



**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**

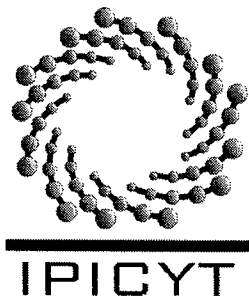
Para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias en Biología Molecular**

Director de la tesis:

**Dr. Luis A. Salazar Olivo**

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



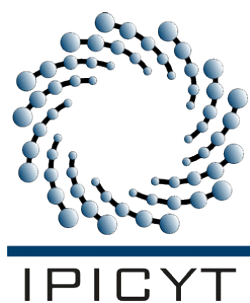
## Constancia de aprobación de la tesis

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

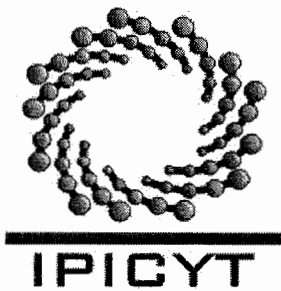


## **Créditos Institucionales**

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:

|   |                   |               |
|---|-------------------|---------------|
| <b>Dr. Rubén Hipólito López Revilla</b>   | <b>Presidente</b> | <b>IPICYT</b> |
| <b>Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro</b> | <b>Secretaria</b> | <b>IPICYT</b> |
| <b>Dr. Luis Antonio Salazar Olivo</b>     | <b>Sinodal</b>    | <b>IPICYT</b> |

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- $\beta$ , 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- $\beta$  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](mailto: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- $\beta$ , 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  $\geq 126$  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  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup>, 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 ( $26.8 \pm 3.59$ ). 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           |
|-----------------------|---|--|
| <b>Normalización</b>  |   |  |
| hsa-mir-16-5p         | 5' - GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCGCCAA - 3'  | 5' - TGTTTTTTTTTGTAGCAGCACGTAAATA - 3' |
| hsa-mir-24            | 5' - GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACACTGAT - 3'  | 5' - GTTTTGTTCCTACTGAGCTGA - 3'        |
| hsa-mir-106a          | 5' - GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCTACCT - 3'  | 5' - TGGGTAAAAGTGCTTACAGTGC - 3'       |
| U6 snRNA              | Rev 5'- AAAATATGGAACGCTTCACGAAT – 3'                          | Fwd 5'- CGCTTCGGCAGCACATATACTA – 3'    |
| <b>Blanco</b>         |   |  |
| 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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<br>n=10 | Sobrepeso<br>n=10 | Obesidad<br>n=10 | Normopeso<br>n=10 | Sobrepeso<br>n=10 | Obesidad<br>n=10 |
| <b>Edad (años)</b>              | 27.1 ± 3.47       | 27.9 ± 3.98       | 27.3 ± 3.40      | 25.1 ± 1.911      | 25.8 ± 3.99       | 28.5 ± 4.24      |
| <b>Peso (kg)</b>                | 67.69 ± 6.26      | 86.7 ± 7.24       | 108.39 ± 18.98   | 53.85 ± 2.74      | 66.87 ± 5.49      | 84.11 ± 9.43     |
| <b>Talla (cm)</b>               | 174.3 ± 6.12      | 172.7 ± 6.41      | 175.53 ± 7.38    | 163.5 ± 3.77      | 157.53 ± 4.86     | 161.06 ± 6.80    |
| <b>IMC</b>                      | 22.33 ± 1.13      | 29.03 ± 0.55      | 34.823 ± 4.24    | 20.16 ± 0.63      | 26.95 ± 1.16      | 32.31 ± 2.81     |
| <b>Perímetro abdominal (cm)</b> | 84.19 ± 5.81      | 100.05 ± 3.05     | 116.99 ± 13.59   | 76.67 ± 3.68      | 90.4 ± 5.92       | 101.73 ± 11.26   |
| <b>% Grasa corporal</b>         | 18.73 ± 3.17      | 30.86 ± 1.07      | 36.36 ± 6.11     | 29.72 ± 1.76      | 41.87 ± 1.91      | 47.55 ± 2.48     |
| <b>Presión arterial (mmHg)</b>  |                   |                   |                  |                   |                   |                  |
| 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     |
| <b>Frecuencia cardiaca</b>      | 73.3 ± 6.86       | 72 ± 10.99        | 80 ± 11.50       | 82.6 ± 12.99      | 79.1 ± 11.47      | 74.87 ± 15.28    |
| <b>Glucosa capilar (mg/dl)</b>  | 92.7 ± 11.87      | 89.9 ± 7.56       | 98.5 ± 21.60     | 103.8 ± 19.98     | 91.5 ± 11.43      | 112.75 ± 36.18   |
| <b>Peso al nacimiento (g)</b>   | 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<br>n=10 | Sobrepeso<br>n=10 | Obesidad<br>n=10 | Normopeso<br>n=10 | Sobrepeso<br>n=10 | Obesidad<br>n=10 |
| <b>Enfermedad Dx (%)</b>                  |                   |                   |                  |                   |                   |                  |
| Afirmativo                                | 10                | 0                 | 10               | 0                 | 0                 | 20               |
| Negativo                                  | 90                | 100               | 90               | 100               | 90                | 80               |
| <b>Actividad física (%)</b>               |                   |                   |                  |                   |                   |                  |
| 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                |
| <b>Tabaquismo (%)</b>                     |                   |                   |                  |                   |                   |                  |
| Afirmativo                                | 20                | 20                | 50               | 10                | 20                | 0                |
| Negativo                                  | 80                | 80                | 50               | 90                | 80                | 100              |
| <b>Suplementación (%)</b>                 |                   |                   |                  |                   |                   |                  |
| Afirmativo                                | 30                | 40                | 10               | 30                | 10                | 20               |
| Negativo                                  | 70                | 60                | 90               | 70                | 90                | 80               |
| <b>Variación peso últimos 6 meses (%)</b> |                   |                   |                  |                   |                   |                  |
| Aumento                                   | 30                | 30                | 10               | 20                | 80                | 80               |
| Reducción                                 | 0                 | 30                | 50               | 10                | 0                 | 0                |
| Negativo                                  | 70                | 40                | 40               | 70                | 20                | 20               |
| <b>Antecedentes familiares (%)</b>        |                   |                   |                  |                   |                   |                  |
| 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/ $\mu$ 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- $\beta$  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-<br>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 |

|     | <b>Vía KEGG</b>  | <b>Valor P</b> | <b>Ajuste FDR</b> | <b>KEGG ID</b> |
|-----|--|----------------|-------------------|----------------|
|     | 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**

| <b>Vía KEGG</b>                     | <b>Valor P</b> | <b>Ajuste FDR</b> | <b>KEGG ID</b> |
|-------------------------------------|----------------|-------------------|----------------|
| Endocitosis                         | 0.001724       | 0.012068          | ko04144        |
| Vía de señalización de TGF- $\beta$ | 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- $\beta$                  | 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- $\beta$  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- $\beta$  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/ $\mu$ 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.

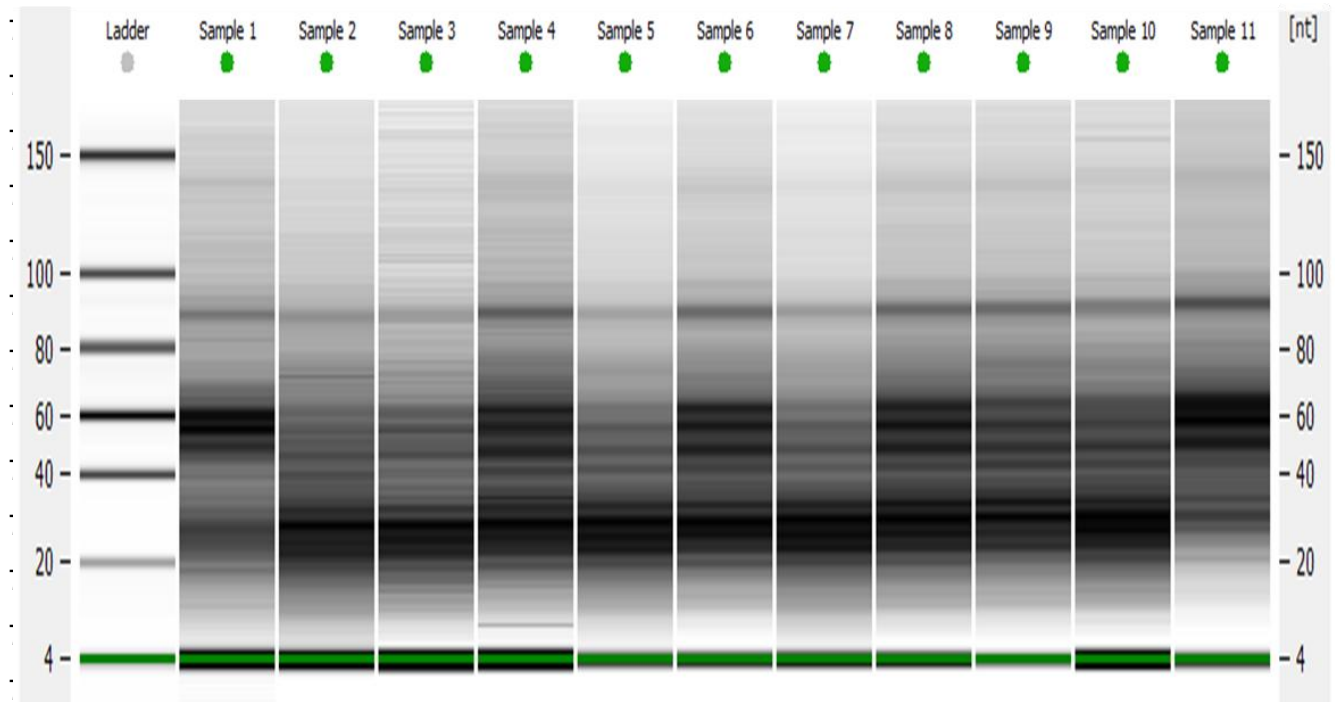
779 75. Bottcher Y, Unbehauen H, Kloting N, Ruschke K, Korner A, Schleinitz D, et al.  
780 Adipose tissue expression and genetic variants of the bone morphogenetic  
781 protein receptor 1A gene (*BMPR1A*) are associated with human obesity.  
782 *Diabetes*. 2009;58: 2119–2128.

783

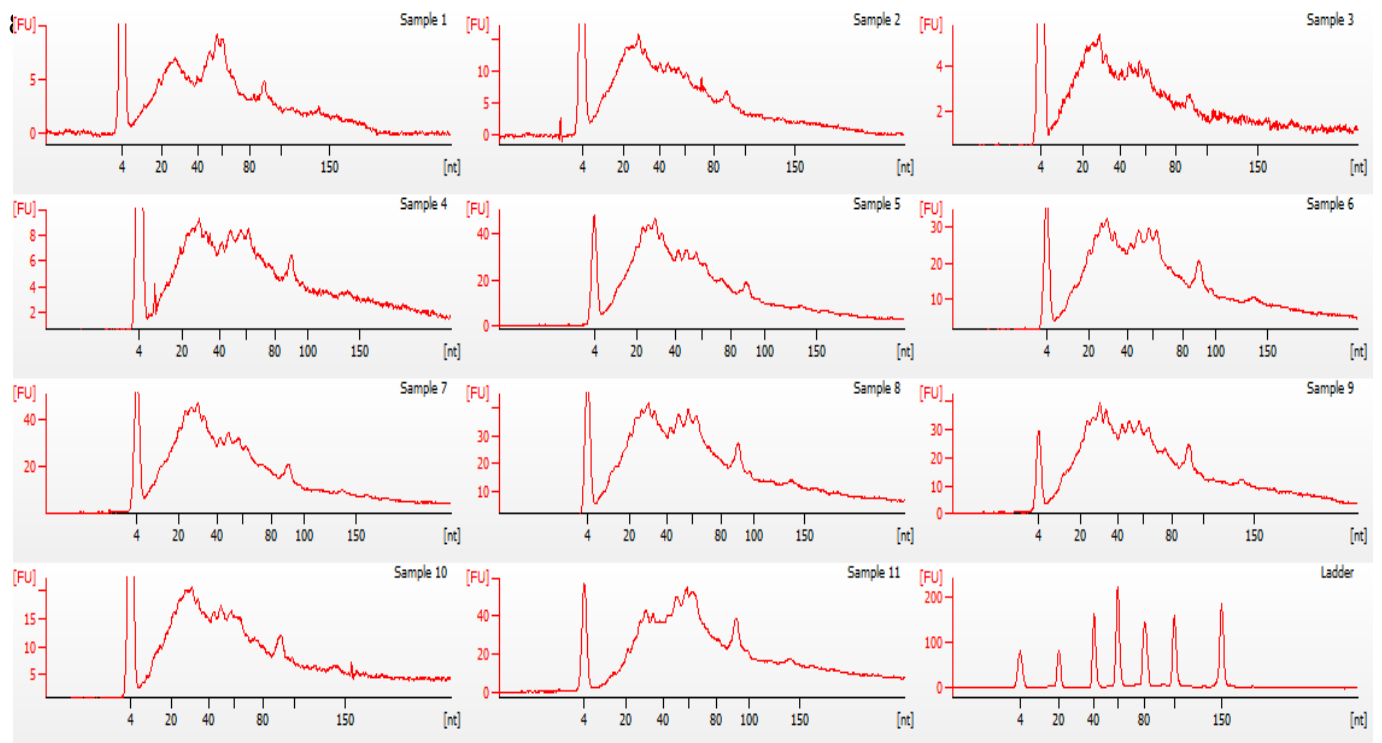


784 **Figura 1.**

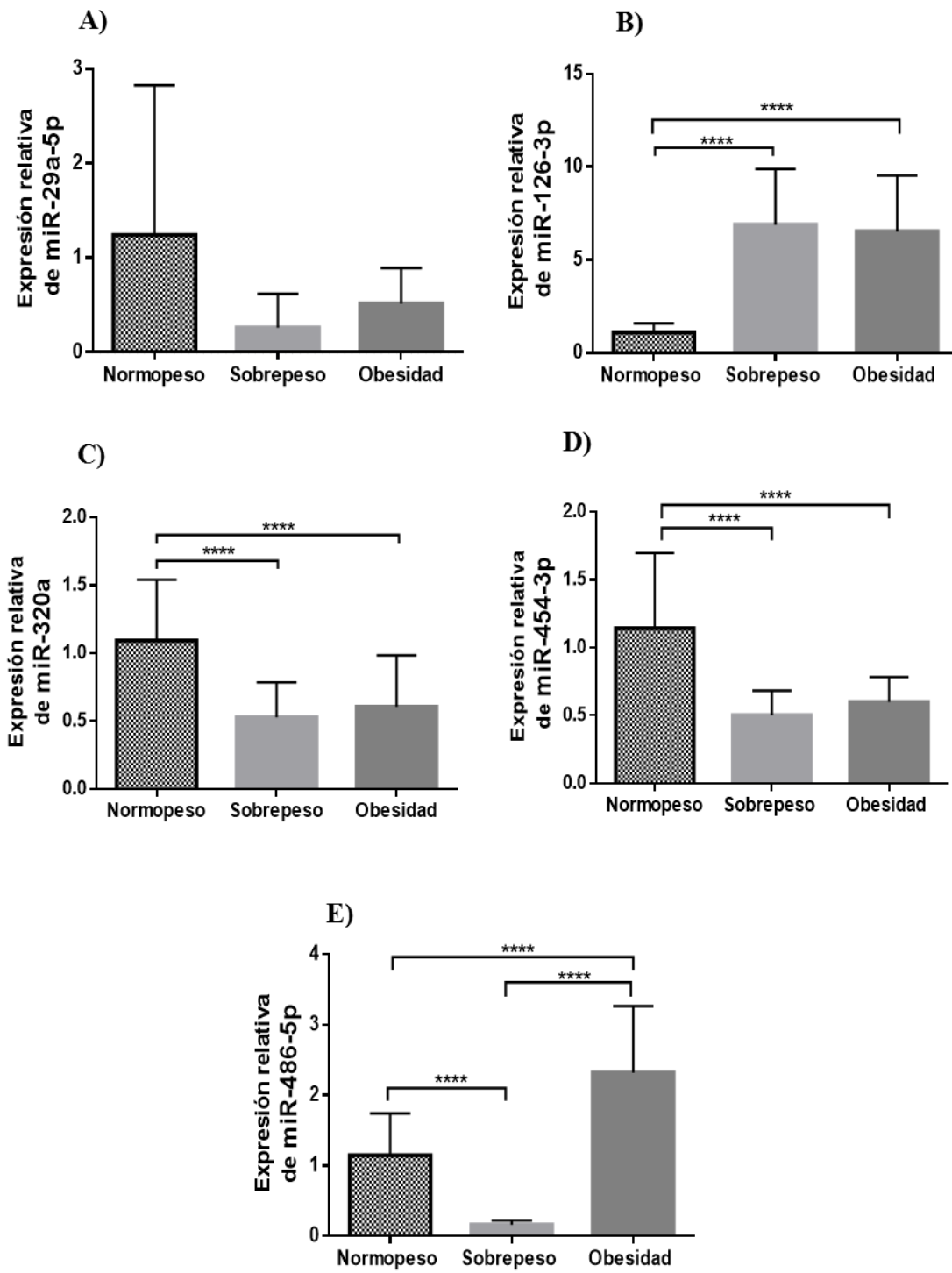
785 **A)**



799 **B)**



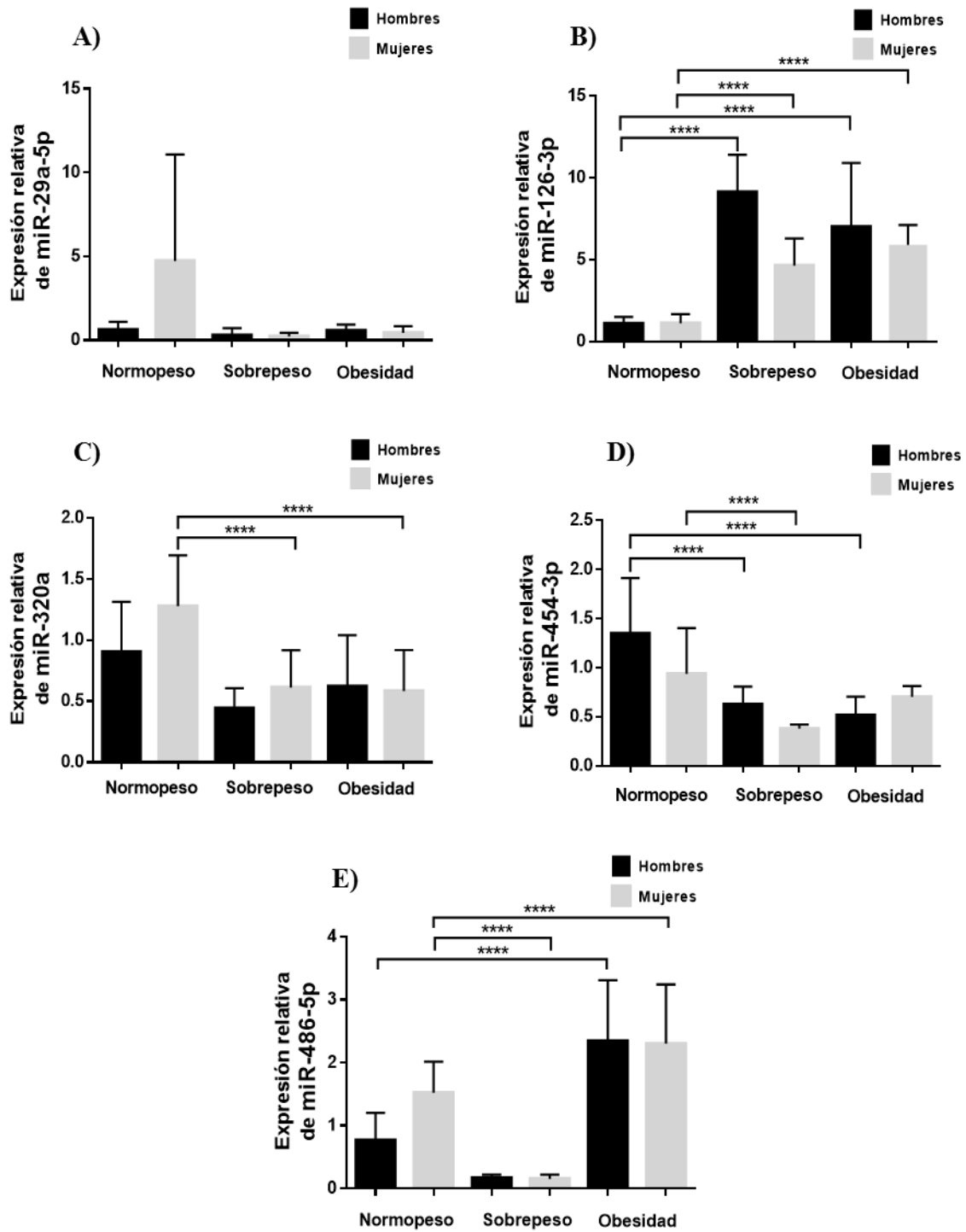
801 **Figura 2**



802

803

804 **Figura 3.**



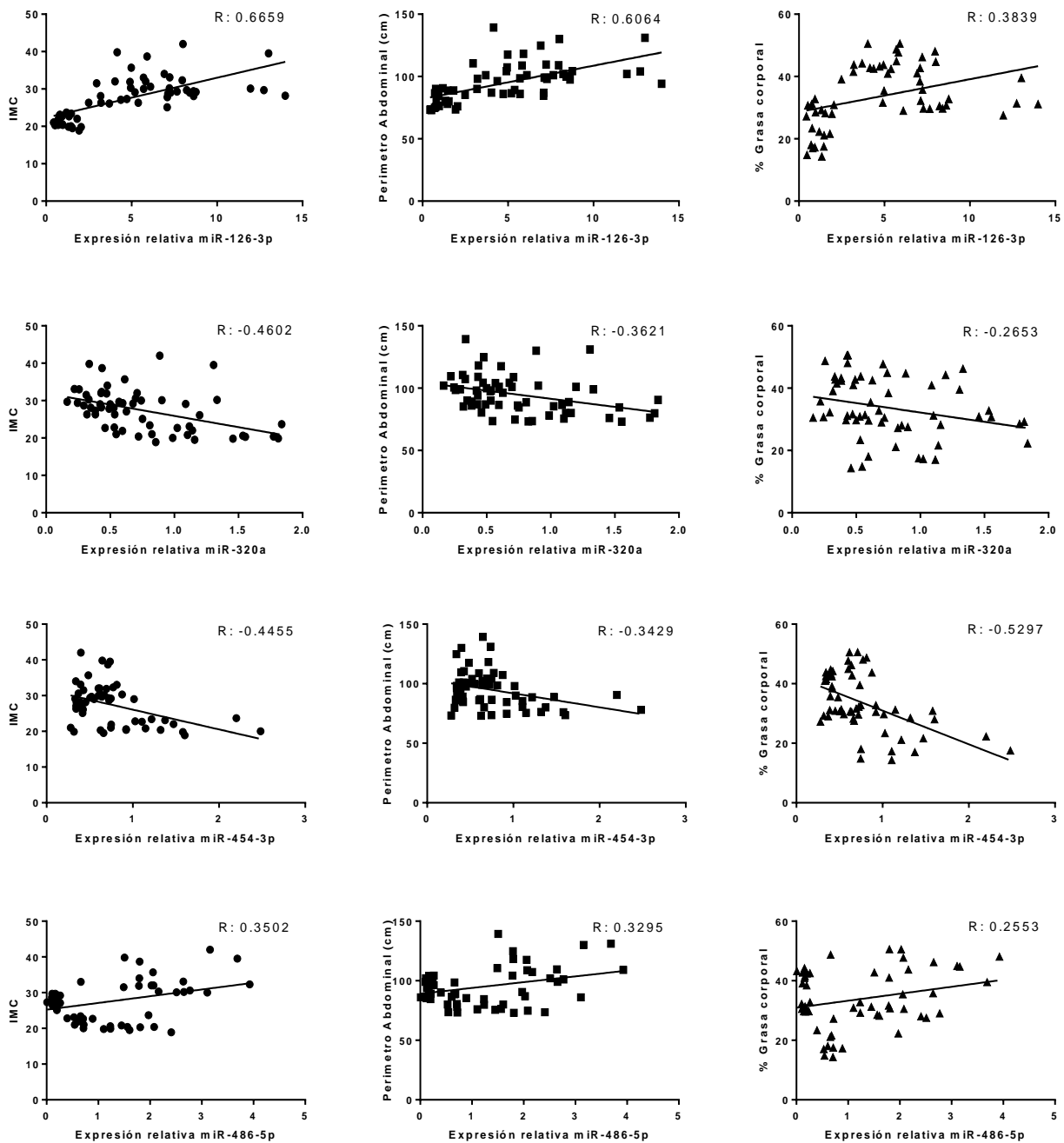
805

806

807

808 **Figura 4.**

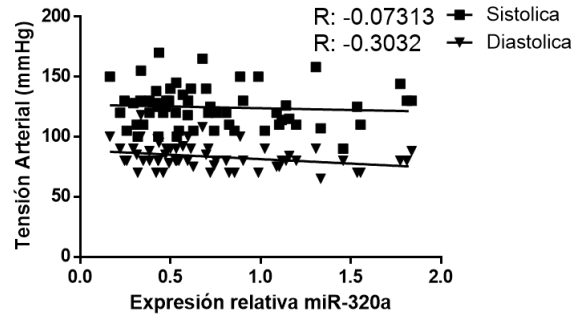
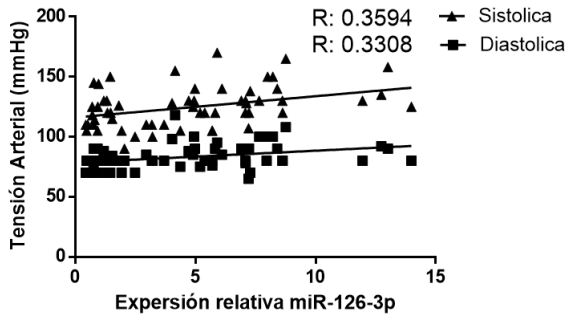
809



810

811

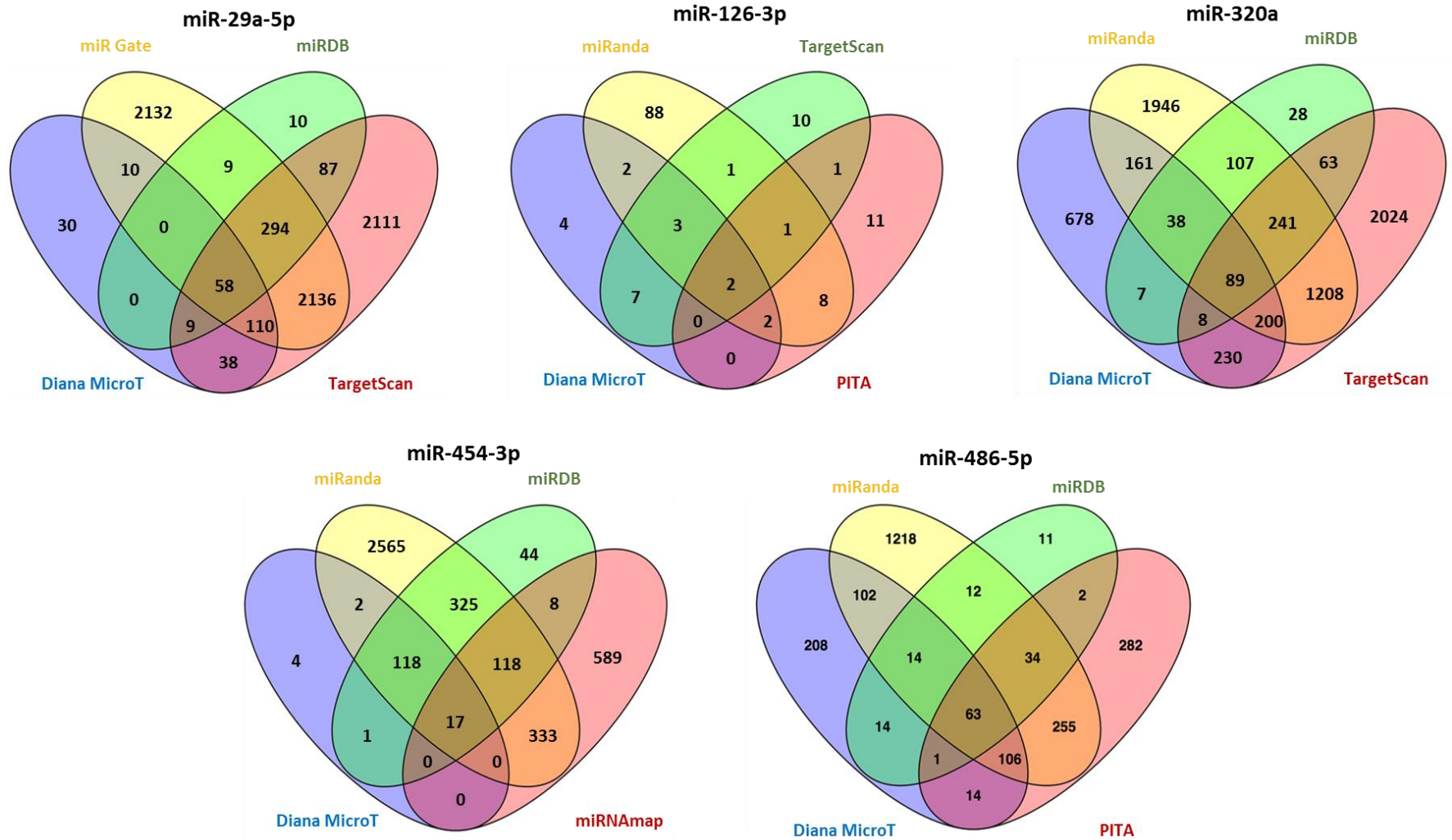
812 **Figura 5.**



813

814

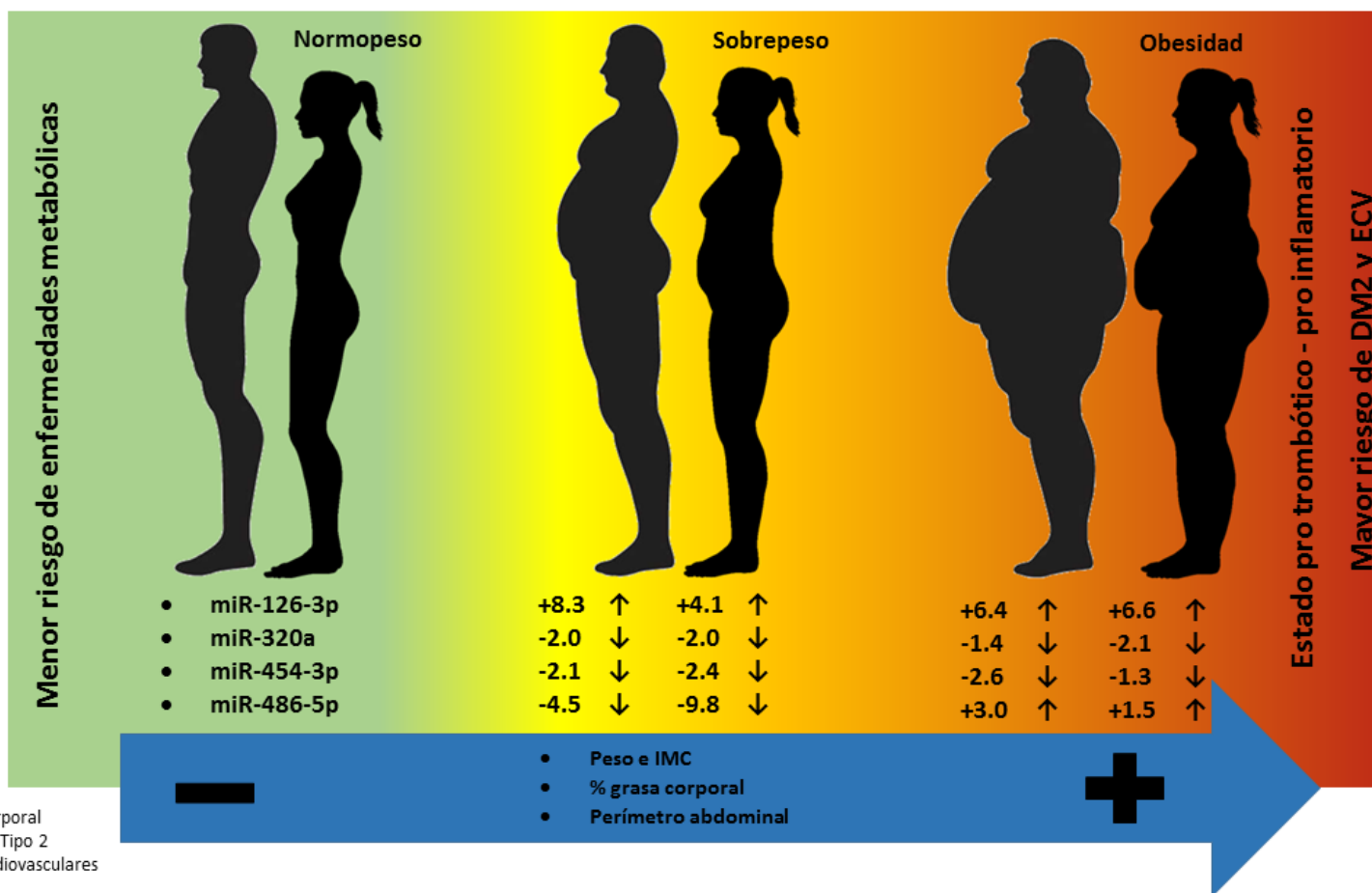
815 **Figura 6.**



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