



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**MicroRNAs circulantes asociados a diabetes
mellitus tipo 2 con expresión alterada en
mexicanos adultos con sobrepeso y obesidad**

Tesis que presenta

Julián Rosendo Ávila Delgadillo

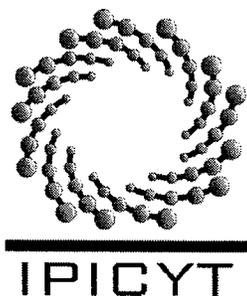
Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de la tesis:

Dr. Luis A. Salazar Olivo

San Luis Potosí, S.L.P., noviembre de 2016



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "***MicroRNAs circulantes asociados a diabetes mellitus tipo 2 con expresión alterada en mexicanos adultos con sobrepeso y obesidad***" presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Julián Rosendo Ávila Delgadillo** y aprobada el **veintinueve de noviembre del dos mil dieciséis** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Luis Antonio Salazar Olivo
Director de la tesis

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Rubén Hipólito López Revilla
Miembro del Comité Tutorial

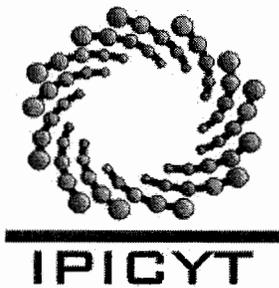


Créditos Institucionales

Esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Medica y Pecuaria de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., con apoyo financiero de FOMIX-SLP (FMSLP-2012-C01-195024), bajo la dirección del Dr. Luis A. Salazar Olivo. y se redactó en el formato de un artículo de investigación original siguiendo las instrucciones para autor de la revista PLOS ONE, editada por Public Library of Science.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-333132).

Agradecemos a los doctores Rubén López Revilla e Irene Castaño Navarro (IPICYT) sus valiosos comentarios y al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Medica y Ambiental (LANBAMA) por permitirnos el uso de sus equipos.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 160 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 29 días del mes de noviembre del año 2016, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Rubén Hipólito López Revilla	Presidente	IPICYT
Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro	Secretaria	IPICYT
Dr. Luis Antonio Salazar Olivo	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Julián Rosendo Ávila Delgadillo

sobre la Tesis intitulada:

MicroRNAs circulantes asociados a diabetes mellitus tipo 2 con expresión alterada en mexicanos adultos con sobrepeso y obesidad

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Luis Antonio Salazar Olivo

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 13:15 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 29 días del mes de noviembre de 2016.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatoria

Para Nico.

Por y para ti, que sin saberlo eres mi gran motivación.

“Ten confianza. No en mí, claro, ni en ningún sabio, aunque sea de los de verdad, ni en alcaldes, curas ni policías. No en dioses ni diablos, ni en máquinas, ni en banderas. Ten confianza en ti mismo. En la inteligencia que te permitirá ser mejor de lo que ya eres y en el instinto de tu amor, que te abrirá a merecer la buena compañía.”

Fernando Savater.

Agradecimientos

Primeramente, agradezco ampliamente al Dr. Luis Salazar por haber confiado en mí y haberme dado la oportunidad de integrarme a su equipo de trabajo, así como por todas las pláticas, consejos y regaños que de alguna u otra forma siempre tuvieron como fin el aprendizaje y la formación.

A Angélica Montoya y Paty Rodil por su paciencia y dedicación, por ser mis mentoras y amigas y compartirme su conocimiento y experticia.

Al Dr. Rubén López, por las pláticas y excelentes consejos que con entusiasmo siempre nos comparte.

A Mireya Sánchez por el apoyo técnico y el no tan técnico que nos brinda a los habitantes del laboratorio.

A todos los grandes amigos que hice en esta gran etapa, por las experiencias, sus oportunas críticas, enseñanzas y buenos momentos que compartimos a Ro, Juan Carlos, Víctor, Marco, Mónica, Karen, Clara, Cindy, Mariel, Pao, Nelly, Alan, Tomas, Esaú, Abraham, Livie, Emma Fitzya, Kevin, David y Andrew.

A Marilu por ser mi compañera, apoyo y confidente, cómplice y amiga.

Y finalmente a mi familia, a mis padres y hermanas a los cuales amo y quienes me dan su apoyo incondicional en cada locura que se me ocurre.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Resumen	ix
Abstract	x
Introducción	4
Materiales y métodos	8
Población de estudio y recolección de muestras	8
Selección de miRNAs circulantes asociados a DM2 y obesidad	8
Extracción, purificación y cuantificación de miRNAs	9
Diseño de oligonucleótidos iniciadores específicos	10
Cuantificación de miRNAs por RT-qPCR	13
Predicción de genes blanco y vías metabólicas asociadas	13
Análisis estadístico	14
Resultados	16
MiRNAs asociados a DM2 y obesidad	16
Características del grupo de estudio	16
Obtención de miRNAs circulantes a partir de muestras de sangre seca	19
Expresión relativa de miR-29a-5p, 126-3p, 320a, 454-3p y 486-5p en adultos con diferente IMC	20
Expresión diferencial de miRNAs en hombres y mujeres	20
Correlación entre variables moleculares y clínicas	21
Predicción de genes blanco y vías metabólicas asociadas a los miRNAs analizados	22
Discusión	30
Pies de Figuras	36
Bibliografía	38
Figuras	47
Figura 1. Evaluación de la calidad y cuantificación de los miRNAs circulantes por electroforesis capilar	47
Figura 2. Expresión relativa por IMC de miRNAs circulantes asociados a diabetes mellitus tipo 2 y obesidad en adultos jóvenes mexicanos con sobrepeso y obesidad	48
Figura 3. Expresión relativa por géneros de miRNAs circulantes asociados a diabetes mellitus tipo 2 y obesidad en adultos jóvenes mexicanos con sobrepeso y obesidad	49
Figura 4. Correlación de parámetros clínicos y niveles de expresión relativa de miRNAs circulantes asociados a DM2 y obesidad	50
Figura 5. Correlación de tensión arterial y niveles de expresión relativa de miRNAs circulantes asociados a DM2 y obesidad	51

Figura 6. Diagramas de Venn que indican los posibles genes blanco predichos para cada miRNA por los algoritmos Diana MicroT, miRanda, miRDB, miRGate, TargetScan, PITA y miRNAMap	52
Figura 7. Concentración de miRNAs circulantes asociados a DM2 en mexicanos adultos.	53
Material Suplementario	54

Resumen

MicroRNAs circulantes asociados a diabetes mellitus tipo 2 con expresión alterada en mexicanos adultos con sobrepeso y obesidad

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es un trastorno metabólico crónico caracterizado por hiperglucemia e intolerancia a la glucosa. El 9.17% de los adultos mexicanos ha sido diagnosticado con DM2 y siete de cada 10 tienen sobrepeso u obesidad, dos condiciones asociadas a la DM2. La DM2 es una enfermedad inicialmente asintomática que requiere diagnóstico temprano y predictivo para su prevención, pero no hay marcadores adecuados para su pronóstico. Los microRNAs (miRNAs) regulan la expresión de más del 60% de los genes de mamíferos y la accesibilidad de sus formas circulantes los hace candidatos idóneos como marcadores clínicos tempranos. Diversos estudios indican que los miRNAs miR-29a-5p, 126-3p, 141-3p, 142-3p, 200c-3p, 221-3p, 320a, 454-3p, 486-5p y 523-3p se asocian a DM2 y obesidad. Para determinar su utilidad como marcadores tempranos de DM2 y obesidad los cuantificamos por RT-qPCR en sangre de adultos con normopeso, sobrepeso y obesidad y exploramos in silico sus posibles genes blanco y las vías de señalización en las que podrían participar. En sujetos obesos miR-486-5p y miR-126-3p aumentaron significativamente 2.02 y 5.90 veces ($P < 0.0001$), y el segundo aumentó 6.23 veces ($P < 0.0001$) en sujetos con sobrepeso. MiR-454-3p y miR-320a disminuyeron en sujetos con sobrepeso 1.9 y 2 veces y en individuos obesos 2.2 y 1.8 veces, respectivamente ($P < 0.0001$). Los genes blanco predichos para miR-126-3p participan en glucólisis y gluconeogénesis, los predichos para miR-454-3p en la señalización de TGF- β , y los predichos para miR-486-5p en la señalización por PI3K-Akt. Nuestros resultados sugieren que estos cuatro miRNAs asociados a la obesidad podrían ser útiles para el diagnóstico temprano de DM2.

Palabras clave. Sobrepeso, obesidad, micro RNAs circulantes, miR-29a-5p, miR-126-3p, miR-320a, miR-454-3p miR-486-5p.

Abstract

Circulating microRNA associated to diabetes mellitus type 2 with altered expression in overweight and obese Mexican adults

Type 2 Diabetes mellitus (T2DM) is a chronic metabolic disorder, characterized by hyperglycemia and glucose intolerance. 9.17% of Mexican adult is diagnosed with T2DM and seven out of 10 are overweight or obese, two etiologic conditions of T2DM. T2DM is initially asymptomatic disease, which requires an early and predictive diagnosis for its prevention and treatment, but no optimal markers have been identified. MicroRNAs (miRNAs) regulate the expression of more than 60% of the genes in mammals and the accessibility of circulating forms makes them suitable early clinical markers. Several researches, indicate that miRNAs miR-29a-5p, 126-3p, 141-3p, 142-3p, 200c-3p, 221-3p, 320a, 454-3p, 486-5p and 523-3p are associated to T2DM and obesity. To determine their utility as early markers, we quantified them by RT-PCR in the blood of adults with different body mass index and we explored, *in silico*, the genes and signaling pathways in which they may be involved. MiR-486-5p and miR-126-3p content increased in obesity 2.02 and 5.90 fold ($P < 0.0001$), respectively, and the latter also increased in overweight 6.23 fold ($P < 0.0001$). MiR-454-3p and miR320a decreased in overweight 1.9 and 2 fold, and decrease 2.2 and 1.8 fold in obesity, respectively ($P < 0.0001$). The target genes predicted for miR-126-3p are involved in glycolysis and gluconeogenesis, those predicted for miR-454-3p in TGF- β signaling, and those predicted for miR-486-5p play a part in the signaling by PI3K-Akt. Our results suggest that these four miRNAs participate in the development of obesity and T2DM and may be useful in the early diagnosis of both conditions.

Key words. overweight, obesity, circulating microRNA, miR-29a-5p, miR-126-3p, miR-320a, miR-454-3p miR-486-5p.

2 **MicroRNAs circulantes asociados a diabetes mellitus tipo**
3 **2 con expresión alterada en mexicanos adultos con**
4 **sobrepeso y obesidad**

5

6

7

8

9

10 Julián Ávila-Delgadillo, Luis Salazar-Olivo*

11

12

13

14 División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y

15 Tecnológica, Camino a la Presa San José 2055 Col. Lomas, C.P. 78216, S.L.P.,

16 México

17

18

19

20 ***Autor para correspondencia:**

21 E-mail: olivo@ipicyt.edu.mx (LAS-O)

22

Resumen

23 La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es un trastorno metabólico crónico
24 caracterizado por hiperglucemia e intolerancia a la glucosa. El 9.17% de los
25 adultos mexicanos ha sido diagnosticado con DM2 y siete de cada 10 tienen
26 sobrepeso u obesidad, dos condiciones asociadas a la DM2. La DM2 es una
27 enfermedad inicialmente asintomática que requiere diagnóstico temprano y
28 predictivo para su prevención, pero no hay marcadores adecuados para su
29 pronóstico. Los microRNAs (miRNAs) regulan la expresión de más del 60% de los
30 genes de mamíferos y la accesibilidad de sus formas circulantes los hace
31 candidatos idóneos como marcadores clínicos tempranos. Diversos estudios
32 indican que los miRNAs miR-29a-5p, 126-3p, 141-3p, 142-3p, 200c-3p, 221-3p,
33 320a, 454-3p, 486-5p y 523-3p se asocian a DM2 y obesidad. Para determinar su
34 utilidad como marcadores tempranos de DM2 y obesidad los cuantificamos por
35 RT-qPCR en sangre de adultos con normopeso, sobrepeso y obesidad y
36 exploramos in silico sus posibles genes blanco y las vías de señalización en las
37 que podrían participar. En sujetos obesos miR-486-5p y miR-126-3p aumentaron
38 significativamente 2.02 y 5.90 veces ($P < 0.0001$), y el segundo aumentó 6.23
39 veces ($P < 0.0001$) en sujetos con sobrepeso. MiR-454-3p y miR-320a
40 disminuyeron en sujetos con sobrepeso 1.9 y 2 veces y en individuos obesos 2.2 y
41 1.8 veces, respectivamente ($P < 0.0001$). Los genes blanco predichos para miR-
42 126-3p participan en glucólisis y gluconeogénesis, los predichos para miR-454-3p
43 en la señalización de TGF- β , y los predichos para miR-486-5p en la señalización

44 por PI3K-Akt. Nuestros resultados sugieren que estos cuatro miRNAs asociados a
45 la obesidad podrían ser útiles para el diagnóstico temprano de DM2.

46

47 **Palabras clave.** Sobrepeso, obesidad, micro RNAs circulantes, miR-29a-5p, miR-
48 126-3p, miR-320a, miR-454-3p miR-486-5p.

49

50 **Introducción**

51 La diabetes mellitus es un grupo de disfunciones metabólicas
52 desencadenadas por la hiperglucemia resultante de defectos en la secreción de
53 insulina, y/o la respuesta tisular a esta hormona. La hiperglucemia crónica se
54 asocia con el daño a largo plazo en múltiples órganos, especialmente ojos,
55 riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos [1]. De acuerdo con la Organización
56 Mundial de la Salud (OMS), en el año 2014 el 9% de la población mundial padecía
57 diabetes y el 90% de estos casos correspondía a diabetes mellitus tipo 2 (DM2),
58 con el doble de casos existentes en 1980 [2]. En México, el 9.17% de la población
59 adulta (6.4 millones de personas) ha sido diagnosticada con DM2 [3].

60 La ineficiente acción de la insulina resulta de su insuficiente secreción y/o la
61 incapacidad de los tejidos blanco para responder a la hormona. La deficiencia en
62 la secreción y los defectos en la acción de la insulina frecuentemente coexisten en
63 el mismo paciente, y no está claro cuál anomalía es la causa primaria de la
64 hiperglucemia [1]. Además, la mayoría de los pacientes con DM2 son obesos o
65 tienen una proporción excesiva de grasa corporal, acumulada principalmente en la
66 región abdominal [4]. La obesidad, por sí misma, causa cierto grado de resistencia
67 a la insulina [5] y un proceso inflamatorio de bajo grado [6], dos alteraciones
68 asociadas a DM2.

69 El sobrepeso y la obesidad se definen como la acumulación excesiva de
70 grasa perjudicial para la salud [7]. La prevalencia de obesidad ha aumentado de
71 forma vertiginosa en todo el mundo. De acuerdo con la OMS el 39% de la
72 población mundial mayor de 18 años tiene sobrepeso u obesidad. En México, siete

73 de cada 10 adultos tienen sobrepeso u obesidad [3]. Por lo tanto, el incremento de
74 la DM2 que es una enfermedad inicialmente asintomática requiere un diagnóstico
75 temprano y predictivo para su prevención y tratamiento.

76 Actualmente no puede predecirse y prevenirse la DM2 porque la
77 enfermedad se identifica por sus signos y síntomas, una vez que se ha
78 desarrollado. Las variables clínicas para diagnosticar DM2 son niveles de glucosa
79 sanguínea en ayuno ≥ 126 mg/dl, niveles de hemoglobina glicada (HbA1c) $\geq 6.5\%$
80 o péptido C sérico > 2 ng/ml. Las características físicas consideradas como
81 factores de riesgo para el desarrollo de DM2 son el índice de masa corporal (IMC)
82 ≥ 25 kg/m², índice cintura-cadera > 0.8 en mujeres y > 1 en hombres, presión
83 arterial $\geq 140/90$ mmHg y el género. Estas características, sumadas al consumo
84 de dietas hipercalóricas, al tabaquismo y al sedentarismo no permiten predecir la
85 enfermedad, sino solo diagnosticarla y dar seguimiento a su progresión [8].

86 La identificación de marcadores que permitan el diagnóstico temprano y
87 eficaz de la DM2 ha sido una meta de numerosos grupos de investigación
88 alrededor del mundo. En este contexto, los microRNAs (miRNAs) son moléculas
89 con características adecuadas como marcadores idóneos: accesibles por medios
90 mínimamente invasivos, específicos, robustos, de vida media prolongada y
91 cuantificables de manera reproducible.

92 Los miRNAs son moléculas de RNA no codificante de 22 nucleótidos de
93 longitud en promedio. Su función es regular la expresión de aproximadamente el
94 60% de los genes de mamíferos [9,10] mediante la degradación de los RNA
95 mensajeros (mRNAs) y/o la represión de la traducción [11,12].

96 La biogénesis de los miRNAs es un proceso de múltiples pasos
97 estrictamente regulados. La desregulación está asociada a muchas
98 enfermedades, incluidas diabetes, afecciones cardiovasculares y metabólicas,
99 diversos tipos de cáncer, trastornos neurodegenerativos y autoinmunes [12,13]. La
100 naturaleza de las interacciones entre los miRNAs y los mRNAs permite que un
101 solo miRNA tenga el potencial de regular la expresión post-transcripcional de una
102 amplia cantidad de genes blanco. Por lo tanto, la alteración en la función de un
103 solo miRNA puede resultar en múltiples condiciones patológicas [14].

104 Los miRNAs han mostrado tener un alto valor predictivo como marcadores
105 que pueden detectarse antes de la manifestación de diversas enfermedades,
106 incluso por años [13]. Además, sus niveles de expresión correlacionan con el
107 estado fisiológico o patológico del organismo [15–17]. Los miRNAs son muy
108 accesibles, pueden ser aislados del suero, son estables, reproducibles y
109 consistentes entre individuos [18].

110 Diversos estudios en otras poblaciones han reportado perfiles de miRNAs
111 expresados diferencialmente en individuos con DM2 [19,20], en etapas tempranas
112 del desarrollo de DM2 [21] o en estados metabólicos asociados a DM2 [20,22,23].
113 Sin embargo, no hay consenso entre los grupos de miRNAs implicados en el
114 desarrollo de DM2 y sus consecuencias metabólicas.

115 La ausencia de estudios en población mexicana, usando miRNAs como
116 marcadores tempranos para el desarrollo de DM2, abre una ventana de
117 oportunidades en su estudio y la búsqueda de posibles aplicaciones.

118 Así, el objetivo del presente trabajo fue correlacionar el contenido de
119 miRNAs séricos en adultos jóvenes mexicanos con normopeso, sobrepeso y

120 obesidad y correlacionarlo con el estado de salud y estilo de vida para evaluar su

121 potencial como marcadores tempranos en el desarrollo de DM2 y sus

122 complicaciones.

123

124 **Material y Métodos**

125 **Población de estudio y recolección de muestras**

126 Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto Potosino de
127 Investigación Científica y Tecnológica, de acuerdo a la declaración de Helsinki
128 (1975), actualización 2013. Todos los sujetos de estudio firmaron un
129 consentimiento informado antes de participar en el estudio. Integramos una
130 cohorte de 106 voluntarios conformada por hombres y mujeres nulíparas entre 20
131 y 35 años de edad (26.8 ± 3.59). Dividimos a la población por género, y
132 posteriormente la agrupamos en tres categorías a partir del IMC: normopeso (IMC
133 18.5-24.9), sobrepeso (IMC 25-29.9) y obesidad (IMC > 30), y conformamos seis
134 grupos con $n = 10$. Con el consentimiento de los voluntarios obtuvimos su historia
135 clínica, recabando datos clínicos y de estilo de vida. Además, de cada uno de los
136 voluntarios colectamos por punción capilar seis gotas de sangre en papel filtro
137 Whatman 903 Proteinsaver. La información fue analizada anónimamente; los
138 investigadores no tuvieron conocimiento de la identidad de las muestras u otra
139 información clínica excepto por la declarada en este manuscrito.

140

141 **Selección de miRNAs circulantes asociados a DM2 y**

142 **obesidad**

143 Para seleccionar miRNAs con potencial uso como marcadores de DM2
144 utilizamos la base de datos PubMed de los Institutos Nacionales de Salud de
145 Estados Unidos de América, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). Revisamos

146 estudios publicados entre enero de 2000 y marzo de 2015 utilizando los términos
 147 miRNA y diabetes, miRNA y obesidad, miRNA y resistencia insulina y miRNA y
 148 adipogénesis. Los criterios de elección fueron: estudios donde se evaluaron
 149 miRNAs circulantes, reportes donde los miRNAs tuvieran un cambio de expresión
 150 significativo. Del total de trabajos donde se evaluó la expresión de miRNAs
 151 circulantes asociados a estas condiciones seleccionamos 10 miRNAs candidatos
 152 (Tabla 1).

153

154 **Tabla 1. MicroRNAs seleccionados como predictores potenciales de**
 155 **obesidad y DM2**

miRNA	Proceso o actividad asociada	Referencias
hsa-mir-29a-5p	Resistencia a la insulina, transporte de glucosa, adipogénesis	[13, 24]
hsa-mir-126-3p	Desarrollo de páncreas, regulación de glucosa, obesidad	[13, 19, 25]
hsa-mir-141-3p	Regulación de la proliferación celular, obesidad, metabolismo de adipocitos	[26 - 28]
hsa-mir-142-3p	Regulación de glucosa, obesidad, sensibilidad insulina	[25, 29, 30]
hsa-mir-200c-3p	Obesidad, regulador mitocondrial, plasticidad celular	[28, 31]
hsa-mir-221-3p	Apoptosis, metabolismo de lípidos, metabolismo de glucosa	[29, 32, 33]
hsa-mir-320a	Resistencia a la insulina, obesidad	[19, 20, 34]
hsa-mir-486-5p	Adipogénesis, proliferación celular, diabetes	[29, 33, 35, 36]
hsa-mir-523-3p	Embarazo, obesidad, diabetes, cáncer	[28, 37]

156

157 **Extracción, purificación y cuantificación de miRNAs**

158 Obtuvimos miRNAs de sangre seca en papel Whatman utilizando el
 159 protocolo de extracción de Rodil García [38]. Enriquecimos la fracción de RNAs
 160 pequeños con el kit de extracción mirVana (Ambion, California, USA). En breve,
 161 rehidratamos la muestra de sangre (dos gotas) con 300 µl de amortiguador TE y

162 agitamos a 2,000 rpm a 4°C por 30 min en un vórtex. Después agregamos Trizol
163 (Ambion, California, USA) y cloroformo, agitamos en vórtex a 2,000 rpm a 25°C
164 por 5 min y centrifugamos a 13,000 rpm a 4°C durante 15 min. Colectamos 600 µl
165 de la fase acuosa a la que añadimos un volumen igual de etanol a temperatura
166 ambiente. Mezclamos por inversión y transferimos a una columna de fibra de vidrio
167 (kit mirVana) y centrifugamos a 10,000 rpm a temperatura ambiente por 15 s.
168 Lavamos la columna con etanol e isopropanol seguido de un lavado con solución
169 2/3 (kit mirVana). Eluimos con 100 µl de agua libre de nucleasas a 95°C y
170 centrifugamos a 13,400 rpm a temperatura ambiente por 30 seg. El líquido filtrado
171 se almacenó a -80°C hasta su uso.

172 Cuantificamos el RNA en las muestras por espectrofotometría considerando
173 una relación 260 nm/280 nm entre 1.8 y 2.0 como RNA de calidad aceptable.
174 Adicionalmente analizamos cualitativa y cuantitativamente las muestras por
175 electroforesis capilar con el equipo Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent
176 Technologies, California, USA) utilizando el kit Small RNA (Agilent Technologies,
177 California, USA) y el ensayo Small RNA de acuerdo con las instrucciones del
178 fabricante (Figura 1).

179

180 **Diseño de oligonucleótidos iniciadores específicos**

181 Diseñamos los iniciadores empleados en la identificación y cuantificación de
182 los miRNAs con el programa miRNA Primer Design Tool [39] utilizando las
183 secuencias de los miRNAs maduros obtenidas de la versión 21 de la base de
184 datos miRBase [40]. Para la retrotranscripción de los miRNAs diseñamos

185 iniciadores “stem loop” mediante un análisis *in silico* para confirmar la formación
186 de las estructuras secundarias adecuadas utilizando el servidor OligoAnalyzer 3.1
187 (<https://www.idtdna.com/calc/analyze>) (Tabla 2). Para la cuantificación (qPCR)
188 diseñamos iniciadores sentido específico y un iniciador antisentido universal.
189

190 **Tabla 2. Secuencias de iniciadores diseñados para identificar y cuantificar los miRNAs de interés**

miRNA	Iniciador Stem Loop	Iniciador sentido específico
Normalización		
hsa-mir-16-5p	5' - GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCGCCAA - 3'	5' - TGTTTTTTTTTGTAGCAGCACGTAAATA - 3'
hsa-mir-24	5' - GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACACTGAT - 3'	5' - GTTTTGTTGCCTACTGAGCTGA - 3'
hsa-mir-106a	5' - GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCTACCT - 3'	5' - TGGGTAAAAGTGCTTACAGTGC - 3'
U6 snRNA	Rev 5'- AAAATATGGAACGCTTCACGAAT – 3'	Fwd 5'- CGCTTCGGCAGCACATATACTA – 3'
Blanco		
hsa-mir-29a-5p	5' - GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCTGAAC - 3'	5' - GTTGGGACTGATTTCTTTTGGT - 3'
hsa-mir-126-3p	5' - GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCGCATT - 3'	5' - TGTTTTTGTTCGTACCGTGAGTAAT - 3'
hsa-mir-141-3p	5' - GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCCATCT - 3'	5' - GGGGGTAAACTGTCTGGTAA - 3'
hsa-mir-142-3p	5' - GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCTCCATA - 3'	5' - TGGTTTGGGG TGTAGTGTTCCTAC - 3'
hsa-mir-200c-3p	5' - GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCTCCATC - 3'	5' - TGGGTTAATACTGCCGGGTAAT - 3'
hsa-mir-221-3p	5' - GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACGAAACC - 3'	5' - GGAGCTACATTGTCTGCTG - 3'
hsa-mir-320a	5' - GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCTCGCCC - 3'	5' - GGGAAAAGCTGGGTTGAGA - 3'
hsa-mir-454-3p	5' - GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACACCCTA - 3'	5' - GGTGTGGTAGTGCAATATTGCTTA - 3'
hsa-mir-486-5p	5' - GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCTCGGG - 3'	5' - TGTTTTTTTTTTCCTGTACTGAGCTG - 3'
hsa-mir-523-3p	5' - GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCAGAAA - 3'	5' - GGGTCTCTAGAGGGAAGCG - 3'
Antisentido Universal	5' - GTGCAGGGTCCGAGGT - 3'	

191

192 **Cuantificación de miRNAs por RT-qPCR**

193 Sintetizamos los cDNA utilizando los iniciadores “stem loop” (Tabla 2) a
194 concentración final de 100 μ M, dNTP’s (Promega, Wisconsin, USA) 10 mM, 200
195 unidades de transcriptasa reversa M-MLV (Promega, Wisconsin, USA), y un
196 volumen fijo de RNA de 2 μ l. Incubamos las mezclas siguiendo el protocolo de
197 Rong-Mey et al. [41] con las siguientes condiciones: 16°C por 30 min, 60 ciclos de
198 30°C por 30 s 42°C por 30 seg y 50°C por 1 segundo; finalmente un ciclo de 85°C
199 por 5 min. Las reacciones se realizaron en un termociclador Touchgene Gradient
200 (Techne, Staffordshire, UK).

201 Posteriormente cuantificamos los miRNAs de interés por qPCR utilizando
202 los iniciadores específicos y el iniciador antisentido universal a concentración final
203 de 100 μ M, la mezcla QuantiTech Probe PCR Master Mix (Qiagen, California,
204 USA) y la sonda Universal Probe Library No. 21 (Roche Diagnostics, Basel, CH)
205 en un termociclador LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics, Basel, CH). Para
206 confirmar que la cantidad de sangre utilizada era suficiente para la identificación y
207 cuantificación de los iniciadores específicos utilizamos sangre fresca como control
208 positivo de amplificación.

209

210 **Predicción de genes blanco y vías metabólicas asociadas**

211 Identificamos los posibles genes blanco de los miRNAs mediante un
212 análisis *in silico* empleando cuatro de los siguientes algoritmos: Diana MicroT [42],
213 miRanda [43,44], miRDB [45,46], TargetScan [47,48], PITA [49], miRGate [50] y
214 miRNAMap [51]. Agrupamos los genes blanco predichos para cada miRNA por

215 cuatro de los algoritmos en diagramas de Venn utilizando el programa Venny 2.1
216 [52]. Seleccionamos los genes predichos para cada miRNA por dos o más
217 algoritmos y los mapeamos en la Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
218 (KEGG) utilizando la aplicación de análisis KEGG Mapper. Las vías metabólicas y
219 de señalización resultantes del mapeo se enriquecieron por una prueba de Fischer
220 (intervalo de confianza 95%) y una posterior corrección de tasa de falsos
221 descubrimientos (FDR) para eliminar falsos positivos utilizando el programa R
222 versión 3.2.2 (R Development Core Team, 2015).

223

224 **Análisis estadístico**

225 Cuantificamos la expresión relativa de los miRNAs candidatos por el
226 método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [53] usando como control de normalización la media geométrica
227 de los miRNAs miR-16-5p y miR-106a-5p, los cuales presentaron una menor
228 dispersión entre los grupos de estudio y un valor de estabilidad de 0.017 de
229 acuerdo al algoritmo NormFinder [54]. Posteriormente realizamos un análisis de
230 varianza (ANOVA de una vía) seguido de una prueba *post hoc* de diferencias
231 honestamente significativas (HSD) de Tukey (intervalo de confianza 95%). El
232 análisis se realizó con el programa Prism 6 (GraphPad, CA, USA, 2012).

233 La correlación entre las variables clínicas se calculó usando el coeficiente
234 de correlación de Pearson (R) controlado para la expresión relativa de los miRNAs
235 (intervalo de confianza 95%). Para este análisis utilizamos los miRNAs que
236 mostraron una expresión diferencial entre los distintos grupos de IMC, así como
237 con las variables cuantitativas de la historia clínica (IMC, perímetro abdominal, %

238 grasa corporal, glucosa capilar, tensión arterial y peso al nacimiento). El análisis
239 se realizó con el programa Prism 6 (GraphPad, CA, USA, 2012).

240

241

242 **Resultados**

243 **MiRNAs asociados a DM2 y obesidad**

244 La revisión bibliográfica en PubMed permitió reconocer 10 miRNAs
245 circulantes asociados a DM2 y obesidad (Tabla 1): miR-29a-5p, miR-126-3p, miR-
246 141-3p, miR-142-3p, miR-200c-3p, miR-221-3p, miR-320a, miR-454-3p, miR-486-
247 5p y miR-523-3p. No obstante, su asociación con obesidad y DM2, se desconoce
248 su utilidad para pronosticar el desarrollo de ambas condiciones en la población
249 mexicana.

250 **Características del grupo de estudio**

251 Para buscar posibles correlaciones entre la expresión de los miRNAs
252 asociados a DM2 y obesidad con el estado de salud y estilo de vida en una
253 muestra de 106 voluntarios mexicanos de 20 a 35 años de edad con normopeso,
254 sobrepeso y obesidad y posteriormente analizados por género, conformando seis
255 grupos (n = 10). Las características y datos clínicos de los participantes se
256 describen en las Tablas 3 y 4. En resumen, la muestra analizada es una población
257 metabólicamente sana con antecedentes familiares de enfermedades metabólicas
258 como DM2, obesidad e hipertensión arterial.

259

260 **Tabla 3. Características clínicas de la población de estudio**

261

262

263

264

265

266

267

268

269

270

271

272

273

Parámetro clínico	Hombres			Mujeres		
	Normopeso n=10	Sobrepeso n=10	Obesidad n=10	Normopeso n=10	Sobrepeso n=10	Obesidad n=10
Edad (años)	27.1 ± 3.47	27.9 ± 3.98	27.3 ± 3.40	25.1 ± 1.911	25.8 ± 3.99	28.5 ± 4.24
Peso (kg)	67.69 ± 6.26	86.7 ± 7.24	108.39 ± 18.98	53.85 ± 2.74	66.87 ± 5.49	84.11 ± 9.43
Talla (cm)	174.3 ± 6.12	172.7 ± 6.41	175.53 ± 7.38	163.5 ± 3.77	157.53 ± 4.86	161.06 ± 6.80
IMC	22.33 ± 1.13	29.03 ± 0.55	34.823 ± 4.24	20.16 ± 0.63	26.95 ± 1.16	32.31 ± 2.81
Perímetro abdominal (cm)	84.19 ± 5.81	100.05 ± 3.05	116.99 ± 13.59	76.67 ± 3.68	90.4 ± 5.92	101.73 ± 11.26
% Grasa corporal	18.73 ± 3.17	30.86 ± 1.07	36.36 ± 6.11	29.72 ± 1.76	41.87 ± 1.91	47.55 ± 2.48
Presión arterial (mmHg)						
Sistólica	123.3 ± 15.06	136.1 ± 13.21	135.8 ± 15.62	116.4 ± 15.07	114.5 ± 11.16	108.12 ± 39.55
Diastólica	80.8 ± 7.13	89 ± 11.63	91.3 ± 10.76	74.9 ± 5.58	78.44 ± 4.95	85.5 ± 12.23
Frecuencia cardiaca	73.3 ± 6.86	72 ± 10.99	80 ± 11.50	82.6 ± 12.99	79.1 ± 11.47	74.87 ± 15.28
Glucosa capilar (mg/dl)	92.7 ± 11.87	89.9 ± 7.56	98.5 ± 21.60	103.8 ± 19.98	91.5 ± 11.43	112.75 ± 36.18
Peso al nacimiento (g)	3080 ± 523.98	3290 ± 664.07	3431.25 ± 764.8	3215 ± 485.36	3252.8 ± 600.49	3281.25 ± 663.29

274 **Tabla 4. Características cualitativas, historia clínica y estilo de vida de la**
 275 **población de estudio**

Variable clínica	Hombres			Mujeres		
	Normopeso n=10	Sobrepeso n=10	Obesidad n=10	Normopeso n=10	Sobrepeso n=10	Obesidad n=10
Enfermedad Dx (%)						
Afirmativo	10	0	10	0	0	20
Negativo	90	100	90	100	90	80
Actividad física (%)						
Sedentario	30	30	50	60	90	70
Leve	20	40	40	30	0	0
Activo	30	20	10	10	10	30
Muy activo	20	10	0	0	0	0
Tabaquismo (%)						
Afirmativo	20	20	50	10	20	0
Negativo	80	80	50	90	80	100
Suplementación (%)						
Afirmativo	30	40	10	30	10	20
Negativo	70	60	90	70	90	80
Variación peso últimos 6 meses (%)						
Aumento	30	30	10	20	80	80
Reducción	0	30	50	10	0	0
Negativo	70	40	40	70	20	20
Antecedentes familiares (%)						
Diabetes mellitus tipo 2	30	60	50	20	40	40
Obesidad	20	50	30	40	50	60
Hipertensión arterial	30	60	40	50	60	30
Dislipidemia	30	10	20	10	10	0
Enfermedades del corazón	10	20	10	10	0	0
Cáncer	10	0	10	0	10	0
Negativos	40	10	20	20	20	10

276

277

278 Los hombres obesos tuvieron hipertensión arterial con presiones sistólica y
279 diastólica de hasta 11.4 mm de Hg y 12 mm de Hg por encima de los límites
280 normales, respectivamente. En los individuos con sobrepeso las presiones
281 sistólica y diastólica fueron hasta 9.3 mm de Hg y 10.6 mm de Hg superiores al
282 valor normal.

283 Los niveles de glucosa capilar fueron 17.8 mg/dl mayores en la población
284 femenina que en la masculina, siendo más elevados en obesos que en los sujetos
285 con normopeso de ambos géneros, 25.15 mg/dl para el grupo de mujeres y para
286 hombres 39.27 mg/dl.

287

288 **Obtención de miRNAs circulantes a partir de muestras de** 289 **sangre seca**

290 De las muestras de sangre colectadas en papel filtro recuperamos miRNAs
291 con concentraciones superiores a 1 ng/ μ l y una relación RNA/miRNA superior al
292 50%. (Figura 1B).

293 De los 10 miRNAs seleccionados pudimos recuperar cantidades
294 cuantificables para cinco: miR-29a-5p, miR-126-3p, miR-320a, miR-454-3p y miR-
295 486-5p. Los cinco miRNAs restantes no fueron identificados o sus niveles fueron
296 muy bajos para ser cuantificados tanto en sangre seca como en el control de
297 sangre fresca.

298 **Expresión relativa de miR-29a-5p, 126-3p, 320a, 454-3p y**
299 **486-5p**

300 La cuantificación de la expresión mostró que miR-126-3p, miR-320a, miR-
301 454-3p y miR-486-5p se expresaron diferencialmente en la población estudiada.
302 La expresión de miR-29a-5p disminuyó en los grupos de sobrepeso y obesidad,
303 aunque no significativamente respecto al grupo de normopeso ($P < 0.0001$)
304 (Figura 2A). La expresión de miR-126-3p fue significativamente mayor ($P <$
305 0.0001) en el grupo con sobrepeso (6.3 veces) y obesidad (5.9 veces) respecto al
306 grupo con normopeso (Figura 2B). Por el contrario, miR-320a y miR-454-3p
307 mostraron una menor expresión en los grupos con sobrepeso y obesidad que con
308 normopeso ($P < 0.0001$). MiR-320a se expresó sólo 0.5 veces en el grupo con
309 sobrepeso y 0.55 veces en el grupo con obesidad (Figura 2C), en tanto que miR-
310 454-3p se expresó sólo 0.45 veces en los voluntarios con sobrepeso y 0.52 veces
311 en el grupo con obesidad (Figura. 2D). Por su parte, miR-486-5p se expresó solo
312 0.14 veces en el grupo con sobrepeso, pero duplicó en el grupo con obesidad ($P <$
313 0.0001) respecto al grupo con normopeso (Figura 2E).

314

315 **Expresión diferencial de los miRNAs en hombres y**
316 **mujeres**

317 Para profundizar en el análisis de la expresión de estos miRNAs en la
318 población estudiada cuantificamos su expresión por géneros.

319 En este análisis miR-29a-5p no mostró diferencias significativas entre
320 hombres y mujeres ($P < 0.0001$) (Figura 3A). El análisis confirmó la

321 sobreexpresión de miR-126-3p en individuos con sobrepeso y obesidad de ambos
322 géneros respecto a sus contrapartes con normopeso. Para los hombres la
323 expresión de miR-126-3p fue 8.3 veces mayor en sobrepeso y en obesidad fue 6.4
324 veces mayor que en normopeso. De igual forma, la expresión de miR-126-3p para
325 las mujeres con sobrepeso fue cuatro veces mayor y 6.6 veces mayor en el grupo
326 con obesidad respecto al grupo de normopeso (Figura 3B).

327 El análisis para miR-320a confirmó su disminución en las mujeres con
328 sobrepeso y obesidad con respecto al grupo de normopeso, pero no mostró
329 diferencias significativas entre los grupos de hombres (Figura 3C). Asimismo, el
330 análisis de miR-454-3p por género confirmó su disminución en los grupos con
331 sobrepeso de ambos géneros en hombres con obesidad, pero no en el grupo de
332 mujeres con obesidad (Figura 3D).

333 Finalmente, el análisis de miR-486-5p ratificó el aumento en ambos géneros
334 con obesidad observado previamente en la población general, pero no mostró
335 diferencias significativas entre hombres con normopeso y sobrepeso (Figura 3E).

336

337 **Correlación entre variables moleculares y clínicas**

338 Para explorar las relaciones entre los niveles de expresión de los miRNAs
339 analizados con rasgos clínicos asociados a enfermedades metabólicas (IMC,
340 perímetro abdominal, porcentaje de grasa corporal, glucosa capilar, tensión arterial
341 y peso al nacimiento) utilizando el coeficiente de correlación de Pearson (R) ($P <$
342 0.05).

343 Cuatro variables (IMC, perímetro abdominal, porcentaje de grasa corporal y
344 tensión arterial) mostraron una correlación significativa con el aumento o

345 disminución de expresión de los miRNAs. Observamos que el aumento de peso y
346 de grasa abdominal correlacionan positivamente con los niveles de expresión de
347 miR-126 y miR-486-5p.

348 En contraste, los niveles de expresión de miR-320a y miR-454-3p
349 disminuyeron en individuos con sobrepeso y obesidad correlacionaron
350 negativamente con las tres características clínicas asociadas (IMC, perímetro
351 abdominal y porcentaje de grasa corporal) (Figura 4).

352 Por otro lado, los valores de presión arterial correlacionaron positivamente
353 con la expresión de miR-126-3p y negativamente con la de miR-320a (Figura 5).
354 Los niveles de miRNAs miR-454-3p y miR-486-5p no correlacionaron con los
355 valores de presión arterial.

356

357 **Predicción de genes blanco y vías metabólicas asociadas** 358 **a los miRNAs analizados**

359 Predecir los genes blanco es indispensable para determinar la participación
360 de un miRNA en los procesos biológicos. Para identificar los posibles genes
361 blanco de los miRNAs miR-29a-5p, miR-126-3p, miR-320a, miR-454-3p y miR486-
362 5p realizamos el análisis *in silico* con los algoritmos descritos en Material y
363 Métodos. Los genes predichos se graficaron en diagramas de Venn que muestran
364 el número de genes blanco identificados por cada herramienta (Figura 6). Los
365 genes blanco predichos para cada miRNA por al menos dos algoritmos se
366 mapearon en KEGG y se enriquecieron por una prueba de Fisher (intervalo de
367 confianza 95%) y una posterior corrección FDR.

368 Los genes blanco predichos para los miRNAs analizados participan en la
369 regulación de procesos relacionados con DM2 y obesidad: metabolismo de
370 carbohidratos, regulación de lipólisis, vías de señalización de PI3K-Akt, AMPK, Jak
371 STAT y TGF- β entre otras. Las vías metabólicas y de señalización en las que cada
372 miRNA parece tener una participación significativa se muestran en las Tablas 5-9.
373

374 **Tabla 5. Análisis *in silico* de vías metabólicas y de señalización para miR-**
 375 **29a-5p**

Vía KEGG	Valor P	Ajuste FDR	KEGG ID
Vías en cáncer	0.001689	0.015201	hsa05200
Vía señalización de Ras	0.01646	0.032655	hsa04014
Adhesión focal	0.01263	0.032655	hsa04510
Proteoglicanos en cáncer	0.01522	0.032655	hsa05205
Vía señalización de HIF-1	0.02177	0.032655	hsa04066
Vía señalización de ErbB	0.01969	0.032655	hsa04012
Vía señalización de MAPK	0.02964	0.03430125	hsa04010
Biosíntesis de mucina tipo O- Glicano	0.03049	0.03430125	hsa00512
Vía de señalización Wnt	0.04616	0.04616	hsa04310

376 Los genes predichos por dos o más algoritmos (Diana miRGate, miRDB, y
 377 TargetScan).

378 .

379 **Tabla 6. Análisis *in silico* de vías metabólicas y de señalización para miR-**
 380 **126-3p**

Vía KEGG	Valor P	Ajuste FDR	KEGG ID
Glucolisis / Gluconeogénesis	3.45E-11	1.21E-09	hsa00010
Metabolismo de carbono	3.68E-08	6.44E-07	hsa01200
Biosíntesis de aminoácidos	1.54E-07	1.80E-06	hsa01230
Metabolismo de fructosa y manosa	2.67E-07	2.34E-06	hsa00051
Biosíntesis de antibióticos	1.31E-06	9.17E-06	hsa01130
Vía de las pentosas fosfato	1.46E-05	8.52E-05	hsa00030
Vía de señalización de mTOR	0.000113	5.65E-04	hsa04150
Vía de señalización de HIF 1	0.0005223	0.0029	hsa04066
Vías metabólicas	0.0007495		hsa01100
Vía de señalización de AMPK	0.0008811	0.00308	hsa04152
Vía de señalización de FoxO	0.001095	0.00348	hsa04068
Vía de señalización de la insulina	0.001214	0.00354	hsa04910
Reabsorción de sodio regulada por aldosterona	0.001603	0.00432	hsa04960
Metabolismo amino azúcares y azúcares nucleicos	0.002373	0.00554	hsa00520
Diabetes mellitus tipo 2II	0.002373		hsa04930
Regulación de lipólisis en adipocitos	0.003177	0.00695	hsa04923
Metabolismo central de carbono en cáncer	0.00446	0.00918	hsa05230
Metabolismo de inositol fosfato	0.004977	0.00968	hsa00562
Apoptosis	0.006987	0.0122	hsa04210
Metabolismo de tiamina	0.006984		hsa00730
Metabolismo de colina en cáncer	0.009657	0.0155	hsa05231
Metabolismo de vitamina B6	0.009763		hsa00750
Resistencia a la insulina	0.01152	0.0175	hsa04931
Vía de señalización de neurotrofina	0.01332	0.0194	hsa04722
Vía de señalización de PI3K Akt	0.01444	0.0199	hsa04151
Guía axonal	0.0148		hsa04360
Sarampión	0.01634	0.0204	hsa05162
Citotoxicidad mediada por células killer naturales	0.01634		hsa04650
Regulación vía de señalización de células troncales	0.01818	0.0219	hsa04550
Enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD)	0.02035	0.0237	hsa04932
Vía de señalización de Jak STAT	0.02211	0.025	hsa04630
Vía de señalización de cGMP PKG	0.02446	0.0268	hsa04022
Influenza A	0.02663	0.0282	hsa05164
Biosíntesis de la estructura de terpenoides	0.03171	0.0326	hsa00900
Metabolismo de galactosa	0.04249	0.0425	hsa00052

381 Los genes predichos por dos o más algoritmos (Diana MicroT, miRanda,
 382 TargetScan y PITA).

383

384 **Tabla 7. Análisis *in silico* de vías metabólicas y de señalización para miR-**
 385 **320a**

Vía KEGG	Valor P	Ajuste FDR	KEGG ID
Vías en cáncer	0.01442	0.03225	hsa05200
Focal adhesión	0.0001068	0.0045924	hsa04510
Endocitosis	0.02985	0.04587179	hsa04144
Regulación de actina de citoesqueleto	0.01016	0.0282725	hsa04810
Proteoglicanos en cáncer	0.008261	0.027821	hsa05205
Desregulación transcripcional en cáncer	0.003692	0.027821	hsa05202
Vía señalización de PKG-cGMP	0.01052	0.0282725	hsa04022
Guía axonal	0.0003848	0.0082732	hsa04360
Transporte de RNA	0.05092	0.05614256	hsa03013
Procesamiento de proteínas en retículo endoplásmico	0.04799	0.05577216	hsa04141
Hepatitis B	0.01337	0.03193944	hsa05161
Vía señalización de AMPK	0.003328	0.027821	hsa04152
Vía señalización de FoxO	0.0272	0.04539808	hsa04068
Toxoplasmosis	0.00615	0.027821	hsa05145
Vía señalización de hormona tiroidea	0.03771	0.05029697	hsa04919
Cáncer de próstata	0.004604	0.027821	hsa05215
Metabolismo de carbono	0.03517	0.04900613	hsa01200
Vía de regulación de longevidad	0.005993	0.027821	hsa04211
Vía de supervivencia de mRNA	0.0187	0.03655	hsa03015
Vía señalización de receptores de células T	0.05512	0.05643238	hsa04660
Cardiomiopatía hipertrófica (HCM)	0.009003	0.027821	hsa05410
Interacción receptor-ligando neuroactivos	0.03533	0.04900613	hsa04080
Apoptosis	0.01575	0.03225	hsa04210
Sistema de señalización de fosfatidilinositol	0.05024	0.05614256	hsa04070
Cardiomiopatía dilatada	0.02745	0.04539808	hsa05414
Vía señalización de prolactina	0.009058	0.027821	hsa04917
Carcinoma de células renales	0.003556	0.027821	hsa05211
Cáncer pancreático	0.006565	0.027821	hsa05212
Tosferina	0.0386	0.05029697	hsa05133
Cáncer colorrectal	0.008566	0.027821	hsa05210
Metabolismo de inositol fosfato	0.023	0.043	hsa00562
Glioma	0.02987	0.04587179	hsa05214
Cardiomiopatía arritmogénica del ventrículo derecho (ARVC)	0.05786	0.05786	hsa05412
Señalización de células epiteliales en infección por <i>Helicobacter pylori</i>	0.03187	0.04725552	hsa05120
Uniones adherentes	0.05512	0.05643238	hsa04520
Células no pequeñas de cáncer de pulmón	0.04599	0.0549325	hsa05223
Depresión de larga duración	0.05432	0.05643238	hsa04730
Diabetes mellitus tipo 2	0.0113	0.02858235	hsa04930
Regulación de lipólisis en adipocitos	0.04599	0.0549325	hsa04923
Cáncer endometrial	0.04085	0.05166324	hsa05213

	Vía KEGG	Valor P	Ajuste FDR	KEGG ID
	Ritmo circadiano	0.008879	0.027821	hsa04710
	Formación del eje dorso-ventral	0.02674	0.04539808	hsa04320
	Metabolismo de vitamina B6	0.01541	0.03225	hsa00750
386	Los genes predichos por dos o más algoritmos (Diana MicroT, miRanda, miRDB y			
387	TargetScan).			
388				
389				

390 **Tabla 8. Análisis in *silico* de vías metabólicas y de señalización para miR-**
 391 **454-3p**

Vía KEGG	Valor P	Ajuste FDR	KEGG ID
Endocitosis	0.001724	0.012068	ko04144
Vía de señalización de TGF- β	0.01607	0.04421	ko04350
Guía axonal	0.02799		ko04360
Vía de señalización de FoxO	0.03921		ko04068
Vía de señalización de p53	0.03971		ko04115
Proteoglicanos en cáncer	0.04393		ko05205
Vía de señalización de Hippo	0.04421		ko04390

392 Los genes predichos por dos o más algoritmos (Diana MicroT, miRanda, miRDB y
 393 miRNAMap).

394 **Tabla 9. Análisis *in silico* de vías metabólicas y de señalización para miR-**
 395 **486-5p**

Vía KEGG	Valor P	Ajuste FDR	KEGG ID
Vía de señalización Akt PI3K	0.007565	0.01523438	hsa04151
Vía de señalización de Ras	0.006066		hsa04014
Vía de señalización de Rap1	0.008125		hsa04015
Adhesión focal	0.007296		hsa04510
Infección HTLV I	0.007296		hsa05166
Desregulación transcripcional en cáncer	0.004576		hsa05202
Moléculas de adhesión celular (CAMs)	0.002031		hsa04514
Melanoma	0.002185		hsa05218
Biosíntesis de anclaje de glicosilfosfatidilinositol	0.009568	0.01594667	hsa00563
Interacción del receptor ECM	0.02031	0.030465	hsa04512
Mediador de proteólisis por Ubiquitinación	0.04095	0.04558929	hsa04120
Vía de señalización de HIF1	0.04255		hsa04066
Vía de señalización de mTOR	0.0411		hsa04150
Adicción a Nicotina	0.03882		hsa05033
Vía de señalización de TGF- β	0.04813	0.04813	hsa04350

396 Los genes predichos por dos o más algoritmos (Diana MicroT, miRanda, miRDB y
 397 PITA).

398

399 **Discusión**

400 En este estudio cuantificamos miRNAs circulantes asociados a
401 enfermedades metabólicas y presentamos la primera evidencia de cambios en su
402 expresión en una muestra de adultos mexicanos jóvenes con sobrepeso y
403 obesidad.

404 Entre los miRNAs seleccionados no detectamos los miRNAs miR-141-3p,
405 miR-142-3p, miR-200c-3p, miR-221-3p ni miR-523-3p en las muestras de sangre
406 preservadas en papel filtro ni en los controles de sangre fresca. Esto pudo deberse
407 a que tales miRNAs no se expresan en la población estudiada o a que se
408 expresan en niveles muy bajos para ser cuantificados por RT-qPCR. Los miRNAs
409 restantes miR-29a-5p, miR-126-3p, miR-320a, miR-454-3p y miR-486-5p pudimos
410 identificarlos y cuantificarlos en todas las muestras analizadas.

411 En la población estudiada miR-29a-5p no presentó diferencias significativas
412 entre los distintos grupos de IMC, en concordancia con reportes previos que
413 muestran que la expresión de este miRNA no cambia con el peso corporal en
414 poblaciones caucásicas o asiáticas [23,55], aunque sí se expresa en diabetes o
415 incluso en prediabetes [56,57] No obstante, un análisis estadístico de nuestros
416 datos con un mayor grado de libertad ($P < 0.0006$) mostró una subexpresión
417 significativa de miR-29a-5p en mujeres con sobrepeso y obesidad respecto a
418 mujeres con normopeso, aunque no en hombres con distinto IMC. Si esta
419 subexpresión es genuina, miR-29a-5p podría tener una asociación género-
420 específica con el IMC, como se ha reportado para otros miRNAs y síndrome
421 metabólico [58]. Para saberlo requerimos analizar un mayor número de individuos.

422 Reportes previos señalan que los niveles séricos de miR-126-3p declinan
423 significativamente en pacientes con DM2 [19] por lo que sería de esperar bajas
424 concentraciones séricas de este miRNA en obesidad, un factor de riesgo para
425 desarrollo de DM2. Contrariamente, nuestro estudio mostró una elevada
426 concentración de miR-126-3p en los grupos con sobrepeso y obesidad de ambos
427 géneros, respecto a normopeso. La sobreexpresión de miR-126-3p se correlacionó
428 directamente con el IMC, la acumulación de grasa abdominal, y los niveles de
429 tensión arterial, pero no con los niveles de glucemia, pues todos los individuos
430 estudiados fueron normoglucémicos. Por el momento no tenemos una explicación
431 para este resultado, aunque podría hipotetizarse que la sobreexpresión de este
432 miRNA en obesidad es un evento predisponente al desarrollo de resistencia a
433 insulina y eventualmente de DM2. Estudios longitudinales de la expresión de miR-
434 126-3p en individuos con diverso riesgo de desarrollar DM2 permitirían confirmar o
435 refutar esta posibilidad.

436 Las vías de señalización en las que miR-126-3p podría participar están
437 directamente asociadas al metabolismo de carbohidratos: glucolisis,
438 gluconeogénesis y resistencia a la insulina. Uno de los posibles blancos de miR-
439 126-3p, el gen *PTPN9* (Tabla 1S), codifica la tirosin-fosfatasa no receptora tipo 9,
440 la cual es un antagonista de la señalización de la insulina en hígado [59] y un
441 potencial blanco terapéutico para la DM2 [60]. *PTPN9* fue uno de los dos posibles
442 genes blanco reconocidos por al menos cuatro algoritmos para miR-126-3p (Tabla
443 1S), lo que robustece la validez de esta predicción. Cuantificar la actividad
444 hepática, adiposa o muscular de la proteína *PTPN9* en las poblaciones estudiadas
445 nos permitiría explicar la sobreexpresión observada de miR-126-3p.

446 El aumento en la expresión de miR-320a se ha asociado con resistencia a
447 la insulina [61] y en pacientes con enfermedad coronaria o con alto riesgo a
448 presentarla. Sin embargo, en la población estudiada la expresión de miR-320a
449 disminuyó significativamente ($P < 0.0005$) en los grupos de sobrepeso y obesidad
450 en el análisis de la población general, aunque dicha subexpresión no fue
451 significativa para hombres con obesidad en el análisis por géneros. Además,
452 nuestros resultados mostraron una correlación negativa entre la expresión de miR-
453 320a y los valores de tensión arterial.

454 Como en el caso de miR-126-3p, explicar el patrón de expresión de miR-
455 320a en la población estudiada demanda la cuantificación de algunas de las
456 actividades codificadas por sus posibles genes blanco. Nuestro análisis *in silico* de
457 los genes blanco y las vías de señalización en las que podría estar implicado miR-
458 320a concordó con algunos blancos confirmados para este miRNA. Entre estas
459 figuran la regulación de estrés oxidante en cáncer de pulmón [62], la señalización
460 por AMPK en células T Jurkat o HeLa [63], y su participación en el desarrollo de
461 DM2 y en el metabolismo de lípidos [61,64]. Uno de los genes blanco predichos
462 para miR-320a (Tabla S2) es AKT serin- treonin cinasa 2, que codifica AKT2, una
463 serin-treonin cinasa que participa en la vía de señalización de la insulina [65].

464 También evaluamos la expresión de miR-486-5p, un miRNA con
465 concentraciones plasmáticas elevadas en obesidad prepubertal [29]. En nuestro
466 estudio miR-486-5p presentó una concentración disminuida en sobrepeso y un
467 aumento significativo en obesidad, tanto en el análisis de la población general
468 como en el análisis por géneros.

469 La sobreexpresión de miR-486-5p se ha asociado a pacientes con
470 enfermedad coronaria, lo que sugiere que induce aterogénesis al promover el

471 aumento en suero de lípidos y citosinas proinflamatorias [64]. La confirmación de
472 su concentración sérica elevada en nuestra población con obesidad lo hace un
473 buen candidato a predictor de enfermedad coronaria. En ese sentido, resultaría
474 interesante explorar si las bajas concentraciones de este miRNA observadas en la
475 población con sobrepeso constituyen un predictor de enfermedad coronaria más
476 temprano aún o un predictor de bajo riesgo para esta afección.

477 Nuestros análisis *in silico* para miR-486-5p mostraron que las probables
478 vías metabólicas en las que participa se asocian al desarrollo de DM2, como las
479 vías de señalización de Akt-PI3K, mTOR, TGF- β y Ras [66]. En la predicción de
480 genes blancos para miR-486-5p (Tabla 4S) identificamos el gen *PTEN*, codificante
481 de la fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa. Esta proteína regula
482 negativamente la señalización por insulina y su inhibición previene la resistencia a
483 esta hormona [67]. Por lo tanto, miR-486- 5p presenta características potenciales
484 de ser un regulador en el desarrollo de DM2 asociada a obesidad.

485 Analizamos también los niveles de expresión de miR-454-3p, el cual se ha
486 asociado principalmente con el desarrollo de cáncer [68–70] y para el que no hay
487 referencias que lo relacionen con obesidad o diabetes. El análisis de la población
488 general mostró concentraciones disminuidas de este miRNA en sobrepeso y
489 obesidad ($P < 0.0001$), así como en hombres con estas dos condiciones y en
490 mujeres con sobrepeso, pero no con obesidad. En esta última condición el análisis
491 de los datos con un valor de $P < 0.0001$ no arrojó diferencias significativas entre
492 mujeres con normopeso y obesidad. Un análisis estadístico con un valor $P < 0.05$
493 sí mostró disminución en la concentración de miR-454-3p en mujeres con
494 obesidad. Además, miR-454-3p presentó una correlación negativa con los
495 parámetros clínicos IMC, y perímetro abdominal sugiriendo una estrecha relación

496 entre la acumulación de grasa corporal y los niveles circulantes de miR-454-3p.
497 Con todo, es necesario un estudio en una población de mayor tamaño que nos
498 permita confirmar la participación de este miRNA en obesidad en ambos géneros.

499 Las vías de señalización predichas para miR-454-3p, FoxO, TGF- β y p53,
500 las cuales tiene una participación directa en el desarrollo de resistencia a insulina
501 [71–73], sugieren la posible participación de este miRNA en el desarrollo de DM2.
502 El análisis de los genes blanco (Tabla 3S) predijo al receptor de activina A tipo 1
503 *ACVR1* como un posible blanco de miR-454-3p. Este receptor participa en
504 alteraciones asociadas a DM2 como retinopatía [74] u obesidad[75]. Estos
505 resultados refieren una posible vía de participación de miR-454-3p en el desarrollo
506 de alteraciones metabólicas.

507 En resumen, el presente trabajo muestra que las concentraciones séricas
508 de miR-126-3p, miR-320a, miR-454-3p y miR-486-5p cambian en relación al IMC
509 en una población de mexicanos adultos jóvenes. miR-126-3p aumentó su
510 concentración sérica en individuos con sobrepeso y obesidad, miR-320a y miR-
511 454-3p presentaron bajas concentraciones séricas en sobrepeso y obesidad y
512 miR-486-5p mostró baja concentración sérica en sobrepeso y alta en obesidad
513 (Figura 7). Las concentraciones séricas de miR29a-5p no mostraron cambios
514 significativos respecto al IMC de la población estudiada.

515 El papel fisiológico de los cambios en la expresión de estos miRNAs y su
516 utilidad como predictores o marcadores diagnósticos de obesidad y diabetes podrá
517 explorarse mediante el análisis de los genes blancos predichos para ellos.

518

519 **Agradecimientos**

520 Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología Medica y
521 Pecuaría de la División de Biología Molecular del IPICYT. Se contó con una beca
522 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-333132). Agradecemos
523 a la MC. Sandra Patricia Rodil García, la Dra. Elvira del Carmen Arellanes Licea y
524 a la LE. Mirna de Carmen Saucedo Bustos por su ayuda en la toma de muestras y
525 parte técnica del trabajo, así como al Laboratorio Nacional de Biotecnología
526 Agrícola, Medica y Ambiental (LANBAMA) y a su técnico LP. Verónica Zárate
527 Chávez por permitirnos el uso de sus equipos.

528

529 **Pies de las figuras**

530 **Fig. 1. Evaluación de la calidad y cuantificación de los miRNAs circulantes**
531 **por electroforesis capilar.** El RNA total presente en las muestras de sangre seca
532 de voluntarios adultos con diverso índice de masa corporal se aisló como se
533 describe en Materiales y métodos y la calidad y concentración de miRNAs se
534 analizó por electroforesis capilar en chip para RNAs pequeños en el equipo
535 Bionalyzer 2100. (A) Representación gráfica de la electroforesis en chip. (B)
536 Electroferogramas de cuantificación para 11 muestras de sangre seca de adultos
537 con concentraciones de miRNA superiores a 1 ng/ μ l.

538

539 **Fig. 2. Expresión relativa por IMC de miRNAs circulantes asociados a**
540 **diabetes mellitus tipo 2 y obesidad en adultos jóvenes mexicanos con**
541 **sobrepeso y obesidad.** La expresión relativa de los miRNAs señalados se
542 analizó por RT-qPCR y se cuantificó por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando como
543 estándares de normalización los miRNAs miR-106a-5p y miR-16-5p. El análisis
544 estadístico se realizó por ANOVA de una vía, seguida de prueba post hoc de
545 Tukey, **** P < 0.0001.

546

547 **Fig. 3. Expresión relativa por géneros de miRNAs circulantes asociados a**
548 **diabetes mellitus tipo 2 y obesidad en adultos jóvenes mexicanos con**
549 **sobrepeso y obesidad.** La expresión relativa de los miRNAs señalados se
550 analizó por RT-qPCR y se cuantificó por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando como
551 estándares de normalización los miRNAs miR-106a-5p y miR-16-5p. El análisis

552 estadístico se realizó por ANOVA de una vía, seguida de prueba post hoc de
553 Tukey, **** P < 0.0001.

554

555 **Fig. 4 Correlación de parámetros clínicos y niveles de expresión relativa de**
556 **miRNAs circulantes asociados a DM2 y obesidad.** La expresión relativa de los
557 miRNAs señalados se analizó en conjunto con las características clínicas (IMC,
558 Perímetro abdominal, % Grasa corporal). El análisis estadístico se realizó por
559 coeficiente de correlación de Pearson (P < 0.05).

560

561 **Fig. 5 Correlación de tensión arterial y niveles de expresión relativa de**
562 **miRNAs circulantes asociados a DM2 y obesidad.** La expresión relativa de los
563 miRNAs señalados se analizó en conjunto con la tensión arterial. El análisis
564 estadístico se realizó por coeficiente de correlación de Pearson (P < 0.05).

565

566 **Fig. 6. Diagramas de Venn que indican los posibles genes blanco predichos**
567 **para cada miRNA por los algoritmos Diana MicroT, miRanda, miRDB,**
568 **miRGate, TargetScan, PITA y miRNAMap**

569

570 **Fig. 7. Concentración de miRNAs circulantes asociados a DM2 en mexicanos**
571 **adultos.**

572

573 **Bibliografía**

- 574 1. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes
575 mellitus. *Diabetes Care*. 2014;37: S81-S90.
- 576 2. Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ, et al.
577 National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: Systematic
578 analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960
579 country-years and 9,1 million participants. *Lancet*. 2011;377: 557–567.
- 580 3. Instituto Nacional de Salud Pública. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
581 2012. Resultados Nacionales. ENSANUT. 2012;1–200.
- 582 4. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes
583 mellitus. *Diabetes Care*. 2013;36: S67-S74.
- 584 5. American Diabetes Association. 2. Classification and diagnosis of diabetes.
585 *Diabetes Care*. 2015; 38: S08–S16.
- 586 6. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000;404: 635–43.
- 587 7. WHO. Global status report on noncommunicable diseases 2014. *World Health*.
588 2014;176.
- 589 8. Guay C, Regazzi R. Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes
590 mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2013;9: 513–521.
- 591 9. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by
592 adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets.
593 *Cell*. 2005;120: 15–20.
- 594 10. Shin C, Nam J-W, Farh KK-H, Chiang HR, Shkumatava A, Bartel DP.
595 Expanding the microRNA targeting code: functional sites with centered pairing.
596 *Mol Cell*. 2010; 38:789–802.

- 597 11. Faller M, Guo F. MicroRNA biogenesis: there's more than one way to skin a
598 cat. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. 2008. 1779:
599 663–667.
- 600 12. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*.
601 2014;15: 509–524.
- 602 13. Seyhan AA. MicroRNAs with different functions and roles in disease
603 development and as potential biomarkers of diabetes: progress and challenges.
604 *Mol BioSyst*. 2015;11: 1217–1234.
- 605 14. Williams MD, Mitchell GM. MicroRNAs in insulin resistance and obesity. *Exp*
606 *Diabetes Res*. 2012;2012.
- 607 15. Kwong A, Ng EKO, Wong CLP, Ma ESK. MicroRNAs as new players for
608 diagnosis, prognosis, and therapeutic targets in breast cancer. *Journal of*
609 *Oncology*. 2009; 2009.
- 610 16. Mirnezami AHF, Pickard K, Zhang L, Primrose JN, Packham G. MicroRNAs:
611 Key players in carcinogenesis and novel therapeutic targets. *Eur J Surg Oncol*.
612 2009;35: 339–347.
- 613 17. Ikeda S, Kong SW, Lu J, Bisping E, Zhang H, Allen PD, et al. Altered
614 microRNA expression in human heart disease. *Physiol Genomics*. 2007;31:
615 367–373.
- 616 18. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of
617 microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and
618 other diseases. *Cell Res*. 2008;18: 997–1006.
- 619 19. Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, et al. Plasma
620 microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in
621 type 2 diabetes. *Circ Res*. 2010;107: 810–817.

- 622 20. Karolina DS, Tavintharan S, Armugam A, Sepramaniam S, Pek SLT, Wong
623 MTK, et al. Circulating miRNA profiles in patients with metabolic syndrome. *J*
624 *Clin Endocrinol Metab.* 2012;97: E2271-E2276.
- 625 21. Kong L, Zhu J, Han W, Jiang X, Xu M, Zhao Y, et al. Significance of serum
626 microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: a clinical
627 study. *Acta Diabetol.* 2010;48: 61–69.
- 628 22. Ortega FJ, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, Rovira O, Guerra E, Esteve E,
629 et al. Profiling of circulating microRNAs reveals common microRNAs linked to
630 type 2 diabetes that change with insulin sensitization. *Diabetes Care.* 2014;37:
631 1375–1383.
- 632 23. Ortega FJ, Moreno-Navarrete JM, Pardo G, Sabater M, Hummel M, Ferrer A,
633 et al. MiRNA expression profile of human subcutaneous adipose and during
634 adipocyte differentiation. *PLoS One.* 2010;5: e9022
- 635 24. McGregor R a, Choi MS. MicroRNAs in the regulation of adipogenesis and
636 obesity. *Curr Mol Med.* 2011;11: 304–316.
- 637 25. Zhu H, Leung SW. Identification of microRNA biomarkers in type 2 diabetes: a
638 meta-analysis of controlled profiling studies. *Diabetologia.* 2015;58: 900-911
- 639 26. Ji J, Qin Y, Ren J, Lu C, Wang R, Dai X, et al. Mitochondria-related miR-141-
640 3p contributes to mitochondrial dysfunction in HFD-induced obesity by inhibiting
641 PTEN. *Sci Rep.* 2015;5: 16262.
- 642 27. Li J, Song L, Zhou L, Wu J, Sheng C, Chen H, et al. A MicroRNA Signature in
643 gestational diabetes mellitus associated with risk of macrosomia. *Cell Physiol*
644 *Biochem.* 2015;37: 243–252.
- 645 28. Ge Q, Shen Y, Tian F, Lu J, Bai Y, Lu Z. Profiling circulating microRNAs in
646 maternal serum and plasma. *Mol Med Rep.* 2015; 12: 3323-3330.

- 647 29. Prats-Puig A, Ortega FJ, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, Moreno M,
648 Bonet N, et al. Changes in circulating microRNAs are associated with childhood
649 obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98: E1655-E1660.
- 650 30. Ortega FJ, Mercader JM, Catalan V, Moreno-Navarrete JM, Pueyo N, Sabater
651 M, et al. Targeting the circulating microRNA signature of obesity. *Clin Chem.*
652 2013;59: 781–792.
- 653 31. Brabletz S, Brabletz T. The ZEB/miR-200 feedback loop-a motor of cellular
654 plasticity in development and cancer *EMBO Rep.* 2010;11: 670–677.
- 655 32. le Sage C, Nagel R, Egan DA, Schrier M, Mesman E, Mangiola A, et al.
656 Regulation of the p27(Kip1) tumor suppressor by miR-221 and miR-222
657 promotes cancer cell proliferation. *EMBO J.* 2007;26: 3699–36708.
- 658 33. Xie H, Lim B, Lodish HF. MicroRNAs induced during adipogenesis that
659 accelerate fat cell development are downregulated in obesity. *Diabetes.*
660 2009;58: 1050–1057.
- 661 34. Williams MD, Mitchell GM. MicroRNAs in insulin resistance and obesity. *Exp*
662 *Diabetes Res.* 2012;2012: 484696.
- 663 35. Kappil M, Chen J. Environmental exposures in utero and microRNA. *Curr Opin*
664 *Pediatr.* 2014;26: 243–451.
- 665 36. Collares CVA, Evangelista AF, Xavier DJ, Rassi DM, Arns T, Foss-Freitas MC,
666 et al. Identifying common and specific microRNAs expressed in peripheral blood
667 mononuclear cell of type 1, type 2, and gestational diabetes mellitus patients.
668 *BMC Res Notes.* 2013;6: 491.
- 669 37. de Jong VM, Zaldumbidea, van der Slika R, Persengiev SP, Roep BO,
670 Koeleman BPC. Post-transcriptional control of candidate risk genes for type 1
671 diabetes by rare genetic variants. *Genes Immun.* 2013;14: 58–61.

- 672 38. Rodil Garcia SP. Cuantificación de microRNAs en neonatos con normopeso,
673 bajo peso y macrosomía usando tarjetas de tamiz neonatal [Tesis]. Instituto
674 Potosino de Investigación Científica y Tecnológica; 2014.
- 675 39. Czimmerer Z, Hulvely J, Simandi Z, Varallyay E, Havelda Z, Szabo E, et al. A
676 versatile method to design stem-loop primer-based quantitative PCR assays for
677 detecting small regulatory RNA molecules. *PLoS One*. 2013;8.: e55168.
- 678 40. Kozomara A, Griffiths-Jones S. MiRBase: Annotating high confidence
679 microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2014;42: D68-D73.
- 680 41. Wu R, Wood M, Thrush A, Walton EF, Varkonyi-Gasic E. Real-Time PCR
681 quantification of plant miRNAs using universal probe library technology.
682 *Biochemica*. 2007;(2):12–5.
- 683 42. Maragkakis M, Vergoulis T, Alexiou P, Reczko M, Plomaritou K, Gousis M, et
684 al. DIANA-microT web server upgrade supports fly and worm miRNA target
685 prediction and bibliographic miRNA to disease association. *Nucleic Acids Res*.
686 2011;39: W145-W148
- 687 43. Betel D, Koppal A, Agius P, Sander C, Leslie C. Comprehensive modeling of
688 microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites.
689 *Genome Biol*. 2010;11: R90.
- 690 44. Betel D, Wilson M, Gabow A, Marks DS, Sander C. The microRNA.org
691 resource: Targets and expression. *Nucleic Acids Res*. 2008;36: D149-D145
- 692 45. Wong N, Wang X. miRDB: An online resource for microRNA target prediction
693 and functional annotations. *Nucleic Acids Res*. 2015;43: D146–D152.
- 694 46. Wang X. Improving microRNA target prediction by modeling with
695 unambiguously identified microRNA-target pairs from CLIP-Ligation studies.
696 *Bioinformatics*. 2016;32: 1316-1322.

- 697 47. Agarwal V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP. Predicting effective microRNA target
698 sites in mammalian mRNAs. *Elife*. 2015;4.
- 699 48. Friedman RC, Farh KKH, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are
700 conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009;19: 92–105.
- 701 49. Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, Gaul U, Segal E. The role of site
702 accessibility in microRNA target recognition. *Nat Genet*. 2007;39: 1278–1284.
- 703 50. Andrés-León E, Peña DG, Gómez-López G, Pisano DG. MiRGate: A curated
704 database of human, mouse and rat miRNA-mRNA targets. *Database*.
705 2015;2015: bav035.
- 706 51. Hsu S Da, Chu CH, Tsou AP, Chen SJ, Chen HC, Hsu PWC, et al. MiRNAMap
707 2.0: Genomic maps of microRNAs in metazoan genomes. *Nucleic Acids Res*.
708 2008;36: D165-D169.
- 709 52. Oliveros JC. VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn
710 Diagrams. BioinfoGP of CNB-CSIC. 2007.
- 711 53. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-
712 time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods*. 2001;25:
713 402–408.
- 714 54. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative
715 reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to
716 identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data
717 sets. *Cancer Res*. 2004;64: 5245–5250.
- 718 55. Liang J, Liu C, Qiao A, Cui Y, Zhang H, Cui A, et al. MicroRNA-29a-c decrease
719 fasting blood glucose levels by negatively regulating hepatic gluconeogenesis. *J*
720 *Hepatol*. 2013;58: 535–542.

- 721 56. He A, Zhu L, Gupta N, Chang Y, Fang F. Overexpression of micro ribonucleic
722 acid 29, highly up-regulated in diabetic rats, leads to insulin resistance in 3T3-L1
723 adipocytes. *Mol Endocrinol.* 2007;21: 2785–2794.
- 724 57. Zhao C, Dong J, Jiang T, Shi Z, Yu B, Zhu Y, et al. Early second-trimester
725 serum miRNA profiling predicts gestational diabetes mellitus. *PLoS One.*
726 2011;6: e23925.
- 727 58. Villard A, Marchand L, Thivolet C, Rome S. Diagnostic Value of cell-free
728 circulating microRNAs for obesity and type 2 diabetes: A meta-analysis. *J Mol*
729 *Biomark Diagn.* 2015;6. pii: 251
- 730 59. Cho CY, Koo SH, Wang Y, Callaway S, Hedrick S, Mak PA, et al. Identification
731 of the tyrosine phosphatase PTP-MEG2 as an antagonist of hepatic insulin
732 signaling. *Cell Metab.* 2006;3: 367–378.
- 733 60. Zhang S, Liu S, Tao R, Wei D, Chen L, Shen W, et al. A highly selective and
734 potent PTP-MEG2 inhibitor with therapeutic potential for type 2 diabetes. *J Am*
735 *Chem Soc.* 2012;134: 18116–18124.
- 736 61. Flowers E, Aouizerat BE, Abbasi F, Lamendola C, Grove KM, Fukuoka Y, et al.
737 Circulating microRNA-320a and microRNA-486 predict thiazolidinedione
738 response: Moving towards precision health for diabetes prevention. *Metabolism.*
739 2015;64: 1051–1059.
- 740 62. Tang H, Lee M, Sharpe O, Salamone L, Noonan EJ, Hoang CD, et al.
741 Oxidative stress-responsive microRNA-320 regulates glycolysis in diverse
742 biological systems. *FASEB J.* 2012;26: 4710–4721.
- 743 63. Cheng Z, Qiu S, Jiang L, Zhang A, Bao W, Liu P, et al. MiR-320a is
744 downregulated in patients with myasthenia gravis and modulates inflammatory

745 cytokines production by targeting mitogen-activated protein kinase 1. *J Clin*
746 *Immunol.* 2013;33: 567–576.

747 64. Chen C, Wang Y, Yang S, Li H, Zhao G, Wang F, et al. MiR-320a contributes
748 to atherogenesis by augmenting multiple risk factors and down-regulating SRF.
749 *J Cell Mol Med.* 2015;19: 970–985.

750 65. Mackenzie RW, Elliott BT. Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel
751 insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Metab*
752 *Syndr Obes.* 2014;7: 55–64.

753 66. Feige JN, Lagouge M, Canto C, Strehle A, Houten SM, Milne JC, et al. Specific
754 SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced
755 metabolic disorders by enhancing fat oxidation. *Cell Metab.* 2008;8: 347–358.

756 67. Wijesekara N, Konrad D, Eweida M, Jefferies C, Liadis N, Giacca A, et al.
757 Muscle-specific Pten deletion protects against insulin resistance and diabetes.
758 *Mol Cell Biol.* 2005;25: 1135–1145.

759 68. Shao N, Wang L, Xue L, Wang R, Lan Q. Plasma miR-454-3p as a potential
760 prognostic indicator in human glioma. *Neurol Sci.* 2015;36: 309–313.

761 69. Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes
762 as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2008;110: 13–21.

763 70. Schee K, Lorenz S, Worren MM, Gunther CC, Holden M, Hovig E, et al. Deep
764 sequencing the microRNA transcriptome in colorectal cancer. *PLoS One.*
765 2013;8: e66165.

766 71. Nakae J, Biggs WH, Kitamura T, Cavenee WK, Wright CVE, Arden KC, et al.
767 Regulation of insulin action and pancreatic beta-cell function by mutated alleles
768 of the gene encoding forkhead transcription factor Foxo1. *Nat Genet.* 2002;32:
769 245–253.

770 72. Han MS, Jung DY, Morel C, Lakhani SA, Kim JK, Flavell RA, et al. JNK
771 expression by macrophages promotes obesity-induced insulin resistance and
772 inflammation. *Science*. 2013;339: 218–222.

773 73 Shimizu I, Yoshida Y, Katsuno T, Tateno K, Okada S, Moriya J, et al. P53-
774 induced adipose tissue inflammation is critically involved in the development of
775 insulin resistance in heart failure. *Cell Metab*. 2012;15: 51–64.

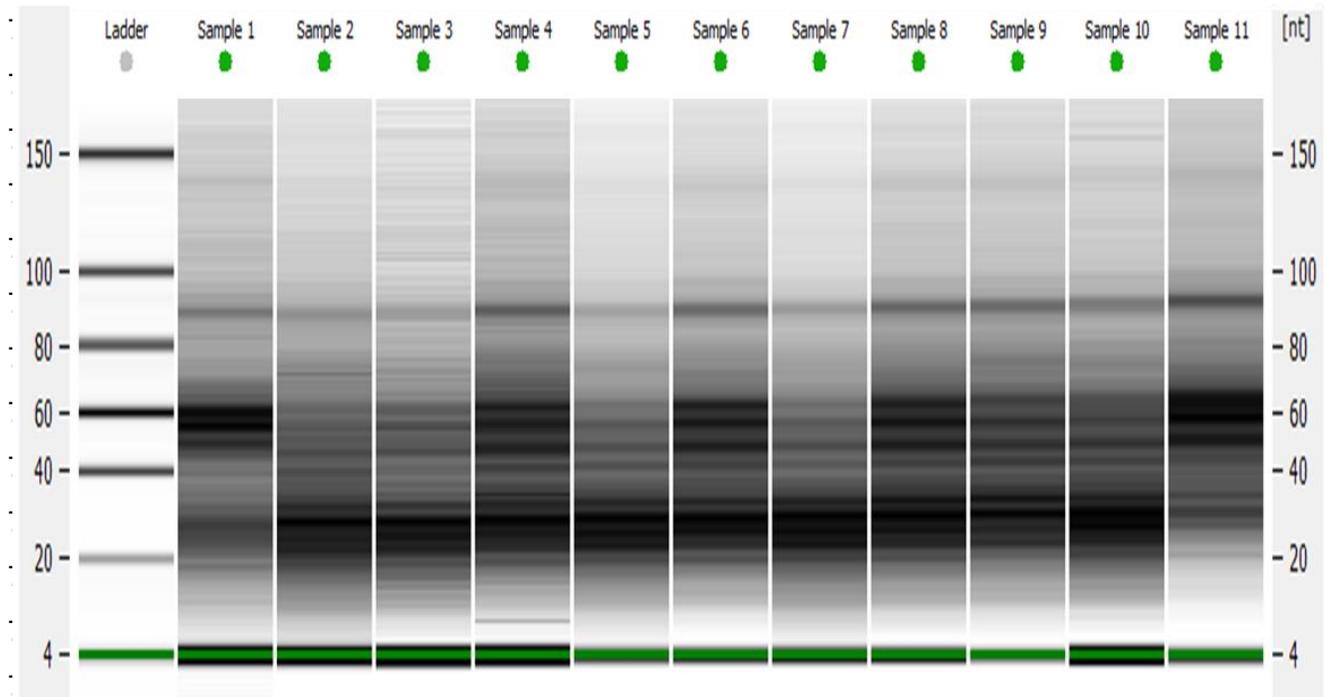
776 74. Rajagopal R, Huang J, Dattilo LK, Kaartinen V, Mishina Y, Deng CX, et al. The
777 type I BMP receptors, *Bmpr1a* and *Acvr1*, activate multiple signaling pathways
778 to regulate lens formation. *Dev Biol*. 2009;335: 305–316.

779 75. Bottcher Y, Unbehauen H, Kloting N, Ruschke K, Korner A, Schleinitz D, et al.
780 Adipose tissue expression and genetic variants of the bone morphogenetic
781 protein receptor 1A gene (*BMPR1A*) are associated with human obesity.
782 *Diabetes*. 2009;58: 2119–2128.

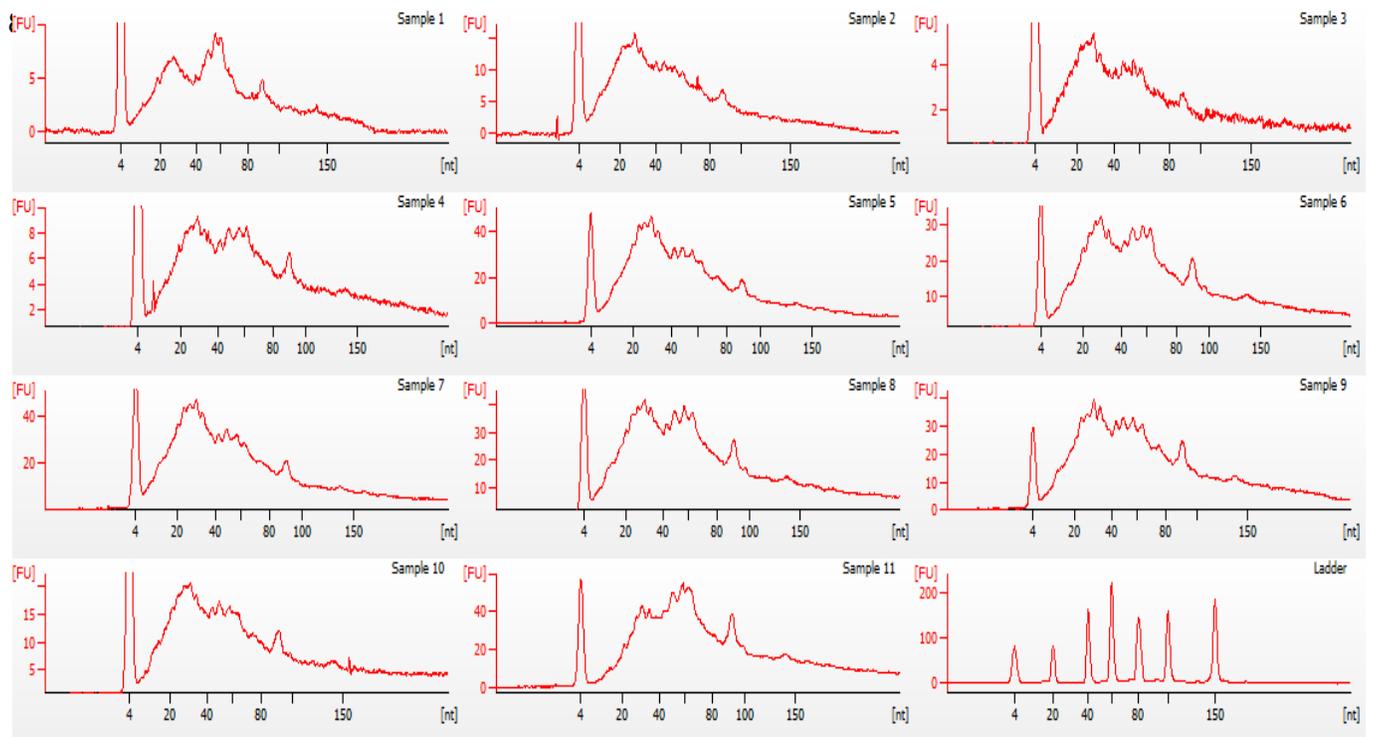
783

784 **Figura 1.**

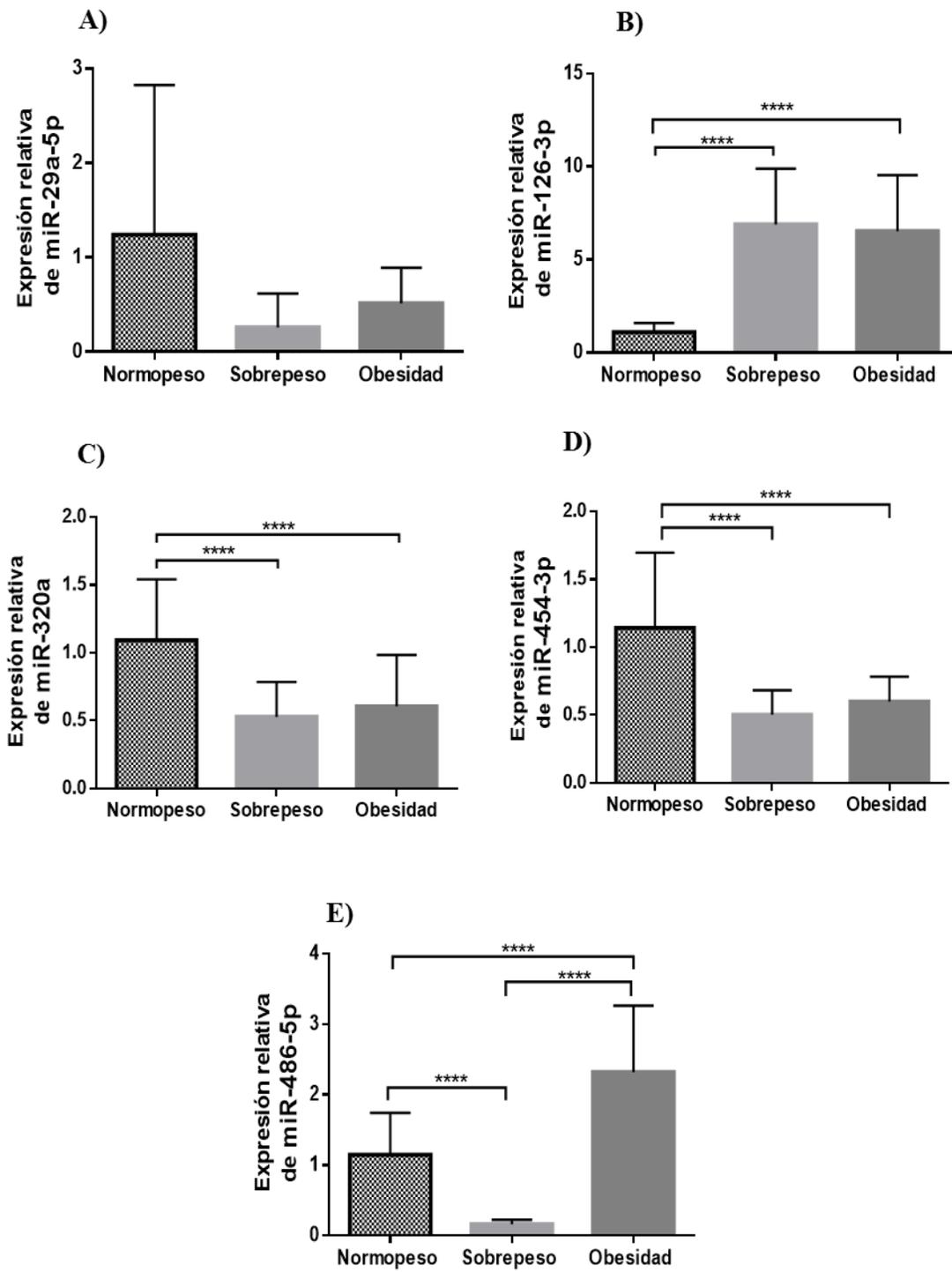
785 **A)**



799 **B)**



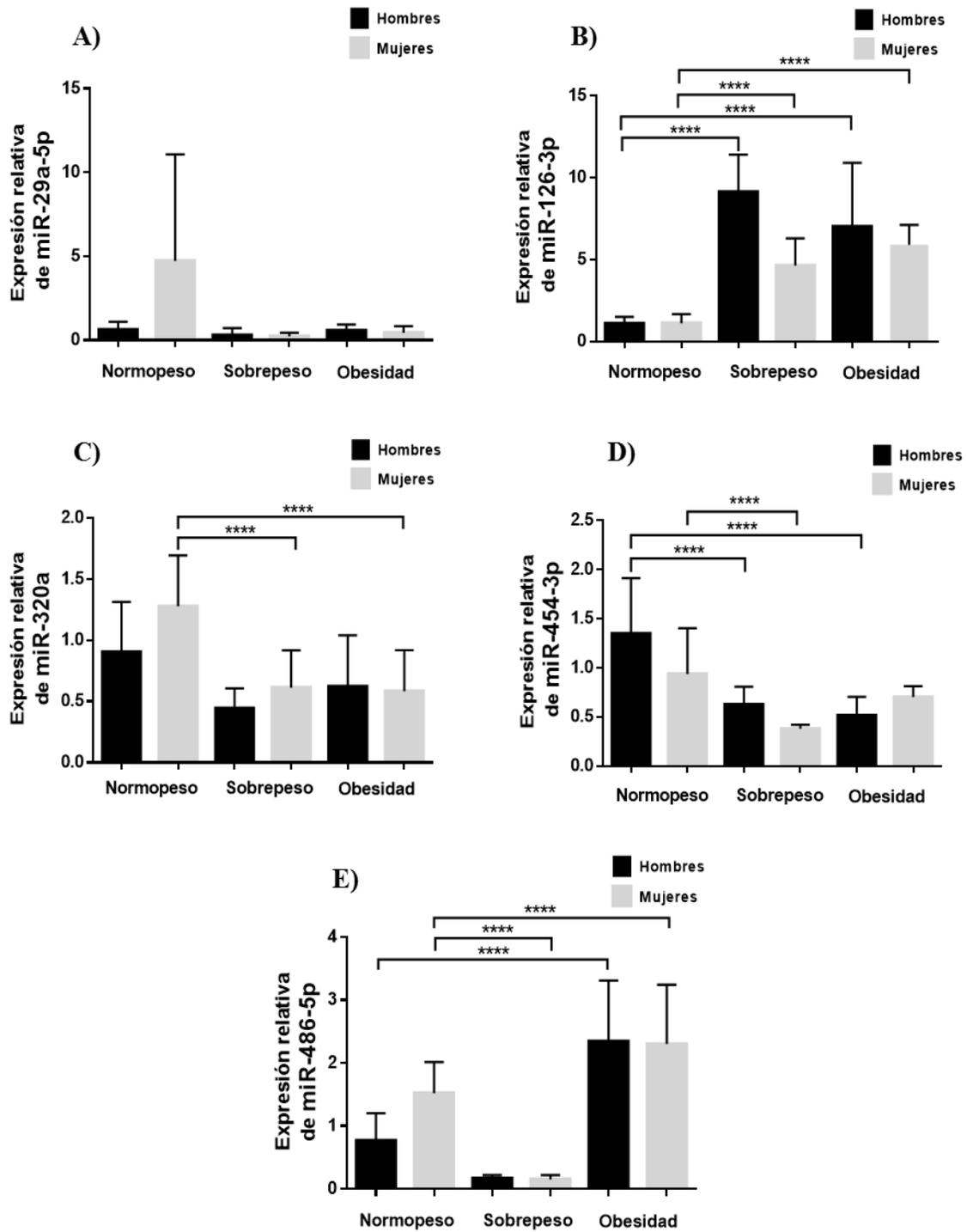
801 **Figura 2**



802

803

804 **Figura 3.**



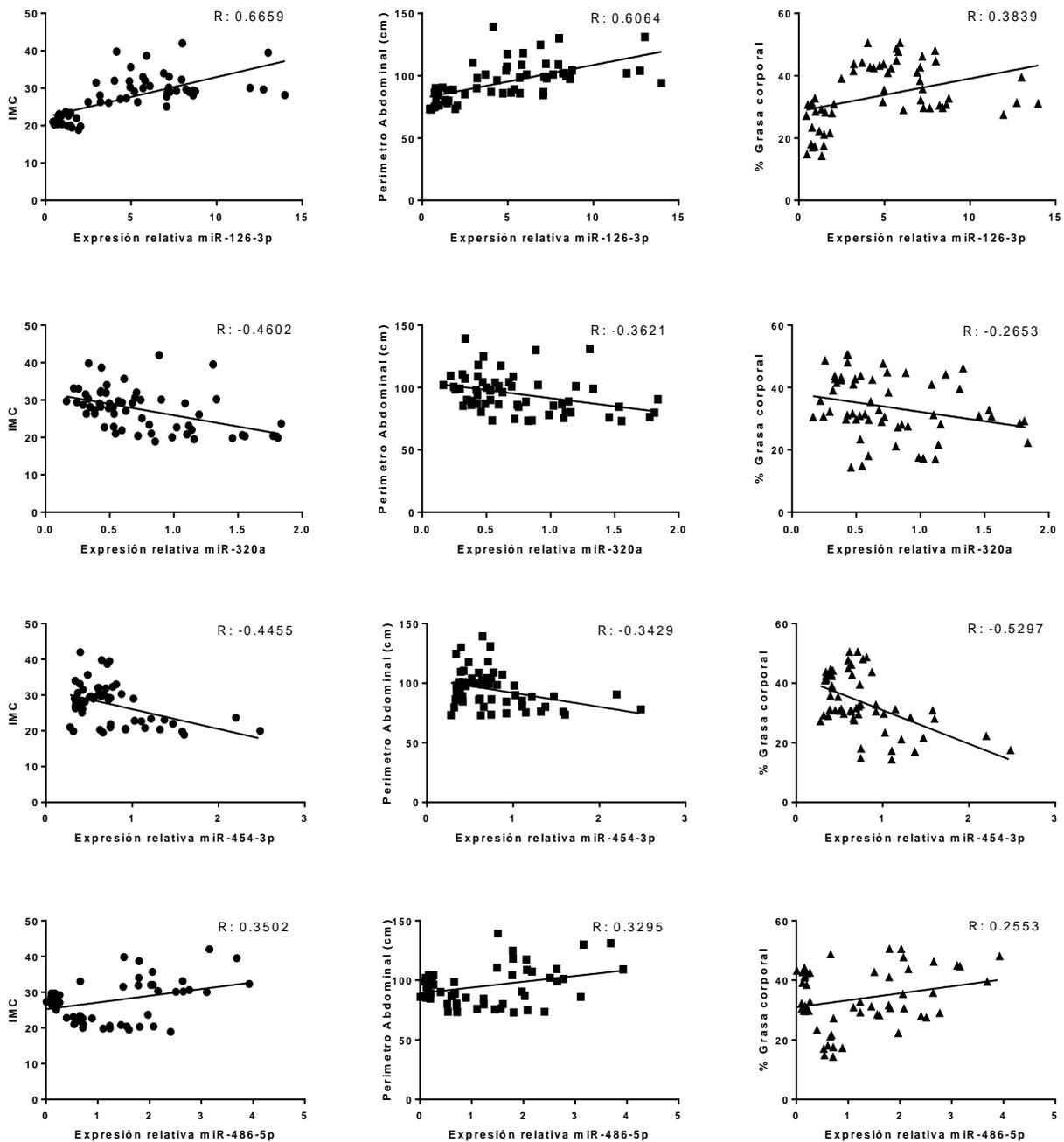
805

806

807

808 **Figura 4.**

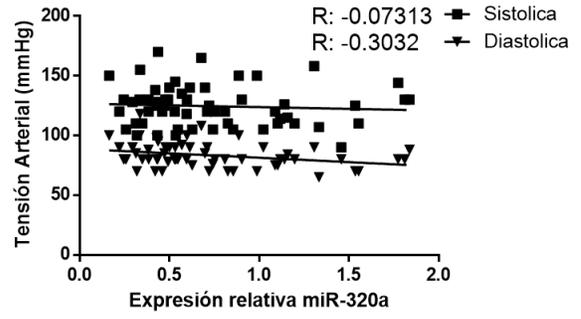
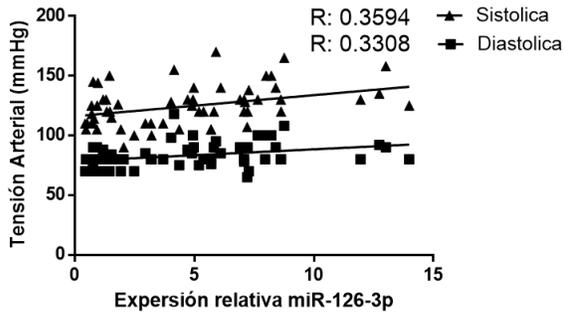
809



810

811

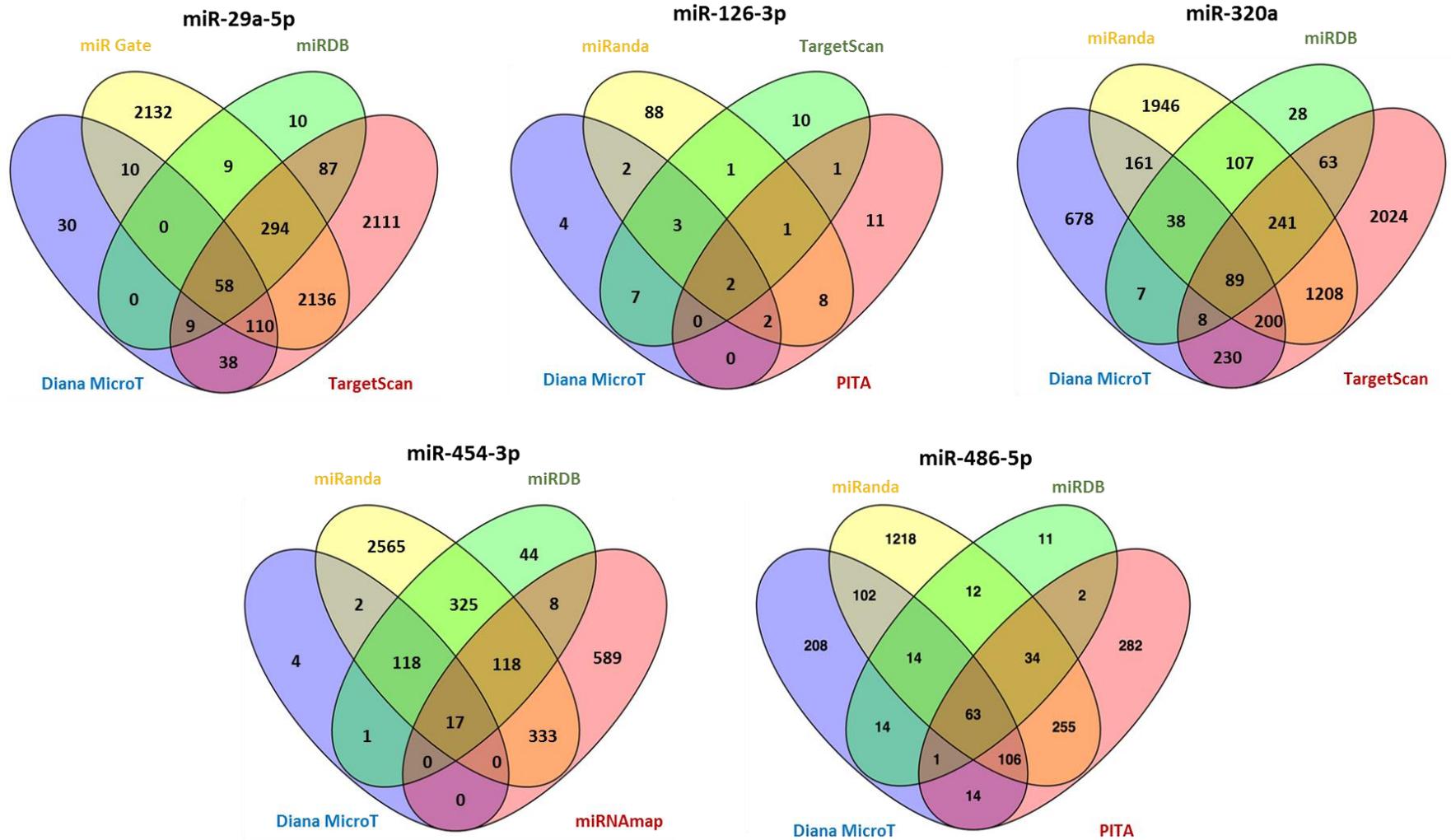
812 **Figura 5.**



813

814

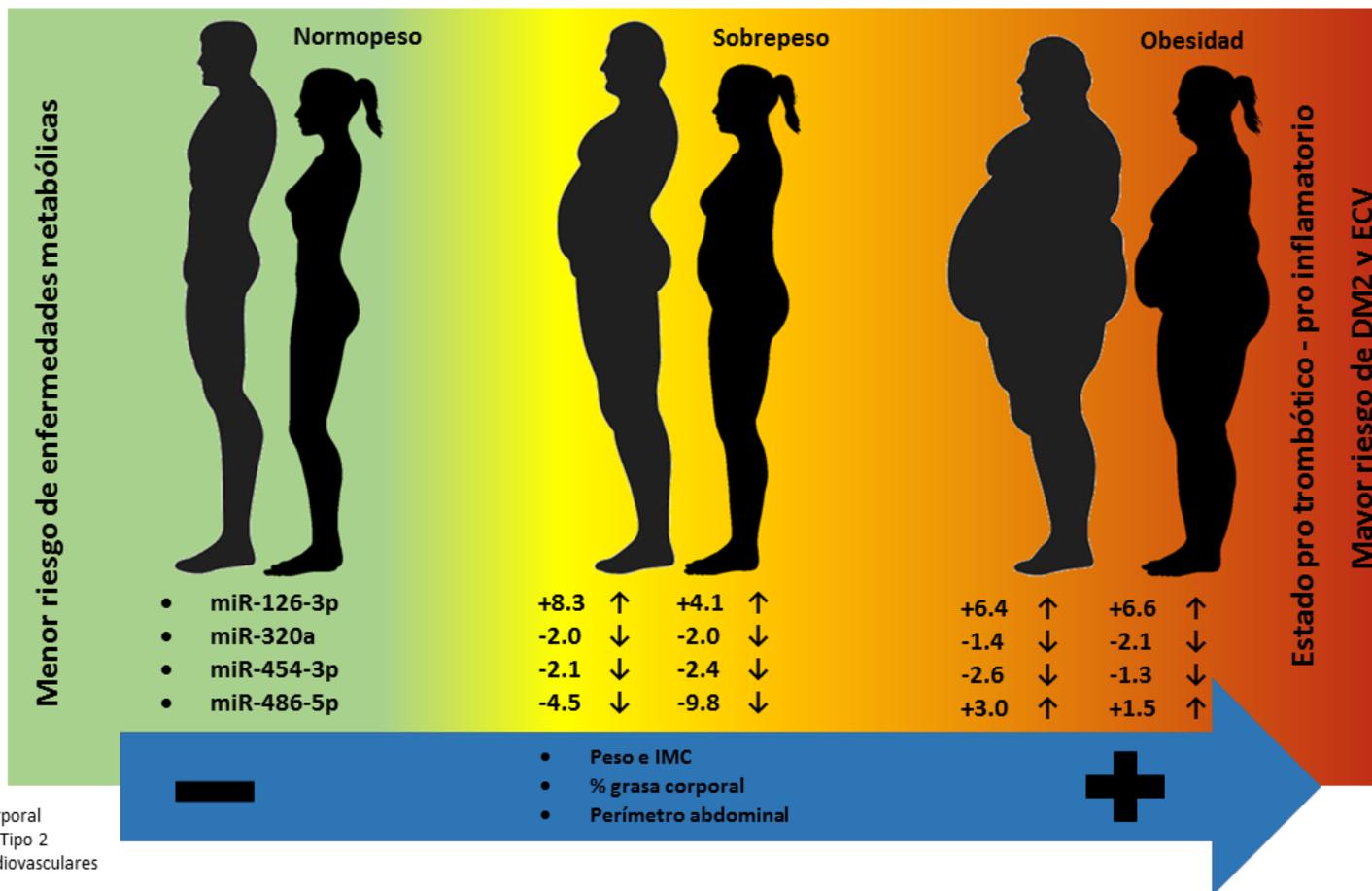
815 **Figura 6.**



816

817

Concentración de miRNAs circulantes asociados a DM2 en mexicanos adultos



IMC. Índice de Masa Corporal
DM2. Diabetes Mellitus Tipo 2
ECV. Enfermedades Cardiovasculares

821 **Material Suplementario**

822

823 **Material Suplementario Tabla 1. Genes predichos por las herramientas Diana**

824 **MicroT, miRanda, TargetScan y PITA para miR-126-3p**

Genes predichos por las cuatro herramientas

PTPN9

PLXNB2

825

826

827 **Material Suplementario Tabla 2. Genes predichos por las herramientas**

828 **miRanda, TargetScan, miRDB, y Diana Tools para miR-320a**

GPCPD1	RAP1A	RAPH1	PBX3	NIN	TRIM24
HNRNPF	DAZAP1	ZBTB10	GHITM	WARS	FAM84B
XBP1	PTEN	DIP2C	MIER3	KLHL36	PHC3
ARFIP1	YTHDF3	PBX1	TMTC1	TNRC6C	RNF138
ZC3H12C	SMNDC1	DBR1	CDK13	ZMYM4	HELZ
DTNA	RAB11FIP2	YWHAQ	USP12	PTGFRN	AKT3
HLA-DPA1	RRN3	MLLT3	COPS2	ZFP91	MSI2
RPL15	KIAA0247	XIAP	DDX54	IGF2BP3	JMY
ESRRG	SH3GL1	FKBP1A	PRSS16	ADAM10	PPM1A
POGZ	FAM49B	RCN2	PNN	MAPK8IP3	NAA15
ACBD3	SYNGR2	RNF185	CLOCK	DNAJB14	MAPK1IP1L
KIAA1598	YWHAE	AP3M1	NR3C1	AFF4	DCP1A
TROVE2	FBXO11	AZIN1	FAM126B	SLC16A1	ARPC5
SEC14L1	CNOT6	METTL7A	GXYLT1	ZNF436	APPL1
USP25	MRPS18B	CRKL	TGOLN2	TMEM106B	

829

830

831 **Material Suplementario Tabla 3. Genes predichos por las herramientas Diana**

832 **MicroT, miRanda, miRDB y miRNAMap para miR-454-3p**

SMARCD2	MIER1	MET	ACVR1
WHSC1L1	LRP12	SLAIN1	MDM4
RAB5A	PTPRG	FRZB	
PAN3	PHF20	STIM2	
HIVEP2	PHF3	JARID2	

833

834

835 **Material Suplementario Tabla 4. Genes predichos por las herramientas Diana**

836 **MicroT, miRand, miRDB y PITA para miR-486-5p**

DOCK3	CSPG5	BCAS2	SMOC1	ST5
ARMC8	TRNT1	TRIM36	ADAMTSL1	GRHL2
AFF3	EPHA3	SNRPD1	BCAS2	ADAMTSL1
ARID4B	VTI1A	SP5	TRIM36	ATXN7L3
BTAF1	ARHGAP5	PIK3R1	SNRPD1	MATN2
PLAGL2	NCOA6	NUDCD1	SP5	MRPL47
PTEN	MXI1	ZNF257	PIK3R1	MYLK2
ZNF331	LCE3E	LINGO4	NUDCD1	MARK1
TOB1	PDZRN3	LMTK2	ZNF257	ZNF418
CTDSPL2	HAT1	CD247	LINGO4	GOLPH3
CIT	NEK2	PYCR2	LMTK2	CNTNAP4
OLFM4	FGF7	ST5	CD247	
SLC10A7	TRAPPC6B	GRHL2	PYCR2	

837