Duque A, Aranda JF, Ramírez CM, Araldi E, et al. MicroRNA-148a Regulates LDL Receptor And ABCA1 Expression To Control Circulating Lipoprotein Levels. *Nat Med*. 2015 Nov 1;21(11):1280–8.
142. 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 May 22;5:9930.
143. Rotllan N, Price N, Pati P, Goedeke L, Fernández-Hernando C. MicroRNAs In Lipoprotein Metabolism And Cardiometabolic Disorders. Vol. 246, *Atherosclerosis*. Elsevier Ireland Ltd; 2016. p. 352–60.
144. Engin AB. MicroRNA And Adipogenesis. In: *Advances in experimental medicine M*. en C. Adrián Hernández Díaz Couder. Tesis Doctorado en Biología Experimental.
-

and biology. Springer, Cham; 2017. p. 489–509.

145. Cho YM, Kim TM, Hun Kim D, Hee Kim D, Jeong SW, Kwon OJ. MiR-148a Is A Downstream Effector Of X-Box-Binding Protein 1 That Silences Wnt10b During Adipogenesis Of 3T3-L1 Cells. *Exp Mol Med*. 2016 Apr 8;48(4):e226.
 146. Shi C, Pang L, Ji C, Wang J, Lin N, Chen J, et al. Obesity-Associated MiR-148a Is Regulated By Cytokines And Adipokines Via A Transcriptional Mechanism. *Mol Med Rep*. 2016 Dec 1;14(6):5707–12.
 147. Cheng L, Zhu Y, Han H, Zhang Q, Cui K, Shen H, et al. MicroRNA-148a Deficiency Promotes Hepatic Lipid Metabolism And Hepatocarcinogenesis In Mice. *Cell Death Dis*. 2017 Jul 13;8(7):e2916.
 148. Sangiao-Alvarellos S, Theofilatos K, Barwari T, Gutmann C, Takov K, Singh B, et al. Metabolic Recovery After Weight Loss Surgery Is Reflected In Serum MicroRNAs. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2020 Oct 28;8(2):1441.
 149. Ariza-Nieto M, Alley JB, Samy S, Fitzgerald L, Vermeylen F, Shuler ML, et al. Circulating MIR148A Associates With Sensitivity To Adiponectin Levels In Human Metabolic Surgery For Weight Loss. *Endocr Connect*. 2018;7(9):975–82.
 150. Johnnidis JB, Harris MH, Wheeler RT, Stehling-Sun S, Lam MH, Kirak O, et al. Regulation Of Progenitor Cell Proliferation And Granulocyte Function By MicroRNA-223. *Nature*. 2008 Feb 28;451(7182):1125–9.
 151. Fazi F, Rosa A, Fatica A, Gelmetti V, De Marchis ML, Nervi C, et al. A
- M. en C. Adrián Hernández Díaz Couder. Tesis Doctorado en Biología Experimental.

- Minicircuitry Comprised Of MicroRNA-223 And Transcription Factors NFI-A And C/EBP α Regulates Human Granulopoiesis. *Cell*. 2005 Dec 2;123(5):819–31.
152. Fukao T, Fukuda Y, Kiga K, Sharif J, Hino K, Enomoto Y, et al. An Evolutionarily Conserved Mechanism For MicroRNA-223 Expression Revealed By MicroRNA Gene Profiling. *Cell*. 2007 May 4;129(3):617–31.
153. Chuang TY, Wu HL, Chen CC, Gamboa GM, Layman LC, Diamond MP, et al. MicroRNA-223 Expression Is Upregulated In Insulin Resistant Human Adipose Tissue. *J Diabetes Res*. 2015;2015:2–10.
154. Deiuliis JA, Syed R, Duggineni D, Rutsky J, Rengasamy P, Zhang J, et al. Visceral Adipose MicroRNA 223 Is Upregulated In Human And Murine Obesity And Modulates The Inflammatory Phenotype Of Macrophages. Xu H, editor. *PLoS One*. 2016 Nov 3;11(11):e0165962.
155. Macartney-Coxson D, Danielson K, Clapham J, Benton MC, Johnstone A, Jones A, et al. MicroRNA Profiling In Adipose Before And After Weight Loss Highlights The Role Of MiR-223-3p And The NLRP3 Inflammasome. *Obesity*. 2020 Mar 24;28(3):570–80.
156. Parrizas M, Mundet X, Castaño C, Canivell S, Cos X, Brugnara L, et al. MiR-10b And MiR-223-3p In Serum Microvesicles Signal Progression From Prediabetes To Type 2 Diabetes. *J Endocrinol Invest*. 2020 Apr 1;43(4):451–9.
157. Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, et al. Plasma MicroRNA Profiling Reveals Loss Of Endothelial MiR-126 And Other

- MicroRNAs In Type 2 Diabetes. *Circ Res.* 2010 Sep 17;107(6):810–7.
158. Sánchez-Ceinos J, Rangel-Zuñiga OA, Clemente-Postigo M, Podadera-Herreros A, Camargo A, Alcalá-Díaz JF, et al. MiR-223-3p As A Potential Biomarker And Player For Adipose Tissue Dysfunction Preceding Type 2 Diabetes Onset. *Mol Ther - Nucleic Acids.* 2021 Jan 20;
159. Barbalata T, Zhang L, Dulceanu MD, Stancu CS, Devaux Y, Sima A V., et al. Regulation Of MicroRNAs In High-Fat Diet Induced Hyperlipidemic Hamsters. *Sci Rep.* 2020 Dec 1;10(1):1–9.
160. WM G, RK P, PS M, JH L, YH K, KD T, et al. Epigenetic Silencing Of The Intronic MicroRNA Hsa-MiR-342 And Its Host Gene EVL In Colorectal Cancer. *Oncogene.* 2008 Jun 19;27(27):3880–8.
161. Kim D, Nguyen QT, Lee J, Lee SH, Janocha A, Kim S, et al. Anti-Inflammatory Roles Of Glucocorticoids Are Mediated By Foxp3+ Regulatory T Cells Via A MiR-342-Dependent Mechanism. *Immunity.* 2020 Sep 15;53(3):581-596.e5.
162. Wang L, Xia J-W, Ke Z-P, Zhang B-H. Blockade Of NEAT1 Represses Inflammation Response And Lipid Uptake Via Modulating MiR-342-3p In Human Macrophages THP-1 Cells. *J Cell Physiol.* 2019 Apr 1;234(4):5319–26.
163. Liu W, Kang L, Han J, Wang Y, Shen C, Yan Z, et al. MiR-342-3p Suppresses Hepatocellular Carcinoma Proliferation Through Inhibition Of IGF-1R-Mediated Warburg Effect. *Onco Targets Ther.* 2018 Mar 23;11:1643.
164. Li X, Chen Y-T, Josson S, Mukhopadhyay NK, Kim J, Freeman MR, et al. M. en C. Adrián Hernández Díaz Couder. Tesis Doctorado en Biología Experimental.
-

MicroRNA-185 And 342 Inhibit Tumorigenicity And Induce Apoptosis Through Blockade Of The SREBP Metabolic Pathway In Prostate Cancer Cells.

Campbell M, editor. PLoS One. 2013 Aug 9;8(8):e70987.

165. Chartoumpekis D V., Zaravinos A, Ziros PG, Iskrenova RP, Psyrogiannis AI, Kyriazopoulou VE, et al. Differential Expression Of MicroRNAs In Adipose Tissue After Long-Term High-Fat Diet-Induced Obesity In Mice. Zhou Z, editor. PLoS One. 2012 Apr 4;7(4):e34872.
166. Oger F, Gheeraert C, Mogilenko D, Benomar Y, Molendi-Coste O, Bouchaert E, et al. Cell-Specific Dysregulation Of MicroRNA Expression In Obese White Adipose Tissue. J Clin Endocrinol Metab. 2014 Aug 1;99(8):2821–33.
167. Wang L, Xu L, Xu M, Liu G, Xing J, Sun C, et al. Obesity-Associated MiR-342-3p Promotes Adipogenesis Of Mesenchymal Stem Cells By Suppressing CtBP2 And Releasing C/EBP α From CtBP2 Binding. Cell Physiol Biochem. 2015;35(6):2285–98.
168. Ortega FJ, Moreno M, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, Fuentes-Batllevell N, Sabater M, et al. Inflammation Triggers Specific MicroRNA Profiles In Human Adipocytes And Macrophages And In Their Supernatants. Clin Epigenetics. 2015;7(1):1–10.
169. Khalyfa A, Kheirandish-Gozal L, Bhattacharjee R, Khalyfa AA, Gozal D. Circulating MicroRNAs As Potential Biomarkers Of Endothelial Dysfunction In Obese Children. Chest. 2016;149(3):786–800.

170. Wang R, Hong J, Cao Y, Shi J, Gu W, Ning G, et al. Elevated Circulating MicroRNA-122 Is Associated With Obesity And Insulin Resistance In Young Adults. *Eur J Endocrinol.* 2015;172(3):291–300.
171. Masotti A, Baldassarre A, Fabrizi M, Olivero G, Loreti MC, Giammaria P, et al. Oral Glucose Tolerance Test Unravels Circulating MiRNAs Associated With Insulin Resistance In Obese Preschoolers. *Pediatr Obes.* 2017;12(3):229–38.
172. Komoll RM, Hu Q, Olarewaju O, von Döhlen L, Yuan Q, Xie Y, et al. MicroRNA-342-3p Is A Potent Tumour Suppressor In Hepatocellular Carcinoma. *J Hepatol.* 2021 Jan 1;74(1):122–34.
173. Zhang Y, Chen Y, Yu J, Liu G, Huang Z. Integrated Transcriptome Analysis Reveals MiRNA–MRNA Crosstalk In Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Genomics.* 2014 Oct 1;104(4):249–56.
174. Koperski Ł, Kotlarek M, Świerniak M, Kolanowska M, Kubiak A, Górnicka B, et al. Next-Generation Sequencing Reveals MicroRNA Markers Of Adrenocortical Tumors Malignancy. *Oncotarget.* 2017 Jul 25;8(30):49191–200.
175. Muys BR, Sousa JF, Praça JR, Araújo LF de, Sarshad AA, Anastasakis DG, et al. MiR-450a Acts As A Tumor Suppressor In Ovarian Cancer By Regulating Energy Metabolism. *Cancer Res.* 2019 Jul 1;79(13):3294–305.
176. Wei C, Meng L, Zhang Y. MiR-450a-5p Eliminates MGO-Induced Insulin Resistance Via Targeting CREB. *Int J Stem Cells.* 2020;13(1):46–54.
177. Mamikutty N, Thent ZC, Sapri SR, Sahrudin NN, Mohd Yusof MR, Haji M. en C. Adrián Hernández Díaz Couder. Tesis Doctorado en Biología Experimental.

- Suhaimi F. The Establishment Of Metabolic Syndrome Model By Induction Of Fructose Drinking Water In Male Wistar Rats. *Biomed Res Int.* 2014;2014.
178. Antunes LC, Elkfury JL, Jornada MN, Foletto KC, Bertoluci MC. Validation Of HOMA-IR In A Model Of Insulin-Resistance Induced By A High-Fat Diet In Wistar Rats. *Arch Endocrinol Metab.* 2016;60(2):138–42.
179. Ghiasi R, Soufi FG, Somi MH, Mohaddes G, Bavil FM, Naderi R, et al. Swim Training Improves HOMA-IR In Type 2 Diabetes Induced By High Fat Diet And Low Dose Of Streptozotocin In Male Rats. *Adv Pharm Bull.* 2015;5(3):379.
180. Shelke GV, Lässer C, Gho YS, Lötvall J. Importance Of Exosome Depletion Protocols To Eliminate Functional And RNA-Containing Extracellular Vesicles From Fetal Bovine Serum. *J Extracell vesicles.* 2014 Jan 30;3(1):24783.
181. Du L, Heaney AP. Regulation Of Adipose Differentiation By Fructose And GluT5. *Mol Endocrinol.* 2012 Oct 1;26(10):1773–82.
182. Garcia-Macedo R, Sanchez-Muñoz F, Almanza-Perez JC, Duran-Reyes G, Alarcon-Aguilar F, Cruz M. Glycine Increases MRNA Adiponectin And Diminishes Pro-Inflammatory Adipokines Expression In 3T3-L1 Cells. *Eur J Pharmacol.* 2008 Jun 10;587(1–3):317–21.
183. Zubiría M, Alzamendi A, Moreno G, Rey M, Spinedi E, Giovambattista A. Long-Term Fructose Intake Increases Adipogenic Potential: Evidence Of Direct Effects Of Fructose On Adipocyte Precursor Cells. *Nutrients.* 2016 Apr 2;8(4):198.

184. Abdulla MH, Sattar MA, Johns EJ. The Relation Between Fructose-Induced Metabolic Syndrome And Altered Renal Haemodynamic And Excretory Function In The Rat. *Int J Nephrol*. 2011;2011:1–17.
185. Goran MI, Ulijaszek SJ, Ventura EE. High Fructose Corn Syrup And Diabetes Prevalence: A Global Perspective. *Glob Public Health*. 2013 Jan;8(1):55–64.
186. Toop CR, Gentili S. Fructose Beverage Consumption Induces A Metabolic Syndrome Phenotype In The Rat: A Systematic Review And Meta-Analysis. Vol. 8, *Nutrients*. MDPI AG; 2016.
187. Faeh D, Minehira K, Schwarz JM, Periasami R, Seongsu P, Tappy L. Effect Of Fructose Overfeeding And Fish Oil Administration On Hepatic De Novo Lipogenesis And Insulin Sensitivity In Healthy Men. *Diabetes*. 2005 Jul 1;54(7):1907–13.
188. Lê KA, Faeh D, Stettler R, Ith M, Kreis R, Vermathen P, et al. A 4-Wk High-Fructose Diet Alters Lipid Metabolism Without Affecting Insulin Sensitivity Or Ectopic Lipids In Healthy Humans. *Am J Clin Nutr*. 2006;84(6):1374–9.
189. Connolly KD, Guschina IA, Yeung V, Clayton A, Draman MS, Von Ruhland C, et al. Characterisation Of Adipocyte-Derived Extracellular Vesicles Released Pre- And Post-Adipogenesis. *J Extracell Vesicles*. 2015 Jan 24;4(1):29159.
190. Durcin M, Fleury A, Taillebois E, Hilairet G, Krupova Z, Henry C, et al. Characterisation Of Adipocyte-Derived Extracellular Vesicle Subtypes Identifies Distinct Protein And Lipid Signatures For Large And Small Extracellular

Vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2017 Apr 10;6(1):1305677.

191. Komai AM, Brännmark C, Musovic S, Olofsson CS. PKA-Independent CAMP Stimulation Of White Adipocyte Exocytosis And Adipokine Secretion: Modulations By Ca²⁺ And ATP. *J Physiol*. 2014 Dec 1;592(23):5169–86.
192. Declercq V, D'Eon B, McLeod RS. Fatty Acids Increase Adiponectin Secretion Through Both Classical And Exosome Pathways. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2015 May 27;1851(9):1123–33.
193. Le MT, Frye RF, Rivard CJ, Cheng J, McFann KK, Segal MS, et al. Effects Of High-Fructose Corn Syrup And Sucrose On The Pharmacokinetics Of Fructose And Acute Metabolic And Hemodynamic Responses In Healthy Subjects. *Metabolism*. 2012 May;61(5):641–51.
194. Sugimoto K, Hosotani T, Kawasaki T, Nakagawa K, Hayashi S, Nakano Y, et al. Eucalyptus Leaf Extract Suppresses The Postprandial Elevation Of Portal, Cardiac And Peripheral Fructose Concentrations After Sucrose Ingestion In Rats. *J Clin Biochem Nutr*. 2010 May;46(3):205–11.
195. Groot M, Lee H. Sorting Mechanisms For MicroRNAs Into Extracellular Vesicles And Their Associated Diseases. *Cells*. 2020 Apr 22;9(4):1044.
196. Shurtleff MJ, Temoche-Diaz MM, Karfilis K V., Ri S, Schekman R. Y-Box Protein 1 Is Required To Sort MicroRNAs Into Exosomes In Cells And In A Cell-Free Reaction. *Elife*. 2016 Aug 25;5(AUGUST):e19276.
197. Esau C, Kang X, Peralta E, Hanson E, Marcusson EG, Ravichandran L V., et M. en C. Adrián Hernández Díaz Couder. Tesis Doctorado en Biología Experimental.

- al. MicroRNA-143 Regulates Adipocyte Differentiation. *J Biol Chem*. 2004 Dec 10;279(50):52361–5.
198. Wang T, Li M, Guan J, Li P, Wang H, Guo Y, et al. MicroRNAs MiR-27a And MiR-143 Regulate Porcine Adipocyte Lipid Metabolism. *Int J Mol Sci*. 2011 Nov 15;12(11):7950–9.
199. Ramzan F, D’Souza RF, Durainayagam BR, Milan AM, Markworth JF, Miranda-Soberanis V, et al. Circulatory MiRNA Biomarkers Of Metabolic Syndrome. *Acta Diabetol*. 2020 Feb 21;57(2):203–14.
200. Sánchez-Lozada LG, Mu W, Roncal C, Sautin YY, Abdelmalek M, Reungjui S, et al. Comparison Of Free Fructose And Glucose To Sucrose In The Ability To Cause Fatty Liver. *Eur J Nutr*. 2010 Feb;49(1):1–9.
201. Sheludiakova A, Rooney K, Boakes RA. Metabolic And Behavioural Effects Of Sucrose And Fructose/Glucose Drinks In The Rat. *Eur J Nutr*. 2012 Jun;51(4):445–54.
202. Evans RA, Frese M, Romero J, Cunningham JH, Mills KE. Fructose Replacement Of Glucose Or Sucrose In Food Or Beverages Lowers Postprandial Glucose And Insulin Without Raising Triglycerides: A Systematic Review And Meta-Analysis. *Am J Clin Nutr*. 2017 Aug 1;106(2):506–18.
203. Kilic ID, Dodurga Y, Uludag B, Alihanoglu YI, Yildiz BS, Enli Y, et al. MicroRNA -143 And -223 In Obesity. *Gene*. 2015;560(2):140–2.
204. Wen D, Qiao P, Wang L. Circulating MicroRNA-223 As A Potential Biomarker M. en C. Adrián Hernández Díaz Couder. Tesis Doctorado en Biología Experimental.
-

- For Obesity. *Obes Res Clin Pract.* 2015;9(4):398–404.
205. Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, et al. Plasma MicroRNA Profiling Reveals Loss Of Endothelial MiR-126 And Other MicroRNAs In Type 2 Diabetes. *Circ Res.* 2010;107(6):810–7.
206. Guan X, Gao Y, Zhou J, Wang J, Zheng F, Guo F, et al. MiR-223 Regulates Adipogenic And Osteogenic Differentiation Of Mesenchymal Stem Cells Through A C/EBPs/MiR-223/FGFR2 Regulatory Feedback Loop. *Stem Cells.* 2015 May 1;33(5):1589–600.
207. Liu B, Qin L, Liu A, Uchiyama S, Ueno T, Li X, et al. Prevalence Of The Equol-Producer Phenotype And Its Relationship With Dietary Isoflavone And Serum Lipids In Healthy Chinese Adults. *J Epidemiol.* 2010;20(5):377–84.
208. Kanneganti TD, Dixit VD. Immunological Complications Of Obesity. Vol. 13, *Nature Immunology.* *Nat Immunol*; 2012. p. 707–12.
209. Chuang TY, Wu HL, Chen CC, Gamboa GM, Layman LC, Diamond MP, et al. MicroRNA-223 Expression Is Upregulated In Insulin Resistant Human Adipose Tissue. *J Diabetes Res.* 2015;2015.
210. Zhuang G, Meng C, Guo X, Cheruku PS, Shi L, Xu H, et al. A Novel Regulator Of Macrophage Activation: MiR-223 In Obesity-Associated Adipose Tissue Inflammation. *Circulation.* 2012;125(23):2892–903.
211. Bauernfeind F, Rieger A, Schildberg FA, Knolle PA, Schmid-Burgk JL, Hornung V. NLRP3 Inflammasome Activity Is Negatively Controlled By MiR-223. *J M. en C. Adrián Hernández Díaz Couder. Tesis Doctorado en Biología Experimental.*
-

Immunol. 2012;189(8):4175–81.

212. Khalyfa A, Kheirandish-Gozal L, Bhattacharjee R, Khalyfa AA, Gozal D. Circulating MicroRNAs As Potential Biomarkers Of Endothelial Dysfunction In Obese Children. *Chest*. 2016;149(3):786–800.
213. Li Z, Jin C, Chen S, Zheng Y, Huang Y, Jia L, et al. Long Non-Coding RNA MEG3 Inhibits Adipogenesis And Promotes Osteogenesis Of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Via MiR-140-5p. *Mol Cell Biochem*. 2017 Sep 1;433(1–2):51–60.
214. Mohany KM, Al Rugaie O, Al-Wutayd O, Al-Nafeesah A, Saleem TH. Association Between Circulating MicroRNAs 486, 146b And 15b And Serum Betatrophin Levels In Obese; Type 2 Diabetic And Non-Diabetic Children. *BMC Endocr Disord*. 2020 Sep 29;20(1):1–9.
215. Al-Khalaf HH, Amir M, Al-Mohanna F, Tulbah A, Al-Sayed A, Aboussekhra A. Obesity And P16INK4A Downregulation Activate Breast Adipocytes And Promote Their Protumorigenicity. *Mol Cell Biol*. 2017 Sep 1;37(17).
216. Jeong Kim Y, Jin Hwang S, Chan Bae Y, Sup Jung J. MiR-21 Regulates Adipogenic Differentiation Through The Modulation Of TGF- β Signaling In Mesenchymal Stem Cells Derived From Human Adipose Tissue. *Stem Cells*. 2009;27(12):3093–102.
217. 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 May
22;5(1):1–11.

