

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO CIENCIAS DE LA SALUD

Doctorado en Ciencias Biomédicas, orientación Inmunología



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR, FISIOLOGIA I IMMUNOLOGIA

Doctorado en Inmunología Avanzada

UAB

Universitat Autònoma
de Barcelona

TESIS DOCTORAL EN COTUTELA

“Expresión relativa de *microRNAs* (*miR-21*, *miR-24*, *miR-34a*, *miR-128-1*) en suero y exosomas y su asociación con biomarcadores inmunometabólicos y el perfil obesogénico en individuos con tejido adiposo disfuncional”

DOCTORANDA:

MSc. Jacqueline Alejandra Noboa Velástegui

DIRECTORA:

Dra. en C. Rosa Elena Navarro Hernández

CODIRECTOR:

Dr. Ignacio Gerardo Álvarez Pérez

Marzo 2025

“Expresión relativa de *microRNAs* (*miR-21*, *miR-24*, *miR-34a*, *miR-128-1*) en suero y exosomas y su asociación con biomarcadores inmunometabólicos y el perfil obesogénico en individuos con tejido adiposo disfuncional”

I. ÍNDICE GENERAL

I.	ÍNDICE GENERAL	I
II.	ÍNDICE DE TABLAS	III
III.	ÍNDICE DE FIGURAS	IV
IV.	ABREVIATURAS, SIGLAS Y ACRÓNIMOS	V
V.	GLOSARIO	VIII
VI.	PALABRAS CLAVE	IX
1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	MARCO TEÓRICO	3
2.1.	Tejido adiposo	3
2.1.1.	Definición	3
2.1.2.	Función	3
2.1.3.	Ontogenia del TA	3
2.1.4.	Clasificación histológica del TA	3
2.1.5.	Adipocitos y adipogénesis	6
2.1.6.	Estroma del tejido adiposo	9
2.1.7.	Modelo celular in vitro de TA: Línea celular de preadipocitos 3T3-L1	11
2.2.	Función secretora de las células del tejido adiposo	11
2.2.1.	Adipocinas	11
2.2.2.	Exosomas	16
2.2.3.	<i>microRNAs</i>	24
2.2.4.	Factores de transcripción y proteínas de señalización	30
2.3.	Perfil obesogénico	31
2.3.1.	Distribución corporal del tejido adiposo	31
2.3.2.	Tejido adiposo disfuncional	33
2.3.3.	Inflamación	36
2.3.4.	Resistencia a la insulina	37
2.3.5.	Dislipidemia	38
2.3.6.	Biomarcadores inmunometabólicos	39
3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	43
4.	HIPÓTESIS	44

5.	OBJETIVOS	45
5.1.	General	45
5.2.	Particulares	45
6.	DISEÑO METODOLÓGICO	46
6.1.	Sedes del estudio y periodo de tiempo.....	46
6.2.	Consideraciones éticas, legales y de bioseguridad	46
6.3.	Diseño del estudio	47
6.3.1.	Universo muestral.....	47
6.3.2.	Tipo de estudio	47
6.3.3.	Grupos y criterios de estudio.....	47
6.4.	Diseño estadístico	48
6.4.1.	Selección de la muestra	48
6.4.2.	Definición de las variables	49
6.4.3.	Plan de registro, procesamiento, captación y presentación de resultados	52
6.5.	Metodología	53
6.5.1.	Evaluación clínica y clasificación de los grupos de estudio con y sin TA disfuncional	53
6.5.2.	Determinación de los biomarcadores inmunometabólicos en muestras sanguíneas de los individuos incluidos en el estudio	55
6.5.3.	Aislamiento de exosomas de línea celular 3T3-L1 y de plasma sanguíneo.....	58
6.5.4.	Identificación de las proteínas SFRP4, IRS1 y KLF4 en los exosomas aislados de plasma sanguíneo ..	60
6.5.5.	Determinación en suero y en exosomas de plasma sanguíneo los niveles de expresión relativa de <i>miR-21</i> , <i>miR-24</i> , <i>miR-34a</i> y <i>miR-128-1</i>	60
7.	RESULTADOS	62
8.	DISCUSIÓN.....	77
9.	CONCLUSIONES	84
10.	BIBLIOGRAFÍA	85
11.	ANEXOS	107
12.	FOLIO DE FOTOGRAFÍAS	114
13.	CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	155

II. ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1 RESUMEN DE EXPRESIÓN DE MIRS Y REGULACIÓN SOBRE MRNA DIANA.....	31
TABLA 2 VALORES DE REFERENCIA DEL PERFIL DE LÍPIDOS	41
TABLA 3 VALORES DE REFERENCIA PARA MARCADORES DE INFLAMACIÓN	41
TABLA 4 VALORES DE REFERENCIA DE BIOMARCADORES METABÓLICOS	42
TABLA 5 DEMOGRAFÍA, ESTADO DE SALUD Y CLASIFICACIÓN DE LOS INDIVIDUOS EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO....	63
TABLA 6 EVALUACIÓN DEL ESTATUS DE ADIPOSIDAD CORPORAL EN LOS SUJETOS DEL ESTUDIO.....	65
TABLA 7 MODELO DE REGRESIÓN LINEAL PARA EL ESTATUS DEL TEJIDO ADIPOSO	66
TABLA 8 MODELO DE REGRESIÓN LOGÍSTICA BINARIA PARA EL ESTATUS DEL TEJIDO ADIPOSO.....	66
TABLA 9 NIVELES DE BIOMARCADORES METABÓLICOS Y ESTATUS DE RI EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO	68
TABLA 10 CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES EN EXOSOMAS OBTENIDOS A PARTIR DE KIT COMERCIAL (INVITROGEN)	74

III. ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE TEJIDO ADIPOSO	6
FIGURA 2 ADIPOGÉNESIS	8
FIGURA 3 ESTRUCTURA LINFOIDE DE LA FRACCIÓN ESTROMAL DEL TEJIDO ADIPOSO	10
FIGURA 4 VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE ADIPONECTINA	13
FIGURA 5 VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE CCL2	14
FIGURA 6 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE QUEMERINA.....	16
FIGURA 7 VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	17
FIGURA 8 TRÁFICO DE EXOSOMAS.....	20
FIGURA 9 REPRESENTACIÓN GENERAL DEL CONTENIDO BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DE LOS EXOSOMAS	21
FIGURA 10 COMUNICACIÓN CELULAR MEDIANTE EXOSOMAS	22
FIGURA 11 BIOGÉNESIS DE MIRS.....	26
FIGURA 12 MODELOS TEÓRICOS DE LA COMUNICACIÓN CELULAR REGULADA POR MIRS.....	27
FIGURA 13 NOMENCLATURA DE MICRORNAS	28
FIGURA 14 DISTRIBUCIÓN DEL TA EN HUMANOS	32
FIGURA 15 CLASIFICACIÓN VISUAL DE LA DISTRIBUCIÓN DE GRASA	33
FIGURA 16 BALANCE DE RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN TEJIDO ADIPOSO	34
FIGURA 17 PROCESOS DE EXPANSIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO	35
FIGURA 18 EXPANSIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO BLANCO	36
FIGURA 19 CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE EN EL TEJIDO ADIPOSO	37
FIGURA 20 MECANISMO DE INDUCCIÓN DE RESISTENCIA A LA INSULINA EN OBESIDAD	38
FIGURA 21 ESQUEMA DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA MEDIADA POR RESISTENCIA A LA INSULINA... 39	
FIGURA 22 METABOLISMO DE LÍPIDOS EN ADIPOCITOS.....	40
FIGURA 23 NIVELES DE PERFIL DE LÍPIDOS EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO	64
FIGURA 24 PERFIL DE LDLC EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO	69
FIGURA 25 NIVELES DE BIOMARCADORES DE INFLAMACIÓN EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO	70
FIGURA 26 PERFIL DE ADIPONECTINA Y QUEMERINA EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO	71
FIGURA 27 CORRELACIÓN DEL PERFIL DE OLIGÓMEROS DE ADIPONECTINA Y QUIMIOCINAS CON EL PERFIL OBESOGÉNICO	72
FIGURA 28 FOTOMICROGRAFÍA DE EXOSOMAS DE PLASMA SANGUÍNEO	73
FIGURA 29 MARCADORES CD9 Y CD81 DE EXOSOMAS AISLADOS POR SEC DE PLASMA SANGUÍNEO	73
FIGURA 30 NIVELES DE KLF4 Y SFRP4 EN EXOSOMAS DE PLASMA SANGUÍNEO	74
FIGURA 31 CONCENTRACION DE MICRORNAS TOTALES EN SUERO Y EXOSOMAS DE PLASMA SANGUÍNEO.....	75
FIGURA 32 EXPRESIÓN RELATIVA DE MIR-34A.....	75
FIGURA 33 EXPRESIÓN RELATIVA DE MIR-128-1.....	76
FIGURA 34 CORRELACIÓN DE VARIABLES DE PREDICCIÓN DE TA DISFUNCIONAL Y EXPRESIÓN RELATIVA DE MIR-34A Y MIR-128-1 SÉRICOS Y DE EXOSOMAS DE PLASMA SANGUÍNEO	76
FIGURA 35 PROCESO DE OBTENCIÓN DE FBS LIBRE DE EXOSOMAS	111
FIGURA 36 DIFERENCIACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR DE PREADIPOCITOS 3T3-L1	112
FIGURA 37 PREADIPOCITOS 3T3-L1 HIPÓXICAS Y TINCIÓN DE ORO	113

IV. ABREVIATURAS, SIGLAS Y ACRÓNIMOS

ABSI:	Índice de la forma corporal (del inglés <i>A Body Shape Index</i>)
AdEVs:	Exosomas derivados de adipocitos (del inglés <i>Adipocytes derived extra vesicles</i>)
AFM:	Microscopía de fuerza atómica (del inglés <i>atomic force microscopy</i>)
AGO2:	Proteína argonauta 2
ALT:	Alanino amino-transferasa
ASC:	Células madre adipocíticas
AST:	Aspartato amino-transferasa
AVI:	Índice de volumen abdominal (del inglés <i>Abdominal Volume Index</i>)
BAI:	Índice de adiposidad corporal (del inglés <i>Body adipose index</i>)
BAT:	Tejido adiposo café (del inglés <i>Brown adipose tissue</i>)
BeAT:	Tejido adiposo beige (del inglés <i>Beige adipose tissue</i>)
BRI:	Índice de redondez corporal (del inglés <i>Body Roundness Index</i>)
C3/C4:	Proteínas del sistema de complemento 3 y 4
CCL2:	Ligando quimiotáctico de quimiocina con motivo C-C 2
CEBP $\alpha/\gamma/\beta$:	Proteína de unión al potenciador $\alpha/\gamma/\beta$ (del inglés <i>CCAAT/enhancer-binding protein $\alpha/\gamma/\beta$</i>)
Cryo-EM:	Criomicroscopía electrónica (del inglés <i>cryogenic electron microscopy</i>)
DI:	Índice de disposición basal (del inglés <i>Basal Disposition Index</i>)
DICER:	Ribonucleasa miembro de la familia de la RNasa III (del inglés <i>Ribonuclease Dicer</i>)
DLS:	Dispersión dinámica de la luz (del inglés <i>Dynamic Light Scattering</i>)
DM2:	Diabetes mellitus tipo 2
FALC	Estructura linfoide asociada a grasa (del inglés <i>Fat Associated Lymphoid Cluster</i>)
FE:	Fracción de eyección
FSG:	Glucosa sérica en ayunas (del inglés <i>Fasting Serum Glucose</i>)
FSI:	Insulina sérica en ayunas (del inglés <i>Fasting Serum Insulin</i>)
FTIR:	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (del inglés <i>Fourier Transform Infrared</i>)
HDLc:	Colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (del inglés <i>High Density Lipoprotein cholesterol</i>)
HMW, MMW, LMW:	Formas multiméricas de adiponectina alto, mediano y bajo peso molecular (del inglés <i>High, Medium, Low Molecular Weight</i>)
HOMA:	Medida de modelo de homeostasis (del inglés <i>Homeostasis Model Assessment</i>)
HOMA- β :	Medida de modelo de homeostasis del funcionamiento de células β (del inglés <i>Homeostasis Model Assessment of β cell function</i>)
HOMA-D:	Medida de modelo de homeostasis de adiponectina (del inglés <i>Homeostasis Model Assessment-adiponectin</i>)

HOMA-IR:	Medida de modelo de homeostasis para resistencia a la insulina (del inglés <i>Homeostasis Model Assessment of Insuline Resistance</i>)
IC:	Índice de conicidad
ICC:	Índice cintura-cadera
IGC:	Índice de grasa corporal
IL-6:	Interleucina 6
IMC:	Índice de masa corporal
iNKT:	Células asesinas naturales invariantes (del inglés <i>invariant Natural Killer</i>)
IR:	Receptor de insulina (del inglés <i>Insulin Receptor</i>)
IRS1:	Sustrato del receptor de la insulina 1 (del inglés <i>Insulin Receptor Sustrate</i>)
IVLs:	Vesículas interluminales (del inglés <i>Interluminal Vesicles</i>)
KLF4:	Factores tipo Krüppel 4 (del inglés <i>Krüppel transcription factor 4</i>)
LDLc:	Colesterol de las lipoproteínas baja densidad (del inglés <i>Low Density Lipoprotein cholesterol</i>)
MALS:	Dispersión multiángulo de luz (del inglés <i>Multi Angle Light Scattering</i>)
M2:	Macrófagos M2
miR:	<i>microRNA</i>
MVB:	Cuerpos multivesiculares (del inglés <i>Multibody Vesicle Bodies</i>)
NEFA:	Ácidos grasos libres no esterificados (del inglés <i>Non-Esterified Fatty Acids</i>)
NK:	Célula asesina natural (del inglés <i>Natural Killer</i>)
NTA:	Análisis de seguimiento de nanopartículas (del inglés <i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>)
OMS:	Organización Mundial de la Salud
pCr:	Proteína C reactiva
PPAR γ :	Receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma (del inglés <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma</i>)
QUICKI:	Índice cuantitativo de comprobación de la sensibilidad a la insulina (del inglés <i>Quantitative Insulin Sensitivity Check Index</i>)
RI:	Resistencia a la insulina
SAT:	Tejido adiposo subcutáneo (del inglés <i>Subcutaneus Adipose Tissue</i>)
SEM:	Microscopía electrónica de barrido (del inglés <i>Scanning Electron Microscopy</i>)
SFRP4:	Proteína 4 secretada relacionada con frizzled (del inglés <i>Secreted Frizzled-Related Protein 4</i>)
SPR:	Resonancia de plasmon de superficie (del inglés <i>Surface Plasmon Resonance</i>)
STAT3:	Transductor de señales y activador de la transcripción tipo 3 (del inglés <i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>)
TA:	Tejido adiposo
TEM:	Microscopía electrónica de transmisión (del inglés <i>Transmission Electron Microscopy</i>)
TNF α :	Factor de necrosis tumoral tipo α (del inglés <i>Tumor Necrosis Factor-α</i>)
VAI:	Índice de adiposidad visceral (del inglés <i>Visceral Adiposity Index</i>)

VAT:	Tejido adiposo visceral (del inglés <i>Visceral Adipose Tissue</i>)
VSG:	Velocidad de sedimentación globular
WAT:	Tejido adiposo blanco (del inglés <i>White Adipose Tissue</i>)
WHtR:	Índice cintura estatura (del inglés <i>Waist To Height Ratio</i>)

V. GLOSARIO

CD9:	<i>Cluster domain 9</i> , conocido también como tetraspanina 9, es una proteína integral de membrana de 27KDa, cuya función principal es la adhesión celular. Receptor para PSG17.
CD81:	<i>Cluster domain 81</i> , comparte el 45% de similitud y 70% a nivel de aminoácidos con CD9 (1). Es una tetraspanina de membrana
CD86:	<i>Cluster de domain 86</i> , expresado en células presentadoras de antígeno, es ligando de dos proteínas de superficie de linfocitos T, CD28 y proteína 4 asociada a los linfocitos T citotóxicos.
Célula endotelial:	Tipo principal de célula aplanada que se encuentra en el revestimiento interno de los vasos sanguíneos, los vasos linfáticos y el corazón.
Célula mesenquimal:	También conocidas como células estromales multipotentes o células estromales mesenquimatosas, son células madre adultas no hematopoyéticas multipotentes presentes en múltiples tejidos, como la médula ósea, el tejido adiposo.
Estroma:	Células y tejidos que sostienen y dan estructura a los órganos, glándulas y otros tejidos del cuerpo
Ontogenia:	Formación y desarrollo individual de un organismo, referido en especial al período embrionario.
Oligodendrocito:	Célula que forma la vaina de mielina (una capa que reviste y protege las células nerviosas) del cerebro y la médula espinal.
Parénquima:	Tejido característico, fundamental o funcional de un órgano.
Reticulocito:	Eritrocitos en la última etapa de maduración
Tejido conectivo:	O también denominado estroma o tejido conjuntivo, es el tejido que sostiene, protege y estructura otros tejidos y órganos del cuerpo.

VI. PALABRAS CLAVE

- Tejido adiposo disfuncional
- Perfil obesogénico
- Biomarcadores inmunometabólicos
- *microRNAs*
- Exosomas
- Sobrepeso corporal

1. INTRODUCCIÓN

En el escenario del tejido adiposo (TA), se ha demostrado que los mecanismos de las respuestas inmune y metabólica están intrínsecamente conectados y mutuamente regulados. Por una parte, la respuesta inmune requiere de adaptación metabólica a nivel celular y orgánica, mientras que la regulación metabólica lleva a la activación de células del sistema inmune.

En el parénquima del TA se integran células del sistema inmune que en estado saludable contribuyen al mantenimiento de la homeostasis tisular, mientras que en trastornos metabólicos como la obesidad, donde el sello clásico es el incremento permanente e irregular en la masa grasa se caracteriza por un estado de inflamación sistémica y tisular crónica de grado bajo, con aporte de un perfil obesogénico mostrándose una transformación funcional (2).

Desde la perspectiva de los procesos inmunometabólicos fisiológicos y en el desarrollo de enfermedades, los reportes científicos muestran la implicación de moléculas bioactivas como los *microRNAs* (*miRs*), que se han identificado *in vivo*, *in vitro* e *in silico* evaluando su función mediante experimentos de sobreexpresión o silenciamiento, y los resultados muestran su potencial aplicación y eficacia en el contexto clínico (3-6).

Estudios previos sugieren que los *miRs* funcionan como supresores o reguladores de diferentes vías de señalización implicadas en procesos metabólicos y respuesta inmune, en este sentido la evidencia experimental muestra que se secretan a la circulación sanguínea en exosomas o unidos a proteínas transportadoras, mediante un proceso regulado susceptible de ser alterado durante procesos patológicos (7-10). En este contexto, el presente estudio propone evaluar el potencial vínculo y la contribución del patrón de expresión de *miRs* con la manifestación clínica de biomarcadores inmunometabólicos asociados al TA disfuncional.

El ambiente biológico revela una relación en la que el transductor de señales y activador de la transcripción (*STAT3* del inglés *signal transducer and activator of transcription 3*), proteína 4 secretada relacionada con frizzled (*SFRP4* del inglés *secreted frizzled-related protein 4*), factor tipo Krüppel 4 (*KLF4* del inglés *Krüppel transcription factor 4*) y sustrato del receptor de insulina 1 (*IRS1*) son genes diana regulados por *miR-21*, *miR-24*, *miR-34a* y *miR-128-1*, respectivamente. Adicionalmente, se ha documentado que estas proteínas son transportadas en exosomas hacia otros tejidos y órganos blanco (11-13).

De forma paralela en este estudio tomamos en cuenta otro escenario relativo a la polarización de monocitos (residentes del TA) M2 hacia M1 durante el proceso inflamatorio subclínico crónico de grado bajo que se favorece en el TA disfuncional, y que se observa por el incremento en los niveles de biomarcadores inmunometabólicos simultáneo al proceso de adipogénesis, en donde los

mecanismos implicados en la expresión de genes adipogénicos específicos involucran vías de señalización regulados por *miRs* (14, 15).

Con base en la experiencia previa de que los *miRs*-solubles se encuentran presentes en diferentes fluidos extracelulares, proponemos el desarrollo de un abordaje desde la integración de diferentes puntos conceptuales, con la siguiente estrategia:

- a) Con un enfoque inmunometabólico: dirigido a establecer el perfil de adipocinas, biomarcadores de inflamación y metabólicos en el proceso patogénico del tejido adiposo disfuncional.
- b) Con un enfoque de expresión molecular relativa: para determinar la expresión relativa de *miR-21*, *miR-24*, *miR-34a*, *miR-128-1* y contenido en exosomas de plasma sanguíneo de *SFRP4*, *IRS1* y *KLF4* relacionados con el proceso inflamatorio y metabólico. Con la estrategia propuesta, el diseño del proyecto se desglosa en vertientes diferentes: expresión relativa de *miRs* extraídos de exosomas de plasma y solubles en suero sanguíneo. E identificación y contenido de *SFRP4*, *IRS1* y *KLF4* en exosomas de plasma sanguíneo.
- c) Con un enfoque de asociación clínica: donde determinaremos la relación de la expresión relativa de un patrón selectivo de *miRs* con el *estatus* del TA disfuncional y los niveles de biomarcadores inmunometabólicos presentes en individuos con un perfil obesogénico.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Tejido adiposo

2.1.1. Definición

El TA es un tejido conectivo especializado integrado por células adiposas denominadas adipocitos que almacenan lípidos en forma de triglicéridos (TG). La distribución corporal del TA varía de acuerdo con el género y la edad (16).

2.1.2. Función

Para que el organismo pueda sobrevivir, necesita asegurar una entrega constante de energía, independiente del suministro variable de nutrientes desde el medio externo. Es así como, entre sus funciones están: mantener el calor corporal, amortiguar y proteger a los órganos vitales (17, 18), y por ser un órgano endocrino, participa en el metabolismo energético (19-21) y de hormonas sexuales (22, 23).

2.1.3. Ontogenia del TA

Formación primaria: en las semanas 14 a 16 de la etapa fetal se ha evidenciado la formación de las células del TA en las que se acumulan múltiples gotas de lípidos formando el BAT (24, 25). En esta etapa, la adipogénesis se centra en depósitos de grasa subcutánea, especialmente en la cara (26).

Formación secundaria: en la etapa fetal tardía (posterior a la semana 23) y en el periodo postnatal temprano, ocurre el proceso de diferenciación de células precursoras que acumulan lípidos, formando una única gota grande por célula que conduce a la diseminación de depósitos de grasa formando WAT en zonas de tejido conectivo (24, 25) y acumulación en visceral (26).

2.1.4. Clasificación histológica del TA

Histológicamente en los mamíferos se observan tres tipos de TA: el tejido adiposo blanco (WAT del inglés *white adipose tissue*), tejido adiposo café (BAT del inglés *brown adipose tissue*) y tejido adiposo Beige o Brite (BeAT del inglés *beige adipose tissue*). La observación del TA por metodologías de microscopía óptica y electrónica muestra poblaciones de adipocitos con características diferenciales en su estructura y morfología celular:

- *Adipocito en el BAT*: conocido también como adipomiocito, tiene un diámetro $\cong 50 \mu\text{m}$, su citoplasma contiene vacuolas de lípidos (multiloculares) y abundantes mitocondrias que en su membrana interna expresan la proteína desacoplante 1 (UPC1 por sus siglas en inglés

uncoupling protein 1) (27). Los marcadores celulares empleados para identificarlos son ¹LHX8, ²ZIC1 (28).

Su función principal la ejecutan las mitocondrias, en el proceso llamado termogénesis, liberando energía en forma de calor, cuando el organismo se somete a cambios ambientales como frío y dieta. Así mismo el BAT emplea glucosa y ácidos grasos para el metabolismo mitocondrial (29).

Participa en el metabolismo de lípidos y carbohidratos (30) y en su función endocrina, secreta citocinas (IL-6, proteína S100b, CXCL-14, proteína morfogenética ósea 8b) y adipocinas, así como también, ³FGF2 que es inducida por el frío, ⁴VEGFA (31, 32), y factores neutrófilos (⁵BDNF, ⁶NGF) que cumplen una función esencial en el BAT, por su innervación por el sistema nervioso simpático y desarrollo vascular, estas citocinas en conjunto se conocen como BATocinas (27).

- *Adipocito en el WAT*: mide $\cong 160 \mu\text{m}$, contiene una vacuola lipídica (unilocular) que distiende la célula y compacta al citoplasma, mientras que el núcleo se desplaza al borde de la célula. Los marcadores celulares empleados para identificarlo son: ⁷Ob, ⁸Hoxc8, Hoxc9, Serpina3k, ⁹Wdnl-like, ¹⁰ASC-1 (28).

Su función principal es captar el exceso de lípidos y glucosa de la circulación sanguínea para proteger la acumulación patológica de triglicéridos (33), por lo que participa en tres procesos esenciales:

1) lipogénesis, proceso por el cual ingresan ácidos grasos hidrolizados por la lipoproteína lipasa (LPL por sus siglas en inglés *lipoprotein lipase*), transportados por los quilomicrones que se esterifican con una molécula de glicerol proveniente de la glucólisis, para formar TG (34)

2) lipólisis, proceso estimulado por glucagón o epinefrina que mediante unión al receptor β -adrenérgico del adipocito, activa una reacción en cadena de activación de la proteína G, adenilato ciclasa, produciendo AMPc que es detectado por la proteína quinasa A (PKA de inglés *protein kinase*) que paralelamente activa la lipasa sensible a hormona (LSH) y fosforila las perilipinas (proteínas que cubren la gota lipídica), éstas últimas sufren un cambio conformacional que permite ingresar a la LSH para hidrolizar a los TG en un glicerol y tres

1 LIM Homeobox 8

2 Zic Family Member 1

3 Fibroblast growth factor 2

4 Vascular Endothelial Growth Factor A

5 Brain derived neurotrophic factor

6 Nerve growth factor

7 Ob gene product, leptin

8 Homeobox c8

9 Westmead DMBA8 nonmetastatic cDNA 1 – like

10 Asc-type amino acid transporter 1

ácidos grasos libres que se unen a la proteína de unión de ácidos grasos adiposos y finalmente se anclan a la albúmina para ser transportados a los tejidos que lo requieren (35) y

3) oxidación de ácidos grasos. Como función endocrina, produce citocinas (IL-6, TNF α , IL-1, IL-10, ¹¹CCL2, angiotensinógeno) y adipocinas (36).

- *Adipocito en el BeAT*: adipocito con perfil funcional del BAT que está integrado en el WAT, tiene un tamaño intermedio entre el blanco y café de $\approx 100 \mu\text{m}$, se transdiferencia en los lechos capilares del WAT, su localización anatómica es en la región cervical, supraclavicular, escapular, axilar, perirrenal y periaórtica. Los marcadores celulares que lo identifican son: 12Tmem26, 13Tbx1, CD137, y 14CITED1 (28).

Sus funciones son almacenar o eliminar energía, de acuerdo con las condiciones ambientales o fisiológicas (37). A diferencia de BAT, la termogénesis no sólo la ejecuta a través de UCP1, sino también por el ciclo fútil del Ca²⁺ a través de la ATPasa de Ca²⁺ del retículo endoplásmico SERCA (38).

- *Adipocito rosa*: son células alveolares con microvellosidades en la superficie apical de la glándula mamaria que almacenan lípidos, secretan y producen leche (39). Se ha propuesto que se originan de la transdiferenciación del WAT y por aumento progresivo de hormonas adquieren características de células epiteliales y posterior a la lactancia el proceso se revierte hacia WAT (40-42).
- *Adipocito azul*: son adipocitos que se encuentran en el espacio perinusoidal entre los hepatocitos y las células endoteliales, conocidos también como células estrelladas o lipocitos (43). En estado quiescente contiene gran cantidad de vesículas que son el principal almacén de vitamina A del cuerpo, y en estado activo su principal función es participar en la homeóstasis de los retinoides y remodelación de la matriz extracelular hepática (42).

¹¹ CC motif chemokine ligand 2

¹² Transmembrane protein 26

¹³ T-box transcription factor

¹⁴ Cbp/p300-interacting transactivator 1

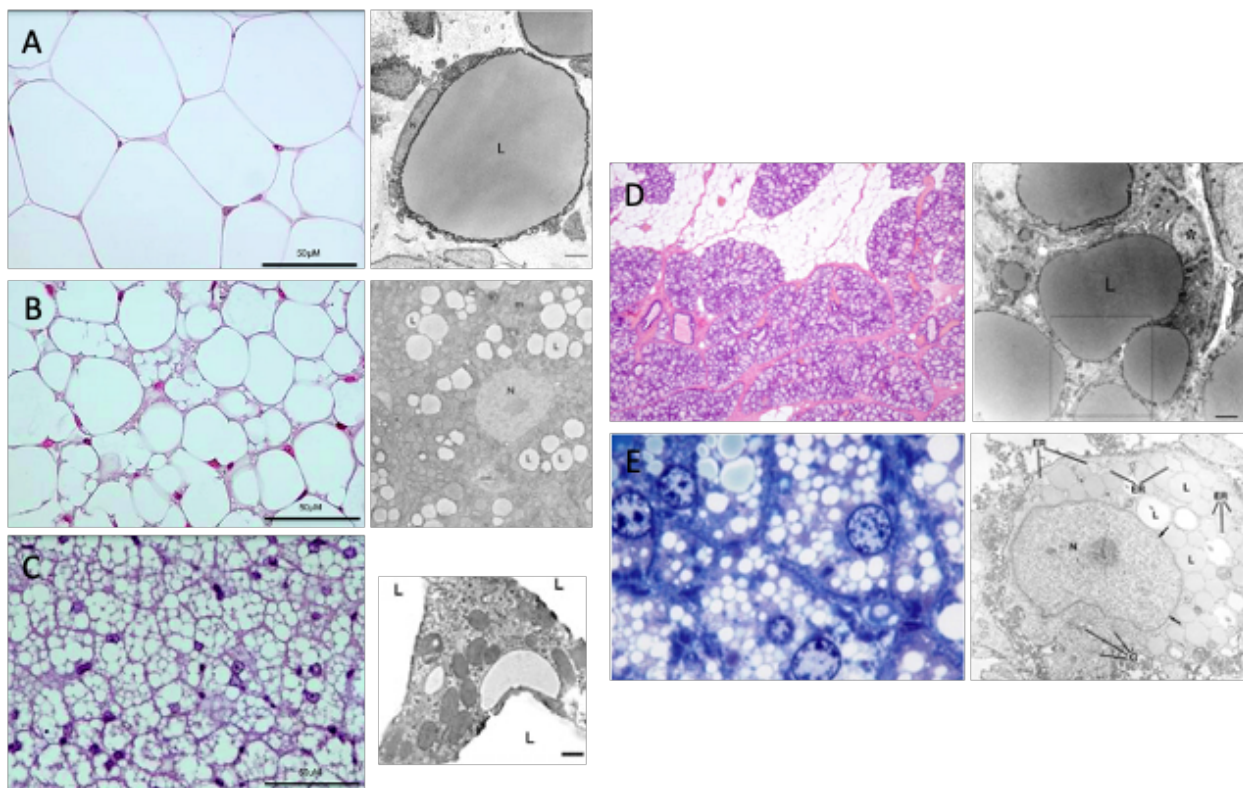


Figura 1 Clasificación histológica de tejido adiposo

Fotomicrografía óptica y por microscopia electrónica de transmisión: A) WAT (44, 45). B) BAT (44, 45), C) Beige (44, 46) , D) Adipocito rosado (44, 46), E) Adipocito azul(43, 47). Abreviaturas: N: núcleo; L: gota de lípidos; M: mitocondria; ER: retículo endoplasmático.

2.1.5. Adipocitos y adipogénesis

Los adipocitos son el principal constituyente celular del TA, que en su estado maduro se caracterizan por presentar una o varias gotas lipídicas intracelulares, que al agruparse en un gran número forman el TA (17). Dentro de las gotas lipídicas, se encuentran los TG, la forma más concentrada de almacenar energía, ya que carecen de agua y contienen el doble de densidad energética que los hidratos de carbono y proteínas (26).

El proceso por el cual el TA se expande y se torna funcional, se denomina adipogénesis y se desarrolla en dos fases: en la primera, en la que una célula mesenquimal (MSC del inglés *mesenchymal stem cell*) se compromete con el linaje preadipocítico hacia una célula progenitora de adipocitos (APC del inglés *adipocyte progenitor cells*), y la segunda es el proceso de diferenciación final, transformación de preadipocitos a adipocitos maduros (48, 49) (**Figura 2**).

La unión de hormonas y ligandos modulan vías de señalización en el proceso de la adipogénesis, por ejemplo: la insulina al activar la vía de señalización del IRS promueve la captación de glucosa en los preadipocitos para la diferenciación final, los glucocorticoides, ¹⁵BMP2 y BMP4 estimulan

¹⁵ Bone morphogenetic protein 2

el receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR γ por sus siglas en inglés *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*), al unirse a ¹⁶GCR o mediante ¹⁷SMAD4 respectivamente. PPAR γ es uno de los reguladores transcripcionales de la adipogénesis, promueve y actúa en conjunto con el coactivador CCAAT/proteína de unión a potenciadores- α (C/EBP α) (50).

BAT y WAT al originarse de dos linajes celulares distintos, presentan diferencias morfológicas y fisiológicas, el BAT como los miocitos del músculo esquelético, derivan de progenitores que expresan factor miogénico 5 (¹⁸Myf5) y ¹⁹PRDM16, mientras que las células del WAT se originan de células madre negativas a éstos (51). El tercer linaje de adipocitos, el BeAT, a pesar de que provienen del mismo progenitor del WAT y que se encuentran dentro él, expresan UCP1 al igual que el BAT (52), lo que le permite trasdiferenciarse hacia cualquiera de estos dos adipocitos, dependiendo de las necesidades biológicas del organismo, ya sea para almacenar lípidos o para una demanda energética (53-56).

Desde el punto de vista celular, la adipogénesis se desarrolla en tres estadios (57):

- i Compromiso de MSC: para que las MSC se comprometan con linaje de adipocitos intervienen distintas vías de señalización, como BMP, ²⁰Wnt que influyen a PPAR γ .
- ii Expansión clonal mitótica: replicación de DNA y duplicación celular, que se induce por señales hormonales (58).
- iii Diferenciación final: implica la expresión de genes y factores transcripcionales como la familia de C/EBPs y PPAR γ , aumenta la lipogénesis y la inducción de genes lipogénicos como el ²¹ACC, ²²FAS y ²³aP2. En esta etapa también participa ²⁴IGF-1 y la insulina (57).

¹⁶ Glucocorticoid receptor

¹⁷ SMAD family member 4

¹⁸ Myogenic regulatory factor

¹⁹ PR/SET Domain 16

²⁰ Proteínas de Wingless

²¹ Acetyl CoA carboxylase

²² Fatty acid synthase

²³ Adipocyte fatty acid binding protein

²⁴ Insulin-like growth factor 1

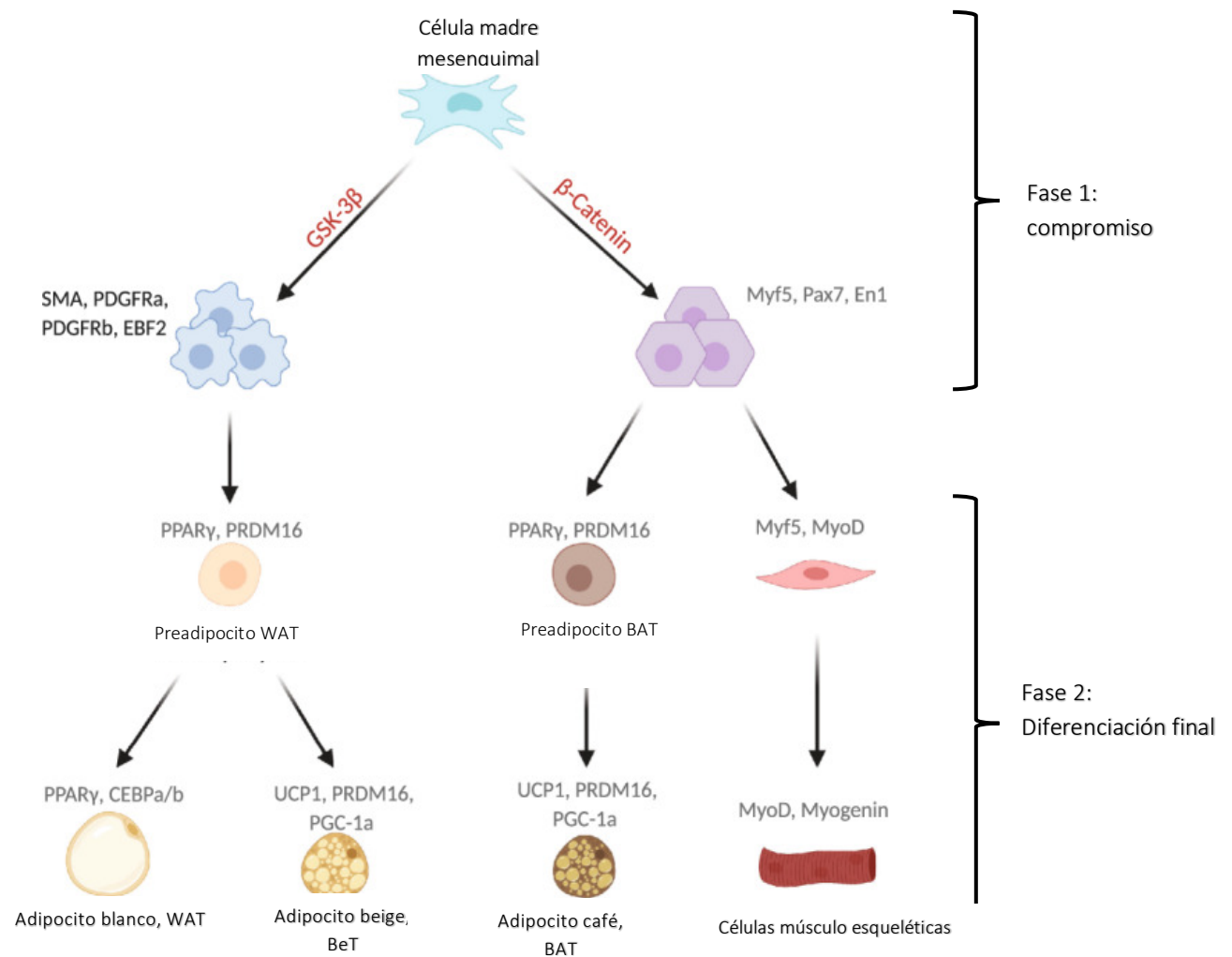


Figura 2 Adipogénesis

En la determinación hacia adipoblasto de la célula madre mesenquimal, ²⁵GSK-3β definen el compromiso hacia adipocito blanco o café (β-catenina). En la fase temprana de la diferenciación se define el cambio a través de la activación de la expresión de genes selectivos, mientras que la diferenciación terminal hacia adipocito blanco o café requiere la activación de los factores de transcripción y regulación alternos, PPARγ/CEBPa/b y UCP1/PRDM16/²⁶PGC-1a, respectivamente. Los adipocitos beige o BRITE pueden transdiferenciarse hacia fenotipo café o hacia fenotipo blanco, dependiente de propiedades termogénicas inducibles por exposición al frío, estimulación adrenérgica o el ejercicio físico (50).

2.1.5.1. Perfil molecular en la adipogénesis

En años recientes se ha evidenciado la función potencial que tienen los *microRNAs* (*miRs*) en la expresión génica del TA, desde la regulación en la adipogénesis, hasta la modulación de vías de señalización en sus funciones.

²⁵ Enzyme glycogen synthase kinase 3

²⁶ Peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator

En la adipogénesis, los *miRs* pueden regular positiva o negativamente la proliferación y diferenciación del WAT y BAT, como evidencia se reporta que *miR-9-5p* al unirse al ligando de ²⁷Wnt (Wnt3a), inhibe la señalización de Wnt β -catenina, estimulando la proliferación y diferenciación del WAT, por lo tanto, la sobreexpresión de *miR-9-5p* se relaciona positivamente con el desarrollo de obesidad (59). Asimismo, se han identificado *miRs* específicos que inducen adipogénesis *miR-422b*, *-148a*, *-107*, *-103*, *-30c*, *-30a-5p*, y *-143* (60).

El *cluster* formado por *miR-193a/b* y *miR-365*, favorece la adipogénesis en el linaje del BAT, ya que interviene la vía de PRDM16, uniéndose a genes inhibidores, que sugiere que la expresión de estos *miRs* se relaciona negativamente con el índice de masa corporal (IMC) con base en reportes previos que muestran que su concentración sérica se incrementa posterior a la cirugía bariátrica o en personas que emprenden un régimen de ejercicio y dieta (59).

Estudios recientes reportan la sobrerregulación de *miRs* en adipogénesis, entre ellos: *miR-519d*, *miR-30c* y *miR-378*, e inhibición de la adipogénesis por unión a PPAR γ y C/EBP α de *miR-155*, *miR-221* y *miR-222* (61).

2.1.5.2. Adipogénesis y desregulación metabólica

El número de adipocitos en un depósito específico de TA, se determina en las primeras etapas de la vida, manteniéndose estable hasta la adultez, sin embargo, el aporte prolongado y en exceso de calorías, favorece la hipertrofia del TA al diferenciarse a nuevos adipocitos a partir de los preadipocitos, por lo tanto, este desbalance entre adipocitos existentes y adipogénesis tiene impacto en el metabolismo energético (62). En modelos murinos se ha demostrado que alteraciones en la adipogénesis en la etapa de gestación, ocasiona disfunción del TA posnatal y predispone a riesgo cardiovascular (63).

Por otro lado, la falta de adipogénesis en el desarrollo ocasiona lipodistrofias, caracterizadas por la ausencia total o parcial de TA lo que ocasiona fallas en el metabolismo sistémico de la glucosa y lípidos, así como en el envejecimiento, la masa de TA disminuye, contribuyendo al deterioro metabólico (62).

2.1.6. Estroma del tejido adiposo

El estroma del TA está compuesto por células del sistema inmune, células madre, células endoteliales, preadipocitos, neuronas, que en conjunto forman la fracción estromal-vascular y representa una tercera parte del volumen del TA (64, 65) (**Figura 3**).

²⁷ Wingless/Integrated

2.1.6.1. Células del sistema inmune en el tejido adiposo

El principal componente del TA son adipocitos maduros y adipocitos maduros para desdiferenciarse (DFAT por sus siglas en inglés *mature adipocytes to dedifferentiate*) (66, 67), sin embargo, el TA alberga una diversidad de células del sistema inmune, que mantienen la homeostasis, controlan la termogénesis, promoviendo pardeamiento de WAT (68) y cumplen funciones vitales dentro del TA como modular el proceso inflamatorio que está íntimamente relacionado con la resistencia a la insulina (RI) (69).

Las células del sistema inmune residentes del TA se agrupan en una estructura linfóide asociada a grasa denominada ²⁸FALC, zona anatómica donde se desarrollan los eventos de la respuesta inmune, formando un domo, que en su lado externo está recubierto por células mesoteliales ²⁹CXCL13+, mientras que en el lado interno las recubren células fibroreticulares que regulan y reclutan más células del sistema inmune (70) (**Figura 3**).

El linaje mieloide es el más abundante dentro del TA, entre ellos los macrófagos que provienen del saco vitelino y son los primeros en colonizar y expandirse en el TA (71).

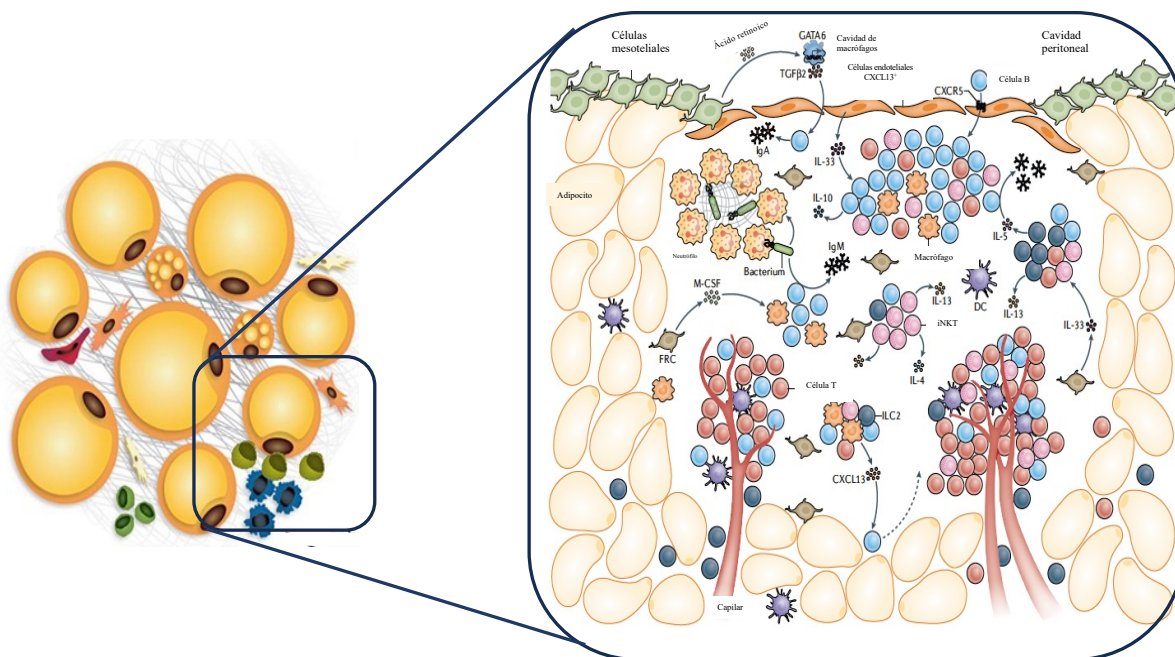


Figura 3 Estructura linfoide de la fracción estromal del tejido adiposo

Representación esquemática de la composición del TA, fracción estromal/vascular, formada por todas células no adiposas, y fracción de adipocitos inmaduros (65), y representación esquemática de la fracción estromal en estructura linfoides del TA, en donde se ubican las células del sistema inmune. Abreviaturas: GATA6 factor de transcripción, TGFβ2: factor de crecimiento tumoral beta 2; CXCL13: ligando de quimiocina 13; CXCR5: receptor de quimiocina 5; IL: interleucina; IgA-IgM inmunoglobulina A inmunoglobulina M, M-CSF: Factor estimulante de colonias macrófagos; ILC2: células linfoides humanas tipo 2, DC: célula dendrítica (70).

Por otro lado se encuentran las células dendríticas convencionales (cDCs, por sus siglas en inglés *conventional dendritic cells*) que mantienen la homeostasis en el TA al secretar IL-10, tanto las de

²⁸ Fat associated lymphoid cluster²⁹ Chemokine (C-X-C motif) ligand 13

perfil cDC1s y cDC2s (72). Dentro del TA sobresalen también poblaciones de células linfoides innatas tipo 2 (ICL2s), NKTi y Treg, que mantienen un perfil anti-inflamatorio dentro del TA al secretar citocinas de perfil 2, entre ellas IL-4, IL-10, IL-13 (69).

2.1.7. Modelo celular *in vitro* de TA: Línea celular de preadipocitos 3T3-L1

El uso de líneas celulares es un recurso en la adquisición de conocimiento sobre la función del TA. La línea embrionaria murina 3T3-L1, fibroblastos indiferenciados tipo preadipocitos, que se aislaron de clones de células 3T3 suizas derivadas de embriones disgregados de ratón de 17 a 19 días de edad (73) es el modelo de celular más utilizado. Esta línea en condiciones apropiadas se pueden diferenciar en células con fenotipo de adipocitos maduros, que se basa en el incremento de síntesis y acumulación de TG (74), razón por la cual se ha empleado para estudios de metabolismo de lípidos (75) y adipogénesis (76) entre otras.

Con base en que los adipocitos secretan vesículas extracelulares para mantenerse en comunicación con otras células dentro del TA y fuera del mismo, se observan dos tipos de vesículas extracelulares, vesículas extracelulares largas (IEVs por sus siglas en inglés *large extracellular vesicles*) de 200 a 500 nm y vesículas pequeñas (sEVs por sus siglas en inglés *small extracellular vesicles*) de 50 a 150 nm similar a las vesículas secretadas por la línea celular 3T3-L1 (15, 77).

En el estudio del TA en individuos con obesidad se ha evidenciado que el cargo de los exosomas se modifica por el estrés al que el TA se ve sometido. Como lo demostraron Wen *et al*, que miR-802-5p se incrementó en exosomas de células 3T3-L1 (78). En condiciones de hipoxia, las proteínas de exosomas que están relacionadas con la lipogénesis como ACC, la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y ácido graso la sintasa, se incrementan tres o cuatro veces (79); asimismo, de 1508 proteínas identificadas, 109 se observaron reguladas de manera distinta, diversa (80).

El uso de esta línea celular ha permitido identificar cambios en el cargo de los exosomas de adipocitos maduros, evitando la contaminación con otras células del TA y la plasticidad de células mesenquimales (81) al emplearse TA de biopsias, así como el costo y complejidad del uso de modelos animales.

2.2. Función secretora de las células del tejido adiposo

El TA es el productor de más de 600 proteínas y péptidos, su secretoma consta de adipocinas, adipomiocinas, lípidos que regulan la actividad de la insulina, además los exosomas que participan en la comunicación intercelular con otros órganos y tejidos (82).

2.2.1. Adipocinas

Las adipocinas, son polipéptidos de 12 a 35 KDa, que comprenden a las citocinas y quimiocinas clásicas, los factores vasoactivos y de coagulación, los reguladores del metabolismo de las

lipoproteínas que son secretados por los adipocitos (83, 84) y que muestran el estado funcional del TA, pueden actuar de forma endocrina, paracrina y autocrina, con un tiempo de vida media de minutos hasta a más de 24 horas (85). Sus funciones sobre los diferentes órganos son pluripotenciales, se asocian con la respuesta inflamatoria de forma bipolar, relacionadas con condiciones pro- o anti-inflamatorias (86, 87).

2.2.1.1. Adiponectina

Fue identificada por cuatro grupos entre 1995 y 1996, por lo que obtuvo distintos nombres, Acrp30 (88), AdipoQ (89), apM1 (90) y GBP28 (91). Es codificada por el gen *ADIPOQ*, ubicado en el cromosoma 3p.27, con un peso molecular de 28KDa (92).

Es secretada por los adipocitos maduros WAT y BAT al torrente sanguíneo en tres formas oligoméricas (92), trímero o de bajo peso molecular (LMW por sus siglas en inglés *low molecular weight*), hexámero (MMW por sus siglas en inglés *medium molecular weight*) y multimérica (HMW por sus siglas en inglés *high molecular weight*) (93), mayormente activa y representa el 50% de la adiponectina circulante (94). Se ha observado que su expresión depende de la edad, género (95) y etnia (96). Se ha visto reducida por citocinas proinflamatorias en un TA disfuncional como en obesidad, por el contrario aumenta con el ejercicio, por la captura de ácidos grasos y glucosa por el músculo (97).

Su estructura molecular consta de 3 regiones: dominio globular, dominio de colágeno y regiones de señal y variable. El dominio globular, resultante de la proteólisis, permite la formación de trímeros de bajo peso molecular (LMW) por enlace hidrofóbico, y las interacciones a nivel del dominio de colágeno por enlaces disulfuro permiten la formación de hexámeros (asociación de dos trímeros) de mediano peso molecular (MMW), y de multímeros de alto peso molecular de 4 a 6 trímeros (HMW), y se unen a los receptores: AdipoR1, AdipoR2 y T-caderina (93) (**Figura 4**).

Los receptores de adiponectina AdipoR1, AdipoR2 se expresan en la mayoría de los tejidos incluyendo las células del sistema inmune. ApoR1 se expresa en músculo esquelético, macrófagos, cerebro (98), al que tiene mayor afinidad LMW; ApoR2 se expresa principalmente en el hígado y adipocitos (98), al cual se une MMW; y un tercer receptor, T-caderina, se expresa abundantemente en las células endoteliales y musculares lisas vasculares lesionadas en las regiones ateroscleróticas, al que se une MMW y HMW (99, 100).

Su función es estimular la oxidación de ácidos grasos en el músculo esquelético e inhibir la producción de glucosa en el hígado, es un agente antiinflamatorio clásico al proteger la vasculatura, corazón, pulmón y colon (101, 102).

La adiponectina es abundante en sangre, representa el 0.01 a 0.05% de proteínas en plasma (103), su concentración en suero sanguíneo es de 5 – 10 mg/mL, con una vida media en plasma sanguíneo de 2.5 horas (92).

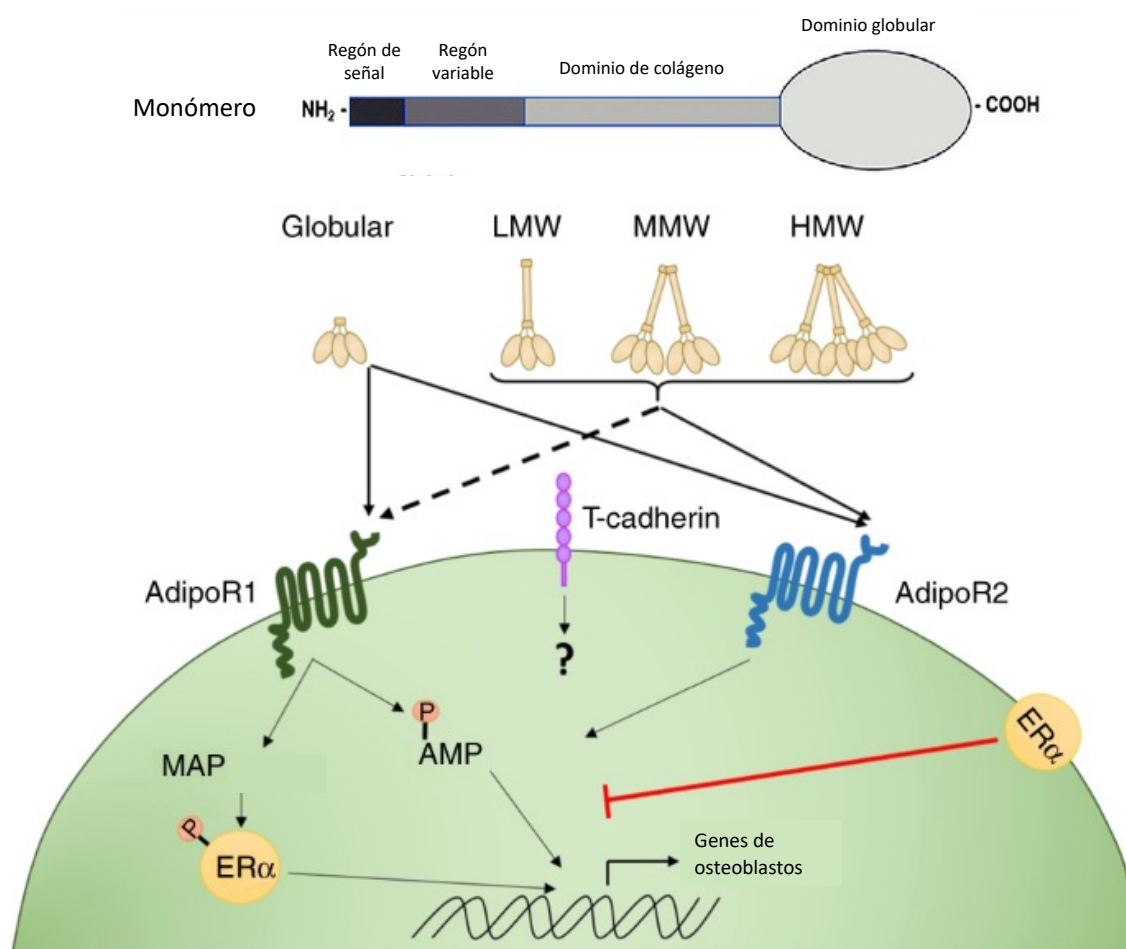


Figura 4 Vía de señalización de adiponectina

La adiponectina monomérica consta del dominio globular, un dominio colágeno, un dominio específico de la especie y un péptido señal. La oligomerización facilita la formación de los trímeros (LMW), hexámeros (MMW) y multímeros (HMW). La adiponectina interactúa con los receptores AdipoR1, AdipoR2 y T-Caderina (104).

Adicionalmente las adipocinas conocidas como adipomiocinas, término que se acuñó en la década del 2000, se refieren a ciertas miocinas (citocinas secretadas por el músculo esquelético) como irisina e IL-6, secretadas también por los adipocitos (105, 106).

2.2.1.2. Citocinas y quimiocinas

2.2.1.3. CCL2

El ligando quimiotáctico de quimiocina con motivo C-C 2 (CCL2), conocido también como proteína 1 quimiotáctico de monocitos (MCP1), fue la primera quimiocina humana de la familia CC descubierta (107). Es un polipéptido monomérico codificado por el gen *CCL2* ubicado en el cromosoma 17q11.2, con un peso molecular de 9 – 15 KDa (108).

Es secretada por células endoteliales, monocitos activados, fibroblastos, células musculares lisas vasculares, células epiteliales tubulares renales, astrocitos, microglía, neuronas (109),

preadipocitos y adipocitos maduros en menor proporción (110). Su expresión es inducible tras la exposición de estímulos inflamatorios como IL-1, IL-4, TNF α , TGF β , LPS, INF γ (111).

Su receptor principal es CCR2, se expresa en monocitos, T CD4+, T CD8+, NKTs, $\gamma\delta$ T, linfocitos B, células dendríticas plasmacitoides, basófilos, células endoteliales, microglia, células musculares (112). CCR2 activa la vía de señalización JAK2/STAT3, la señalización MAP cinasa y la señalización PI3K, que favorece la migración celular, proliferación, angiogénesis, incluso incrementa la autoestimulación de expresión de CCL2 (112), así como la liberación de calcio mediada por la fosfolipasa-C (111) (**Figura 5**). También se ha descrito que se une al receptor atípico de quimiocinas 1 (ACKR1), ACKR2 y las cadenas de glicosaminoglicanos de los proteoglicanos, incluidos el heparán sulfato, la heparina y el dermatán sulfato (113).

Participa en la migración e infiltración de células mieloides y linfoides, principalmente de macrófagos en el sitio de la lesión o infección; en el caso de obesidad o tejido adiposo disfuncional, en donde hay apoptosis de adipocitos (107), actúa como un factor importante vinculante del SAT con la alteración del metabolismo de la glucosa y la distribución de la grasa corporal (114).

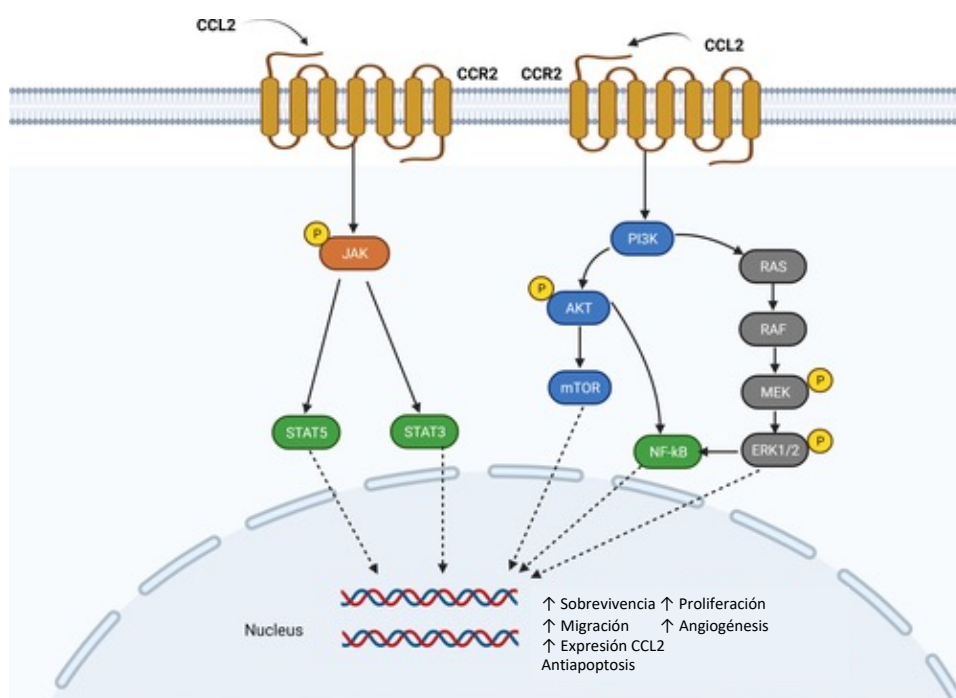


Figura 5 Vía de señalización de CCL2

El eje CCL2-CCR2 y la vía de transducción. CCR2 es un receptor típico acoplado a proteína G. Cuando CCR2 se une a su ligando CCL2, se activan una serie de señales descendentes, como JAK/STAT, p38MAPK y PI3K/AKT (115).

2.2.1.4. Quemerina

Se identificó por primera vez en el 2003 a partir de la purificación de células de cáncer de ovario (116) y en 2007 fue reconocida como una adipocina (117). Denominada también proteína

respondedora del receptor de ácido retinoico 2 (RARRES2 por sus siglas en inglés *retinoic acid receptor responder 2 protein*) o respondedora del receptor de ácido retinoico TIG2 (por sus siglas en inglés *RAR-responsive protein Tazarotene-induced gene 2*) (118), es una proteína de 18.6 KDa codificada por el gen RARRES2 (119), ubicada en el cromosoma 7q36.1. (120).

Se expresa en adipocitos e hígado (118). Inicialmente se secreta de manera inactiva denominada proquemerina o hChem163 en humanos y es activada al escindir 5 a 9 aminoácidos C terminal por una serina proteasa como elastasa y triptasa (118). La expresión de quemerina es estimulada por IL-1 β y TNF α (121). En años recientes se ha identificado isoformas de la quemerina, la más activa es la hChem157 que es escindida por una elastasa de neutrófilo (122).

Su receptor chem23 o CMLRK1 (123), expresado en macrófagos y CD inmaduras, induce la liberación intracelular de Ca²⁺, la fosforilación de la cinasa regulada por señales extracelulares e inhibe la acumulación de AMPc mediante la unión a heterotrímeros acoplados a proteínas G, induciendo así la activación de moléculas de señalización intracelular y participando en reacciones metabólicas e inflamatorias (124, 125). Asimismo, se ha propuesto al TLR4 como receptor activando la vía NF κ B, que este a su vez incrementa la expresión de TLR4 en más tejidos y liberación de CCL2 (126).

Principalmente actúa como un quimioatrayente de macrófagos, células dendríticas y NK (120), también participa en la adipogénesis, lipogénesis, angiogénesis, inflamación, proliferación y diferenciación de los adipocitos mediante regulación de la expresión de genes. Participa en la regulación del metabolismo energético en el proceso de inflamación crónica en TA, piel, sistema cardiovascular, tracto reproductivo, entre otros (127, 128). Se ha reportado que la concentración sérica de quemerina es proporcional con el IMC, por lo que está relacionada con el desgaste del disco vertebral en personas con obesidad (126), también se ha demostrado que desempeña un papel en el metabolismo de la glucosa y los lípidos EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica) (129).

Por otro lado, ensayos *in vitro* en líneas celulares de preadipocitos, han demostrado que la quemerina tiene un efecto antiinflamatorio, formando péptidos de quemerina, C15, que se unen a Chem23 e inhiben vías de señalización de genes proinflamatorios y suprime el reclutamiento de neutrófilos y monocitos en el omento de ratones tratados con C15 (130).

No existe un rango de concentración de quemerina validado en sangre, sin embargo, en un estudio en el que se evaluó la asociación de pacientes con artritis reumatoide, índice de masa corporal y quemerina, se determinó que una concentración ≥ 130 ng/mL es considerada elevada (131), de igual manera se ha reportado que personas con obesidad presentan mayores concentraciones de quemerina en plasma que en delgados, 4.3 ng/mL y 0.3 ng/mL respectivamente (132).

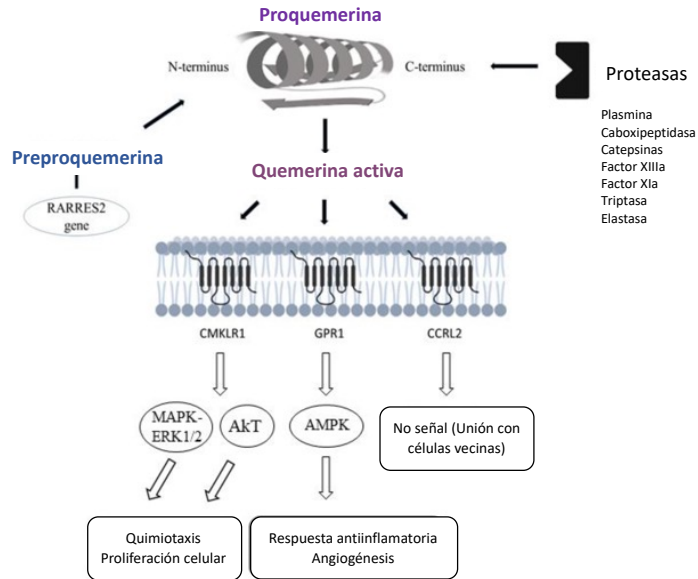


Figura 6 Vías de señalización de quemerina

Síntesis de quimeras y señalización de receptores. RARRES2 retinoic acid receptor responder 2; CMKLR1 chemokine-like receptor 1; GPR1 G protein-coupled receptor 1; CCRL2 C-C chemokine receptor-like 2 (130, 133).

2.2.2. Exosomas

Inicialmente las vesículas extracelulares (EVs por sus siglas en inglés *extracellular vesicles*) eran consideradas como material obsoleto que eliminaba aleatoriamente residuos o “basura” celular. Posteriormente dos grupos de investigación reportaron que participaban en la comunicación intercelular (134), al identificar vesículas de ~50 nm expulsadas directamente de los reticulocitos sanguíneos al espacio extracelular (135-137). Pero no es sino hasta 1987, cuando se acuñe el nombre de exosomas a estas vesículas que portaban receptores de transferrina (138) y que participan en la presentación antigénica al transportar moléculas de MHC II derivados de linfocitos B conduciendo respuestas específicas en linfocitos T, entre otras funciones de acuerdo al tipo celular (139).

La morfología de las EVs se ha observado tradicionalmente por microscopía electrónica de transmisión. Sin embargo, recientemente, con microscopía electrónica criogénica de transmisión, se ha logrado apreciar que pueden poseer varias capas superficiales (mono, bi o multicapa) (140), con vesículas internas y que su contenido puede variar de acuerdo con la electrodensidad (141, 142).

Los exosomas o Exos, son nanovesículas esféricas de membrana lipídica con un diámetro entre 10 y 160 nm (promedio 100 nm) (143-146) que pertenecen al grupo de las EVs, junto con los ectosomas (microvesículas y cuerpos apoptóticos) (147) y las vesículas provenientes de mitocondrias (148) (**Figura 7**). Las EVs se nombran de acuerdo con la célula que lo secreta, por ejemplo: prostasomas (30 - 500 nm, provenientes de células epiteliales prostáticas y aislados del plasma seminal (149, 150)), oncosomas (100 - 400 nm, provenientes de células de tejido tumoral (147)), dexosomas (30 -150 nm, provenientes de células dendríticas (151, 152)), lactosomas (20 a

100 nm (153), provenientes de tejido adiposo rosado o glóbulos de grasa láctea (154), se aíslan en la leche materna), cada una con función biológica diferente (155).

Los exosomas se han aislado de bacterias, hongos, plantas, y en el ser humano principalmente de tumores y fluidos corporales: sangre, orina, leche materna, lágrimas, saliva, semen, mucosidad, fluido cerebroespinal, humor vítreo, linfa, sudor (156).

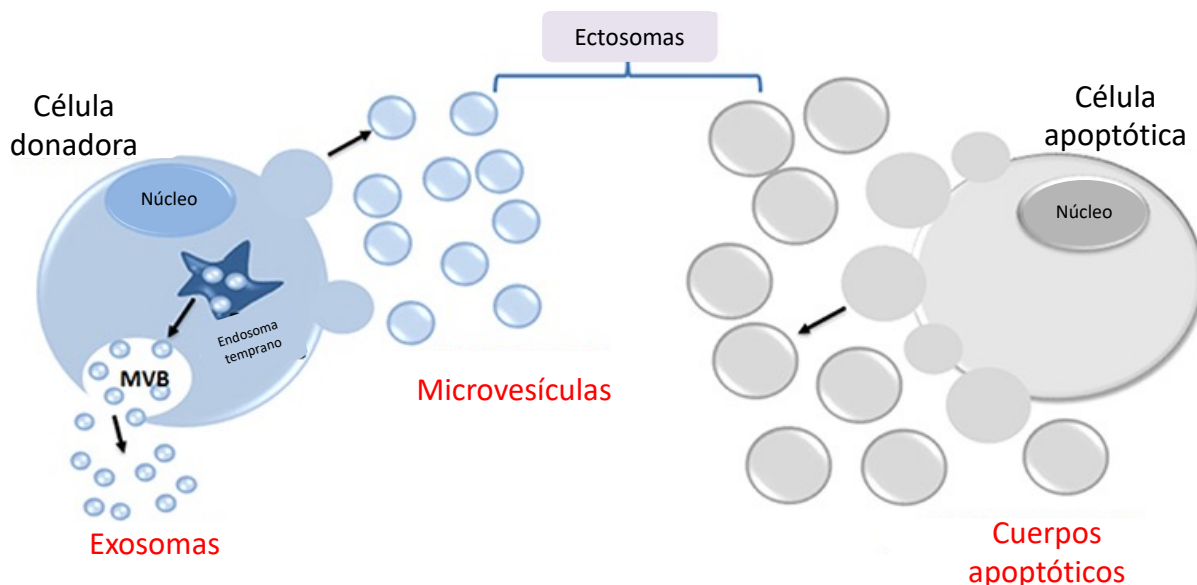


Figura 7 Vesículas extracelulares

Representación esquemática de los principales subtipos de vesículas extracelulares: exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos. Los exosomas, las EV más pequeñas, se originan dentro de una célula por fusión seguida de exocitosis de cuerpos multivesiculares (MVB) desde la membrana celular hacia el espacio extracelular. Los ectosomas se ensamblan y se desprenden de la membrana plasmática mediante un proceso de gemación (147).

2.2.2.1. Biogénesis, tráfico y contenido de exosomas

La generación de las EVs se clasifican de acuerdo con su origen membranal, en ectosomas y exosomas (155). Los ectosomas se originan de la evaginación de la membrana plasmática, los cuerpos apoptóticos son liberados posterior a la muerte celular programada, mientras que los exosomas son de origen endosomal, es decir de la invaginación de la membrana plasmática (157).

La biogénesis de los exosomas se inicia con la endocitosis, ya sea por la vía mediada por clatrina, vía mediada por caveolina y la vía independiente de clatrina y caveolina, de la membrana celular, formando un endosoma temprano (EE por sus siglas en inglés *early endosome*); que puede tomar dos rutas dependiendo del destino de su contenido; cuando es reciclado éste se localiza a los extremos del EE y se dirige al Aparato de Golgi o nuevamente a la membrana celular, por el contrario cuando su contenido es cargado a vesículas se localiza en la parte central, madurando a un endosoma tardío (LA por sus siglas en inglés *late endosome*) o cuerpo multivesicular (MVB por sus siglas en inglés *multivesicle body*); este endosoma vuelve a invaginar la membrana para formar vesículas interluminales (ILV por sus siglas en inglés *inter luminal vesicles*), que finalmente

se fusionará con lisosomas para ser degradado, o se fusionará con la membrana plasmática para ser exportados como exosomas (158).

El proceso de formación y cargo de los exosomas se realiza mediante dos vías:

1. Vía ESCRT, complejo de clasificación necesario para el transporte endosomal, en la que intervienen aproximadamente 20 proteínas clasificadas en cuatro complejos multiproteicos heteroligoméricos, ³⁰ESCRT-0-I-II y III que se encargan de formar los MVB, del brote vesicular y de clasificar la carga proteica a través de subunidades de unión a ubiquitina (159).

El complejo ESCRT-0, compuesto por ³¹HRS y ³²STAM1 ayuda a reconocer proteínas transmembrana ubiquitinizadas para su incorporación a la membrana endosomal. ESCRT-I, junto con ESCRT-II, inicia el brote local de la membrana endosomal; y ESCRT-III (reclutada por ESCRT-I, ESCRT-II y ³³ALIX) a través de su interacción con la enzima HD-PTP, participa en la desubiquitinación de proteínas (160, 161).

2. Vías independientes de ESCRT. Hasta el momento se han descrito dos vías independientes de ESCRT (162). La primera vía está relacionada con las tetraspaninas, que constituyen una superfamilia de proteínas que organizan microdominios de membrana formando grupos e interactuando con una gran variedad de proteínas de señalización transmembranales y citosólicas; estos dominios se denominan microdominios enriquecidos con tetraspanina y sirven como plataformas de transporte de carga, entre ellos CD9, CD63, CD81, CD82 (162).

En la segunda vía consiste en los dominios lipídicos de colesterol incluidas las flotilinas. Las flotilinas reclutan Rab31, lo que promueve el enriquecimiento de ³⁴EGFR en MVB que contienen CD63 (163). Dentro de esta vía también está la descrita por Stufteers *et al* en exosomas derivados de oligodendrocitos de ratón, que se relacionaban con la actividad de la esfingomielinasa (enzima productora de ceramida) (164). La ceramida se metaboliza a esfingosina 1-fosfato que tiene receptores en MVB lo que promueve su brote y a su vez la producción de ILVs, mientras que la ceramida sintética promueve directamente la producción de MVBs (165).

Para terminar el proceso de biogénesis, los exosomas son liberados por fusión del MVB con la membrana plasmática, en la que participan varias proteínas SNAREs de vesículas (v-SNAREs por sus siglas en inglés *vesicles-SNAREs*) y de membrana (*target membrane-SNAREs*), y Rab GTPasas (166). Las proteínas Rabs, como Rab27a, Rab27b y Rab35, reclutan enlaces específicos para unirse a las SNAREs, así como participar en el acoplamiento vesicular a la membrana celular (167).

³⁰ Endosomal sorting complexes required for transport

³¹ Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate

³² Signal Transducing Adaptor Molecule

³³ Apoptosis-linked gene 2-interacting protein X

³⁴ Factor de crecimiento epidérmico

Una vez que los exosomas han sido exportados de la célula donadora, la internalización en la célula receptora o diana puede ocurrir de tres maneras: por interacción con proteínas de membrana celular, como tetraspaninas, inmunoglobulinas, receptores de lectina, por fusión con la membrana plasmática y por último por endocitosis, fagocitosis o micropinocitosis (167).

Por lo tanto, de manera resumida, la biogénesis y tráfico de los exosomas se genera en diez etapas:

1. Invaginación de la membrana endosomal
2. Formación de ILVs
3. Carga de diferentes biomateriales (DNA, familia de RNA, proteínas, entre otros)
4. Formación de cuerpos multivesiculares (MVBs; ESCRT- 0, I, II, & 4, ³⁵Vps-4, ALIX)
5. Acoplamiento y fusión de MVB que han escapado de la fusión con componentes lisosomales a la membrana plasmática (proteínas ³⁶Rab y ³⁷SNARE)
6. Liberación de exosomas al medio extracelular
7. Interacción exosoma-receptor
8. Captación de exosomas receptor
9. Internalización del exosoma y
10. Liberación del contenido del exosoma en el citoplasma (**Figura 8**).

³⁵ Vacuolar protein sorting-associated protein 4A

³⁶ Rab GTPases

³⁷ Soluble NSF Attachment Protein

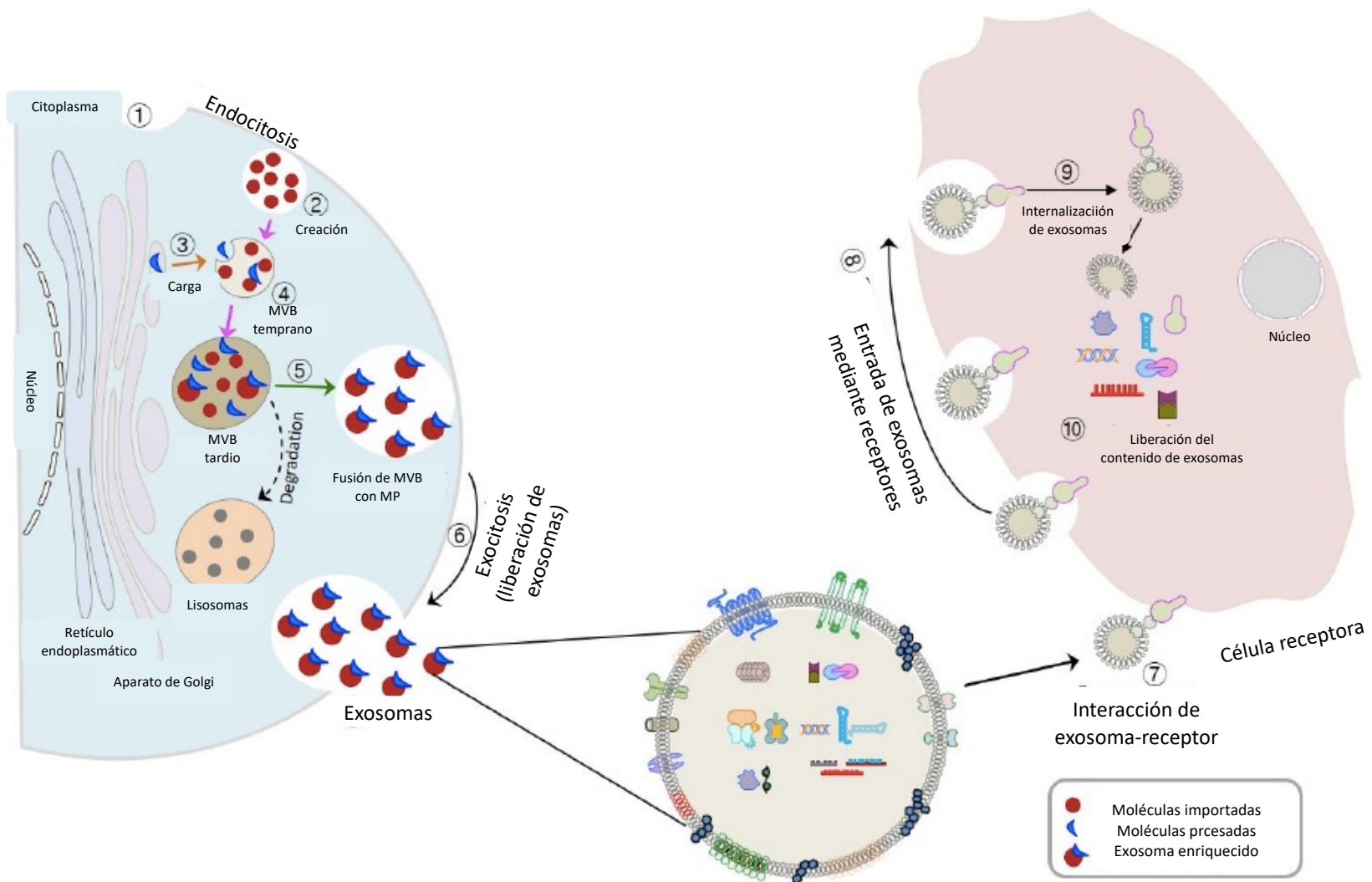


Figura 8 Tráfico de exosomas

El proceso de empaquetamiento y producción de exosomas inicia con desprendimiento de membrana plasmática hacia el interior formando vesículas (endosomas tempranas), posteriormente se cargan de material biológico, desarrollan un proceso de maduración hacia endosomas tardíos que se convertirán en cuerpos multivesiculares (MVB). Nuevamente los MVB se fusionan con la membrana plasmática para liberar a los exosomas al espacio extracelular (160).

El contenido interno o material bioactivo depende del tipo de célula donadora, sin embargo, de manera general por tener origen endosómico, transportan proteínas asociadas a la formación de vesículas intracelulares como Tsg101, tetraspaninas y Alix, proteínas de transporte y fusión de membrana, anexinas, GTPasas y flotilinas, proteínas de choque térmico (³⁸HSP60, HSP70, y HSP90), proteínas de presentación antigénica (³⁹MHC-I, MHC-II), proteínas de citoesqueleto, actina, miosina y tubulina (168), proteínas de adhesión (integrinas, CD31), tetraspaninas (CD9, CD63, CD81, CD82) empleadas como marcadores de identificación de exosomas (Figura 16) (169, 170), factores de transcripción, lípidos, enzimas, ácidos nucleicos (DNA, *mRNA*, *miR* (171)). En el caso de exosomas provenientes de TA, se emplean como marcadores a la adiponectina, proteína de unión de ácidos grasos (FABP), perilipona-1, PPAR γ (172) (**Figura 9**).

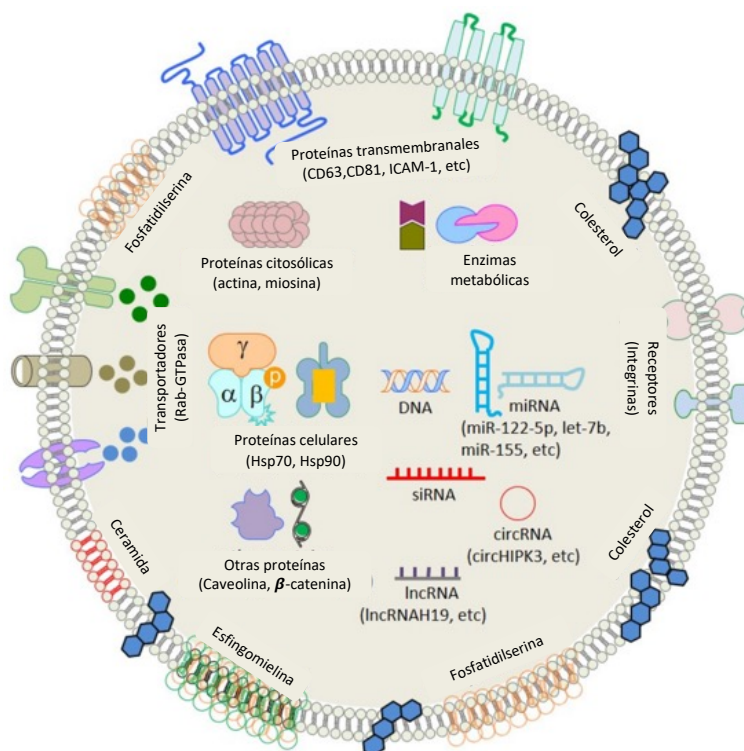


Figura 9 Representación general del contenido bioquímico y molecular de los exosomas

De manera general los exosomas transportan ácidos nucleicos, metabolitos y proteínas, todos ellos rodeados por una membrana lipídica de origen celular (160).

El contenido que transportan los exosomas dicta el estatus funcional de la célula (estrés, reposo, estimulada, transformada) (160). Los ácidos nucleicos en los exosomas son los protagonistas en procesos fisiológicos como biogénesis, respuesta inmune, reparación tisular, y en procesos patológicos como enfermedades cardiovasculares, neurodegeneración, cáncer e inflamación en las células receptoras (173); sin embargo, la bioactividad de los exosomas está sustentada en su contenido de lípidos (colesterol, prostaglandina, esfingomielina, ácido araquidónico), que

³⁸ Chaperonas

³⁹ Complejo mayor de histocompatibilidad I y II

estabilizan la rigidez estructural. Por lo tanto, el material bioactivo tiene impacto en las células diana de tres maneras (174):

- estimulación directa vía unión mediante ligandos
- transferencia de receptores
- reprogramación epigenética (**Figura 10**) (175)

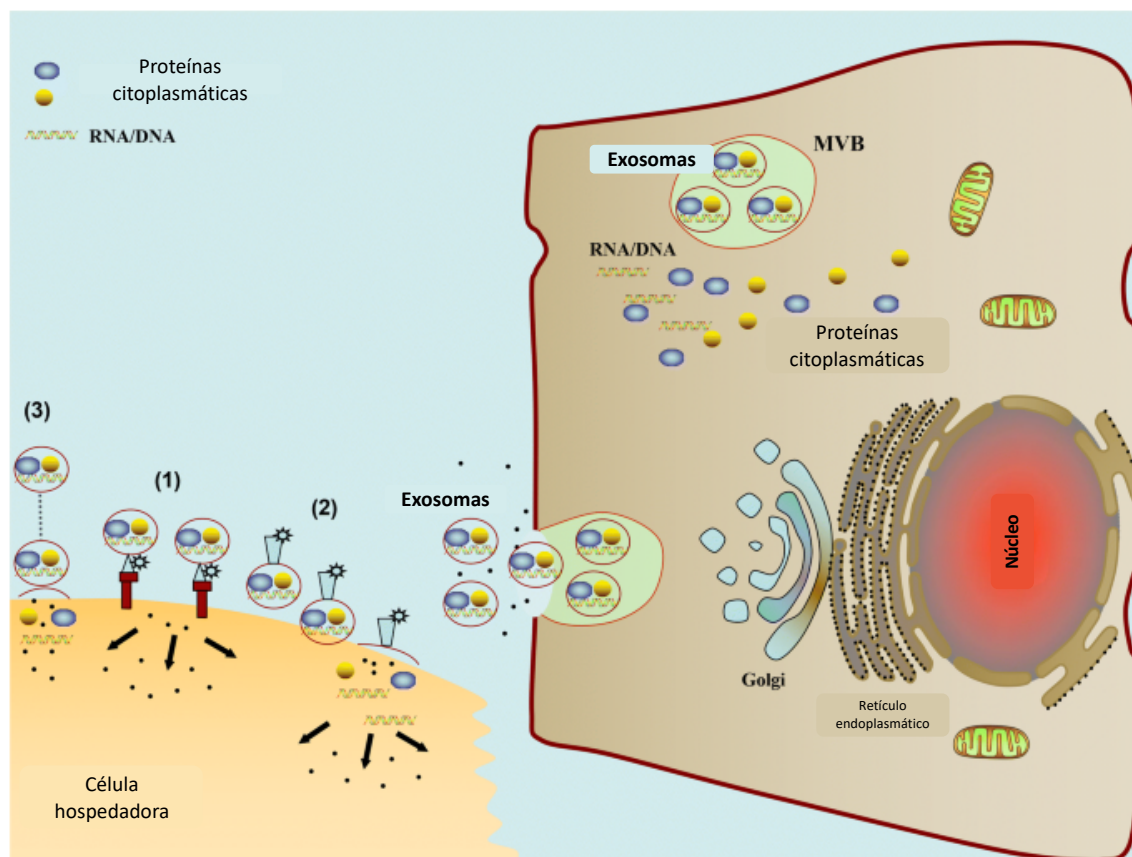


Figura 10 Comunicación celular mediante exosomas

Vías implicadas en la comunicación intercelular mediada por exosomas. (1) Los exosomas señalan a las células receptoras mediante ligandos directos anclados en la superficie de la membrana de la célula hospedadora. (2) Los exosomas transfieren receptores activados a las células receptoras. (3) Los exosomas pueden reprogramar epigenéticamente las células receptoras mediante el suministro de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos funcionales (175).

2.2.2.2. Función en tejido adiposo

La función de los exosomas es mantener la comunicación intercelular al transportar material biológico de una célula donadora a una receptora; en el TA, son los vectores entre los adipocitos y las células de la fracción del estroma y con células de otros sistemas, convirtiéndolo en el mayor productor de exosomas, denominados de manera general como vesículas extracelulares derivados de adipocitos (AdEVs por sus siglas en inglés *adipocyte-derived extracellular vesicles*) (176). Las AdEVs se encuentran cargados de ácidos nucleicos principalmente de *miRs*, lípidos y proteínas, que en el TA funcionan como factores en alteraciones metabólicas como obesidad, DT2 y enfermedades asociadas (177).

Cada tipo celular que conforma el TA secreta exosomas que mantienen la comunicación entre ellas y con otros órganos, y de acuerdo con la condición del TA, difiere el contenido de los exosomas (178).

En las AdEVs, los *miRs* y las proteínas modulan el metabolismo de varios órganos y sistemas, como el desarrollo de la placenta y el desarrollo fetal en mujeres embarazadas, el flujo de colesterol en obesidad y RI (179). En condiciones de hipoxia, el número de exosomas secretado por TA incrementan afectando la actividad lipogénica de las células receptoras, de igual manera pueden interferir directamente en la señalización de insulina en hígado y músculo (180).

De las células del TA, los ATM (macrófagos residentes de tejido adiposo por sus siglas en inglés *adipose tissue-resident macrophages*), son los protagonistas de la homeóstasis del TA, así como de la respuesta inmune, por lo que la comunicación entre los ATM y adipocitos es primordial, se ha evidenciado que las AdEVs participan en diferenciación final de macrófagos (181) y polarización M1/M2 (182).

Dentro del WAT, el papel de las EVs se ha confirmado en modelos murinos KO de Cav1, donde su expresión continuaba abundante, lo que demostró el tráfico de esta proteína de células endoteliales hacia adipocitos a través de las EVs (183). Asimismo, los exosomas de macrófagos provenientes del SAT (tejido adiposo subcutáneo por sus siglas en inglés *subcutaneous adipose tissue*) y OAT (tejido adiposo omental por sus siglas en inglés *omental adipose tissue*), regulan las rutas de inflamación y la sensibilización a la insulina en este tejido (184).

Por otro lado, en BAT los exosomas pueden intervenir en otros procesos que al ser activado por diferentes estímulos son secretados al torrente sanguíneo. En termogénesis por exposición al frío y por estimulación adrenérgica, BAT secreta mayor cantidad de exosomas, lo que sugiere que la secreción es vital para la actividad de BAT, y brinda un campo para el análisis de su contenido (185, 186).

2.2.2.3. Técnicas de aislamiento, caracterización y cuantificación de exosomas

Considerando que la composición corporal y la técnica de aislamiento son determinantes para las imágenes de la morfología y la composición de los exosomas (187), en este apartado se mencionan algunas de las técnicas para aislar exosomas:

- 1) Ultracentrifugación: esta técnica es considerada como la prueba “*gold standar*” para el aislamiento de exosomas, consiste en realizar una serie de centrifugaciones a diferentes velocidades, para descartar paulatinamente células, cuerpos celulares, organelos y terminar con los exosomas en el pellet (188)
- 2) Cromatografía por exclusión de tamaño (SEC por sus siglas en inglés *size exclusion chromatography*) (189)
- 3) Captura por inmunofinidad

- 4) Precipitación con polímeros (190)
- 5) Kits comerciales para sedimentación (191, 192)

Para la caracterización y cuantificación, los métodos más usados son ópticos, entre ellos:

- 1) Dispersión dinámica de la luz (DLS por sus siglas en inglés *Dynamic Light Scattering*)
- 2) Dispersión multiángulo de la luz (MALS por sus siglas en inglés *Multi Angle Light Scattering*)
- 3) Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA por sus siglas en inglés *Nanoparticle Tracking Analysis*) (193)
- 4) Citometría de flujo
- 5) Resonancia de plasmon de superficie (SPR por sus siglas en inglés *surface plasmon resonance*) (194)

No ópticos como:

- 6) Microscopía electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés *Scanning Electron Microscopy*)
- 7) Microscopía electrónica de transmisión (TEM por sus siglas en inglés *Transmission Electron Microscopy*)
- 8) Microscopía electrónica de transmisión criogénica (Cryo-EM por sus siglas en inglés *Cryogenic Electron Microscopy*)
- 9) Microscopía de fuerza atómica (AFM por sus siglas en inglés *Atomic Force Microscopy*)
- 10) Métodos de inmunodetección
- 11) Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR por sus siglas en inglés *Fourier transform infrared*)
- 12) Sensor de imágenes de reflectancia interferométrica de una sola partícula (SP-IRIS) (193)
- 13) Marcaje de proteínas de membrana (CD9, CD63, CD81, CD82) (195)

2.2.3. *microRNAs*

El primer *microRNA* (*lin-4*) se descubrió en 1993 en *Caenorhabditis elegans*. El primer *microRNA* humano, *let-7*, se descubrió en 2000 (196), y actualmente se han descrito aproximadamente 1917 de acuerdo con las bases de *microRNA* (*miRs*) actualizadas al 2024 (197-200).

Los *miRs* son moléculas pequeñas de *RNA* monocatenario (21 a 25 nucleótidos) no codificantes, que regulan de manera positiva o negativa la expresión génica post-transcripcional, al unirse a la región 3'UTR o 5'UTR, secuencia codificante o promotor de un *mRNA* diana (201). Esta especificidad hacia uno o más *mRNA* blanco viene dada por una secuencia conservada de 2 a 8 nt (202) denominada “semilla” (203). Al igual que otros ácidos nucleicos, su expresión es regulada por factores múltiples factores, mecanismos biológicos y epigenéticos (204, 205), ya sea a nivel nuclear o citoplasmático durante la biogénesis (206).

Como se mencionó anteriormente, los *miRs* pueden ser transportados por los exosomas, y éstos pueden intervenir en varios procesos como la angiogénesis, inmunomodulación, y regulación del metabolismo, que, para nuestro interés, su perfil y nivel de expresión varía en personas con y sin adiposidad patológica (207, 208), por lo que los *miRs* pueden regular funciones fisiológicas y procesos patológicos en trastornos metabólicos (186, 209).

Además de los *miRs*, se ha demostrado que los *mRNA* de $\cong 2000$ nt de proteínas citosólicas transportados en exosomas, se traducen en la célula receptora (11, 210, 211). Adicionalmente, se ha reportado que la expresión de *emRNA* (*mRNA* de exosoma) tienen diferentes patrones de expresión de un *mRNA* en condiciones patológicas (212), lo que nos conduce a integrar la expresión de *miR* con la de sus *mRNAs* diana.

2.2.3.1. Biogénesis y transporte de *miRs*

La biogénesis de los *miRs* inicia con el procesamiento de los transcritos de la RNA polimerasa II, generando los *pri-miRs*, que pueden tener cuatro orígenes de acuerdo con su localización cromosómica: intrónico en región de transcripción codificante; exónico en región de transcripción no codificante; intrónico en región de transcripción no codificante y exónico en región de transcripción codificante (213). Posteriormente, el *pri-miR* es recortado por una RNA polimerasa III para formar el *pre-miR* que forma una horquilla debido a la presencia de secuencias complementarias en su estructura, y que será exportado del núcleo con la ayuda de exportina 5. En el citoplasma, otra RNasa (DICER) cortará la horquilla para formar un *miR* maduro que se unirá a una proteína argonauta 2 (AGO2) hasta su *mRNA* diana; si la complementariedad entre el *miR* y su *mRNA* diana es total, el *mRNA* se degrada, si es parcial habrá represión en la traducción a proteína o silenciamiento de ésta (201, 214) (**Figura 11**).

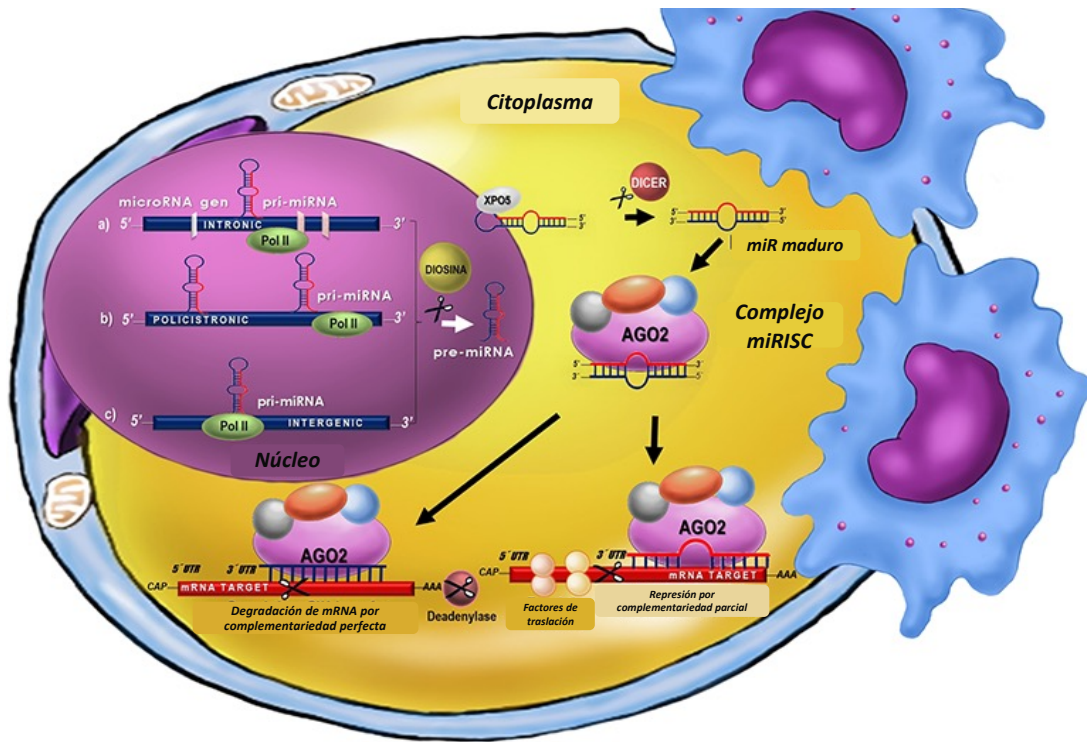


Figura 11 Biogénesis de miRs

El gen de miRNA es transcrito en el núcleo, a continuación el pri-miRNA se dirige al citoplasma, se convertirá en pre-miRNA y por enzimas endonucleasas se obtendrá miRNA maduro, que puede actuar en la misma célula o en otras, transportados por exosomas o unidas a proteínas argonautas (201).

Con respecto a la comunicación celular mediada por *miRs*, se ha propuesto varias vías, entre ellas (**Figura 12**):

- 1) Las uniones Gap (GJ por sus siglas en inglés *gap junction*): canales intercelulares en la membrana plasmática para la comunicación directa entre células adyacentes, mediante las cuales los *miRs* maduros se dirigen al *mRNA* de las células vecinas (215).
- 2) Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) también pueden transportar *miRs* al interior de la célula (216).
- 3) Las proteínas de unión a *RNA* (RBP por sus siglas en inglés *RNA binding proteins*)
- 4) Las microvesículas, cuerpos apoptóticos y exosomas.

Cuando los *miRs* son reclutados en los exosomas, la proteína ALIX interactúa con el complejo *miR*-AGO2, cabe mencionar que la inhibición de la expresión de AGO2, disminuye el nivel de carga de *miRs* en los exosomas, mas no la liberación de exosomas (217-219).

La incorporación de los *miRs* en exosomas, no es aleatoria, depende de la condición fisiológica del organismo, la familia de *miRs*, incluso de la naturaleza de la patología (220). Existen cuatro posibles vías por la cuales los *miRs* son incorporados en los exosomas:

- 1) dependiente de esfingomielinasa 2, que promueve la secreción de *miRs* por exosomas
- 2) dependiente de ribonucleoproteína nuclear heterogénea (hnRNP) que controla la entrada de *miRs* en exosomas
- 3) asociada a *miRISC*, que reduce la incorporación de *miRs* a los exosomas, y

- 4) depende de la secuencia del *miR*, los *miRs* con extremo 3' adenilado se encuentran en la célula formadora y los *miRs* con extremo 3' urilidado se encuentran mayormente en exosomas y esto finalmente guía o no al *miR* hacia el exosoma (221).

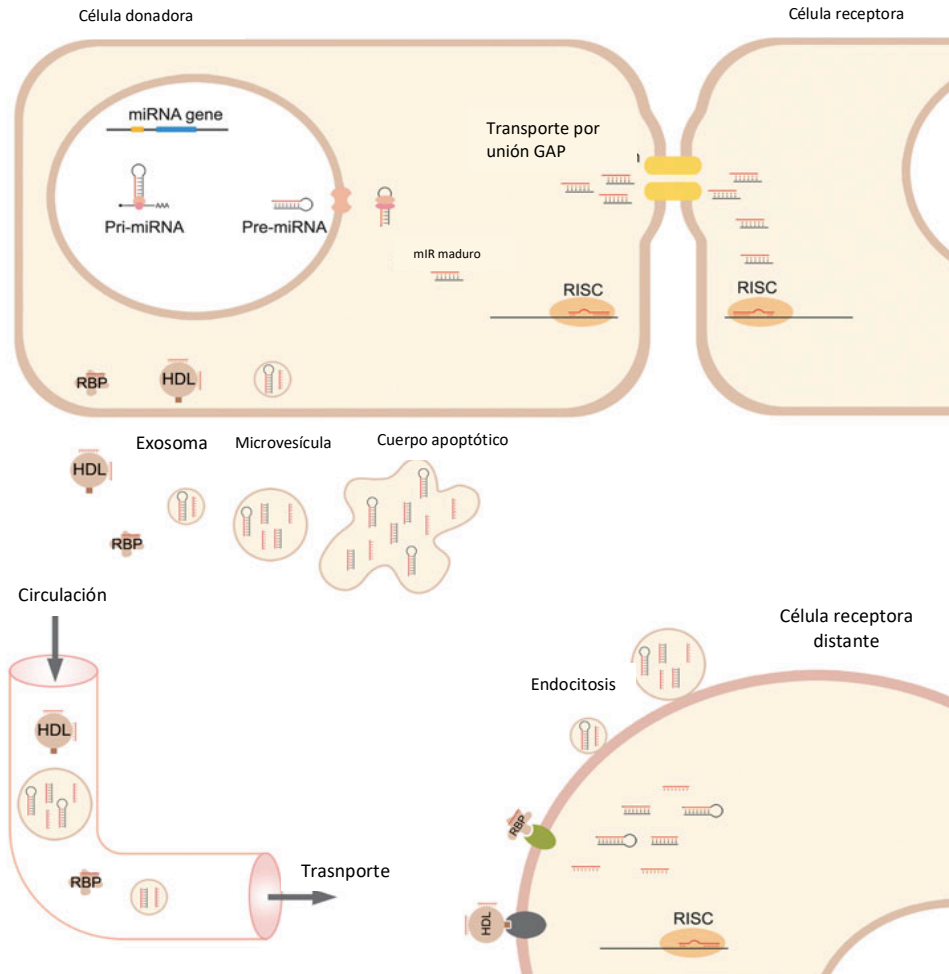


Figura 12 Modelos teóricos de la comunicación celular regulada por miRs

Los miRs sin proteína se transfieren directamente a las células adyacentes mediante uniones Gap. miRs individuales secretados por la célula donante se dirigen a las células receptoras a través de exosomas, microvesículas, cuerpos apoptóticos, HDL o RBP a través de la circulación (196)

2.2.3.2. Nomenclatura

Los *miRs* se nombran con codificación alfanumérica. Las primeras tres letras representan la especie de donde se origina el *miR*, las siglas que continúan indican que se trata de un *microRNA*, el siguiente número indica la familia del *miR* y la letra denota un miembro de la familia cuya secuencia puede diferir en una posición de nucleótidos, el número contiguo muestra si un transcrito de secuencia idéntica es procedente de otra localización cromosómica, y finalmente 5p o 3p, especifica si el *miR* maduro surge del extremo 5' o 3' de la horquilla (**Figura 13**) (222).

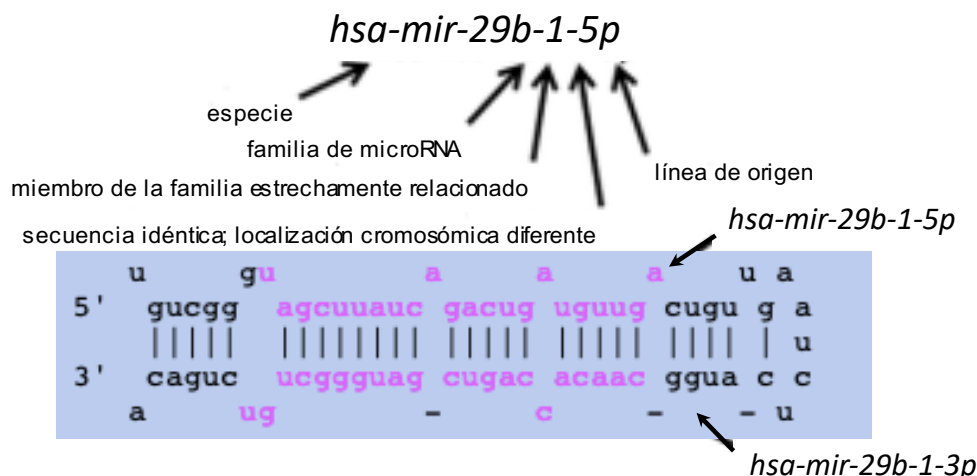


Figura 13 Nomenclatura de microRNAs

Ejemplo de nomenclatura de microRNA hsa-mir-29b-1-5p. hsa: hommo sapiens, mir: microRNA, 29: familia 29; b: denota que es un segundo tipo de miembro de la familia 29; 1: podría proceder de 1 localización más, 5p: surge del extremo 5'; 3p: surge del extremo 3' (222)

2.2.3.3. miRs en tejido adiposo disfuncional

Se han descrito aproximadamente 140 *miRs* secretados del TA en exosomas (8, 9), así como *miRs* específicos residentes en el TA (10). Por citar algunos ejemplos, el *miR-122* elevado en suero se relaciona con la RI en niños con obesidad (223, 224), el *miR-144* sobreexpresado en TA regula la señalización de mTOR (225) y *miR144-5p* se asocia con RI en individuos obesos (143).

Para el presente estudio se evaluarán cuatro *miRs* asociados a un perfil obesogénico:

- *miR-21*: está localizado en el cromosoma 17q23.1., región exónica codificante, inmediatamente aguas abajo del gen de la proteína-1 de la membrana de la vacuola (VMP1) y reside en el exón 10 del gen VMP1 (226). El pre-miRNA consta de 72 pares de bases (https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000284190;r=17:59858068-59858169;t=ENST00000362134). Su expresión está regulada por Varios factores de transcripción pueden estar implicados en la regulación de la expresión de *miR-21*, ⁴⁰AP-1, ⁴¹C/EBPα, ⁴²NF-I, ⁴³SRF, p53 y STAT3 (227).

Fue identificado por primera vez en 2004 , y continúa siendo el más estudiado por estar involucrado en varios procesos biológicos, como apoptosis, proliferación y diferenciación celular (228). Experimentalmente se ha relacionado con 300 enfermedades y se estima que tiene 469 genes diana (229). Se ha sugerido a *miR-21* como marcador de diagnóstico y predictivo de desórdenes del sistema nervioso central, como Parkinson, esclerosis múltiple, miastenia gravis y epilepsia (227), en algunos cánceres y enfermedades cardiovasculares (230).

⁴⁰ Activator protein 1

⁴¹ Ets/PU.1, CCAAT/enhancer-binding protein α

⁴² Nuclear factor I

⁴³ serum response factor

En la obesidad e hiperinsulinemia su expresión se encuentra disminuida, incrementando la expresión de *STAT3* a través de la vía de PPAR γ (231-234).

- *miR-24*: localizado en el cromosoma 9q22.32., en región exónica no codificante, con un pre-miRNA de 68 pares de bases (https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000284459;h=hsa-miR-24-3p;m=9:95086021-95086088;r=9:95086021-95086088;t=ENST00000637495). Se codifica en grupo junto con *mir-23* y *mir-27* (235). La transcripción de *miR-24* está regulada a la baja por la señalización de TGF- β dependiente de la vía Smad3 (236, 237). Su expresión se incrementa en la miogénesis, mientras que su supresión retrasa la diferenciación de los mioblastos (237). Se ha demostrado que *miR-24* regula el ciclo celular y se emplea como marcador de cánceres (mama, colorectal, próstata, pancreático, entre otros (238)) como apoptosis, proliferación, metástasis, invasión, angiogénesis, autofagia, resistencia a medicamentos y patogénesis de enfermedades (235), por ejemplo se encuentra elevado en el epitelio colónico de pacientes con colitis ulcerativa durante la inflamación activa (239).

Con respecto a obesidad y sobrepeso, se relaciona con la lipogénesis, modulando la sobreexpresión del gen *INSIG1* (gen 1 inducido por la insulina), inhibidor de la lipogénesis (240). También se ha visto involucrado en la sobreexpresión de *SFRP4*, proteína que conduce a la inflamación y en última instancia a la RI (241).

- *miR-34a*: localizado en el cromosoma 1p36.22., en región exónica no codificante, con un pre-miRNA de 100 pares de bases (https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000284357;r=1:9151668-9151777;t=ENST00000385130). En el ser humano se han identificado tres miembros de la familia *miR-34*, *miR-34a*, *miR-34b* y *miR-34c*, codificados en dos unidades transcripcionales diferentes (242). Al igual que los demás miRs, la regulación transcripcional está regulada por diversos factores, como p53 que se une directamente al promotor del gen *miR-34*, activando su transcripción, del mismo modo ⁴⁴Elk-1, STAT3, ⁴⁵Snail, ⁴⁶Slug, ⁴⁷ZEB1 y ZEB2 (243).

miR-34 promueve la apoptosis de células de músculo liso vascular (VSMC) y células endoteliales de vena umbilical (UEVC) inhibiendo la expresión de ⁴⁸AAT (244). Por otro lado, es un inhibidor de la polarización de los macrófagos a M2, al suprimir la expresión del *KLF4* (245). La sobreexpresión en VAT se correlaciona positivamente con los parámetros de RI e inflamación metabólica (12).

- *miR128-1*: localizado en el cromosoma 2q21.3, región intrónica, con un pre-miRNA de 82 pares de bases (https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000207654;r=2:135665397-135665478;t=ENST00000384921). Al igual que los demás *miRs* intrónicos, *miR128-1* depende

⁴⁴ Transcription factor Elk-1

⁴⁵ Family of zinc-finger transcription factors

⁴⁶ family of zinc-finger transcription factors (Snail2)

⁴⁷ Zinc finger E-box binding homeobox 1

⁴⁸ Alpha-1 antitrypsin

transcripcionalmente de la expresión de su gen huésped y se procesa a partir del mismo transcrito primario, conservándose a través de algunas especies, sin embargo, también han demostrado que alrededor del 26% de los miRs intrónicos de mamíferos podrían transcribirse a partir de sus propios promotores (246).

La expresión de *miR-128* se ha visto aumentada durante el desarrollo y alcanza su máximo en la edad adulta, desempeñando una función clave en el desarrollo del sistema nervioso y la regulación de diversas funciones neuronales, sin embargo, también se ha asociado a distintos tipos de cáncer (247). Se sobre expresa en hipoxia elevada, afectando negativamente a los niveles de expresión IR (13), IRS1 y ⁴⁹PI3K α en el TA (13, 248).

2.2.4. Factores de transcripción y proteínas de señalización

Tanto las proteínas como *miRs* que son transportados en exosomas secretados por adipocitos, activan o inhiben señales intercelulares y participan en reparación celular (249). Actualmente se desconoce la procedencia exacta de los exosomas que están circulando en sangre, no obstante, se ha propuesto marcadores de exosomas de TA, como ⁵⁰aP2/FABP4, adiponectina, perilipina-1, más cabe recalcar que las condiciones patológicas pueden variar la expresión de estos marcadores (15).

El análisis proteómico de exosomas de TA ha permitido determinar la presencia de aproximadamente 884 proteínas, denominadas como exoadipocinas, y mediante herramientas bioinformáticas se han revelado su participación en procesos inflamatorios, inmunológicos y metabólicos (250, 251).

La base de datos de exosomas, ExoCarta, reporta 6514 proteínas en exosomas en seres humanos (http://exocarta.org/browse_results?org_name=Homo%20sapiens&cont_type=&tissue=&gene_symbol=), en este trabajo se propone el análisis proteico de proteínas reguladas por *miRs* que intervienen en procesos inmunometabólicos en individuos con perfil obesogénico, y se detallan a continuación:

- *STAT3*: proteína perteneciente a la familia de proteínas STAT, se expresa en múltiples células (neuronas, adipocitos, monocitos), y en respuesta a citocinas y factores de crecimiento se activa y actúa como factor de transcripción, asimismo, es fundamental para el mantenimiento de los procesos homeostáticos y de desarrollo; sin embargo, la desregulación y la activación crónica de STAT3 da lugar a numerosas enfermedades, entre ellas la obesidad, en donde se ha visto asociado con hiperinsulinemia y adipogénesis (252-254).
- *SFRP4*: es un factor antiangiogénico y proapoptótico, que pertenece a la familia de las proteínas secretoras (241). Dentro del TA, participa en la maduración de preadipocitos, lo que conduce a una elevada acumulación de lípidos (255). En obesidad se encuentra

⁴⁹ Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory

⁵⁰ Fatty acid-binding protein 4

sobreexpresada y su *mRNA* incrementado sobre todo en VAT (256), así como en DM2 (257).

- *KLF4*: pertenece a la familia de factores de transcripción, tiene efecto antiinflamatorio, promueve la oxidación de ácidos grasos, y tiene un rol importante en la homeostasis de la glucosa y la acumulación de lípidos en las células, por lo que su baja expresión en VAT puede correlacionarse con obesidad, dislipidemia e inducir inflamación (258). De la misma forma, se ha demostrado que las células perivasculares del TA responden dinámicamente a una dieta inducida a obesidad y modulan la inflamación del tejido y su metabolismo de manera dependiente de KLF4 (259).
- *IRS1*: pertenece a la familia de los IRS, traduce la cascada de señal de la insulina activando la ruta de PI3K, su expresión anormal en SAT se asocia con riesgo de RI (260).

La **Tabla 1** resume las proteínas que son moduladas por *miRs* y la función que éstos ejercen en tejido adiposo disfuncional:

Tabla 1 Resumen de expresión de miRs y regulación sobre mRNA diana

<i>miRNA</i>	Expresión de <i>miRNA</i>	<i>mRNA</i> diana y resultado en su expresión	Efecto en el organismo
<i>miR-21</i> <i>Cr17q23.1, exón 1</i>	Subexpresión	<i>STAT3</i> Incrementa expresión	Obesidad e hiperinsulinemia, adipogénesis (252, 253)
<i>miR-24</i> <i>Cr9q22.32, exón 1</i>	Sobreexpresión	<i>SFRP4</i> Incrementa expresión	Inflamación (255)
<i>miR-34a</i> <i>Cr1p36.22, exón 1</i>	Sobreexpresión	<i>KLF4</i> Suprime expresión	Inhibición de polarización de M2 (258)
<i>miR-128-1</i> <i>Cr2q21.3, exón 1</i>	Sobreexpresión	<i>IRS1</i> Suprime expresión	Resistencia a la insulina (260)

2.3. Perfil obesogénico

2.3.1. Distribución corporal del tejido adiposo

El patrón de distribución corporal de la grasa en el tronco en comparación con la periférica tiene influencia en el metabolismo energético y, por tanto, en el riesgo de padecer enfermedades metabólicas (261, 262).

El WAT es el tejido adiposo con mayor abundancia y distribución en el organismo. Basándose en la anatomía y las propiedades funcionales, se ha propuesto una clasificación con énfasis en los compartimentos internos, detectados mediante exámenes de imagen (263):

- *Tejido adiposo subcutáneo (SAT por sus siglas en inglés subcutaneous adipose tissue)*: localizado en la parte superior e inferior del cuerpo bajo la piel. En los hombres suele acumularse en el tronco, mientras que en mujeres se acumula homogéneamente en abdomen y miembros inferiores hasta la adultez cuando empieza a acumularse en el abdomen (261). El SAT representa un amortiguador fisiológico para el exceso de ingesta de energía, y un almacén donde desemboca el exceso de lípidos (264, 265).
- *Tejido adiposo visceral (VAT por sus siglas en inglés visceral adipose tissue)*: se localiza entre las paredes de la cavidad abdominal, y rodeando los órganos, el VAT toma el nombre del órgano al que recubre, por ejemplo: cuando envuelve al corazón se denomina TA epicárdico y pericárdico; a vasos sanguíneos, TA periovascular; al riñón, tejido perirrenal; al intestino y páncreas, TA omental y mesentérico; a gónadas, epididimal y parametrial (266, 267). Se ha demostrado que VAT es más sensible a muerte y más resistente a diferenciación que en SAT (62).

En el caso del BAT se ubica superficialmente en regiones interescapulares, supraclavicular, axilares y en lo profundo en periaórticos, pericárdicos, perirrenales, inguinales (**Figura 14**) (268).

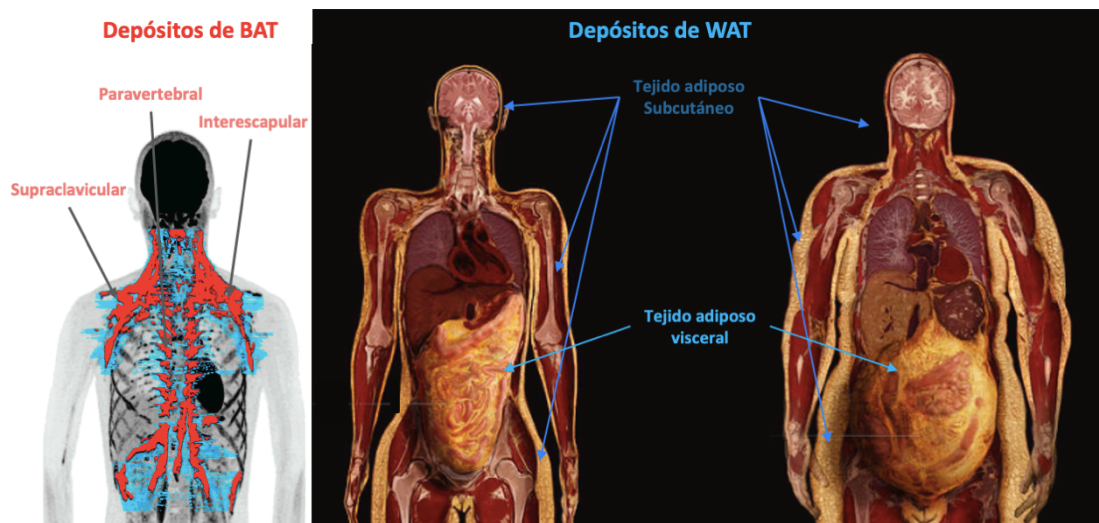


Figura 14 Distribución del TA en humanos

El TA se distribuye en todo el organismo. En la imagen de la izquierda se aprecia la distribución de BAT en adultos. Imagen tomada mediante tomografía de emisión de positrones (PET). En la parte derecha, se muestra la distribución de WAT, en diferentes zonas corporales, subcutáneo (craneal, facial y extremidades) y visceral, alrededor de los órganos. Modificado de (269).

Por otro lado, visualmente, se ha propuesto cuatro regiones de acumulación de grasa como: 1) parte inferior del cuerpo, 2) subcutáneo abdominal, debajo de la piel, 3) cobertura general, y 4) grasa visceral, localizada en la cavidad abdominal entre los órganos, esta distribución puede variar entre los individuos, ya sea por género, edad, etnia, genética (**Figura 15**) (270).

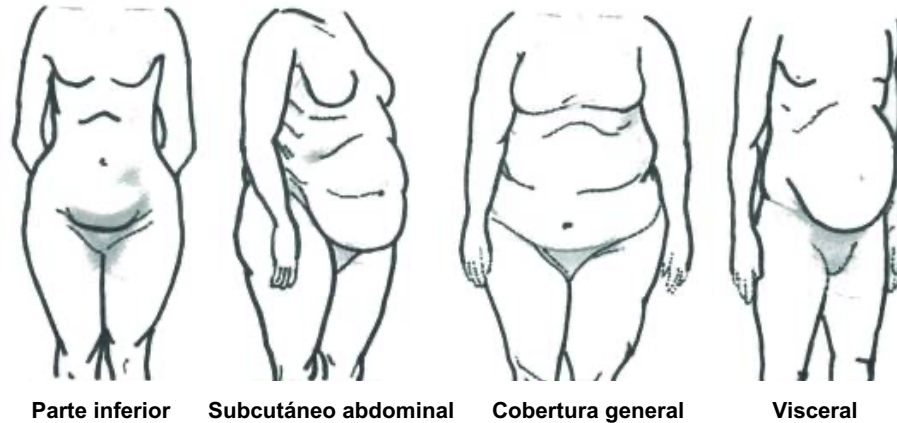


Figura 15 Clasificación visual de la distribución de grasa

Parte inferior del cuerpo incluye almacenamiento de grasa: alrededor del glúteo, las caderas y los muslos. Subcutáneo abdominal acumulación de grasa subcutánea: alrededor del estómago y el tronco. Cobertura general acumulación de grasa: en los brazos, el tronco, los muslos, el glúteo, la parte inferior de la espalda y el tronco. Visceral: depósito de grasa intraabdominal entre órganos como los intestinos, el estómago, el hígado y el páncreas (270).

2.3.2. Tejido adiposo disfuncional

Desde que se conoce que células del sistema inmune en el TA cumplen funciones inmunológicas, que participan en la termogénesis y homeostasis de los adipocitos, el término de TA disfuncional hace referencia a la desregulación o desbalance de éstas y que favorecen el desarrollo de enfermedades (70).

En el TA en homeostasis energético existe un balance entre perfil pro y anti-inflamatorio con predominio de este último, por el contrario el TA disfuncional se caracteriza por un desbalance en la homeostasis fisiológica, generándose un microambiente pro-inflamatorio, con infiltración de células del sistema inmune de perfil pro-inflamatorio (**Figura 16**) (271).

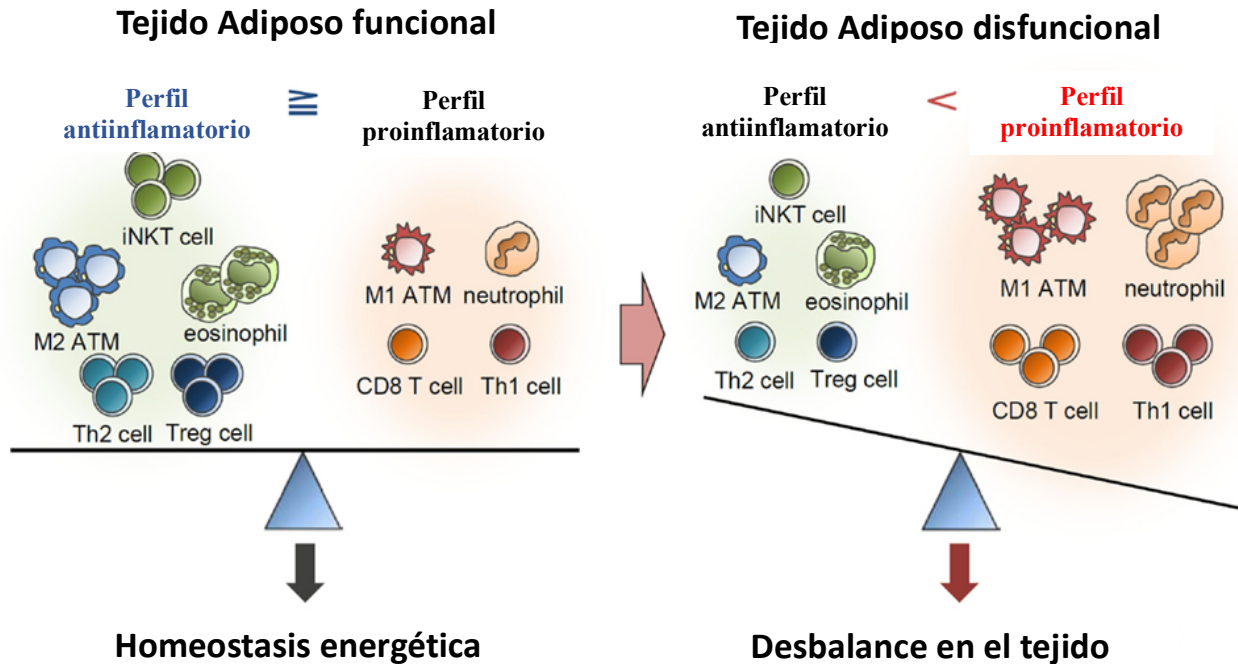


Figura 16 Balance de respuesta inmunológica en tejido adiposo

El tejido adiposo funcional alberga varias células del sistema inmune con perfil antiinflamatorias (eosinófilos, macrófagos M2, Th2, iNKT y Treg). Estas células mantienen la sensibilidad a la insulina y almacenan energía extra en forma de TG. Por el contrario, en el tejido adiposo disfuncional, el número de células del sistema inmune con perfil proinflamatorias (neutrófilos, macrófagos M1, mastocitos, Th1 y TCD8) es muy elevado. La reducción simultánea del número de células antiinflamatorias acelera la respuesta proinflamatoria y la disfunción del tejido adiposo (271).

En el TA, se observan dos escenarios, una expansión limitada de adipocitos, en la que predomina un perfil anti-inflamatorio, hipoxia controlada y una correcta angiogénesis y, un escenario patológico en el que la expansión de adipocitos se exagera, la hipoxia aumenta, infiltración de células del sistema inmune con perfil proinflamatorio, en especial macrófagos M1 (**Figura 17**) (272, 273).

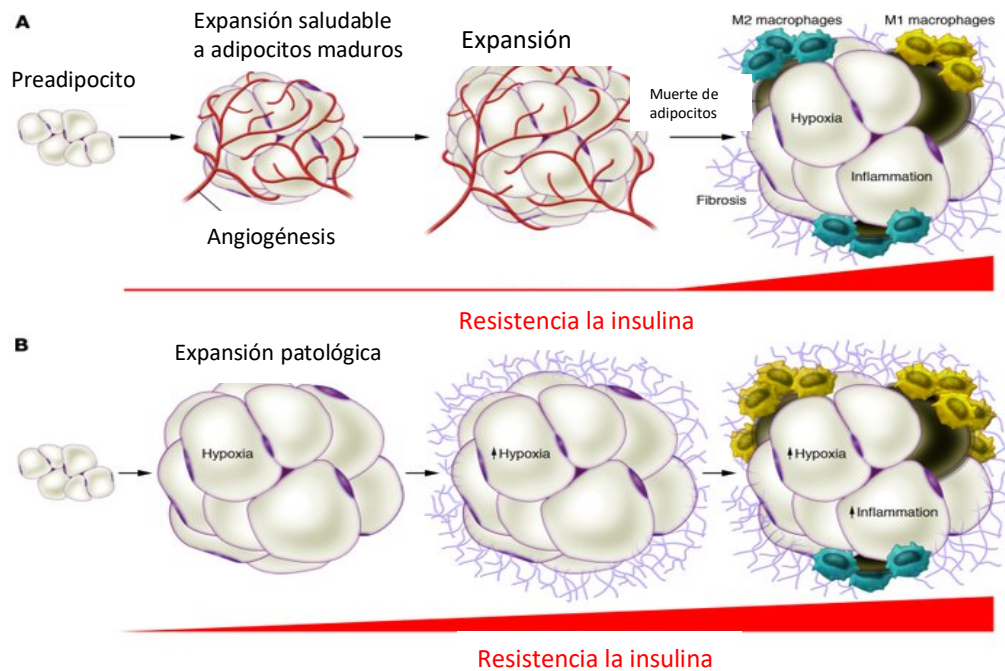


Figura 17 Procesos de expansión del tejido adiposo

A. La expansión saludable del TA consiste en un agrandamiento a través del reclutamiento efectivo de células precursoras adipogénicas junto con una respuesta angiogénica adecuada. B. Por el contrario, la expansión patológica del TA consiste en un aumento masivo de los adipocitos existentes, una angiogénesis limitada y la consiguiente hipoxia. Como resultado, se induce HIF-1α (por sus siglas en inglés hypoxia-inducible factor 1-alpha), que a su vez puede provocar la inducción de un programa fibrótico. En última instancia, prevalecen los macrófagos M1, lo que da lugar a un fenotipo inflamatorio que está asociado a la RI.

Este desequilibrio en la expansión de adipocitos o “acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud” (OMS) (274), es la obesidad, patología considerada como epidemia y que plantea un problema de salud pública ya que predispone a enfermedades crónicas-degenerativas (275).

El individuo que reúne alteraciones metabólicas como: hiperglucemia (glucosa mayor de 100 mg/dL), hipertrigliceridemia (triglicéridos mayor de 150 mg/dL), hipercolesterolemia (colesterol mayor de 200 mg/dL), IMC (índice de masa corporal) mayor de 30 kg/m², se caracteriza como individuo con perfil obesogénico (276). Del mismo modo, en la obesidad se ha reportado incremento en los niveles de adipocinas proinflamatorias y disminución en los niveles de las antiinflamatorias, que favorece el desarrollo de un proceso inflamatorio crónico de grado bajo (277).

2.3.2.1. Hipertrofia e hiperplasia

Además de la distribución ectópica del TA, la hipertrofia e hiperplasia son los dos mecanismos que contribuyen al desarrollo del perfil obesogénico y a patologías asociadas a él (**Figura 18**).

La hipertrofia es el incremento del tamaño de los adipocitos. Es la razón principal en el desarrollo de desórdenes metabólicos, ya que al mismo tiempo que aumentan de tamaño, ocurre necrosis de adipocitos que impide su correcto funcionamiento, y la sobreexpresión de citocinas proinflamatorias induce el aumento de hipoxia en el TA, y el desborde de ácidos grasos por lipólisis (271).

Por otro lado, la hiperplasia es el incremento en número de adipocitos, a pesar de que es un mecanismo de reparación ante la hipertrofia y necrosis celular, al renovar adipocitos en un individuo con obesidad es el primer evento en el desbalance entre lo fisiológico y patológico (278).

La hipertrofia se desencadena previo a la hiperplasia para satisfacer la necesidad de capacidad de almacenamiento de grasa adicional en la progresión de la obesidad, de hecho, se ha propuesto que el cambio de tamaño celular depende de la dieta, y el cambio de número de células depende de la genética y la dieta, así como de la interacción entre ambas (279).

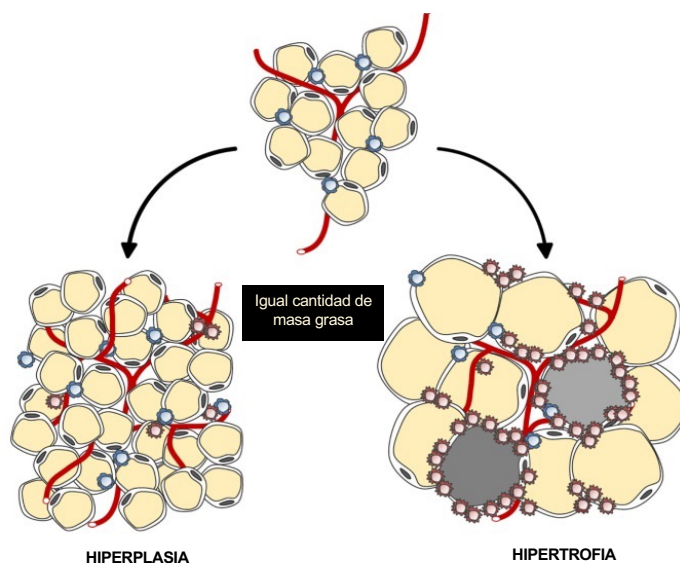


Figura 18 Expansión del tejido adiposo blanco

La expansión hipertrófica se asocia con el aumento de la liberación de ácidos grasos basales, la liberación de citocinas proinflamatorias, el reclutamiento de células del sistema inmune, la hipoxia, la fibrosis, la disminución de la adiponectina y el deterioro de la sensibilidad a la insulina. Por otro lado, la expansión hiperplásica está relacionada con el aumento de la adiponectina, la disminución de la liberación de ácidos grasos basales, la liberación de citocinas proinflamatorias, el reclutamiento de células del sistema inmune, la hipoxia, la fibrosis y la mejora de la sensibilidad a la insulina.

2.3.3. Inflamación

En TA fisiológico coexisten adipocitos y células del sistema inmune entre ellas: macrófagos M2, eosinófilos, Th2, Threg, productoras de citocinas antiinflamatorias (IL-10, IL-4, IL-13, IL-33), y mantienen la homeostasis en el organismo, sin embargo, cuando ocurren procesos patológicos como obesidad, se presenta infiltración de otras células inmunitarias: neutrófilos, monocitos, macrófagos M1, Th1, Th17 que secretan citocinas proinflamatorias (IL-1, TNF α) (280, 281). (Figura 19).

Los protagonistas de la inflamación en el TA son los ATM manteniendo el equilibrio inmunometabólico (282), de hecho en un ambiente inflamatorio los preadipocitos se desdiferencian a macrófagos M1 (283, 284).

El ambiente antiinflamatorio en el TA se mantiene debido a que los ATM-M2 captan los lípidos y adipocitos muertos, además que están asociados con la activación de BAT y pardeamiento del WAT mediante vía expresión de tirosina hidroxilasa que induce termogénesis (285).

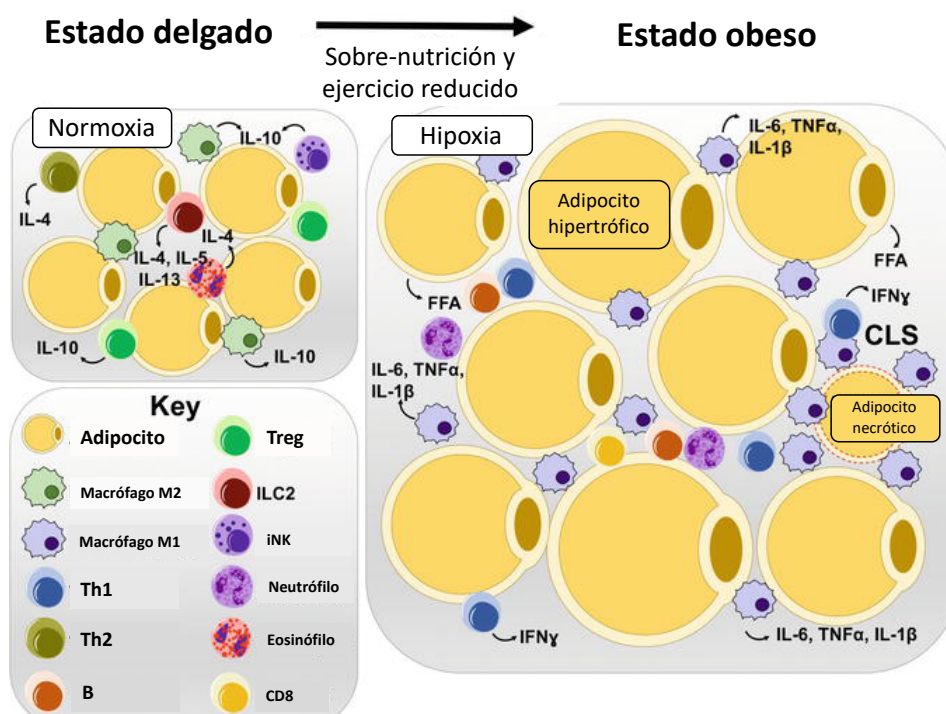


Figura 19 Células del sistema inmune en el tejido adiposo

En el estado delgado, células del sistema inmune citocinas que favorecen un estado normóxico del TA. En el estado obeso, la hipertrofia de los adipocitos, la hipoxia provocan la necrosis de los adipocitos, lo que da lugar a un estado proinflamatorio y al reclutamiento de macrófagos, que forman estructuras tipo corona (CLS) que rodean a los adipocitos, lo que polarizan hacia un fenotipo proinflamatorio (285).

2.3.4. Resistencia a la insulina

Las primeras evidencias del vínculo entre obesidad e inflamación mostraron niveles elevados de TNFα secretados por ATM en TA (286), desde entonces, posteriores investigaciones han evidenciado que en el microambiente proinflamatorio de bajo grado en obesidad, los macrófagos y los cambios en WAT se correlacionan positivamente con la RI, que es la desensibilización de la insulina y la incapacidad de captar glucosa de la sangre y otros nutrientes en las células, y a manera de compensación las células β del páncreas sobreproducen insulina (hiperinsulinemia) (287). Si la lipólisis no es suprimida por la insulina en el TA, especialmente en el VAT, aumentan los ácidos grasos circulantes estimulando la expresión de CD86 en adipocitos y ATM (285) y esto afecta directamente al metabolismo hepático y muscular agravando aún más la RI (288, 289).

En la RI contribuye la intervención de $\text{TNF}\alpha$ e IL6 en la vía señalización de la insulina, inhibiendo IRS1 y por ubiquitinación respectivamente (**Figura 20**) (290).

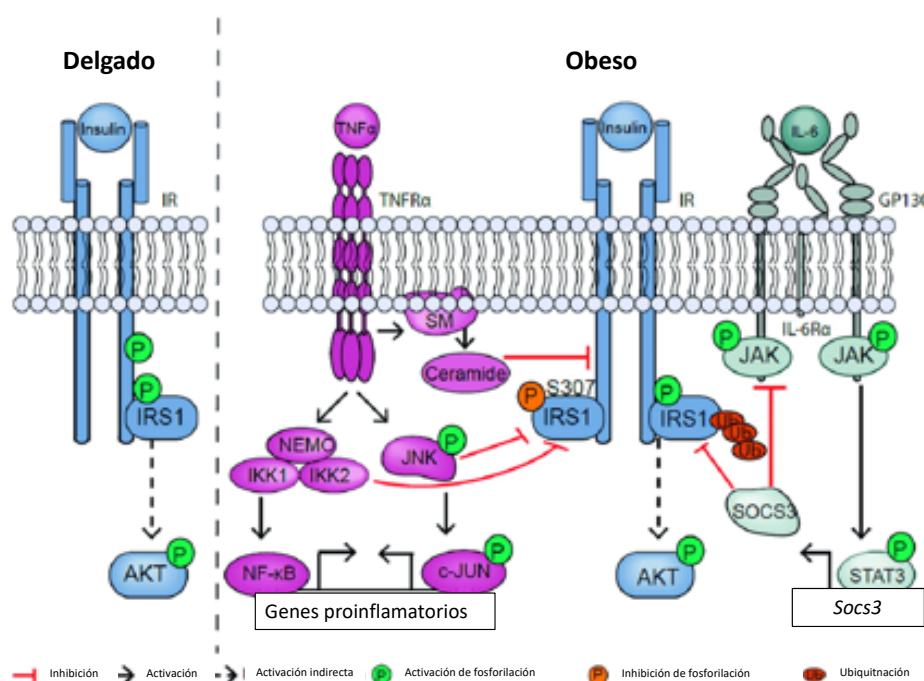


Figura 20 Mecanismo de inducción de resistencia a la insulina en obesidad

TNF α activa la espingomielinasa para producir ceramidas que convierten al IRS1 en un inhibidor de la tirosina quinasa intrínseca del IR (receptor de insulina). Por otro lado, el TNF α activa la cinasa intracelular c-JUN N-terminal (JNK) y la cinasa I κ B (IKK) que atenúan la señalización de la insulina mediante la fosforilación inhibitoria del IRS1 en la serina 307, lo que constituye una lectura del impacto negativo del TNF α sobre la sensibilidad a la insulina.

2.3.5. Dislipidemia

Por otro lado, la obesidad también se asocia con dislipidemia o dislipoproteínemia: desequilibrio o cambio cuantitativo de la concentración de lípidos, como colesterol LDLc (LDLc por sus siglas en inglés *low density lipoprotein cholesterol*), HDLc (*high density lipoprotein cholesterol*) y triglicéridos en plasma sanguíneo (291). El cambio un perfil disfuncional del WAT, caracterizado por una expansión inapropiada de adipocitos, y concentraciones elevadas de lípidos en sangre, conduce a la generación de depósitos ectópicos de lípidos en hígado, músculos (292).

Existen dos tipos de dislipidemias: primaria, grupo de enfermedades heterogéneas como genética, de etiología mono o poligénica, mientras que la secundaria resulta de factores externos u otras patologías (293). La dislipidemia característica en la obesidad consiste en incremento de sdLDLc, LDLc, triglicéridos, ácidos libres, y ApoB debido a la sobreproducción hepática de lipoproteínas y disminución de HDLc. La dislipidemia secundaria puede agruparse de acuerdo con el lípido que acumule: hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, niveles bajos de HDLc (294).

2.3.6. Biomarcadores inmunometabólicos

Los niveles alterados en biomarcadores inmunometabólicos representan el estado disfuncional del TA:

- **Insulina:** Hormona secretada por las células β del páncreas. Es esencial para mantener la homeostasis de la glucosa, principalmente facilitando su captación en las células musculares y grasas después de las comidas. En el TA, la insulina promueve la captación y almacenamiento de ácidos grasos en forma de triglicéridos, inhibiendo su lipólisis (285). La función como hormona anabólica es favorecer el almacenamiento de energía en lugar de su uso. Valor normal en sangre es de 5 a 25 uU/ml o ≤ 99 mg/dL (295, 296).

El receptor de insulina (IR) es un receptor tirosina quinasa (RTK por sus siglas en inglés *receptor tyrosine kinase*), al cual se une la insulina y da inicio a la vía de señalización. Esta activación recluta moléculas enzimáticas/proteicas, entre ellas IRS que permitirá la unión de PI3K que propagará la señal de la insulina. Esta vía de señalización es de vital importancia para el mantenimiento de los niveles normales de glucosa en sangre (297) (**Figura 21**).

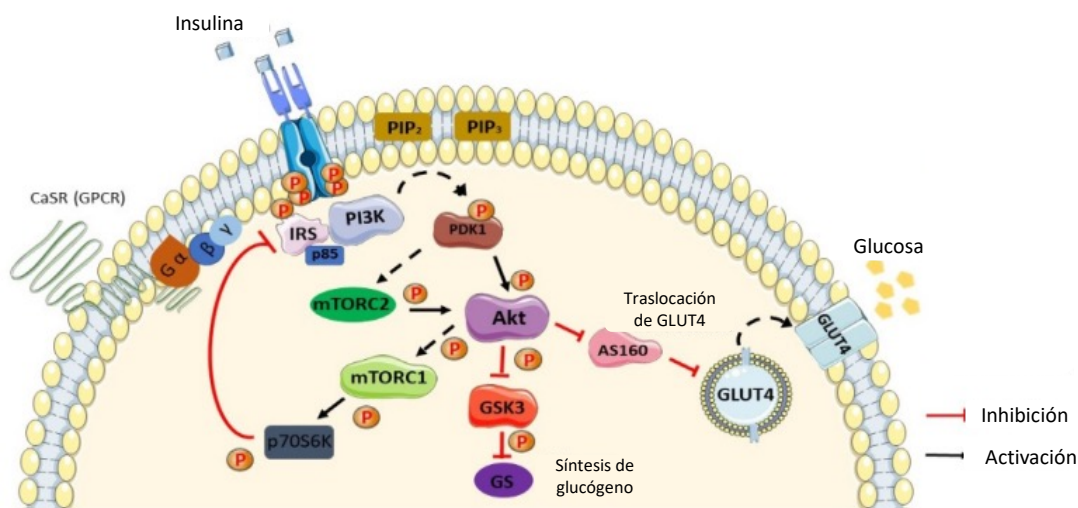


Figura 21 Esquema de la vía de señalización de la insulina mediada por resistencia a la insulina

La activación del receptor IR desencadena el reclutamiento y la activación en cascada de la fosforilación del sustrato del receptor de insulina (IRS), principalmente el IRS-1/2, que proporciona un sitio de acoplamiento para la unión de la enzima PI3K; una vez activada la fosforilación de PI3K, convierte el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) en fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PIP3) en la membrana plasmática. El PIP3 es un segundo mensajero vital para la amplificación de las señales de la insulina, y un aumento de la concentración de PIP3 recluta a la proteína quinasa 1 dependiente de fosfoinositidos (PDK1), que en consecuencia activará la Akt/PKB (proteína quinasa B). La activación de Akt inhibe la AS160 reguladora, provocando la translocación del depósito de vesículas GLUT4 en el citosol a la membrana de la célula para captar la glucosa (297).

- **Glucosa:** Monosacárido que se adquiere de la ingesta de alimentos y es transportada a todas las células para gasto energético. Los valores normales son: glucosa plasmática en ayuno ≥ 7.0 mmol/L (< 100 mg/dL) o glucosa plasmática a las 2 horas de la carga ≥ 11.1 mmol/L o HbA1c ≥ 48 mmol/mol (298).

Una herramienta para predecir el riesgo de progresión de diabetes o síndrome metabólico es el modelo homeostático de resistencia a la insulina (HOMA-IR por sus siglas en inglés *homeostatic model assessment*) y del funcionamiento de las células pancreáticas (HOMA-B), así como también el Índice cuantitativo de comprobación de la sensibilidad a la insulina (QUICKI por sus siglas en inglés *Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*). Para ello se emplean los valores de insulina y glucosa en ayunas.

- **Lípidos:** Son de dos tipos: colesterol y triglicéridos. El colesterol se presenta en la sangre de dos maneras, como HDLc y LDLc, mientras que los triglicéridos son proporcionados por los alimentos y transportados a la sangre para gasto energético y almacenaje (298).

En el caso del TA, los adipocitos contienen la maquinaria necesaria para almacenar y usar los triglicéridos cuando el organismo lo requiere, mediante procesos de lipogénesis y lipólisis respectivamente (299) (**Figura 22**).

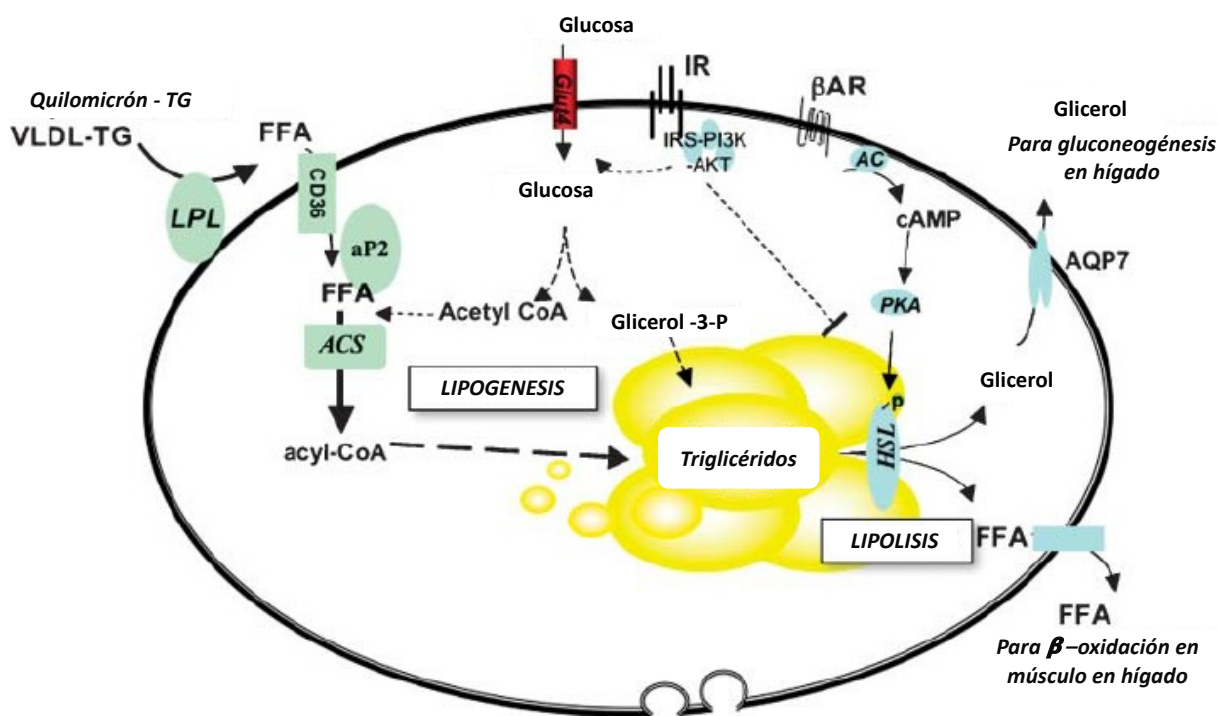


Figura 22 Metabolismo de lípidos en adipocitos

El metabolismo de los lípidos puede explicarse a partir del catabolismo y el anabolismo. En la reacción anabólica los ácidos grasos se convierten en triglicéridos, mientras que, en la reacción de catabolismo de los lípidos, los triglicéridos se convierten en ácido graso glicerol bajo la acción de la lipasa (299).

Las enfermedades cardiovasculares son la mayor causa de mortalidad temprana en el mundo, y se han asociado con los niveles de lípidos en sangre (300). Concentraciones elevadas de LDLc y triglicéridos se relacionan con arterosclerosis y trombosis (301); mientras que concentraciones disminuidas de HDLc se correlaciona con enfermedades coronarias (302).

Tabla 2 Valores de referencia del perfil de lípidos

Lípidos en sangre	Niveles de referencia lípidos en sangre
Colesterol total	< 200 mg/dL
HDLc	> 40 mg/dL
LDLc	< 100 - 130 mg/dL
Triglicéridos	< 150 mg/dL

- Marcadores de inflamación: Parámetros que indican la presencia de un proceso inflamatorio en el organismo, estos son: recuento total de leucocitos, proteínas del complemento (C3, C4), proteína C Reactiva (pCr), velocidad de sedimentación globular (VSG) y citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6) (303).

Tabla 3 Valores de referencia para marcadores de inflamación

Marcador	Función	Valores de referencia
Proteínas del complemento (C3, C4)	La mayoría de las proteínas del complemento son sintetizadas por los hepatocitos, pero la mayoría de los componentes, especialmente los de la vía alternativa (C3, factor B, factor D), también son producidos por los macrófagos y los adipocitos (304).	Valores normales: C3: 88 - 201 mg/dL C4: 15 - 45 mg/dL C3 está más relacionado con la obesidad, y C4 con la inflamación y los factores de riesgo cardiometabólico (305). < 0.3 mg/dL: Normal (nivel observado en la mayoría de los adultos sanos). 0.3 – 1.0 mg/dL: Normal o elevación menor (obesidad, embarazo, depresión, diabetes, resfriado común, sedentarismo, tabaquismo).
Proteína C reactiva (pCr)	Proteína pentamérica sintetizada por el hígado, su nivel aumenta en respuesta a la inflamación. La pCr es una proteína reactante de fase aguda.	1.0 – 10.0 mg/dL: Elevación moderada (enfermedades autoinmunes, tumores malignos, infarto de miocardio, pancreatitis, bronquitis). > 10.0 mg/dL: Elevación marcada (infecciones bacterianas agudas, infecciones virales, vasculitis sistémica, traumatismos importantes). > 50.0 mg/dL: Elevación grave (infecciones bacterianas agudas) (306).
Velocidad de sedimentación globular (VSG)	Prueba indirecta en la que los eritrocitos bajan a un ritmo más rápido en personas con afecciones inflamatorias.	Hombre < 50 años ≤ 15 mm/hora Mujer < 50 años ≤ 20 mm/hora Hombre > 50 años ≤ 20 mm/hora Mujer > 50 años ≤ 30 mm/hora Niño ≤ 10 mm/hora La VSG suele ser más alta en las mujeres que en los hombres y aumenta gradualmente con la edad (307).

- Biomarcadores de función orgánica: parámetros que indican el correcto funcionamiento orgánicos. Entre ellos:

Tabla 4 Valores de referencia de biomarcadores metabólicos

Marcador	Órgano que produce	Función	Valores de referencia
Aspartato aminotransferasa (AST)	Hígado principalmente	Participa en la gluconeogénesis en el hígado y el riñón, en la gliceroneogénesis en el tejido adiposo (308).	0 – 35.0 UI/L
Alanino aminotransferasa alanina (ALT)	Hígado	Participa en la transaminación de la alanina, cuando está presente en suero indica lesión hepática (309).	0 – 35.0 UI/L
Creatinina	Riñón	Mantiene el suministro continuo de energía a los músculos (310).	0.6 a 1.4 mg/dL
Albúmina	Hígado	Participa como un importante modulador de la presión oncótica del plasma y transportador de ligandos endógenos (bilirrubina, iones, ácidos grasos) y exógenos (fármacos).	3.2 – 6.0 g/dL
Urea	Riñón	Principal producto de desecho nitrogenado del metabolismo, se genera a partir de la descomposición de proteínas (311).	15 a 45 mg/dL

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el proceso de acumulación y redistribución del exceso de masa grasa en el cuerpo, favorece el desarrollo de enfermedades metabólicas con componente inflamatorio, principalmente RI, síndrome metabólico y DM2 (312, 313), y la permanencia de este incremento genera el estatus de sobrepeso. El sobrepeso durante su curso clínico se manifiesta como una enfermedad compleja de fondo multifactorial, involucrando diferentes alteraciones biológicas en la interrelación de la respuesta inmune y el metabolismo energético, los cuales convergen en el escenario del tejido adiposo. En este contexto, el mecanismo patológico principal es la modificación funcional en el sistema monocito/macrófago residente del tejido adiposo que establece un estado asociado con desbalance en los biomarcadores inmunometabólicos y/o factores que favorecen un perfil obesogénico.

En el humano, existe un vínculo específico de la respuesta inmune y metabólica que se manifiesta a nivel molecular, donde participan factores de transcripción regulados por *miRs* producto de procesos fisiológicos o del desarrollo de enfermedades. Los *miRs* relacionados con el TA se han identificado *in vivo*, *in vitro* e *in silico*, se describe su aptitud en diferentes enfermedades evaluando su función mediante experimentos de sobreexpresión o silenciamiento, y los resultados muestran su potencial aplicación y eficacia en el contexto clínico (9).

Desde la perspectiva de que la producción de biomarcadores inmunometabólicos con origen en el tejido adiposo se regulan por *miRs* que muestran un efecto bipolar en sentido proinflamatorio o antiinflamatorio, se sugiere funcionan como supresores o reguladores de diferentes vías de señalización en procesos metabólicos y respuesta inmune. En este escenario, los reportes previos muestran que los *miRs* presentes y activos en los fluidos extracelulares no son iguales, y se considera que existe un enriquecimiento selectivo en diferentes fluidos de los individuos normales o enfermos.

La evidencia experimental detalla que los *miRs* se secretan a la circulación sanguínea en exosomas o unidos a proteínas transportadoras (*miRs*-solubles), mediante un mecanismo regulado susceptible de ser alterado por un estado patológico instalado en el organismo, por lo tanto, este escenario puede reflejar los eventos iniciales en el desarrollo de la historia natural de una enfermedad. Sin embargo, no se ha evaluado el potencial vínculo del perfil de expresión selectiva de los *miRs*: *miR-21*, *miR-24*, *miR-34a*, *miR-128-1* y los niveles de las proteínas *SFRP4*, *IRS1* y *KLF4* transportadas en exosomas y la contribución de estos con la manifestación clínica de desequilibrio fisiológico en los biomarcadores inmunometabólicos y/o factores que favorecen un escenario clínico obesogénico asociados al tejido adiposo disfuncional (6, 7).

4. HIPÓTESIS

El perfil de expresión relativa de *miRs* (disminución de *miR-21*, e incremento de *miR-24*, *miR-34a* y *miR-128-1*) en suero y exosomas, y presencia de las proteínas (*SFRP4*, *IRS1* y *KLF4*) en exosomas, se asocian con desequilibrio en los niveles séricos de biomarcadores inmunometabólicos y/o factores que favorecen un escenario clínico obesogénico en individuos con tejido adiposo disfuncional.

5. OBJETIVOS

5.1. General

Determinar el perfil de expresión relativa en suero y exosomas de *miR-21*, *miR-24*, *miR-34a*, *miR-128-1* e identificar la presencia de las proteínas SFRP4, IRS1 y KLF4 en exosomas, y su asociación con niveles séricos de biomarcadores inmunometabólicos y perfil obesogénico en individuos con tejido adiposo disfuncional.

5.2. Particulares

1. Clasificar con y sin tejido adiposo disfuncional a los individuos incluidos, de acuerdo con los criterios de estudio, e incluirlos en los grupos que corresponda: referencia, estudio y comparación.
2. Determinar los niveles de biomarcadores inmunometabólicos y perfil obesogénico.
3. Determinar los niveles de oligómeros de adiponectina y quimiocinas y su correlación con el perfil obesogénico.
4. Identificar y validar la presencia de exosomas en plasma sanguíneo.
5. Identificar y cuantificar los niveles relativos de SFRP4, IRS1 y KLF4 en exosomas y su asociación con el perfil obesogénico.
6. Cuantificar en suero y en exosomas de plasma sanguíneo los niveles de expresión relativa de *miR-21*, *miR-24*, *miR-34a*, y *miR-128-1*.
7. Determinar la asociación de la expresión relativa de *miR-21*, *miR-24*, *miR-34a*, *miR-128-1* solubles y en exosomas con biomarcadores inmunometabólicos y perfil obesogénico.

6. DISEÑO METODOLÓGICO

6.1. Sedes del estudio y periodo de tiempo

Universidad de Guadalajara: Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud; Departamento de Farmacobiología, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías; Antiguo Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde” O.P.D., Departamento de Nutrición Clínica, Servicio de Nutrición Secretaría de Salud Jalisco y Cuerpo Académico UDG-CA-701. Inmunometabolismo en enfermedades complejas y envejecimiento.

Universitat Autònoma de Barcelona: Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Institut de Biotecnologia i Biomedicina.

Periodo de enero 18 de 2021 a enero 31 de 2025.

6.2. Consideraciones éticas, legales y de bioseguridad

El proyecto de la línea de aplicación y generación de conocimiento (LAGC) “Investigación en Inmunonutrigenómica, Neuroinmunología y *microRNAs* en Enfermedades Complejas” del cual se deriva este protocolo fue aprobado por la Comisión de Investigación y Ética del Antiguo Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde” O.P.D. HCG/CEI-0835/22, N°. 130/22.

El consentimiento informado (Anexo 1) se dió a conocer verbalmente y por escrito a todos los individuos participantes y se solicitó su firma autorizando su inclusión en el estudio, para cumplir con los protocolos de las guías hospitalarias de acuerdo con la declaración de Helsinki de 1964, revisadas en 2013 Fortaleza, Brasil y el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, última reforma en 2014.

Los residuos químicos y biológico-infecciosos que se originen se trataron hasta su disposición final en concordancia con la normatividad vigente (NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-052-SEMARNAT-2005, que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos, NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo).

6.3. Diseño del estudio

6.3.1. Universo muestral

Individuos adultos de la población general, residentes de la zona metropolitana de Guadalajara, Jalisco, México con muestreo por convocatoria.

6.3.2. Tipo de estudio

Estudio transversal analítico con grupo de comparación interno.

6.3.3. Grupos y criterios de estudio

6.3.3.1. Grupos

- Grupo de referencia: Individuos caracterizados sin tejido adiposo disfuncional y sin perfil obesogénico, pareados por sexo con los grupos de estudio y de comparación.
- Grupo de estudio: Individuos caracterizados con tejido adiposo disfuncional y perfil obesogénico pareado por sexo con el grupo de referencia y de comparación.
- Grupo de comparación: Individuos caracterizados sin tejido adiposo disfuncional y con perfil obesogénico pareados por sexo con el grupo de referencia y de estudio.

6.3.3.2. Criterios

- De inclusión
 - Edad de 20 a 59 años
 - Hombres y mujeres
 - Consentimiento informado por escrito y firmado
 - Sin enfermedades crónico-degenerativas
- De exclusión
 - Muestra sanguínea que no cumpla los criterios de calidad para su análisis (NOM-007-SSA3-2011)
 - Que el individuo solicite su baja del estudio
 - Expediente incompleto
- De no inclusión
 - Coexistencia con otras enfermedades agudas y/o crónicas
 - Mujeres embarazadas o en lactancia
- De interpretación
 - IMC normal de 18.50 a 24.99 kg/m²
 - Perfil obesogénico
 - Estatus de adiposidad > 2 DS del grupo de referencia
 - Tejido adiposo disfuncional, dos de los siguientes criterios:

- Sobrepeso IMC de $> 25.00 \text{ kg/m}^2$
- Masa grasa $\geq 25\%$ en hombres y $\geq 35\%$ en mujeres
- Inflamación subclínica de grado bajo: $\text{pCr} > 3.0$ y $< 15.0 \text{ mg/L}$
- RI y/o dislipidemia mixta y/o hipoalfalipoproteinemia
- RI: $\text{HOMA-IR} > 4.65$ o $\text{HOMA-IR} > 3.60$ e $\text{IMC} > 27.50 \text{ kg/m}^2$
- Hipoalfalipoproteinemia: $\text{HDLc} < \text{de } 40 \text{ mg/dL}$ en hombres, y $< \text{de } 50 \text{ mg/dL}$ en mujeres
- Dislipidemia mixta: dos o tres de las siguientes dislipidemias
 - Hipertrigliceridemia: nivel sérico de triglicéridos $> \text{de } 150 \text{ mg/dL}$
 - Hiperlipoproteinemia: nivel sérico de $\text{LDLc} > \text{de } 190 \text{ mg/dL}$
 - Hipercolesterolemia: nivel sérico de colesterol total $> \text{de } (\text{mg/dL})$

<u>Edad</u>	<u>Hombres</u>	<u>Mujeres</u>
20-24	128-216	128-209
25-29	140-236	134-218
30-34	150-250	141-229
35-39	156-264	147-240
40-44	162-274	155-253
45-49	166-280	162-265
50-54	170-286	171-278
55-59	173-291	179-291(314)

6.4. Diseño estadístico

6.4.1. Selección de la muestra

6.4.1.1. Cálculo del tamaño de la muestra con el software *G*power* versión 3.1.9.4.

- Se usará la prueba F-ANCOVA de acuerdo con las expresiones de *miRs* reportadas (315) considerando los valores siguientes:
- Tamaño de efecto = 0.25
- $\alpha = 0.05$
- Poder estadístico $(1-\beta) = 0.95$
- Número de grupos = 3
- Con los modelos matemáticos para el cálculo de los estadísticos se determinó un tamaño de muestra de 120 individuos, seleccionados de la población general.

6.4.2. Definición de las variables

6.4.2.1. Clasificación operacional de las variables de estudio

- Variables independientes e intervinientes

<i>Variable independiente</i>	GRUPOS					
	<i>de referencia</i>		<i>de comparación</i>		<i>de estudio</i>	
Sobrepeso	-	Ausente	Presente	-	Presente	-
Resistencia a la insulina	-	Ausente	-	Ausente	Presente	-
Dislipidemia mixta	-	Ausente	-	Ausente	Presente	-
Dislipidemia		Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente
Tejido adiposo disfuncional	-	Ausente	-	Ausente	Presente	-
Obesidad	-	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente
Obesidad abdominal	-	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente
<i>Variable interviniente</i>						
Anemia		Ausente	-	Ausente		Ausente
Anorexia/bulimia	-	Ausente	-	Ausente		Ausente

- Variables dependientes
 - Variables demográficas y clínicas
 - Sexo
 - Edad
 - Presión arterial
 - Sistólica
 - Diastólica
 - Media
 - Ingesta calórica
 - Total
 - Carbohidratos
 - Proteínas
 - Grasas saturadas
 - Evaluación de órganos por parámetros bioquímicos
 - Química sanguínea (mg/dL)
 - Urea
 - Creatinina
 - Ácido úrico
 - Perfil hepático (UI/mL)
 - AST, ALT (aspartato y alanino amino-transferasas, respectivamente)
 - Albúmina (g/dL)

ESTATUS DE ADIPOSIDAD		
Reserva corporal de masa grasa y no grasa	Dimensiones corporales (cm)	Almacenamiento de grasa corporal
<i>Distribución de masa grasa corporal</i> (% , kg) <ul style="list-style-type: none"> • Total <ul style="list-style-type: none"> ▪ Peso corporal (kg) ▪ Masa grasa ▪ Masa no grasa • Por segmentos corporales <ul style="list-style-type: none"> ▪ Tronco ▪ Miembros <ul style="list-style-type: none"> ○ Superiores ○ Inferiores • Subcutánea (Panículos adiposos (mm)) <ul style="list-style-type: none"> ▪ Abdominal ▪ Bicipital ▪ Subescapular ▪ Suprailíaco ▪ Tricipital 	Estatura Diámetro coronal abdominal Diámetro sagital abdominal Circunferencias (cm) <ul style="list-style-type: none"> • Cintura • Cadera • Medio brazo Área adiposa abdominal (cm ²) <ul style="list-style-type: none"> • Total • Visceral • Subcutánea 	<i>Índices de adiposidad corporal</i>
		IMC (kg/m ²)
		IGC (kg/m ²)
		BAI
		ABSI
		BRI
		VA
		<i>Índices de adiposidad central</i>
		AVI (cm ²)
		IC
		VAI
		WHtR
		ICC

Abreviaturas: IMC: índice de masa corporal; IGC: índice de grasa corporal; BAI: índice de adiposidad corporal; ABSI: índice de forma corporal, AVI: índice de volumen abdominal, IC: índice de conicidad; VAI: índice de adiposidad visceral, WHtR: índice cintura-estatura, ICC: índice cintura-cadera, BRI: índice de redondez corporal, VA: área visceral.

Análisis proteico de:	Análisis molecular	Perfil de adipocinas y quimiocinas (ng/mL)	Biomarcadores de Inflamación	Biomarcadores metabólicos (mg/dL)		Estatus de RI
<ul style="list-style-type: none">SFRP4IRS1KLF4 en exosomas	Niveles de expresión relativa de: <ul style="list-style-type: none">miR-21miR-24miR-34miR-128-1 en suero y exosomas	CCL2 Quemerina Adiponectina total Formas multiméricas <ul style="list-style-type: none">HMWMMW + LMW en suero	pCr (mg/L) C3 (mg/dL) en suero VSG (mm/h) en sangre	Perfil de lípidos: TG NEFA (nM) HDLc VLDLc Apo A-1 Apo B CT en suero	Índices de lípidos TG/HDLc CT/HDLc LDLc/HDLc sdLDLc/LDLc Apo B/Apo A-1	Glucosa basal (mg/dL) Insulina basal (μUI/mL) en suero Índices HOMA-IR HOMA-β HOMA-AD QUICKI DI
		Índices <ul style="list-style-type: none">CCL2/AdipoQ indexCCL2/ QuemerinaQuemerina /AdipoQ index		Perfil LDL: <ul style="list-style-type: none">LDLcsdLDLc en Suero Índices <ul style="list-style-type: none">LDLc no-sdLDLc%total sdLDLc%sdLDLc no-LDLcCT no-sdLDLc		

Abreviaturas: SFRP4: proteína 4 secretada relacionada con frizzled; IRS1: sustrato del receptor de la insulina 1; KLF4: factor tipo Kruppel 4; miR: microRNA; HMW, MMW, LMW: oligómeros de adiponectina (High, Medium, Low molecular weight, respectivamente); CCL2: Ligando quimiotáctico de quimiocina con motivo C-C 2; pCr: proteína C reactiva; VSG: velocidad de sedimentación globular; C3: proteínas del sistema de complemento; TG: Triglicéridos; CT: colesterol total; NEFA: Ácidos grasos libres no esterificados; HDLc, LDLc, VLDLc, sdLDLc: colesterol de las lipoproteínas de alta, baja, muy baja y small dense respectivamente; Apo: apolipoproteína; HOMA: Medida de modelo de homeostasis -IR: para resistencia insulina, -D: de adiponectina, -β: de funcionamiento de las células β; QUICKI: índice cuantitativo de comprobación de la sensibilidad a la insulina DI: índice de disposición basal.

6.4.3. Plan de registro, procesamiento, captación y presentación de resultados

6.4.3.1. Procesamiento estadístico de resultados

El análisis de las variables se realizará con los paquetes estadísticos:

- Prism 8.0 para macOS. Versión 8.4.0. (455). Febrero 20, 2020.
- Jasp. Copyright 2013-2024 University of Amsterdam. Versión Jasp 0.18.3 (Intel). Enero 16, 2024.

6.4.3.2. Análisis de las variables

- Se analizará la distribución normal de todas las variables con *Z de Kolmogorov-Smirnov test*.
- Las mediciones de las variables clínicas, adiposidad, niveles séricos de biomarcadores bioquímicos, metabólicos y de inflamación y adipocinas, quimiocinas y expresión relativa de *miRs* se analizará con *H* de Kruskal-Wallis y test post hoc, ANOVA one way y *HSD* Tukey test post hoc, según aplique, para determinar diferencias entre los grupos referencia, de estudio y de comparación.
- Diseño de 6 modelos de regresión lineal. El estatus del tejido adiposo se determinará mediante regresión logística binaria, con las covariables que el modelo matemático permita, y se interpretará por AUC (area under curve) del modelo.
- Los datos de la expresión relativa de *miRs*, niveles de biomarcadores metabólicos, de inflamación, adipocinas y adiposidad se someterán a pruebas de correlación con *r* de *Pearson* o *Rho* de Spearman, según aplique.
- Los datos de la expresión relativa de *miRs* y niveles séricos de biomarcadores bioquímicos, metabólicos, de inflamación, adipocinas y adiposidad se someterán a pruebas de correlación con rho de Spearman.

6.4.3.3. Definición de la significancia estadística

Una $P < 0.05$, se considerará significativa.

6.4.3.4. Presentación de los resultados

Los resultados se presentarán en tablas y figuras y se reportan en promedio $\pm SD$ o SE , mediana con percentiles 25 – 75, máximos y mínimos, frecuencias o proporciones.

6.5. Metodología

6.5.1. *Evaluación clínica y clasificación de los grupos de estudio con y sin TA disfuncional*

6.5.1.1. *Examen médico general*

- Historia clínica.
- Exploración física y revisión por órganos y sistemas.
- Antecedentes familiares patológicos y enfermedades actuales.
- Signos vitales (presión arterial, pulso y temperatura corporal).
- Función hepática: aspartato aminotransferasa (AST, valores de referencia 0 - 35 UI/L), alanino aminotransferasa (ALT, valores de referencia 0 - 35.0 UI/L), albúmina (ALB, valores de referencia 3.2 – 6.0 g/dL).
- Función renal: Urea, creatinina y ácido úrico (valores de referencia 15 a 45 mg/dL y 0.6 a 1.4 mg/dL, 3.5 y 7.2 mg/dL respectivamente).

6.5.1.2. *Evaluación nutrición y del estatus de adiposidad*

- Evaluación nutrición:
 - Composición de la dieta, grasa, carbohidratos, proteínas por recordatorio de 24 horas y frecuencia de consumo de alimentos mensual.
 - Consumo calórico por día y mes (Kcal/día/mes), calculado por el sistema mexicano de alimentos equivalentes (Pérez Lizaur AB y cols. SMAE, Sistema Mexicano de Alimentos Equivalentes. 4a ed. México: Fomento de Nutrición y Salud, A.C. / Ogali; 2014).
- Estatus de adiposidad:
 - Distribución corporal de masa de grasa y no grasa
 - Reserva corporal de masa grasa total y por segmentos corporales por el método de impedancia bioeléctrica (con el sistema); siguiendo las instrucciones del fabricante:
 - Peso (kg), reserva total de tejido adiposo (masa grasa total %, kg).
 - Distribución de masa grasa por cinco regiones anatómicas (piernas, brazos y tronco % y kg).
 - Masa no grasa total (kg).
 - Masa grasa subcutánea
 - Panículos adiposos (mm; abdominal, bicipital, tricipital, subescapular, suprailíaco), se miden del lado derecho del cuerpo con plicómetro Harpenden, modelo HSB-BI: abertura de 80 mm y precisión de ± 0.2 mm, a presión constante de 10 g/mm² (Baty International, UK).

- Dimensiones corporales (cm)
 - Estatura, con el estadímetro Seca 214 (GmbH & Co. KG. Hamburgo, Alemania con 1mm de precisión).
 - Circunferencias de cintura, cadera y medio brazo con cinta de acero (GULICK® length 0-180 cm precisión $\pm 1\text{mm}$; USA), medidas de acuerdo con las recomendaciones del National Heart, Lung, and Blood Institute as a part of the National Institutes of Health and the U.S. Department of Health and Human Services (www.nhlbi.nih.gov/guidelines/obesity).
 - Diámetros sagital y coronal medidos de acuerdo con la técnica de Garaulet. (https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112010000200003).
 - Área adiposa abdominal (cm^2)
 - Total

$$\text{AAT} = \text{WC}^2 / 4\pi$$
 - Visceral

$$\text{AV} = \pi ((\text{WC} / 2\pi) - \text{Panículo adiposo abdominal})^2$$
 - Subcutánea

$$\text{AS} = \text{AAT} - \text{AV}$$
- Almacenamiento de grasa corporal
 - Índices de adiposidad corporal:
 - Índice de masa corporal: $\text{IMC} = \frac{\text{Peso (kg)}}{\text{Estatura (m}^2\text{)}} \quad (316)$
 - Índice de grasa corporal: $\text{IGC} = \frac{\text{Masa grasa corporal total (kg)}}{\text{Estatura (m}^2\text{)}} \quad (317)$
 - Índice de adiposidad corporal: $\text{BAI} = \frac{\text{Circunferencia de cadera (cm)}}{\text{Estatura}^{1.5}(\text{m})} - 18 \quad (317)$
 - A body shape index: $\text{ABSI} = \frac{\text{Circunferencia de cintura (cm)}}{\left[\sqrt[3]{\text{IMC}^2 \left(\frac{\text{kg}^2}{\text{m}} \right) \times \sqrt{\text{Estatura (m)}}} \right]} \quad (318)$
 - Índices de adiposidad central:
 - Índice de cintura – cadera: $\text{ICC} = \frac{\text{Circunferencia de cintura (cm)}}{\text{Circunferencia de cadera (cm)}} \quad (319)$
 - Índice de cintura – estatura: $\text{WtHR} = \frac{\text{Circunferencia de cintura (cm)}}{\text{Estatura (cm)}} \quad (319)$
 - Índice de conicidad: $\text{IC} = \frac{\text{Circunferencia de cintura (m)}}{0.109 \times \sqrt{\frac{\text{Peso (kg)}}{\text{Estatura (m)}}}} \quad (320-322)$

- *Índice de adiposidad visceral:*

$$VAI_{Hombres} = \frac{Circunferencia\ de\ cintura\ (cm)}{[39.68 + 1.88 \times IMC\ (kg/m^2)] \times [TG\ (\frac{mmol}{L}) \div 1.03] \times [1.31 \div HDLc\ (\frac{mmol}{L})]} \quad (323, 324)$$

$$VAI_{Mujeres} = \frac{Circunferencia\ de\ cintura\ (cm)}{[36.58 + 1.89 \times IMC\ (kg/m^2)] \times [TG\ (\frac{mmol}{L}) \div 0.81] \times [1.52 \div HDLc\ (\frac{mmol}{L})]} \quad (323, 324)$$

- *Índice de volumen abdominal:*

$$AVI = \frac{[2 \times Cir.cintura^2(cm) + 0.7 \times (Cir.cintura(cm) - Cir.cadera(cm))^2]}{1000} \quad (325)$$

6.5.1.3. Clasificación de los individuos en los grupos de estudio

- Clasificación de individuos en el **grupo de referencia**
 - Sin sobrepeso IMC normal de 18.50 a 24.99 kg/m²
 - Sin RI de acuerdo con los criterios de Stern: HOMA-IR < 3.60
 - Sin dislipidemia con los criterios de la NOM-037-SSA2-2012
- Clasificación de individuos en el **grupo de estudio**
 - Con sobrepeso IMC de 25.00 kg/m² a 39.99 kg/m²
 - Con RI de acuerdo con los criterios de Stern: HOMA-IR > 4.65 o IMC > 27.50 kg/m² y HOMA-IR > 3.60
 - Con dislipidemia mixta y/o hipoalfalipoproteinemia con los criterios de la NOM-037-SSA2-2012
- Clasificación de individuos en el **grupo de comparación**
 - Con sobrepeso IMC de 25.00 kg/m² a 39.99 kg/m²
 - Sin RI de acuerdo con los criterios de Stern: HOMA-IR < 3.60
 - Sin dislipidemia mixta y/o con uno o ninguno de los siguientes criterios: dislipidemia (hipertrigliceridemia o hipercolesterolemia o hiperlipoproteinemia) con los criterios de la NOM-037-SSA2-2012

6.5.2. Determinación de los biomarcadores inmunometabólicos en muestras sanguíneas de los individuos incluidos en el estudio

6.5.2.1. Obtención de muestras biológicas

- Por punción venosa se obtendrán muestras de sangre total en tubos del sistema al vacío (vacutainer® BD Diagnostic Systems Montenegro 1402, (C1427AND) Buenos Aires – Argentina), una en el sedisystem tube, una con anticoagulante EDTA-K₃ 1 mg/mL y otra con activador de coagulación, este una vez que coagule a temperatura ambiente se

centrifugará y se separará el suero en alícuotas para ser almacenado a -80°C hasta su análisis.

6.5.2.2. Niveles de biomarcadores de inflamación

- Velocidad de sedimentación globular (VSG) mm/h, por el método de Wintrobe con el sistema sedisystem tube (vacutainer® BD Diagnostic Systems Montenegro 1402, (C1427AND) Buenos Aires – Argentina).
- Proteína C reactiva de alta sensibilidad (hs-pCr mg/L) por turbidimetría reacción antígeno-anticuerpo anti-proteína C reactiva humana, con límite de detección de 0.15 mg/L. C3 mg/dL, con el método inmuno-turbidimétrico de RANDOX (Randox Laboratories Limited, 55 Diamond Road, Crumlin, Country Antrim, BT29 4QY, UK).

6.5.2.3. Evaluación de órganos por parámetros bioquímicos

- Perfil renal: urea, creatinina y ácido úrico (mg/dL).
- Perfil hepático: AST, ALT (UI/mL) y albumina sérica (g/dL) por métodos cinético y colorimétrico, respectivamente (RANDOX Laboratories Limited, 55 Diamond Road, Crumlin, Country Antrim, BT29 4QY, UK).

6.5.2.4. Biomarcadores metabólicos

- Perfil de lípidos (mg/dL): concentración sérica de triglicéridos (TG), colesterol total (CT), HDLc, LDLc, apolipoproteína A-1 y B, ácidos grasos libres no esterificados (NEFAs) y sdLDLc se medirán con el método inmuno-turbidimétrico (RANDOX Laboratories Limited, 55 Diamond Road, Crumlin, Country Antrim, BT29 4QY, UK). Se calculará el colesterol de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDLc) por la fórmula de Friedewald.
- Índices de lípidos calculados mediante las fórmulas: TG/HDLc, CT/HDLc; LDLc/HDLc, ApoB/Apo A-1, sdLDLc/LDLc.
- Perfil LDLc (mg/dL):
 - LDLc
 - sdLDLc
 - $\text{LDLc no-sdLDLc} = \text{LDLc} - \text{sdLDLc}$
 - $\% \text{total sdLDLc} = (\text{sdLDLc} / \text{CT}) \times 100$
 - $\% \text{sdLDLc no-LDLc} = (\text{LDLc} - \text{sdLDLc}) \times 100$
 - $\text{CT no-sdLDLc} = \text{CT} - \text{sdLDLc}$

6.5.2.5. Estatus de RI

- Glucosa sérica basal (mg/dL): RANDOX Laboratories Limited, 55 Diamond Road, Crumlin, Country Antrim, BT29 4QY, UK).
- Insulina sérica basal, por inmunoensayo de tipo ELISA (límite de detección 0.399 μ IU/ml. Human Immunoassay ALPCO Diagnostics, 26G Keewaydin Drive Salem, NH 03079 USA).
- Índices de RI calculados mediante las fórmulas:

$$\text{HOMA} - IR = \frac{[\text{glucosa (mg/dL)} \times \text{insulina}(\mu\text{IU/ml})]}{405}$$

$$\text{HOMA} - B = \frac{20 \times \text{insulina} (\mu\text{IU/mL})}{\text{glucosa (mmol/L)} - 3.5}$$

$$\text{HOMA} - AD = \frac{[\text{glucosa (mmol/mL)} \times \text{insulina}(\mu\text{IU/ml})]}{22.5 \times \text{adiponectina} (\mu\text{g/mL})} (326)$$

$$DI = \frac{\text{HOMA} - B}{\text{HOMA} - IR}$$

$$QUICKI = \frac{1}{\log \text{insulina} (\mu\text{IU/mL}) + \log \text{glucosa (mg/dL)}}$$

6.5.2.6. Determinación del perfil de adipocinas y quimiocinas

6.5.2.6.1. Obtención de muestras biológicas

Por punción venosa se obtendrán muestras de sangre total en tubos del sistema al vacío (vacutainer® BD Diagnostic Systems Montenegro 1402, (C1427AND) Buenos Aires – Argentina), con activador de coagulación, una vez que coagule a temperatura ambiente se centrifugará y se separará el suero en alícuotas para ser almacenado a -80°C hasta su análisis.

6.5.2.6.2. Medición por la técnica de ELISA de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes:

- Sistema multimérico de Adiponectina. Sensibilidad 19 pg/mL, (HWM and Total Adiponectin ELISA; Cat. No. 47-ADPHU-E01; ALPCO Keewaydin Drive, Salem, NH 03079).
- CCL2. Sensibilidad 1.7 pg/mL (ELISA kit Cat. DCP00 USA R&D Systems, Inc. 614 McKinley Place NE, Minneapolis, MN 55413).
- Quemerina RARRES2. Sensibilidad 5000 pg/mL (Cat No. MBS029209. MyBioSource).

6.5.3. Aislamiento de exosomas de línea celular 3T3-L1 y de plasma sanguíneo

6.5.3.1. Cultivo de la línea celular 3T3-L1

Obtención de suero fetal bovino libre de exosomas

Primero se inactiva el complemento en el suero fetal bovino (FBS, del inglés *Fetal Bovine Serum*, Merck. F2442-500ML) incubando 30 min a 56 °C. Para obtener FBS libre de exosomas, se centrifugará durante 18 h a 120,000x g a 4°C. Finalmente, se filtra con un filtro de 0.22 µm (CORNING 45 mm diámetro).

Diferenciación de la línea celular

- La línea celular 3T3-L1 (Merck. Cat 86052701-DNA-5UG; donadas por la Universidad de Barcelona), se cultivará en DMEM (por sus siglas en inglés *Dulbecco's modified Eagles médium*. Merck. Cat D6429) con 10% v/v de FBS, a 37 °C y 5% CO₂.
- Para la diferenciación de la línea celular, se prepararán las soluciones stock: 50 mM de 3 isobutil-1-metilxantino (IBMX. (SERVA. 26445.02. 500 mg) en dimetil sulfóxido (DMSO. Sigma Aldrich. Cat. D2650-100ML), 1 µM dexametasona (Dexa. MCE. Cat. HY-14648. 500 mg) en metanol (MERCK. Cat. 1.06035).
- Con 80% de confluencia si es en un frasco de cultivo, inicia la diferenciación con MDI (medio de diferenciación I: 0.5 mM de IBMX, 1 µM Dexa y 10 µg/mL insulina en DMEM + 10% FBS) por 2 días. Posteriormente se reemplazará por MDII (medio de diferenciación II) para la maduración a adipocitos con 10 µg/mL insulina (NeoBiotech. Cat. NB-58-0012. 5mg/ml) en DMEM + 10% FBS hasta que se observe la diferenciación (~10 días) cambiando el medio cada dos días, finalmente se mantienen en DMEM + 10% FBS hasta posteriores experimentos (79, 327).
- Una vez que se han diferenciado se someterá a hipoxia por 2.5 horas y 24 horas, en una cámara hermética (BD GasPak™ EZ Lot. 581972) en donde se generará consumo de O₂ mediante anaerobiosis (BD GasPak™ EZ. Anaerobe Container System. Ref 260678), se comprobará el consumo de O₂, mediante indicadores anaeróbicos (BD BBL™ Dry Anaerobic Indicator Strips. Ref 271051).
- Los lípidos intracelulares y triglicéridos de las células diferenciadas se teñirán con oil-red O (ORO) (Sigma-Aldrich Cat. O7505) 0,5% en isopropanol, diluido en agua MiliQ (3:2). Se fijarán con formaldehído 10% por 10 minutos a temperatura ambiente, teñirán con ORO por 15 minutos [protocolo modificado de Du J., *et al.* (328)].
- Las fotografías de cultivo celular se realizarán directamente de los frascos de cultivo en el microscopio invertido (Nikon Inverted Routine Microscope ECLIPSE Ts2. Software Nis-Elements), por la técnica de contraste de fases.

6.5.3.2. Aislamiento y caracterización de exosomas de las células con fenotipo de adipocitos (3T3-L1 diferenciadas) y plasma sanguíneo

6.5.3.2.1. Aislamiento de exosomas

Centrifugación diferencial (CD)

- A partir de 50 mL de sobrenadante se aislarán exosomas por centrifugación diferenciada: 300x g 10 minutos 4 °C (Heraeus Megafuge 2.0 R), el sobrenadante se volverá a centrifugar a 2,000x g 20 minutos 4 °C (Heraeus Megafuge 2.0 R), el sobrenadante se centrifugará a 10,000x g 20 minutos 4 °C (Beckman Coulter. Rotor JA-14. Frascos NALGENE® 250 mL), el sobrenadante se centrifugará a 100,000 x g (3,5000 rpm) 70 minutos 4 °C (Beckman Coulter. Rotor T70i. Tubos Beckman Centrifuge Tubes 26.3 mL), resuspender pellet en 500 µL de PBS 1X y centrifugar a 100,000x g (33,000 rpm) 70 minutos 4 °C (Thermo Sorvall Discovery M150 SE Floor Micro-Ultracentrifuge 150K RPM. Rotor S150-AT Tubos Eppendorf PP 1 mL) y resuspender en 200 µL de PBS 1X. Modificado de Lobb et al. (329).

Cromatografía de exclusión de tamaño (SEC del inglés size exclusion chromatography)

- Se colocará 1mL de plasma sanguíneo en columnas (Econo-Pac® Chromatography Columns, Pkg of 50 #7321010) con sefarosa (Sephacrose™ CL-2B). Se combinarán las fracciones de los exosomas 3 a 9, y 13 a 15 como control negativo (189).

Kit comercial

- Se aislará exosomas del plasma como lo recomienda el kit Total Exosome Isolation (from plasma) (Invitrogen Cat. No. 4404450). Se re-suspenderán en 50 µl de solución salina.

6.5.3.2.2. Caracterización de exosomas

Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

- Se colocará 10 µl de exosomas aislados en la rejilla de microscopía (Formvar/carbon EMS Cat. No. 71137).
- Se realizará tinción negativa: fijación con glutaraldehído 3%, lavado y acetato de uracilo 2%.
- Se observará en microscopio electrónico de transmisión (TEM, Transmission Electron Microscopy FEI Technology, Model Tecnai Spirit BioTwin, software FEI TIA 4.15.

Microscopia electrónica de transmisión criogénica (cryo-TEM)

- Se empleará 3 µl de exosomas aislados. La técnica de criogénica será llevada a cabo por el técnico del servicio de microscopía.
- Microscopio cryo-TEM, Jeol JM-2011, Tokyo, Japan.

Western Blot de tetraspaninas de exosomas

- La identificación inmunológica de los exosomas observados se realizará por Western Blot para los marcadores CD9 (1:1000; antibodies.com. Anti-CD9 Anticuerpo (MEM-61) (A86089)), CD81 (1:1000; antibodies.com. Anti-CD81 Anticuerpo (M38) (A86719)), como proteína constitutiva se incluyó Vinculina (1:500 Invitrogen Ref. MA5-11690), anticuerpo secundario Anti-mouse (1:5000; abcam. NA931V ECL Anti-mouse IgG). El revelado se realizará con ECL (BioRad Clarity Western ECL Substrate, 500 ml #1705061) en espectrofotómetro (Li-cor, Odyssey XF, LI-COR Acquisition Software).

6.5.4. Identificación de las proteínas SFRP4, IRS1 y KLF4 en los exosomas aislados de plasma sanguíneo

- Los exosomas se lisarán con 20 µL lisis buffer (PBS 1x, NP40 10%, inhibidor de proteasas) y se incubarán con 150 µL de muestra, en frío por 1 hora, en agitación lenta. Se centrifugarán a 13,000x g por 15 minutos a 4°C, en el sobrenadante se cuantificará las proteínas totales por BCA (del inglés bicinchoninic acid assay. Pierce™ BCA Protein Assay Kits), de acuerdo con protocolo del kit y leer a 546 nm (Perkin Elmer. Viktor 3™).
- Mediante western blot, se identificarán las proteínas SFRP4 (1:2000; NeoBiotech. Cat NB-22-29487-50. Anti-SFRP4 Ig.), IRS1 (1:2000; NeoBiotech. Cat NB-22-3773-50. Anti-IRS1 Ig.) y KLF4 (1:2000; Cohesion Bioscience. Cat CQA2050), como proteína constitutiva Vinculina (1:1000. Invitrogen Ref. MA5-11690). Como anticuerpo secundario, Anti-mouse IgG (HRP) (1:5000, Cohesion Bioscience. Cat CSA2108). Revelado con ECL (BioRad Clarity Western ECL Substrate, 500 ml #1705061, 1:1) en espectrofotómetro (Li-cor, Odyssey XF, LI-COR Acquisition Software).

6.5.5. Determinación en suero y en exosomas de plasma sanguíneo los niveles de expresión relativa de miR-21, miR-24, miR-34a y miR-128-1

6.5.5.1. Obtención de muestras biológicas

Muestra de los exosomas obtenidos en el punto 6.2.2.6.1. y otra muestra sanguínea obtenida por punción venosa en tubo Vacutainer con activador de coagulación, esta una vez que coagule a

temperatura ambiente se centrifugará 10 minutos a 1900 RCF (Rotanta 460R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG.)

- Se separará el suero en alícuotas para ser almacenado a -80°C hasta su análisis.

6.5.5.2.Extracción y purificación de *miRs* de exosomas y suero

- Realizar el proceso del punto 5.3.2.1., mediante el Kit Total Exosome Isolation (from plasma) (Invitrogen Cat. No. 4404450).
- Las muestras extraídas de los exosomas y el suero se tratarán con TRIzol® LS Reagent de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Ambion RNA Life Technologies, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, California 92008) para la extracción de *miRs*.

6.5.5.3.Síntesis de *cDNA* a partir de *miRs* de exosomas y suero

Se utilizará el sistema de síntesis TaqMan® Advanced *miRNA* Assays, que integra reacciones de poliadenilación, ligación de adaptador, transcripción reversa y pre-amplificación.

6.5.5.4.Expresión relativa para *miR-21*, *miR-24*, *miR-34a* y *miR-128-1*

- La expresión de los *miRs* se determinará por RT-qPCR a partir de las muestras de *cDNA*, en el sistema StepOne plus™ Real-Time PCR (Life Technologies Corporation. Applied Biosystems 5791 Van Allen Way, Carlsbad, California 92008).
- Se utilizará SybrGreen (Cat. No. A25742).
- Los resultados se normalizarán con *miR-24* con el modelo matemático $2^{-\Delta C_T}$.

7. RESULTADOS

El consumo de grasas saturadas y aporte calórico total coincide con dislipidemias con mayor aporte de la ruta metabólica TG-VLDLc-Apo B.

En este estudio, primero evaluamos los parámetros clínicos y la ingesta calórica en los sujetos incluidos en el estudio para identificar el estado de salud general (**Tabla 5**).

En los individuos del grupo de estudio se observó incremento en los parámetros de presión arterial y ácido úrico sérico presentaron incremento, e igual aporte calórico representado por el consumo de lípidos (**Tabla 5**). De la misma forma, la comparación entre los individuos del grupo de estudio *versus* los grupos de comparación y referencia se observa incremento en los parámetros de la ruta metabólica TG-VLDLc-Apo B y CT con disminución en los niveles de HDLc (**Figura 23**). Estos resultados respaldan la cuidadosa selección de individuos incluidos en el estudio.

La integración de los índices de adiposidad corporal y central y metabólicos predicen el estatus del TA disfuncional.

Las evaluaciones de los indicadores del estatus de adiposidad corporal se incrementan en el grupo de comparación *versus* el grupo de referencia, con algunas excepciones. Es importante notar que las diferencias fueron consistentes entre los tres grupos en los parámetros de peso corporal total, cantidad absoluta de masa grasa corporal y del tronco, IMC y área adiposa abdominal (**Tabla 6**).

Los parámetros de distribución de masa grasa subcutánea, área adiposa abdominal total y visceral, dimensiones corporales y el índice WHtR mostraron un patrón diferente: mientras que se observó diferencia entre los grupos de referencia *versus* el de estudio y de comparación, entre el grupo de comparación *versus* el grupo de estudio no. Al mismo tiempo, en la magnitud de todos los parámetros de adiposidad se observó incremento en el siguiente orden: el grupo de estudio mayor que el grupo de comparación y este a su vez mayor que el grupo de referencia (**Tabla 6**).

En un análisis más detallado para evaluar el perfil de TA disfuncional, con base en los índices de adiposidad corporal que mostraron incremento en el grupo de estudio, se diseñaron 6 modelos de regresión lineal, que asigna la dependencia de la cantidad absoluta de masa grasa total. El modelo de regresión lineal integrado por los índices: ICC, BAI, IGC, IMC, AVI, y grupos de TAD, representa con mayor fidelidad un perfil de TA disfuncional (**Tabla 7**).

Particularmente el modelo de regresión logística binomial con método de entrada en bloque, TG, CT, WHtR, BRI, AVI, QUICKI, DI y C3 se identificaron con potencial informativo para caracterizar a los individuos incluidos en el estudio con o sin TA disfuncional (**Tabla 8A**). Sin embargo, un análisis posterior con método de entrada paso a paso, en el cual se contrasta el modelo

en bloque frente al modelo paso a paso, los parámetros que soportan el modelo para clasificar el estatus del TA son: QUICKI, WHtR, BRI, CT Y C3 (Tabla 8).

Tabla 5 Demografía, estado de salud y clasificación de los individuos en los grupos de estudio

Grupos	Referencia	Estudio	Comparación
n	34	41	45
Datos demográficos			
Sexo (Masculino : Femenino)	9:25	21:20	18:27
Femenino (%)	74	54	48
Rango de edad	32 ± 9	37 ± 11	36 ± 11
Presión sanguínea (mmHg)			
Sistólica	^{1P} 105 ± 7 ***	^{3P} 121 ± 13 *	^{2P} 112 ± 11
Diastólica	^{1P} 66 ± 5 ***	^{3P} 78 ± 10 **	70 ± 10
Media	^{1P} 79 ± 4 ***	^{3P} 93 ± 10 **	85 ± 10
Evaluación de los órganos por parámetros bioquímicos			
Albumina (g/dL)	4.61 ± 0.35	4.57 ± 0.40	4.73 ± 0.48
ALT (UI/L)	20 ± 13	22 ± 11	23 ± 11
AST (UI/L)	25 ± 9	24 ± 9	23 ± 6
Creatinina (mg/dL)	0.54 ± 0.07	0.59 ± 0.12	0.56 ± 0.10
Urea (mg/dL)	23.21 ± 5.67	23.52 ± 5.93	26.26 ± 6.24
Ácido úrico (mg/dL)	3.89 ± 1.79	^{3P} 6.49 ± 3.49 **	5.75 ± 2.15
Evaluación nutricia (ingesta calórica g/24horas)			
Total (kcal)	1818 ± 654	1757 ± 987	1630 ± 813
Carbohidratos	155 ± 110	134 ± 86	169 ± 81
Proteínas	92 ± 36	87 ± 43	76 ± 39
Lípidos	37 ± 28	38 ± 32	39 ± 19

Población de estudio (n = 120). Los resultados se muestran en $\bar{x} \pm SD$. Diferencias entre grupos: Diferencias entre grupos: Columna ^{1P} Referencia versus Estudio, columna ^{2P} Referencia versus Comparación; columna ^{3P} Estudio versus Comparación. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 significativa (ANOVA One-way y HSD Tukey post hoc). Abreviaturas: ALT: alanina aminotransferasa, AST: aspartato aminotransferasa.

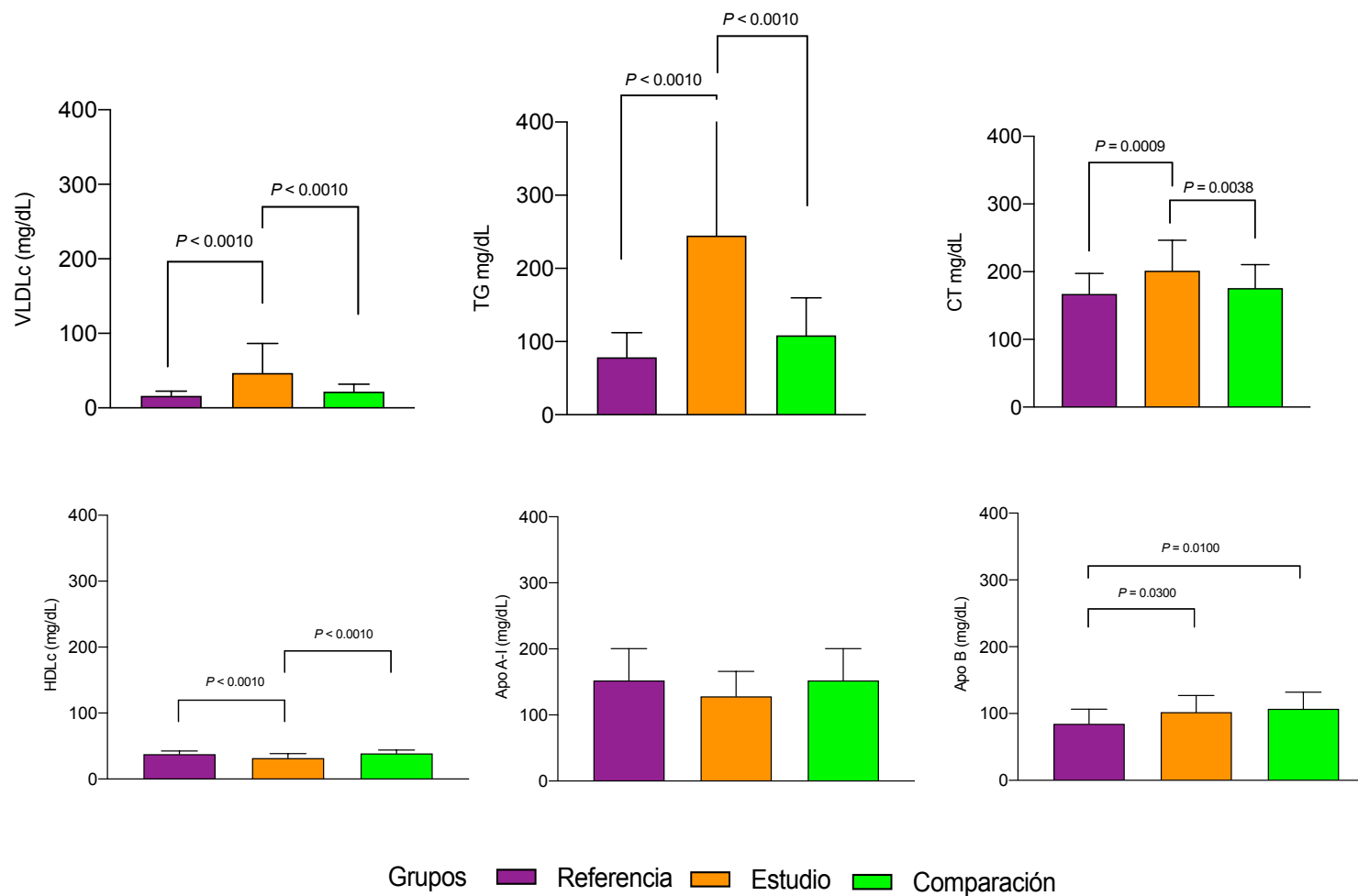


Figura 23 Niveles de perfil de lípidos en los grupos de estudio

Población de estudio ($n = 120$). $P < 0,05$ significativa (Kruskal-Wallis y Prueba de comparaciones múltiples de Dunn post hoc). Abreviaturas: VLDL: colesterol de lipoproteínas de muy baja densidad, TG: triglicéridos, CT: colesterol total, HDLc: colesterol de lipoproteínas de alta densidad.

Tabla 6 Evaluación del estatus de adiposidad corporal en los sujetos del estudio

Grupos	Referencia	Estudio	Comparación
n	34	41	45
Reserva total de masa grasa y no grasa			
Peso corporal (kg)	^{1P} 60.1 ± 9***	^{3P} 94.9 ± 17***	^{2P} 81.2 ± 16***
Masa grasa corporal total (kg)	^{1P} 14.1 ± 4.2***	^{3P} 33.1 ± 13.1*	^{2P} 27.8 ± 10.9***
Masa grasa corporal total (%)	^{1P} 24.2 ± 6.9**	^{3P} 33.6 ± 13.1*	^{2P} 27.8 ± 10.9
Masa no-grasa corporal total (kg)	^{1P} 75.6 ± 7.0***	63.2 ± 12.5	^{2P} 66.4 ± 9.3**
Masa no-grasa corporal total (%)	^{1P} 75.7 ± 6.9***	63.0 ± 12.3	^{2P} 66.4 ± 9.4***
Distribución de masa grasa por segmentos corporales			
Masa grasa del tronco (kg)	^{1P} 6.8 ± 2.6***	^{3P} 17.8 ± 5.9*	^{2P} 14.3 ± 5.2***
Masa grasa del tronco (%)	40.4 ± 16.3	^{3P} 41.4 ± 13.1*	^{2P} 48.8 ± 9.8*
Masa no-grasa del tronco (kg)	^{1P} 25.4 ± 4.3***	^{3P} 33.0 ± 6.0*	^{2P} 29.5 ± 5.9*
Masa no-grasa del tronco (%)	63.2 ± 12.4	61.9 ± 9.5	^{2P} 57.1 ± 6.3**
Distribución de grasa subcutánea (panículos adiposos, mm)			
Bicipital	^{1P} 8.36 ± 4.0**	^{3P} 14.71 ± 8.0	^{2P} 14.80 ± 7.3**
Tricipital	^{1P} 13.0 ± 5.9**	^{3P} 20.8 ± 12.1	^{2P} 20.28 ± 7.5**
Subscapular	^{1P} 13.5 ± 6.2***	^{3P} 29.2 ± 15.1	^{2P} 26.3 ± 10.5***
Suprailíaco	^{1P} 13.4 ± 6.4***	^{3P} 25.3 ± 13.5	^{2P} 25.5 ± 10.2***
Abdominal	^{1P} 16.4 ± 7.8**	^{3P} 28.0 ± 15.5	^{2P} 29.2 ± 11***
Femoral	10.2 ± 5.2	19.5 ± 12.1	20.1 ± 20.1
Dimensiones corporales (cm)			
Circunferencia de medio brazo	^{1P} 30.0 ± 11.6***	37.0 ± 4.1	^{2P} 34.3 ± 3.7**
Circunferencia de cintura	^{1P} 76.4 ± 16.6***	104.5 ± 15.4	^{2P} 94.7 ± 15.4***
Circunferencia de cadera	^{1P} 93.3 ± 6.4***	112.1 ± 11.4	^{2P} 107.8 ± 11.4***
Diámetro Coronal abdominal	^{1P} 22.8 ± 2.4***	^{3P} 28.8 ± 5.7**	25.4 ± 4.7
Diámetro Sagital abdominal	^{1P} 18.0 ± 2.0***	24.7 ± 4.2	^{2P} 23.5 ± 4.6***
Área adiposa abdominal (cm²)			
Total	^{1P} 486.9 ± 291.1***	^{3P} 887.3 ± 282.5*	^{2P} 733.2 ± 273.9**
Subcutánea	^{1P} 392.1 ± 325.4*	662.8 ± 329.8	642.6 ± 425
Visceral	^{1P} 248.5 ± 323.7**	1128 ± 1550	^{2P} 1104 ± 997.9**
Índices de adiposidad corporal			
IMC (kg/m ²)	^{1P} 22.2 ± 1.7***	^{3P} 33.6 ± 5.4**	^{2P} 30.3 ± 5.2***
IGC (kg/m ²)	^{1P} 5.4 ± 1.7***	12.1 ± 5.2	^{2P} 10.4 ± 4.4***
BAI	^{1P} 26.8 ± 4.1***	33.8 ± 7.7	^{2P} 33.4 ± 7.1**
ABSI	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.008	0.07 ± 0.01
Índices de adiposidad central			
AVI (cm ²)	^{1P} 13.1 ± 8.3***	^{3P} 22.4 ± 7.2*	^{2P} 18.6 ± 6.9**
IC	^{1P} 1.6 ± 0.3*	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.1
VAI	^{1P} 13 ± 6***	^{3P} 28 ± 13**	19 ± 10
WHtR	^{1P} 0.4 ± 0.1 ***	0.6 ± 0.1	^{2P} 0.6 ± 0.1***
ICC	^{1P} 0.8 ± 0.2 **	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.1

Población de estudio (n = 120). Los resultados se muestran en $\bar{x} \pm SD$. Diferencias entre grupos: Columna ^{1P} Referencia versus Estudio, columna ^{2P} Referencia versus Comparación; columna ^{3P} Estudio versus Comparación. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 significativa (ANOVA One-way y HSD Tukey post hoc). Abreviaturas: IMC: índice de masa corporal, IGC: índice de grasa corporal, BAI: índice de adiposidad corporal, ABSI: índice de la forma corporal, AVI: índice de volumen abdominal, IC: índice de conicidad, VAI: índice de adiposidad visceral, WHtR: índice de cintura estatura; ICC: índice cintura cadera.

Tabla 7 Modelo de regresión lineal para el estatus del tejido adiposo

A			
R² Ajustado 0.987			
Modelo	Estandarizada	t	P
ICC	-0.283	-9.229	< 0.001
BAI	-0.429	-15.724	< 0.001
IGC (kg/m ²)	1.105	30.014	< 0.001
IMC (kg/m ²)	0.109	3.755	< 0.001
Grupos de TAD (noTAD)		-3.065	0.003
AVI	0.309	8.514	< 0.001
B			
Resumen de Modelos – Masa grasa total (kg)			
Modelo	R	R²	R² Ajustado
1	0.000	0.000	0.000
2	0.970	0.940	0.940
3	0.985	0.971	0.970
4	0.988	0.977	0.976
5	0.989	0.978	0.977
6	0.993	0.986	0.986

Población de estudio (n = 120). A. Modelo de regresión lineal Método Entero, con Factores (Grupos TAD y no TAD). Significancia $P^* < 0.05$. B. Modelo de Regresión lineal Método Paso a Paso, sin Factores (Grupos con y sin TAD). $*P < 0.05$ significativa. Abreviaturas: ICC: índice de cintura cadera, BAI: índice de adiposidad corporal, IGC: índice de grasa corporal, IMC: índice de masa corporal, AVI: índice de volumen abdominal, TAD: tejido adiposo disfuncional.

Tabla 8 Modelo de regresión logística binaria para el estatus del tejido adiposo

A		
R²	0.956	
Sensibilidad (noTAD)	0.955	
Especificidad (TAD)	0.975	
Precisión	0.955	
Covariable	gl	P
TG	1	0.431
CT	1	0.245
WHtR	1	0.156
BRI	1	0.171
AVI	1	0.408
QUICKI	1	0.201
DI	1	0.193
C3	1	0.547
B		
R²	0.944	
Sensibilidad (noTAD)	1.000	
Especificidad (TAD)	0.975	
Precisión	0.957	
Covariable	gl	P
QUICKI	1	0.099
WHtR	1	0.074
BRI	1	0.078
CT	1	0.181
C3	1	0.223

Población de estudio (n = 120). A. Modelo de regresión logística. Método Entero, sin Factores. Prueba de Wald. Significancia $P^* < 0.05$. B. Modelo de regresión logística. Método Paso a paso, sin Factores. Prueba de Wald. $*P$ significativa < 0.05 . Abreviaturas: TG: triglicéridos, CT: colesterol total, WHtR: índice de cintura estatura, BRI: índice de redondez corporal, AVI: índice de volumen abdominal, QUICKI: índice cuantitativo de la sensibilidad de la insulina, DI: índice de disposición basal.

El desequilibrio del escenario de oligómeros de adiponectina y quimiocinas con contribución del proceso inflamatorio caracterizado por el incremento en marcadores de inflamación subclínica concuerda con el desbalance en los índices metabólicos.

En los niveles de biomarcadores metabólicos y de RI se observaron diferencias esenciales:

- Las diferencias entre los grupos de estudio *versus* el grupo de referencia son constantes en el estado de resistencia/sensibilidad a la insulina, mostrados por los niveles de insulina y la magnitud de los índices HOMA-IR y QUICKI (**Tabla 9**).
- Los niveles del perfil sdLDLc, índices de lípidos y RI muestran diferencias entre el grupo de estudio *versus* el grupo de referencia, mientras que los grupos de referencia *versus* comparación no muestran diferencias (**Figura 24**).

Paralelamente a lo anterior, en los resultados en el perfil de adipocinas y biomarcadores de inflamación mostraron un patrón singular:

- Los niveles de C3 mostraron incremento en los grupos de estudio y comparación *versus* el grupo de referencia; mientras que en los niveles de pCr y magnitud de VSG se observaron resultados alternos, el primero, incremento en el grupo de estudio *versus* el grupo de referencia, y el segundo aumentó con respecto al grupo de comparación (**Figura 25**).
- Los niveles de quemerina y CCL2 se mantienen constantes en los tres grupos de estudio.
- Los oligómeros de adiponectina muestran disminución en el grupo de estudio *versus* el de referencia que concuerdan con el patrón mostrado de adiponectina total (**Figura 26**).
- El perfil de oligómeros de adiponectina y quimiocinas, biomarcadores de inflamación, índices de grasa corporal, estatus de RI y biomarcadores metabólicos, muestran correlación entre ellos (**Figura 27**).

Tabla 9 Niveles de biomarcadores metabólicos y estatus de RI en los grupos de estudio

Grupos	Referencia	Estudio	Comparación
n	34	41	45
Índice de lípidos			
TG/HDLc	^{1P} 2.2844 ± 1.1902**	^{3P} 6.3705 ± 6.1241*	^{2P} 3.3537 ± 2.4652
CT/HDLc	^{1P} 4.5848 ± 1.0080***	^{3P} 5.8897 ± 0.9630*	^{2P} 5.0532 ± 1.1982
Apo B/Apo A-1	^{1P} 0.5498 ± 0.2024**	0.8460 ± 0.2726	0.8145 ± 0.4668
LDLc/HDLc	^{1P} 2.9934 ± 0.8895***	4.0578 ± 1.0163	3.5526 ± 1.1321
sdLDLc/LDLc	^{1P} 0.1913 ± 0.0241**	0.2655 ± 0.1248	0.2339 ± 0.0875
Estatus de resistencia a la insulina			
Glucosa basal (mg/dL)	^{1P} 71.3 ± 11.8***	^{3P} 103.5 ± 47.8***	70.3 ± 9.4
Insulina basal (μUI/mL)	^{1P} 8.2 ± 4.7***	^{3P} 28.1 ± 12.1***	13.6 ± 4.9
HOMA-IR	^{1P} 1.3 ± 0.9***	^{3P} 7.2 ± 4.7***	2.1 ± 1.0
HOMA-B	43.5 ± 66.1	25.5 ± 24.4	45.7 ± 74.1
QUICKI	^{1P} 0.38 ± 0.05***	^{3P} 0.29 ± 0.01***	^{2P} 0.34 ± 0.02***
DI	^{1P} 798 ± 894**	108 ± 117	453 ± 6536

Población de estudio (n = 120). Los resultados se muestran en $\bar{x} \pm SD$. Diferencias entre grupos: columna ^{1P} Referencia versus Estudio, columna ^{2P} Referencia versus Comparación; columna ^{3P} Estudio versus Comparación. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 significativa (ANOVA One-way y HSD Tukey post hoc). Abreviaturas: TG: triglicéridos, CT: colesterol total, LDLc: colesterol de lipoproteínas de baja densidad; HDLc: colesterol de lipoproteínas de alta densidad, sdLDLc: partículas pequeñas de colesterol de las lipoproteínas de baja densidad, HOMA: medida de modelo de homeostasis; RI: resistencia insulina; B: índice funcionamiento de células β; QUICKI: índice cuantitativo de la sensibilidad de la insulina, DI: índice de disposición basal.

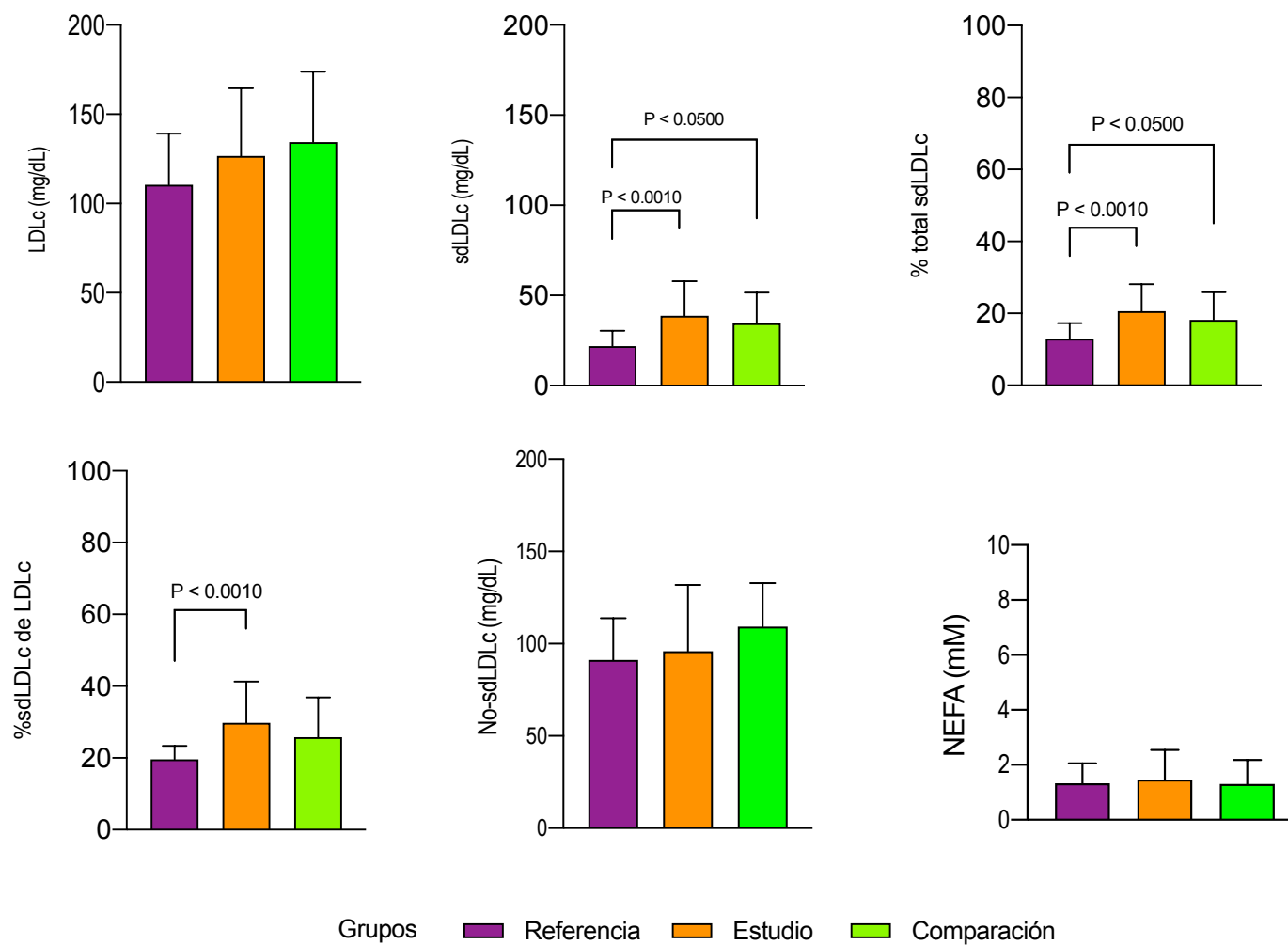


Figura 24 Perfil de LDLc en los grupos de estudio

Población de estudio ($n = 120$). $P < 0.05$ significativa (Kruskal-Wallis y Prueba de comparaciones múltiples de Dunn post hoc). Abreviaturas: LDLc: colesterol de lipoproteína de baja densidad; sdLDLc: partículas pequeñas de colesterol de las lipoproteínas de baja densidad; NEFA: ácidos grasos libres no esterificados

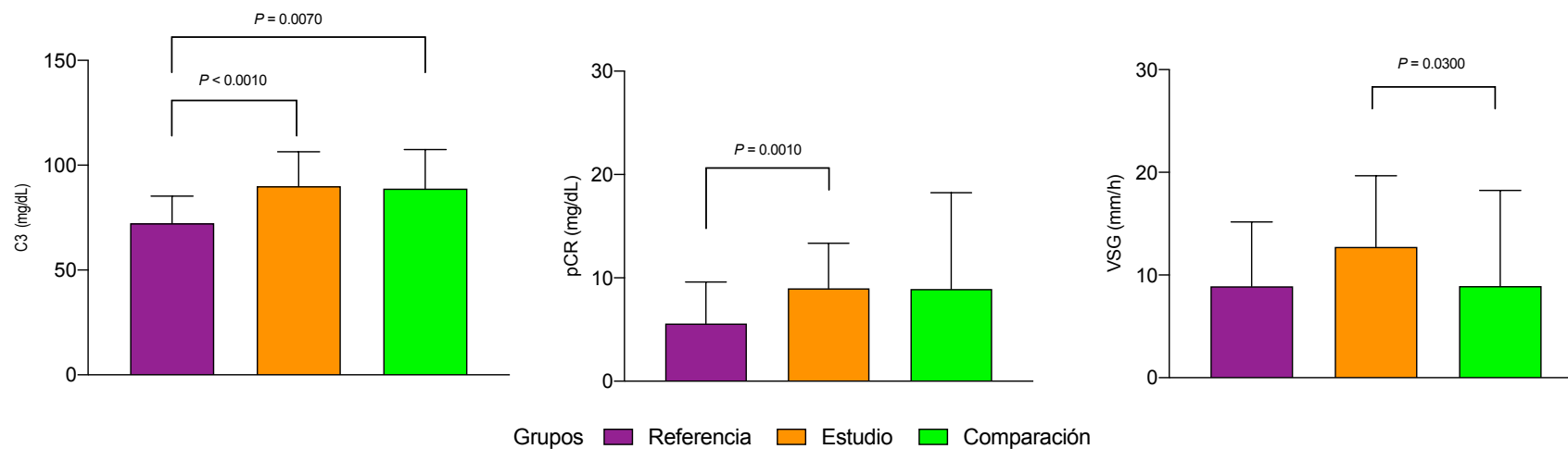


Figura 25 Niveles de Biomarcadores de inflamación en los grupos de estudio

Población de estudio ($n = 120$). $P < 0.05$ significativa (Kruskal-Wallis y Prueba de comparaciones múltiples de Dunn post hoc). Abreviaturas: pCr: proteína C reactiva; VSG: velocidad de sedimentación globular.

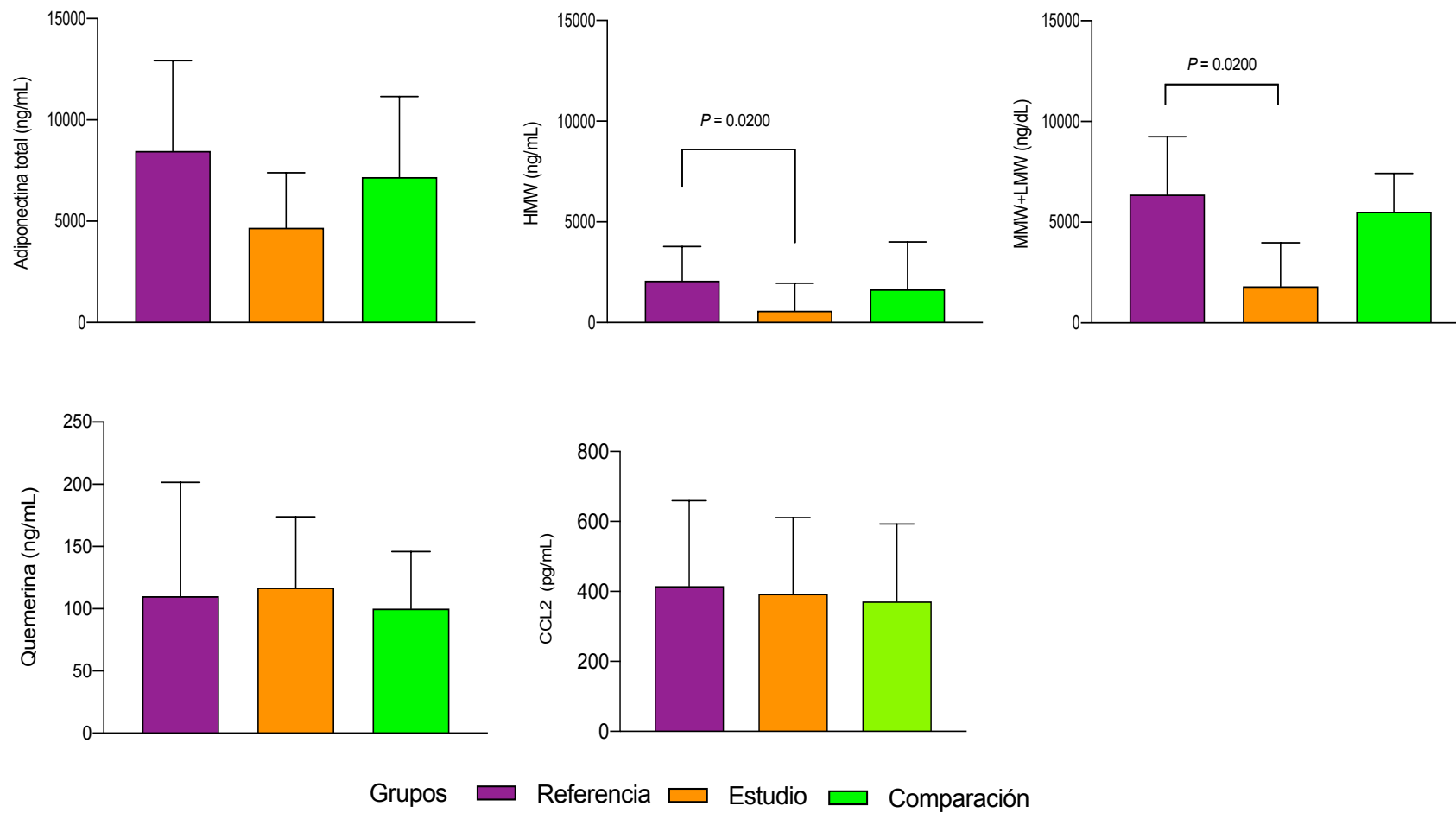


Figura 26 Perfil de adiponectina y quemerina en los grupos de estudio

Población de estudio ($n = 120$). $P < 0.05$ significativa (Kruskal-Wallis y Prueba de comparaciones múltiples de Dunn post hoc). Abreviaturas: HMW: oligómero adiponectina de alto peso molecular; MMW: oligómero de adiponectina de mediano peso molecular; LMW: oligómero de adiponectina de bajo peso molecular, CCL2: ligando quimiotáctico de quimiocina con motivo C-C 2.

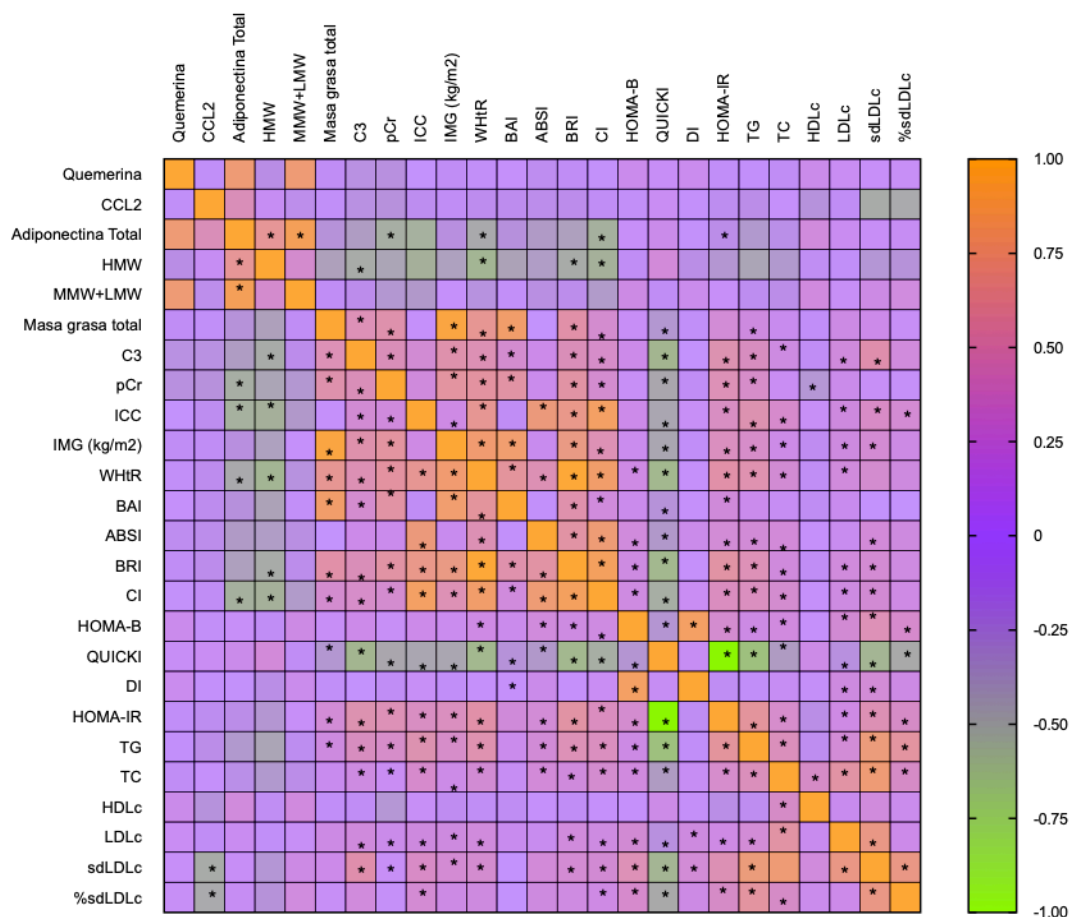


Figura 27 Correlación del perfil de oligómeros de adiponectina y quimiocinas con el perfil obesogénico. Población de estudio ($n = 120$). * $P < 0.05$ significativa. Correlación con Rho de Spearman. Abreviaturas: CCL2: ligando quimiotáctico de quimiocina con motivo C-2, HMW: oligómero de adiponectina de alto peso molecular; MMW: oligómero de adiponectina de mediano peso molecular; LMW: oligómero de adiponectina de bajo peso molecular, ICC: índice cintura-cadera, IMG: índice de masa grasa, BAI: índice de adiposidad corporal, ABSI: índice de la forma corporal, BRI: índice de redondez corporal, CI: índice de conicidad, HOMA- β : medida de modelo de homeostasis del funcionamiento de células β ; DI: índice de disposición basal, HOMA-IR: medida de modelo de homeostasis de la resistencia a la insulina, TG: triglicéridos, TC: colesterol total, HDLc: colesterol de lipoproteínas de alta densidad, LDLc: colesterol de lipoproteína de baja densidad; sdLDLc: partículas pequeñas de colesterol de las lipoproteínas de baja densidad.

La presencia de exosomas se identifica por su morfología y por receptores de membrana

La morfología de los exosomas aislados de plasma sanguíneo, concuerda con la morfología reportada como se muestra en la **Figura 28**.

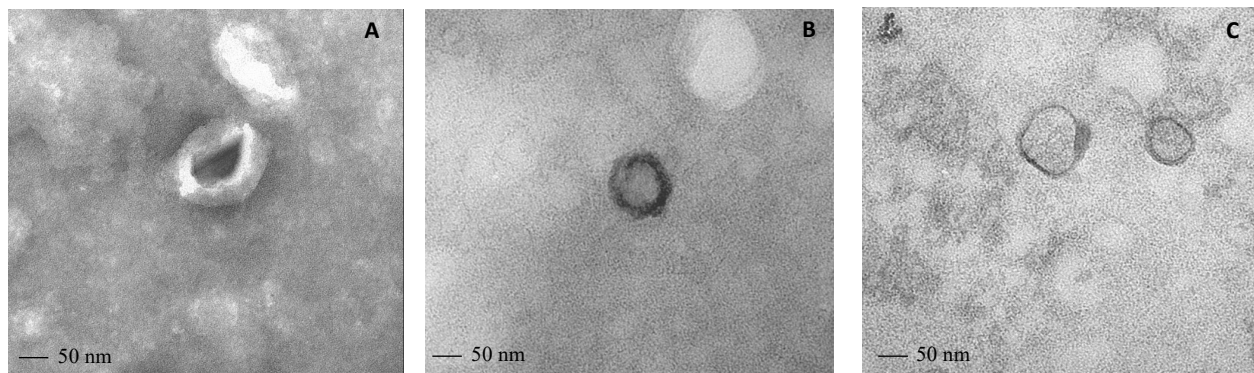


Figura 28 Fotomicrografía de exosomas de plasma sanguíneo

A. exosomas con concentración de proteínas totales 500 µg/mL, B y C. exosomas con concentración de proteínas totales 1000 µg/mL. Imagen de microscopía electrónica de transmisión (TEM) por tinción negativa, exosomas con el de extracción del kit Total Exosome Isolation (from plasma) (Invitrogen Cat. No. 4404450). Imágenes tomadas en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

En estas EVs se identificó la presencia de los receptores de membrana CD9 y CD81 que caracterizan los exosomas (**Figura 29**).

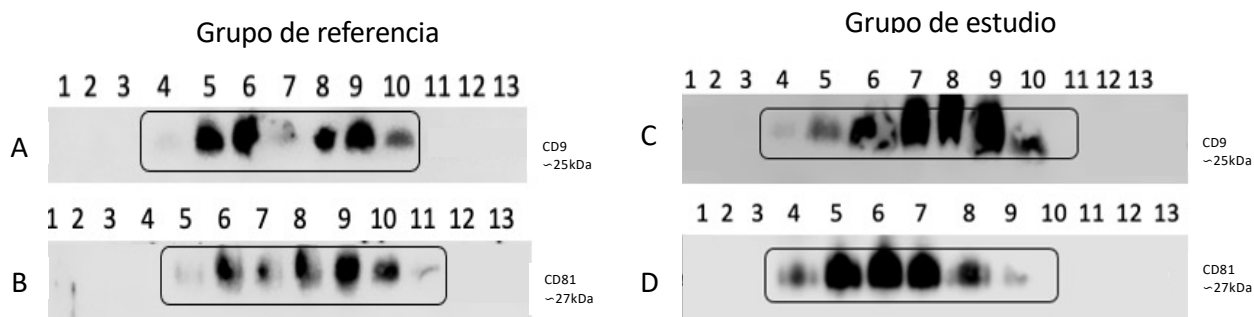


Figura 29 Marcadores CD9 y CD81 de exosomas aislados por SEC de plasma sanguíneo

a). Western Blot de CD9, carriles 1-3 y 11-13 sin presencia de exosomas en las fracciones de exclusión, carriles 4 -10 presencia de exosomas en las fracciones de exclusión. b). Western Blot de CD81, carriles 1-4 y 12-13 sin presencia de exosomas en las fracciones de exclusión, carriles 5 -11 presencia de exosomas en las fracciones de exclusión. c). Western Blot de CD81, carriles 1-3 y 11-13 sin presencia de exosomas en las fracciones de exclusión, carriles 4 -10 presencia de exosomas en las fracciones de exclusión. d). Western Blot de CD81, carriles 1-4 y 10-13 sin presencia de exosomas en las fracciones de exclusión, carriles 4-9 presencia de exosomas en las fracciones de exclusión, aislados por SEC de plasma de paciente con sobrepeso.

Los niveles de proteínas totales y la presencia de SFRP4 y KLF4 en exosomas son independientes del estatus del tejido adiposo.

El rendimiento observado en los niveles de proteínas totales (mg/ml) en los exosomas de plasma sanguíneo (obtenidos mediante las tres metodologías de aislamiento) fue en el siguiente orden: en el kit comercial (4.0 ± 0.9) mayor que SEC (3.7 ± 6.5) y DC (3.7 ± 0.3).

En un análisis adicional mostramos que la capacidad del método de extracción de exosomas elegido (kit comercial), la concentración de proteínas entre los tres grupos de estudio se mantiene estable (Tabla 10).

Tabla 10 Concentración de proteínas totales en exosomas obtenidos a partir de kit comercial (INVITROGEN)

SEXO \ PROTEÍNAS TOTALES (mg/mL)	GRUPOS		
	Referencia	Estudio	Comparación
Femenino	2.34	4.86	4.58
Masculino	4.72	3.54	4.52
TOTAL	3.53 ± 1.68	4.20 ± 933	4.55 ± 42

Los resultados se muestran en $x \pm SD$. P no significativa entre grupos de estudio (ANOVA one way y HSD Tukey post hoc) y sexo (U de Mann-Whitney). Proteínas totales cuantificadas con Qubit™ Protein Assay.

La **Figura 30** muestra que KLF4 y SFRP4 en exosomas de plasma sanguíneo se encuentran 2.2 y 1.7 veces más en el grupo de estudio versus el de referencia, respectivamente.

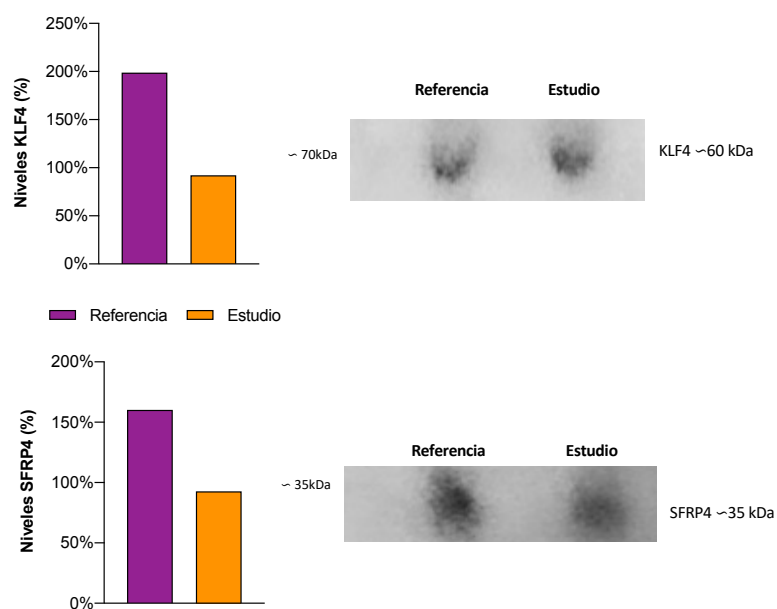


Figura 30 Niveles de KLF4 y SFRP4 en exosomas de plasma sanguíneo

Histogramas de niveles relativos de KLF4 y SFRP4. Imagen superior derecha, SFRP4 de grupo de referencia y grupo de estudio. Imagen inferior, KLF4 de grupo de referencia.

La expresión relativa de miR-34a y miR-128-1 en suero y exosomas de plasma sanguíneo muestra tendencia a la asociación con inflamación, adiposidad y sensibilidad a la insulina.

El rendimiento en la obtención de *miRs* totales en suero y exosomas de plasma sanguíneo se muestra en la **Figura 31**.

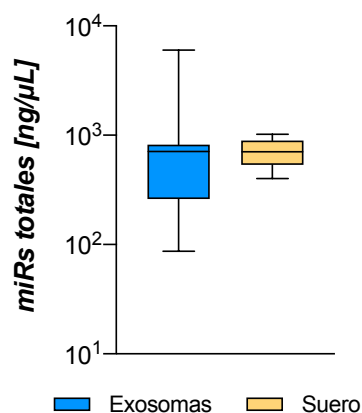


Figura 31 Concentración de microRNAs totales en suero y exosomas de plasma sanguíneo
Población de estudio (n = 60). $P < 0.05$ significativa (Mann-Whitney)..

La expresión relativa de *miR-34a* en suero se incrementa versus en los exosomas de plasma sanguíneo, mientras que se mantiene estable en los grupos de estudio (**Figura 32**).

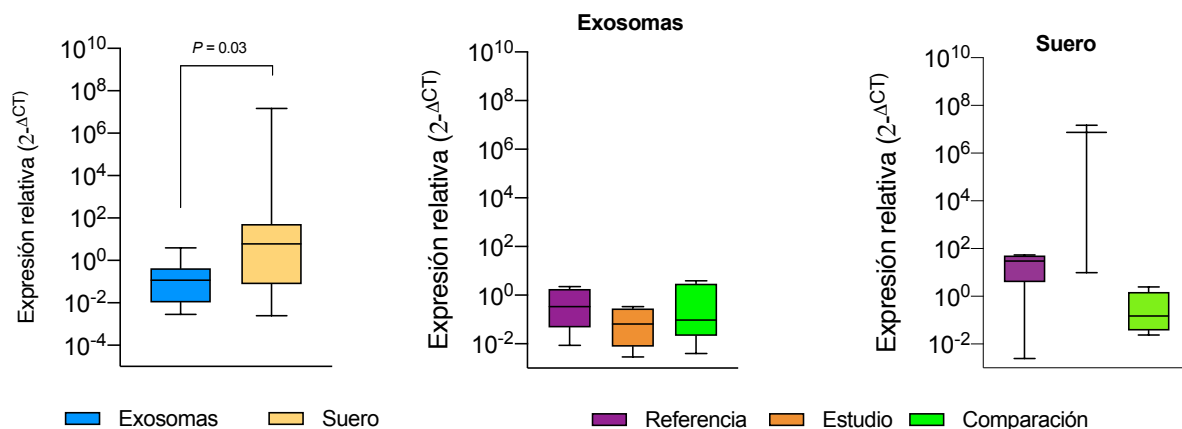


Figura 32 Expresión relativa de *miR-34a*
Población de estudio (n = 60). $P < 0.05$ significativa (Mann-Whitney; Kruskal-Wallis y Prueba de comparaciones múltiples de Dunn post hoc).

Los niveles de la expresión relativa de *miR-128-1*, fueron consistentes en suero y exosoma de plasma sanguíneo y en los tres grupos de estudio (**Figura 33**).

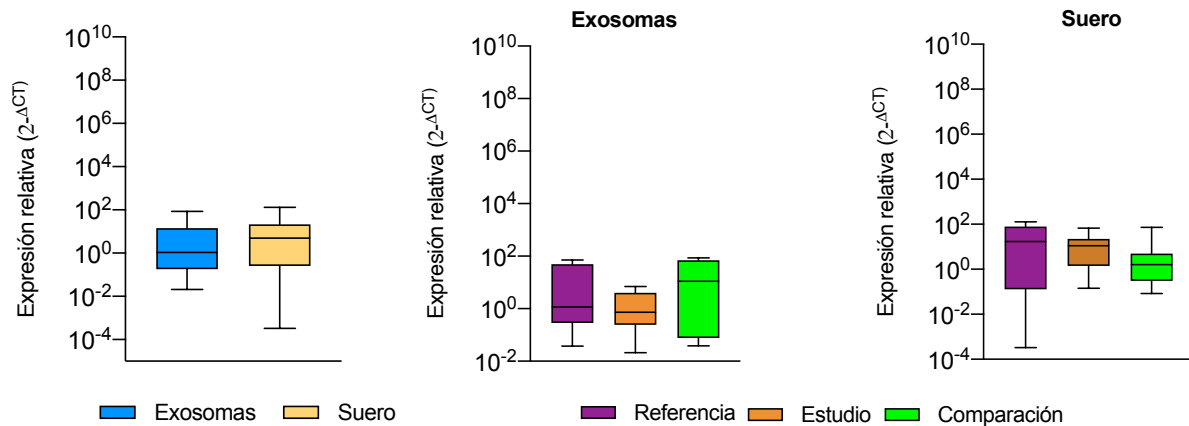


Figura 33 Expresión relativa de *miR-128-1*

Población de estudio (n = 60). $P < 0.05$ significativa (Mann-Whitney; Kruskal-Wallis y Prueba de comparaciones múltiples de Dunn post hoc).

La asociación de la expresión relativa de los *miR-34a* y *miR-128-1*, con las variables de predicción de TA disfuncional de acuerdo con el modelo matemático planteado, se observan las siguientes tendencias (**Figura 34**):

1. La expresión relativa de *miR-34a* en suero y exosomas negativa con C3 y WHtR.
2. La expresión relativa de *miR-128-1* positiva en suero y negativa en exosomas con QUICKI.
3. La expresión relativa de ambos *miRs* en exosomas positiva y negativa en suero con BRI.
4. La expresión relativa de ambos *miRs* en exosomas y *miR-34a* en suero positiva con CT.

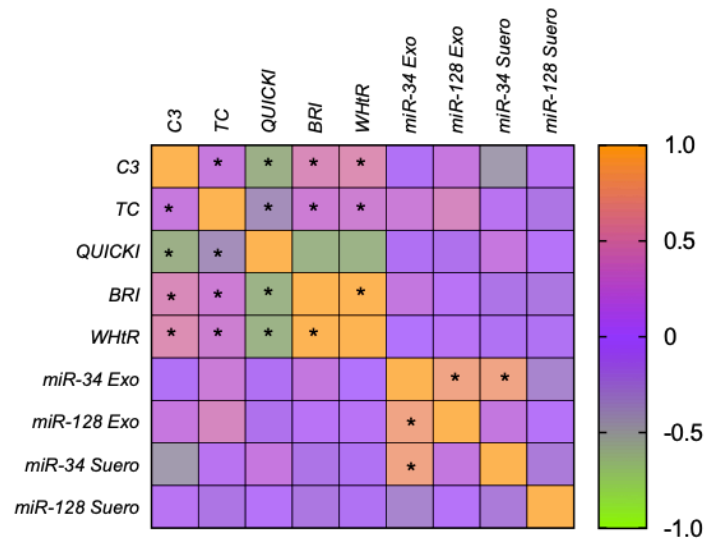


Figura 34 Correlación de variables de predicción de TA disfuncional y expresión relativa de *miR-34a* y *miR-128-1* séricos y de exosomas de plasma sanguíneo

Población de estudio (n = 120). $P^* < 0.05$ significativa. Correlación con Rho de Spearman. Abreviaturas: C3: factor de complemento C3, CT: colesterol total, QUICKI: índice cuantitativo de la sensibilidad de la insulina, BRI: índice de redondez corporal, WHtR: índice de cintura estatura.

8. DISCUSIÓN

En la función inmunometabólica del TA se ha demostrado que los mecanismos de las respuestas inmune y metabólica están intrínsecamente conectados y mutuamente regulados. Por una parte, la respuesta inmune requiere de adaptación metabólica a nivel celular y orgánica, mientras que la regulación metabólica lleva a la activación de células del sistema inmune. En este contexto, la disfunción del TA se caracteriza por la expansión y distribución irregular de la masa grasa, que favorece la alteración del metabolismo energético y se manifiesta como obesidad. El proceso patológico establecido lleva a la acumulación ectópica de lípidos en órganos como el hígado y el músculo esquelético favoreciendo el desarrollo de resistencia a la insulina, cardiopatías y síndrome metabólico (330). Estas alteraciones, se caracterizan por un estado de inflamación sistémica y tisular crónica de grado bajo, con aporte de un perfil obesogénico mostrándose una transformación funcional (2, 331, 332).

En las estrategias para evidenciar alteraciones en la función metabólica del TA, se contrastan diferentes escenarios con enfoque en biomarcadores tempranos, como los *microRNAs* (3-6). Se ha mostrado que funcionan como supresores o reguladores de diferentes vías de señalización implicadas en procesos metabólicos y respuesta inmune, se secretan a la circulación sanguínea en exosomas o unidos a proteínas transportadoras, mediante un proceso regulado susceptible de ser alterado durante procesos patológicos (7-10).

En este estudio evaluamos el patrón de expresión de *miRs* con la manifestación clínica de biomarcadores inmunometabólicos asociados al TA disfuncional, con un abordaje desde la integración de diferentes puntos conceptuales:

- índices de adiposidad corporal y central y metabólico en el estatus del TA disfuncional
- el escenario de oligómeros de adiponectina y quimiocinas con contribución en el proceso inflamatorio evaluando marcadores de inflamación subclínica y los índices metabólicos
- la presencia de exosomas en plasma sanguíneo y
- la expresión relativa de *miR-34a* y *miR-128-1* en suero y exosomas de plasma sanguíneo en asociación con inflamación, adiposidad y sensibilidad a la insulina.

En 1972, Ancel Keys propuso el índice de masa corporal (IMC) como indicador de obesidad (333). Si bien su utilidad en estudios epidemiológicos es significativa, no proporciona información sobre la composición corporal ni el estado del TA. Estudios como el de Purnell J.Q. y colaboradores han señalado que el exceso de adiposidad puede manifestarse en distintos pesos corporales y distribuciones de grasa, dependiendo de la población analizada (334). Esto resalta la relevancia de nuestra clasificación, que combina IMC, parámetros de adiposidad corporal, biomarcadores inflamatorios y metabólicos, perfil de adipocinas y estado de resistencia a la insulina (RI), consolidando su validez con base en reportes previos (314).

El análisis antropométrico realizado en el presente estudio reflejó con precisión la distribución de masa grasa en los tres grupos de estudio, y con significancia para los índices de obesidad central, AVI y VAI entre el grupo de estudio y de referencia, lo que sugiere que una obesidad patológica se caracteriza por acumulación de VAT y esto correlaciona con el incremento de enfermedades asociadas a obesidad, como lo reporta Salmón L., *et al.* en su análisis del fenotipado de la obesidad basado en el IMC y la salud metabólica (335).

Adicionalmente, en el modelo matemático lineal desarrollado en el presente estudio, basado en la masa grasa corporal para individuos clasificados con o sin tejido adiposo disfuncional, los índices ICC, AVI, BAI, IGC, VA e IMC fueron significativos. Confirmamos que esta clasificación del estado del TA es correcta, ya que coincide con nuestra clasificación inicial de los tres grupos de estudio. Los promedios de cada variable en el modelo lineal se encuentran dentro del mismo rango que los promedios de las variables en la clasificación inicial. Esto sugiere que nuestras clasificaciones son adecuadas para la población local.

En cuanto al índice cintura-cadera (IC), nuestros puntos de corte son consistentes con estudios como el de Martins C. *et al.*, que estimaron valores similares para hombres y mujeres (336). Asimismo, investigaciones previas sobre el riesgo de hiperlipidemias, basadas en IC e ICC, también coinciden con nuestros resultados (337). Estos hallazgos subrayan la utilidad de los índices antropométricos como herramientas clave para identificar enfermedades asociadas a la obesidad.

Respecto al TA disfuncional, investigaciones previas se han centrado principalmente en perspectivas moleculares y celulares (338). Aunque existen índices como el DAI, que incluyen variables como CC, TG, HDLc e IMC (339-341), no incorporan biomarcadores de inflamación ni sensibilidad a la insulina. Nuestro modelo matemático incluye parámetros metabólicos e inflamatorios, mejorando la caracterización del estado del TA. Sin embargo, marcadores como adiponectina, quemerina y CCL2 no fueron útiles para robustecer el modelo, lo que sugiere la necesidad de evaluar isoformas específicas de estas proteínas.

La proteína C3 a pesar que es un marcador de riesgo cardiovascular, también actúa como un marcador del proceso inflamatorio crónico subyacente en individuos con RI (342), independientemente del sexo (343). Copenhaver *et al.* señalan que los pacientes con niveles incrementados de LDLc y TG, y niveles disminuidos de HDLc y sensibilidad a la insulina, presentan un aumento en los niveles de C3 (305). Este patrón lo observamos entre nuestros grupos. En cuanto a la pCr, al igual que nuestro estudio, Visser M. *et al.*, reportó niveles elevados en individuos con preobesidad y obesidad (344), por lo que corroboramos que la acumulación excesiva de masa grasa favorece un estado de inflamación sistémica de grado bajo y que el aumento del IMC representa mayor riesgo de pasar de un estado metabólicamente sano a enfermo (345).

Destacando los resultados del perfil de las adipocinas, adiponectina difiere de otras adipocinas, ya que es inversamente proporcional a la cantidad de masa grasa, y disminuye en pacientes con obesidad (346), donde es protagonista porque regula la sensibilidad a la insulina e inflamación. En nuestra investigación los niveles de adiponectina total disminuyeron en individuos con IMC mayor a 25.00 kg/m², glucosa \geq 7.0 mmol/L en ayuno y obesidad abdominal, al igual que lo reportado por He L., *et al.* (347), por lo que sugerimos que adiponectina total puede ser un predictor de progresión de la disfunción del TA e incluso DT2. Estudios anteriores han demostrado que la adiponectina es cardioprotector en individuos con TA disfuncional (348). En nuestro estudio observamos un patrón inverso entre adiponectina y presión sanguínea en los pacientes del grupo de estudio, como lo señala Wu O., *et al.*, en su reevaluación del impacto de la adiponectina en la hipertensión arterial por obesidad (349).

Entre las isoformas de la adiponectina, la más abundante y biológicamente activa es la de alto peso molecular (HMW), al promover oxidación de ácidos grasos y captación de glucosa. En nuestro estudio, el patrón de disminución de HMW y MMW + LMW sugiere que, en individuos con alto porcentaje de masa grasa, cada isoforma se relaciona con el IMC y el TA disfuncional. En un estudio en el que se evaluó la expresión de HMW, MMW y LMW en individuos con obesidad con cicatrización normal y cicatrización tardía, para HMW, MMW y adiponectina en suero sanguíneo mostraron el mismo patrón que nuestro estudio. Mientras que para LMW en forma dimérica la expresión fue mayor. Esto nos permite comprender por qué en el grupo de estudio, MMW + LMW incrementa en comparación con HMW (350).

En otro estudio que evaluó los polimorfismos, G45R en hispanoamericanos y R55C en afroamericanos, se observó la ausencia en suero sanguíneo de la isoforma HMW, y disminución de MMW, e incremento en la isoforma LMW. Esto sugiere que la isoforma LMW podría compensar la ausencia o disminución de las otras isoformas en individuos portadores de alelos polimórficos (351). El incremento de MMW + LMW en nuestro grupo de estudio, podría estar relacionado con la presencia de alelos polimórficos.

Otra de las adipocinas relevantes en el progreso de la obesidad es la quemerica (Chem), quimioatrayente de macrófagos y participa en inflamación secretada principalmente por adipocitos (86, 120, 128, 352). La liberación de Chem correlaciona con el IMC, ICC y el volumen de adipocitos (353), datos confirmados en nuestro grupo de estudio. En modelos murinos obesos y en la línea celular 3T3-L1 diferenciada a adipocito maduro, se ha evidenciado la expresión de Chem en condiciones de hipertrofia, pero en estudios realizados en humanos, se ha evidenciado que la Chem circulante en suero es inerte (132), esto sugiere el por qué no encontramos diferencias entre los grupos.

CCL2, quimiocina proinflamatoria es secretada por preadipocitos y adipocitos, además de otras células, se expresa en respuesta a estímulos proinflamatorios (109-111). Esta adipocina se encuentra mayormente en el TA formando CLS a consecuencia de un TA disfuncional y no

circulante en sangre (107), lo que corrobora nuestros resultados en los individuos del estudio. En un estudio de CCL2 como factor de cicatrización de heridas, se observó disminución en personas con diabetes, (354). Esta evidencia podría explicar la tendencia disminuida que observamos en los individuos tanto del grupo de estudio como del grupo de comparación.

Los indicadores antropométricos, biomarcadores metabólicos e inflamatorios, el perfil de adipocinas y el estatus de resistencia a la insulina (RI) permitió identificar correlaciones significativas entre varios de estos parámetros. Estos hallazgos destacan su relevancia potencial para ser incluidos en los estudios clínicos de rutina, ya que ofrecen una perspectiva integral sobre la salud metabólica y cardiovascular de los individuos.

En particular, parámetros como el índice cintura-talla (WHtR), el índice de forma corporal (BRI), el índice de conicidad (IC), las lipoproteínas de baja densidad pequeñas y densas (sdLDLc), y el índice cuantitativo de sensibilidad a la insulina (QUICKI), mostraron ser especialmente informativos. Estos índices reflejan, de manera indirecta, la adiposidad central y la susceptibilidad del tejido adiposo visceral (VAT), lo que se traduce en un mayor riesgo cardiovascular y alteraciones en la sensibilidad a la insulina.

Es importante destacar que tres de estos parámetros (WHtR, BRI y QUICKI) fueron determinantes en el modelo matemático desarrollado para la predicción de tejido adiposo disfuncional, como se mencionó previamente. Este modelo subraya su utilidad clínica potencial para identificar pacientes en riesgo de desarrollar complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad y otras condiciones relacionadas. Así, la integración de estos índices en el ámbito clínico podría optimizar el diagnóstico temprano y la toma de decisiones terapéuticas personalizadas.

El TA es una fuente importante de exosomas, proporcionando información sobre el estado del TA, de acuerdo con su contenido (176, 177). Para corroborar que la producción de exosomas es mayor en un escenario obesogénico, con ingesta continua e hipoxia, realizamos cultivo de la línea 3T3-L1, empleada como modelo celular de obesidad, al diferenciarlas a fenotipo de adipocito maduro. Esta diferenciación, permite simular la hipertrofia en el TA (355), lo que sugiere que la ingesta continua en exceso, junto con la falta de gasto energético, es un delicado equilibrio entre la concentración de glucosa y el tiempo de diferenciación de adipocitos (356), favoreciendo la acumulación de triglicéridos en el TA.

En nuestro estudio a partir del décimo día de cultivo de preadipocitos 3T3-L1, observamos un cambio morfológico en las células, similar al estudio de Baldini F. *et al* (357). La estimulación durante la diferenciación ya sea con insulina, como en nuestro estudio o con distintas concentraciones de glucosa como en otros estudios (356), hace que las gotas de lípidos incrementen su tamaño y disminuyan en cantidad (358).

Con la idea de simular un escenario obesogénico, estimulamos a las células por 43 días, etapa en la cual la mayor proporción de células cultivadas presentaron el fenotipo de WAT, con una única gota lipídica que ocupa todo el citoplasma, que lo corroboramos con la tinción de triglicéridos intracelulares. Adicional a la estimulación prolongada para el almacenamiento de TG, sometimos a las células a hipoxia a 2 horas y media y a 24 horas. En la primera prueba de hipoxia, al no haber cambio morfológico en las células, sugiere que una hipoxia controlada no altera el ambiente del TA, mientras que, a las 24 horas, las células pierden su estructura y las gotas de lípidos revierten su tamaño. Por lo que, el estímulo continuo, que se traduce en un exceso de almacenaje de TG, junto con la hipoxia, favorece la muerte celular (359).

Una vez estandarizada y seleccionada una técnica de aislamiento de exosomas, nos planteamos comprobar la presencia de las proteínas IRS1, KLF4 y SFRP4, que intervienen en la RI, inflamación del TA y DM2, respectivamente.

En la base de datos de Exocarta, existen únicamente dos investigaciones, que reportan IRS1 en exosomas. Las dos investigaciones fueron realizadas en modelos animales, *Rattus norvegicus* (357) y *Bos Taurus* (360), sin embargo, sugieren que la presencia de IRS1 en exosomas, podría estar involucrada en enfermedades inmunológicas, metabólicas humanas, entre otras (357). Kapogiannis D. *et al* (361) y Chou S. *et al* (362), determinaron el nivel de RI cerebral en pacientes con Alzheimer, Diabetes Mellitus tipo 2 y Parkinson, a partir de exosomas aislados de plasma sanguíneo. Los adipocitos hipertróficos secretan adipocinas y proteínas proinflamatorias, que fosforilan IRS1 (363), recomendamos evaluar el estado de fosforilación de IRS1.

En el caso de KLF4 y SFRP4, no existen reportes de investigaciones en las bases de datos de exosomas. Sin embargo, hemos encontrado varias investigaciones que reportan la presencia de KLF4 y SFRP4 en exosomas. La presencia de KLF4 se ha demostrado en exosomas de células de cáncer hepatocelular (364), cáncer de mama, pulmón, próstata, colesterol, hígado, entre otros, como un inhibidor de proliferación celular (365), también en células madre mesenquimales de la médula ósea (366). Esta proteína participa en varios roles biológicos, entre ellos como un inhibidor hacia perfil M1 (143, 180). A pesar de que no se ha demostrado la presencia de la proteína KLF4 en exosomas provenientes de adipocitos, ni en exosomas aislados de plasma sanguíneo, lo reportado en bibliografía concuerda con nuestro estudio, en donde KLF4 se encuentra en presente en individuos con normopeso, en donde el perfil M2 es predominante. Para la proteína SFRP4, se ha reportado su presencia en exosomas de células de granulosa (367), más no en exosomas de provenientes de otras células, sin embargo, hemos identificado esta proteína en individuos con normo y sobrepeso, lo que nos sugiere que esta proteína no depende directamente del IMC.

En cuanto a la expresión relativa de los cuatro *microRNAs* (*miR-21*, *miR-24*, *miR-34* y *miR-128*) tanto en exosomas de plasma sanguíneo como en suero sanguíneo, esta no parece depender del estatus del TA. Estudios previos han reportado la sobreexpresión y subexpresión de estos *miRs* en el TA (12, 13, 231-234, 240, 241, 245, 248), lo que sugiere que estos *miRs* podrían ejercer su

función de manera local en este tejido. Esto concuerda con lo señalado por Waters P., *et al.*, quienes destacan que los *miRs* tienen roles diferenciados en la circulación y en el tejido (368). Asimismo, Matveev G., *et al.* demuestran que, bajo las mismas condiciones experimentales, los niveles de expresión de los *miRs* pueden variar significativamente entre la circulación y el TA (369).

La selección del *miRNA* constitutivo adecuado es fundamental para evaluar la expresión relativa de *miRNAs* en un contexto experimental. En este estudio, inicialmente se empleó el *miR-320a*, recomendado tanto por reportes previos (370), como por el kit comercial de expresión utilizado (https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/100027897_TaqManAdv_miRNA_Assays_UG.pdf), donde se sugiere su uso como constitutivo para normalizar la qPCR. Sin embargo, no mostró una expresión estable. Por ello, se seleccionó *miR-24*, respaldado tanto por el kit comercial (<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/GSD/Reference-Materials/identifying-mirna-normalizers-white-paper.pdf>) como por Sandau U., *et al.* (371). Es importante considerar que, como destaca Krho E., *et al.* (372), no existe un *microRNA* ideal que pueda normalizar completamente la variabilidad biológica. Aunque los *miRNAs* constitutivos son útiles para normalizar datos y evaluar la calidad de las muestras, pueden no corregir la variabilidad asociada a *miRNAs* específicos. Según nuestra experiencia, en el contexto metabólico, *miR-191* y *RNU48* son opciones viables para suero y exosomas de plasma sanguíneo (373, 374).

La expresión de *miR-21* no se detectó en exosomas de plasma sanguíneo ni en suero en el presente estudio. Reportes previos revelan que este *miRNA* está estrechamente asociado al cáncer debido a su papel regulador en la vía de STAT3 (375, 376). En el contexto metabólico, *miR-21* ha mostrado subexpresión en circulación, asociada a la presencia de citocinas proinflamatorias, como lo reporta Benbaibech H., *et al.* (377). Por otro lado, *miR-34a*, aunque no presentó diferencias significativas entre los grupos estudiados, mostró una tendencia al aumento en suero de individuos con sobrepeso y tejido adiposo disfuncional (TAD). Este hallazgo coincide con los reportes de Lischka J., *et al.*, quienes describen una asociación desfavorable entre el *miR-34a* sérico, la inflamación relacionada con la obesidad y las enfermedades metabólicas (378) Además, Cornejo P., *et al.*, identificaron niveles elevados de *miR-34a* en ratones alimentados con una dieta alta en grasas (379).

La expresión relativa de *miR-218-1* se mantuvo estable en los grupos de estudio en exosomas de plasma sanguíneo y suero, sin embargo, se observó una tendencia de menor expresión en el grupo de estudio *versus* el de referencia, este resultado contrasta con los hallazgos de Arcidiacono D., *et al.*, quienes reportaron una mayor expresión de este *miRNA* en el tejido adiposo visceral (VAT) de individuos con obesidad (13), y con los de Raj P., *et al.*, que identificaron una mayor expresión sérica de *miR-128-1* en personas con obesidad (380). Cabe destacar que estos estudios utilizaron *RNU48* como control de expresión estable.

Nuestros resultados son consistentes con reportes previos, lo que permite proponer tres aspectos clave en relación con estos *miRNAs*: 1) su participación en la función del tejido adiposo, 2) la existencia de diversas fuentes de síntesis de *miRNAs* en los tejidos asociadas a la patología (381,

382), y 3) la expresión relativa de los diferentes *miRNAs* depende de la expresión del *miRNA* constitutivo en el contexto experimental analizado.

En conjunto, nuestros hallazgos aportan nuevas perspectivas sobre el TA disfuncional, destacando la utilidad de biomarcadores específicos, índices antropométricos y modelos matemáticos para su caracterización. Esto abre nuevas líneas de investigación orientadas a estrategias de prevención y tratamiento en patologías relacionadas con obesidad.

9. CONCLUSIONES

- En este estudio los individuos con perfil obesogénico se caracterizaron con dislipidemias con mayor aporte de la ruta metabólica TG-VLDLc-Apo B que concuerda con sensibilidad/resistencia a la insulina y el aporte calórico total. Mientras que los índices de adiposidad y metabólicos predicen el estatus del TA disfuncional.
- En el escenario de perfil obesogénico, la evaluación del perfil LDLc reveló la contribución de las partículas pequeñas de LDLc (sdLDLc) con el estatus de adiposidad, el proceso inflamatorio y la desregulación del metabolismo de glucosa y lípidos.
- En los individuos con TA disfuncional la disminución de los niveles de adiponectina total y de HMW, con contribución del proceso inflamatorio caracterizado por el incremento de C3 y pCr, correlacionan con indicadores de adiposidad central y resistencia a la insulina.
- La presencia de exosomas se identificó por su morfología y por los receptores de membrana CD9 y CD81.
- En los exosomas de plasma sanguíneo de individuos con TA disfuncional el contenido en proporción relativa de SFRP4 es un tercio mayor mientras que KLF4 se duplica.
- La expresión relativa de *miR-34a* y *miR-128-1* se mantiene estable en los grupos de estudio. Mientras que en suero *miR-34a* se incrementa *versus* en los exosomas de plasma sanguíneo.
- La expresión relativa de *miR-34a* y *miR-128-1* en suero y exosomas de plasma sanguíneo muestra tendencia a la asociación con inflamación, adiposidad y sensibilidad a la insulina.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Fan Y, Pionneau C, Cocozza F, Boëlle PY, Chardonnet S, Charrin S, et al. Differential proteomics argues against a general role for CD9, CD81 or CD63 in the sorting of proteins into extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2023;12(8):e12352.
2. Chavakis T. Immunometabolism: Where Immunology and Metabolism Meet. *Journal of Innate Immunity*. 2022;14(1):1-3.
3. Maurizi G, Babini L, Della Guardia L. Potential role of microRNAs in the regulation of adipocytes liposecretion and adipose tissue physiology. *Journal of cellular physiology*. 2018;233(12):9077-86.
4. Arner P, Kulyté A. MicroRNA regulatory networks in human adipose tissue and obesity. *Nature reviews Endocrinology*. 2015;11(5):276-88.
5. Lorente-Cebrián S, González-Muniesa P, Milagro FI, Martínez JA. MicroRNAs and other non-coding RNAs in adipose tissue and obesity: emerging roles as biomarkers and therapeutic targets. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2019;133(1):23-40.
6. Vienberg S, Geiger J, Madsen S, Dalgaard LT. MicroRNAs in metabolism. *Acta physiologica (Oxford, England)*. 2017;219(2):346-61.
7. Lu M, Yuan S, Li S, Li L, Liu M, Wan S. The Exosome-Derived Biomarker in Atherosclerosis and Its Clinical Application. *Journal of cardiovascular translational research*. 2019;12(1):68-74.
8. Fernanda-Isadora Corona-Meraz MV-DM, Francisco José Ortega, Sandra-Luz Ruiz-Quezada, Milton-Omar Guzmán-Ornelas, Rosa-Elena Navarro-Hernández. Ageing influences the relationship of circulating miR-33a and miR-33b levels with insulin resistance and adiposity. *SAGE Journals*. 2018;16(3):10.
9. Fodor A, Lazar AL, Buchman C, Tiperciuc B, Orasan OH, Cozma A. MicroRNAs: The Link between the Metabolic Syndrome and Oncogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(12):6337.
10. Gharanei S, Shabir K, Brown JE, Weickert MO, Barber TM, Kyrou I, et al. Regulatory microRNAs in Brown, Brite and White Adipose Tissue. *Cells*. 2020;9(11).
11. Haque S, Vaiselbuh SR. Exosomes are predominantly loaded with mRNA transcript encoding cytoplasmic proteins and exclude mRNA transcript encoding nuclear proteins. *bioRxiv*. 2020:2020.07.29.227223.
12. Pan Y, Hui X, Hoo RLC, Ye D, Chan CYC, Feng T, et al. Adipocyte-secreted exosomal microRNA-34a inhibits M2 macrophage polarization to promote obesity-induced adipose inflammation. *J Clin Invest*. 2019;129(2):834-49.
13. Arcidiacono B, Chiefari E, Foryst-Ludwig A, Curro G, Navarra G, Brunetti FS, et al. Obesity-related hypoxia via miR-128 decreases insulin-receptor expression in human and mouse adipose tissue promoting systemic insulin resistance. *EBioMedicine*. 2020;59:102912.
14. Chylikova J, Dvorackova J, Tauber Z, Kamarad V. M1/M2 macrophage polarization in human obese adipose tissue. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*. 2018;162(2):79-82.
15. Rome S, Blandin A, Le Lay S. Adipocyte-Derived Extracellular Vesicles: State of the Art. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(4):1788.

16. MeSH. Adipose Tissue. NCBI. 2006.
17. Ali AT, Hochfeld WE, Myburgh R, Pepper MS. Adipocyte and adipogenesis. *Eur J Cell Biol.* 2013;92(6-7):229-36.
18. Ross MH, & Pawlina, W. Tejido Adiposo. *Histologia Texto y Atlas.* 7. Barcelona: Wolters Kluwer; 2015. p. 275-90.
19. Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;316(2):129-39.
20. Kim JA, Choi KM. Newly Discovered Adipokines: Pathophysiological Link Between Obesity and Cardiometabolic Disorders. *Frontiers in Physiology.* 2020;11.
21. Adamczak M, Wiecek A. The Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *Semin Nephrol.* 2013;33(1):2-13.
22. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocr Metab.* 2004;89(6):2548-56.
23. Siiteri PK. Adipose tissue as a source of hormones. *Am J Clin Nutr.* 1987;45(1 Suppl):277-82.
24. Desoye G, Herrera E. Adipose tissue development and lipid metabolism in the human fetus: The 2020 perspective focusing on maternal diabetes and obesity. *Progress in Lipid Research.* 2021;81:101082.
25. Raszewski R. Encyclopedia of Human Nutrition. *Library Journal.* 2005;130(19):96-.
26. Kwok TnC, Ojha S, Symonds ME. Chapter 50 - Obesity/Perinatal Origins of Obesity. In: Kovacs CS, Deal CL, editors. *Maternal-Fetal and Neonatal Endocrinology: Academic Press;* 2020. p. 891-911.
27. Townsend K, Tseng YH. Brown adipose tissue: Recent insights into development, metabolic function and therapeutic potential. *Adipocyte.* 2012;1(1):13-24.
28. Pilkington AC, Paz HA, Wankhade UD. Beige Adipose Tissue Identification and Marker Specificity-Overview. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021;12:599134.
29. Enerback S. Brown adipose tissue in humans. *Int J Obes (Lond).* 2010;34 Suppl 1:S43-6.
30. Symonds ME, Aldiss P, Dellschaft N, Law J, Fainberg HP, Pope M, et al. Brown adipose tissue development and function and its impact on reproduction. *J Endocrinol.* 2018;238(1):R53-r62.
31. Villarroya F, Cereijo R, Villarroya J, Giralt M. Brown adipose tissue as a secretory organ. *Nature reviews Endocrinology.* 2017;13(1):26-35.
32. Villarroya J, Cereijo R, Gavalda-Navarro A, Peyrou M, Giralt M, Villarroya F. New insights into the secretory functions of brown adipose tissue. *J Endocrinol.* 2019;243(2):R19-r27.
33. Heinonen S, Jokinen R, Rissanen A, Pietilainen KH. White adipose tissue mitochondrial metabolism in health and in obesity. *Obes Rev.* 2020;21(2):e12958.
34. Marcela RJ. Características biológicas del tejido adiposo: el adipocito como célula endocrina. *Revista Médica Clínica Las Condes.* 2012;23(2):136-44.
35. Edwards M MS. Biochemistry, Lipolysis National Library of Medicine2022 [updated 2022 Jul 18. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560564/>.
36. Torres N, Vargas-Castillo AE, Tovar AR. Adipose Tissue: White Adipose Tissue Structure and Function. In: Caballero B, Finglas PM, Toldrá F, editors. *Encyclopedia of Food and Health.* Oxford: Academic Press; 2016. p. 35-42.

37. Rui L. Brown and Beige Adipose Tissues in Health and Disease. *Compr Physiol*. 2017;7(4):1281-306.
38. Michel LYM. Extracellular Vesicles in Adipose Tissue Communication with the Healthy and Pathological Heart. *Int J Mol Sci*. 2023;24(9).
39. Correa LH, Heyn GS, Magalhaes KG. The Impact of the Adipose Organ Plasticity on Inflammation and Cancer Progression. *Cells*. 2019;8(7).
40. Cinti S. Pink Adipocytes. *Trends Endocrinol Metab*. 2018;29(9):651-66.
41. Giordano A, Smorlesi A, Frontini A, Barbatelli G, Cinti S. White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. *Eur J Endocrinol*. 2014;170(5):R159-71.
42. Betsy Corina-Sosa LB, Eva Luqueño, Ariadna Robledo, Hugo Mendieta-Zerón, Rigoberto Oros-Pantoja. Los colores del tejido adiposo y la relación con la irisina. *Cirugía y Cirujanos*. 2020;90.
43. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev*. 2008;88(1):125-72.
44. Keipert S, Jastroch M. Brite/beige fat and UCP1 - is it thermogenesis? *Biochim Biophys Acta*. 2014;1837(7):1075-82.
45. Giordano A, Smorlesi A, Frontini A, Barbatelli G, Cinti S. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. *European Journal of Endocrinology*. 2014;170(5):R159-R71.
46. Pisani D, Barquissau V, Chambard J-C, Beuzelin D, Ghandour R, Giroud M, et al. Mitochondrial fission is associated with UCP1 activity in human brite/beige adipocytes. *Molecular Metabolism*. 2017;7.
47. Stacchiotti A, Favero G, Giugno L, Lavazza A, Sánchez-Ramos C, Prieto I, et al. Sirtuin 1 Downregulation Exacerbates Fibrosis and Inflammation in Obese Mice Liver. 2016. p. 209-10.
48. Ambele MA, Dhanraj P, Giles R, Pepper MS. Adipogenesis: A Complex Interplay of Multiple Molecular Determinants and Pathways. *Int J Mol Sci*. 2020;21(12).
49. Raajendiran A, Ooi G, Bayliss J, O'Brien PE, Schittenhelm RB, Clark AK, et al. Identification of Metabolically Distinct Adipocyte Progenitor Cells in Human Adipose Tissues. *Cell Rep*. 2019;27(5):1528-40 e7.
50. Nunn ER, Shinde AB, Zaganjor E. Weighing in on Adipogenesis. *Front Physiol*. 2022;13:821278.
51. Audano M, Pedretti S, Caruso D, Crestani M, De Fabiani E, Mitro N. Regulatory mechanisms of the early phase of white adipocyte differentiation: an overview. *Cell Mol Life Sci*. 2022;79(3):139.
52. Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem*. 2010;285(10):7153-64.
53. Shin S, Pang Y, Park J, Liu L, Lukas BE, Kim SH, et al. Dynamic control of adipose tissue development and adult tissue homeostasis by platelet-derived growth factor receptor alpha. *Elife*. 2020;9.
54. Rodgers A, Sferruzzi-Perri AN. Developmental programming of offspring adipose tissue biology and obesity risk. *Int J Obes (Lond)*. 2021;45(6):1170-92.

55. Unamuno X, Frühbeck G, Catalán V. Adipose Tissue. In: Huhtaniemi I, Martini L, editors. *Encyclopedia of Endocrine Diseases (Second Edition)*. Oxford: Academic Press; 2019. p. 370-84.
56. Antonopoulos AS, Tousoulis D. The molecular mechanisms of obesity paradox. *Cardiovascular Research*. 2017;113(9):1074-86.
57. Ahmad B, Serpell CJ, Fong IL, Wong EH. Molecular Mechanisms of Adipogenesis: The Anti-adipogenic Role of AMP-Activated Protein Kinase. *Front Mol Biosci*. 2020;7:76.
58. Esteve Ràfols M. Tejido adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional. *Endocrinología y Nutrición*. 2014;61(2):100-12.
59. Kurylowicz A. microRNAs in Human Adipose Tissue Physiology and Dysfunction. *Cells*. 2021;10(12).
60. Engin AB. MicroRNA and Adipogenesis. *Adv Exp Med Biol*. 2017;960:489-509.
61. Heo Y, Kim H, Lim J, Choi SS. Adipocyte differentiation between obese and lean conditions depends on changes in miRNA expression. *Scientific Reports*. 2022;12(1):11543.
62. Ghaben AL, Scherer PE. Adipogenesis and metabolic health. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(4):242-58.
63. Mikolajczak A, Sallam NA, Singh RD, Scheidl TB, Walsh EJ, Larion S, et al. Accelerated developmental adipogenesis programs adipose tissue dysfunction and cardiometabolic risk in offspring born to dams with metabolic dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2021;321(5):E581-E91.
64. Frühbeck G. Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders. *Methods Mol Biol*. 2008;456:1-22.
65. Bourgeois C, Gorwood J, Barrail-Tran A, Lagathu C, Capeau J, Desjardins D, et al. Specific Biological Features of Adipose Tissue, and Their Impact on HIV Persistence. *Frontiers in Microbiology*. 2019;10.
66. Wei S, Bergen WG, Hausman GJ, Zan L, Dodson MV. Cell culture purity issues and DFAT cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;433(3):273-5.
67. Wei S, Zan L, Hausman GJ, Rasmussen TP, Bergen WG, Dodson MV. Dedifferentiated adipocyte-derived progeny cells (DFAT cells): Potential stem cells of adipose tissue. *Adipocyte*. 2013;2(3):122-7.
68. Rosell M, Kaforou M, Frontini A, Okolo A, Chan YW, Nikolopoulou E, et al. Brown and white adipose tissues: intrinsic differences in gene expression and response to cold exposure in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014;306(8):E945-64.
69. Man K, Kallies A, Vasanthakumar A. Resident and migratory adipose immune cells control systemic metabolism and thermogenesis. *Cell Mol Immunol*. 2022;19(3):421-31.
70. Trim WV, Lynch L. Immune and non-immune functions of adipose tissue leukocytes. *Nat Rev Immunol*. 2021.
71. Hassnain Waqas SF, Noble A, Hoang AC, Ampem G, Popp M, Strauss S, et al. Adipose tissue macrophages develop from bone marrow-independent progenitors in *Xenopus laevis* and mouse. *J Leukoc Biol*. 2017;102(3):845-55.
72. Macdougall CE, Wood EG, Loschko J, Scagliotti V, Cassidy FC, Robinson ME, et al. Visceral Adipose Tissue Immune Homeostasis Is Regulated by the Crosstalk between Adipocytes and Dendritic Cell Subsets. *Cell Metabolism*. 2018;27(3):588-601.e4.

73. MERCK. Rapid Analysis of Human Adipose-Derived Stem Cells and 3T3-L1 Differentiation Towards Adipocytes Using the Scepter™ 2.0 Cell Counter. 2023;Recuento y análisis de la salud celular.
74. Rizzatti V, Boschi F, Pedrotti M, Zoico E, Sbarbati A, Zamboni M. Lipid droplets characterization in adipocyte differentiated 3T3-L1 cells: size and optical density distribution. *Eur J Histochem*. 2013;57(3):e24.
75. Zheng XY, Yu BL, Xie YF, Zhao SP, Wu CL. Apolipoprotein A5 regulates intracellular triglyceride metabolism in adipocytes. *Mol Med Rep*. 2017;16(5):6771-9.
76. Pujimulyani D, Yulianto WA, Setyowati A, Arumwardana S, Sari Widya Kusuma H, Adhani Sholihah I, et al. Hypoglycemic Activity of Curcuma mangga Val. Extract via Modulation of GLUT4 and PPAR-gamma mRNA Expression in 3T3-L1 Adipocytes. *J Exp Pharmacol*. 2020;12:363-9.
77. Durcin M, Fleury A, Taillebois E, Hilairet G, Krupova Z, Henry C, et al. Characterisation of adipocyte-derived extracellular vesicle subtypes identifies distinct protein and lipid signatures for large and small extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2017;6(1):1305677.
78. Wen Z, Li J, Fu Y, Zheng Y, Ma M, Wang C. Hypertrophic Adipocyte-Derived Exosomal miR-802-5p Contributes to Insulin Resistance in Cardiac Myocytes Through Targeting HSP60. *Obesity (Silver Spring)*. 2020;28(10):1932-40.
79. Sano S, Izumi Y, Yamaguchi T, Yamazaki T, Tanaka M, Shiota M, et al. Lipid synthesis is promoted by hypoxic adipocyte-derived exosomes in 3T3-L1 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2014;445(2):327-33.
80. Laria AE, Messineo S, Arcidiacono B, Varano M, Chiefari E, Semple RK, et al. Secretome Analysis of Hypoxia-Induced 3T3-L1 Adipocytes Uncovers Novel Proteins Potentially Involved in Obesity. *Proteomics*. 2018;18(7):e1700260.
81. Miana VV, Gonzalez EAP. Adipose tissue stem cells in regenerative medicine. *Ecancelmedalscience*. 2018;12:822.
82. Xie D, Li J, Jiang P, Xue X, Wu L. Effect of adipose-derived exosome and exosomal miRNA on glycolipid metabolism. *Clinical and Translational Discovery*. 2022;2(3):e134.
83. Eckel J. The cellular secretome and organ crosstalk. 1st edition. ed. San Diego, CA: Elsevier; 2018. pages cm p.
84. Gimeno RE, Klamann LD. Adipose tissue as an active endocrine organ: recent advances. *Current Opinion in Pharmacology*. 2005;5(2):122-8.
85. Yadav A, Kataria MA, Saini V, Yadav A. Role of leptin and adiponectin in insulin resistance. *Clin Chim Acta*. 2013;417:80-4.
86. Nakamura K, Fuster JJ, Walsh K. Adipokines: a link between obesity and cardiovascular disease. *J Cardiol*. 2014;63(4):250-9.
87. Ambroszkiewicz J, Chelchowska M, Rowicka G, Klemarczyk W, Strucinska M, Gajewska J. Anti-Inflammatory and Pro-Inflammatory Adipokine Profiles in Children on Vegetarian and Omnivorous Diets. *Nutrients*. 2018;10(9).
88. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem*. 1995;270(45):26746-9.
89. Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ Is a Novel Adipose-specific Gene Dysregulated in Obesity (*). *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271(18):10697-703.

90. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. cDNA Cloning and Expression of a Novel Adipose Specific Collagen-like Factor, apM1 (AdiposeMost Abundant Gene Transcript 1). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1996;221(2):286-9.
91. Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita M. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem*. 1996;120(4):803-12.
92. Hirako S. Subchapter 48B - Adiponectin. In: Ando H, Ukena K, Nagata S, editors. *Handbook of Hormones (Second Edition)*. San Diego: Academic Press; 2021. p. 577-9.
93. Nguyen TMD. Adiponectin: Role in Physiology and Pathophysiology. *Int J Prev Med*. 2020;11:136.
94. Pena AS, Harrington J, Peters Black SK, Gent R, Hirte C, Couper JJ, et al. Vascular Function and Distribution of Adiponectin Isomers during Puberty in Children and Adolescents with Obesity. *Horm Res Paediatr*. 2021;94(5-6):186-93.
95. Choubey M, Ranjan A, Krishna A. Chapter Twenty-Three - Adiponectin/AdipoRs signaling as a key player in testicular aging and associated metabolic disorders. In: Litwack G, editor. *Vitamins and Hormones*. 115: Academic Press; 2021. p. 611-34.
96. Sulistyoningrum DC, Gasevic D, Lear SA, Ho J, Mente A, Devlin AM. Total and high molecular weight adiponectin and ethnic-specific differences in adiposity and insulin resistance: a cross-sectional study. *Cardiovasc Diabetol*. 2013;12:170.
97. Diagnostics C. Adiponectin Signaling Pathway 2023 [2023]. Signaling pathway, Metabolism]. Available from: <https://www.creative-diagnostics.com/adiponectin-signaling-pathway.htm>.
98. Yamauchi T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Kadowaki T. Adiponectin receptors: A review of their structure, function and how they work. *Best Pract Res Cl En*. 2014;28(1):15-23.
99. Polito R, Nigro E, Pecoraro A, Monaco ML, Perna F, Sanduzzi A, et al. Adiponectin Receptors and Pro-inflammatory Cytokines Are Modulated in Common Variable Immunodeficiency Patients: Correlation With Ig Replacement Therapy. *Front Immunol*. 2019;10:2812.
100. Pilon M. Paradigm shift: the primary function of the “Adiponectin Receptors” is to regulate cell membrane composition. *Lipids in Health and Disease*. 2021;20(1):43.
101. Fang H, Judd RL. Adiponectin Regulation and Function. *Compr Physiol*. 2018;8(3):1031-63.
102. Fiaschi T. Mechanisms of Adiponectin Action. *Int J Mol Sci*. 2019;20(12).
103. Kyrou I, Mattu HS, Chatha K, Randeva HS. Chapter 7 - Fat Hormones, Adipokines. In: Schisler JC, Lang CH, Willis MS, editors. *Endocrinology of the Heart in Health and Disease: Academic Press*; 2017. p. 167-205.
104. Lewis JW, Edwards JR, Naylor AJ, McGettrick HM. Adiponectin signalling in bone homeostasis, with age and in disease. *Bone Res*. 2021;9(1):1.
105. Trayhurn P, Drevon CA, Eckel J. Secreted proteins from adipose tissue and skeletal muscle – adipokines, myokines and adipose/muscle cross-talk. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 2011;117(2):47-56.
106. Eckel J. Adipomyokines. 2018. p. 91-115.
107. Dommel S, Blüher M. Does C-C Motif Chemokine Ligand 2 (CCL2) Link Obesity to a Pro-Inflammatory State? *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(3):1500.

108. Mirzaei H, Ferns GA, Avan A, Mobarhan MG. Chapter Two - Cytokines and MicroRNA in Coronary Artery Disease. In: Makowski GS, editor. *Advances in Clinical Chemistry*. 82: Elsevier; 2017. p. 47-70.
109. Lin Z, Shi JL, Chen M, Zheng ZM, Li MQ, Shao J. CCL2: An important cytokine in normal and pathological pregnancies: A review. *Front Immunol*. 2022;13:1053457.
110. Gerhardt CC, Romero IA, Cancellor R, Camoin L, Strosberg AD. Chemokines control fat accumulation and leptin secretion by cultured human adipocytes. *Mol Cell Endocrinol*. 2001;175(1-2):81-92.
111. Gschwandtner M, Derler R, Midwood KS. More Than Just Attractive: How CCL2 Influences Myeloid Cell Behavior Beyond Chemotaxis. *Frontiers in Immunology*. 2019;10.
112. Fei L, Ren X, Yu H, Zhan Y. Targeting the CCL2/CCR2 Axis in Cancer Immunotherapy: One Stone, Three Birds? *Front Immunol*. 2021;12:771210.
113. Bonecchi R, Graham GJ. Atypical Chemokine Receptors and Their Roles in the Resolution of the Inflammatory Response. *Front Immunol*. 2016;7:224.
114. Rouault C, Marcelin G, Adriouch S, Rose C, Genser L, Ambrosini M, et al. Senescence-associated beta-galactosidase in subcutaneous adipose tissue associates with altered glycaemic status and truncal fat in severe obesity. *Diabetologia*. 2021;64(1):240-54.
115. Xu M, Wang Y, Xia R, Wei Y, Wei X. Role of the CCL2-CCR2 signalling axis in cancer: Mechanisms and therapeutic targeting. *Cell Prolif*. 2021;54(10):e13115.
116. Wittamer V, Franssen JD, Vulcano M, Mirjolet JF, Le Poul E, Migeotte I, et al. Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. *J Exp Med*. 2003;198(7):977-85.
117. Bozaoglu K, Bolton K, McMillan J, Zimmet P, Jowett J, Collier G, et al. Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. *Endocrinology*. 2007;148(10):4687-94.
118. Karczewska-Kupczewska M, Nikolajuk A, Stefanowicz M, Matulewicz N, Kowalska I, Strączkowski M. Serum and adipose tissue chemerin is differentially related to insulin sensitivity. *Endocrine Connections*. 2020;9(5):360-9.
119. Kennedy AJ, Davenport AP. International Union of Basic and Clinical Pharmacology CIII: Chemerin Receptors CMKLR1 (Chemerin(1)) and GPR1 (Chemerin(2)) Nomenclature, Pharmacology, and Function. *Pharmacol Rev*. 2018;70(1):174-96.
120. Parmentier M. Chapter 88 - Chemerin. In: Kastin AJ, editor. *Handbook of Biologically Active Peptides (Second Edition)*. Boston: Academic Press; 2013. p. 649-55.
121. Kralisch S, Weise S, Sommer G, Lipfert J, Lossner U, Bluher M, et al. Interleukin-1 β induces the novel adipokine chemerin in adipocytes in vitro. *Regulatory Peptides*. 2009;154(1):102-6.
122. Kwiecien K, Majewski P, Bak M, Brzoza P, Godlewska U, Skulimowska I, et al. Alternative splicing is not a key source of chemerin isoforms diversity. *Molecular Biology Reports*. 2023;50(3):2521-9.
123. Du XY, Zabel BA, Myles T, Allen SJ, Handel TM, Lee PP, et al. Regulation of chemerin bioactivity by plasma carboxypeptidase N, carboxypeptidase B (activated thrombin-activable fibrinolysis inhibitor), and platelets. *J Biol Chem*. 2009;284(2):751-8.
124. Diganostic C. Chemerin Signaling Pathway 2023 [Signaling pathway, Metabolism]. Available from: <https://www.creative-diagnostics.com/chemerin-signaling-pathway.htm>.

125. Szpakowicz A, Szpakowicz M, Lapinska M, Paniczko M, Lawicki S, Raczkowski A, et al. Serum Chemerin Concentration Is Associated with Proinflammatory Status in Chronic Coronary Syndrome. *Biomolecules*. 2021;11(8).
126. Hu S, Shao Z, Zhang C, Chen L, Mamun AA, Zhao N, et al. Chemerin facilitates intervertebral disc degeneration via TLR4 and CMKLR1 and activation of NF- κ B signaling pathway. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(12):11732-53.
127. Skuratovskaia D, Zatolokin P, Vulf M, Mazunin I, Litvinova L. Interrelation of chemerin and TNF- α with mtDNA copy number in adipose tissues and blood cells in obese patients with and without type 2 diabetes. *BMC Med Genomics*. 2019;12(Suppl 2):40.
128. Helfer G, Wu QF. Chemerin: a multifaceted adipokine involved in metabolic disorders. *J Endocrinol*. 2018;238(2):R79-R94.
129. Li J, Lu Y, Li N, Li P, Wang Z, Ting W, et al. Chemerin: A Potential Regulator of Inflammation and Metabolism for Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Pulmonary Rehabilitation. *Biomed Res Int*. 2020;2020:4574509.
130. Yoshimura T, Oppenheim JJ. Chemerin reveals its chimeric nature. *J Exp Med*. 2008;205(10):2187-90.
131. Gonzalez-Ponce F, Gamez-Nava JJ, Perez-Guerrero EE, Saldana-Cruz AM, Vazquez-Villegas ML, Ponce-Guarneros JM, et al. Serum chemerin levels: A potential biomarker of joint inflammation in women with rheumatoid arthritis. *PLoS One*. 2021;16(9):e0255854.
132. Buechler C, Feder S, Haberl EM, Aslanidis C. Chemerin Isoforms and Activity in Obesity. *Int J Mol Sci*. 2019;20(5).
133. Macvanin MT, Rizzo M, Radovanovic J, Sonmez A, Paneni F, Isenovic ER. Role of Chemerin in Cardiovascular Diseases. *Biomedicines*. 2022;10(11):2970.
134. Santos P, Almeida F. Exosome-Based Vaccines: History, Current State, and Clinical Trials. *Front Immunol*. 2021;12:711565.
135. Harding C, Stahl P. Transferrin recycling in reticulocytes: pH and iron are important determinants of ligand binding and processing. *Biochem Biophys Res Commun*. 1983;113(2):650-8.
136. Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*. 1983;33(3):967-78.
137. Harding CV, Heuser JE, Stahl PD. Exosomes: Looking back three decades and into the future. *Journal of Cell Biology*. 2013;200(4):367-71.
138. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem*. 1987;262(19):9412-20.
139. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med*. 1996;183(3):1161-72.
140. Muller Bark J, Trevisan Franca de Lima L, Zhang X, Broszczak D, Leo PJ, Jeffree RL, et al. Proteome profiling of salivary small extracellular vesicles in glioblastoma patients. *Cancer*. 2023.
141. D'Acunzo P, Perez-Gonzalez R, Kim Y, Hargash T, Miller C, Alldred MJ, et al. Mitovesicles are a novel population of extracellular vesicles of mitochondrial origin altered in Down syndrome. *Sci Adv*. 2021;7(7).

142. Emelyanov A, Shtam T, Kamyshinsky R, Garaeva L, Verlov N, Miliukhina I, et al. Cryo-electron microscopy of extracellular vesicles from cerebrospinal fluid. *PLoS One*. 2020;15(1):e0227949.
143. Lei LM, Lin X, Xu F, Shan SK, Guo B, Li FX, et al. Exosomes and Obesity-Related Insulin Resistance. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:651996.
144. Dance A. The body's tiny cargo carriers. *Knowable magazine*. 2019.
145. Jiang X, You L, Zhang Z, Cui X, Zhong H, Sun X, et al. Biological Properties of Milk-Derived Extracellular Vesicles and Their Physiological Functions in Infant. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021;9.
146. Ragusa M, Barbagallo C, Statello L, Caltabiano R, Russo A, Puzzo L, et al. miRNA profiling in vitreous humor, vitreal exosomes and serum from uveal melanoma patients: Pathological and diagnostic implications. *Cancer biology & therapy*. 2015;16(9):1387-96.
147. Jaiswal R, Sedger LM. Intercellular Vesicular Transfer by Exosomes, Microparticles and Oncosomes - Implications for Cancer Biology and Treatments. *Front Oncol*. 2019;9:125.
148. Amari L, Germain M. Mitochondrial Extracellular Vesicles - Origins and Roles. *Front Mol Neurosci*. 2021;14:767219.
149. Urabe F, Kosaka N, Asano K, Egawa S, Ochiya T. Chapter 5 - Physiological and pathological functions of prostasomes: From basic research to clinical application. In: Edelstein L, Smythies J, Quesenberry P, Noble D, editors. *Exosomes*: Academic Press; 2020. p. 101-21.
150. Baskaran S, Panner Selvam MK, Agarwal A. Chapter Four - Exosomes of male reproduction. In: Makowski GS, editor. *Advances in Clinical Chemistry*. 95: Elsevier; 2020. p. 149-63.
151. Nikfarjam S, Rezaie J, Kashanchi F, Jafari R. Dexosomes as a cell-free vaccine for cancer immunotherapy. *J Exp Clin Canc Res*. 2020;39(1).
152. Sakamoto T, Koya T, Togi M, Yoshida K, Kato T, Jr., Ishigaki Y, et al. Different In Vitro-Generated MUTZ-3-Derived Dendritic Cell Types Secrete Dexosomes with Distinct Phenotypes and Antigen Presentation Potencies. *Int J Mol Sci*. 2022;23(15).
153. Kaibori M, Matsui K, Hayashi M. Theranostics Using Indocyanine Green Lactosomes. *Cancers*. 2022;14(15):3840.
154. Argov-Argaman N, Smilowitz JT, Bricarello DA, Barboza M, Lerno L, Froehlich JW, et al. Lactosomes: structural and compositional classification of unique nanometer-sized protein lipid particles of human milk. *J Agric Food Chem*. 2010;58(21):11234-42.
155. Jung MK, Mun JY. Sample Preparation and Imaging of Exosomes by Transmission Electron Microscopy. *Jove-J Vis Exp*. 2018(131).
156. Schuh C, Cuenca J, Alcayaga-Miranda F, Khoury M. Exosomes on the border of species and kingdom intercommunication. *Transl Res*. 2019;210:80-98.
157. Kalluri R, LeBleu Valerie S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*. 2020;367(6478):eaau6977.
158. Lau NCH, Yam JWP. From Exosome Biogenesis to Absorption: Key Takeaways for Cancer Research. *Cancers (Basel)*. 2023;15(7).
159. Burtenshaw D, Regan B, Owen K, Collins D, McEneaney D, Megson IL, et al. Exosomal Composition, Biogenesis and Profiling Using Point-of-Care Diagnostics-Implications for Cardiovascular Disease. *Front Cell Dev Biol*. 2022;10:853451.

160. Jan AT, Rahman S, Badierah R, Lee EJ, Mattar EH, Redwan EM, et al. Expedition into Exosome Biology: A Perspective of Progress from Discovery to Therapeutic Development. *Cancers*. 2021;13(5).
161. Cocucci E, Meldolesi J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends in Cell Biology*. 2015;25(6):364-72.
162. Xie S, Zhang Q, Jiang L. Current Knowledge on Exosome Biogenesis, Cargo-Sorting Mechanism and Therapeutic Implications. *Membranes (Basel)*. 2022;12(5).
163. Kenific CM, Zhang H, Lyden D. An exosome pathway without an ESCRT. *Cell Research*. 2021;31(2):105-6.
164. Stuffers S, Sem Wegner C, Stenmark H, Brech A. Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic*. 2009;10(7):925-37.
165. Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*. 2008;319(5867):1244-7.
166. Pfeffer SR. Unsolved mysteries in membrane traffic. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:629-45.
167. Krylova SV, Feng D. The Machinery of Exosomes: Biogenesis, Release, and Uptake. *Int J Mol Sci*. 2023;24(2).
168. Yue B, Wang H, Cai X, Wang J, Chai Z, Peng W, et al. Adipose-Secreted Exosomes and Their Pathophysiologic Effects on Skeletal Muscle. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(20):12411.
169. Whitehead C, Luwor R, Morokoff A, Kaye A, Stylli S. Cancer exosomes in cerebrospinal fluid. *Translational Cancer Research*. 2017;6.
170. Deng FY, Miller J. A review on protein markers of exosome from different bio-resources and the antibodies used for characterization. *J Histotechnol*. 2019;42(4):226-39.
171. Mashouri L, Yousefi H, Aref AR, Ahadi AM, Molaei F, Alahari SK. Exosomes: composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance. *Mol Cancer*. 2019;18(1):75.
172. Connolly KD, Rees DA, James PE. Role of adipocyte-derived extracellular vesicles in vascular inflammation. *Free Radic Biol Med*. 2021;172:58-64.
173. Gurung S, Perocheau D, Touramanidou L, Baruteau J. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Commun Signal*. 2021;19(1):47.
174. Ratajczak MZ, Ratajczak J. Extracellular microvesicles/exosomes: discovery, disbelief, acceptance, and the future? *Leukemia*. 2020;34(12):3126-35.
175. Zhang Y, Liu Y, Liu H, Tang WH. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell Biosci*. 2019;9:19.
176. Shamsi F, Zhang H, Tseng YH. MicroRNA Regulation of Brown Adipogenesis and Thermogenic Energy Expenditure. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8:205.
177. Mei R, Qin W, Zheng Y, Wan Z, Liu L. Role of Adipose Tissue Derived Exosomes in Metabolic Disease. *Frontiers in Endocrinology*. 2022;13.
178. Bond ST, Calkin AC, Drew BG. Adipose-Derived Extracellular Vesicles: Systemic Messengers and Metabolic Regulators in Health and Disease. *Front Physiol*. 2022;13:837001.
179. Liu Y, Wang C, Wei M, Yang G, Yuan L. Multifaceted Roles of Adipose Tissue-Derived Exosomes in Physiological and Pathological Conditions. *Front Physiol*. 2021;12:669429.
180. Żbikowski A, Błachnio-Zabielska A, Galli M, Zabielski P. Adipose-Derived Exosomes as Possible Players in the Development of Insulin Resistance. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(14):7427.

181. Greenberg AS, Reeves AR. The good and bad of adipose tissue macrophage exosomes in obesity. *Cell Metab.* 2021;33(4):700-2.
182. Hong PY, Yu M, Tian WD. Diverse RNAs in adipose-derived extracellular vesicles and their therapeutic potential. *Mol Ther-Nucl Acids.* 2021;26:665-77.
183. Crewe C, Joffin N, Rutkowski JM, Kim M, Zhang F, Towler DA, et al. An Endothelial-to-Adipocyte Extracellular Vesicle Axis Governed by Metabolic State. *Cell.* 2018;175(3):695-708 e13.
184. Kranendonk ME, Visseren FL, van Herwaarden JA, Nolte-'t Hoen EN, de Jager W, Wauben MH, et al. Effect of extracellular vesicles of human adipose tissue on insulin signaling in liver and muscle cells. *Obesity (Silver Spring).* 2014;22(10):2216-23.
185. Chen Y, Buyel JJ, Hanssen MJ, Siegel F, Pan R, Naumann J, et al. Exosomal microRNA miR-92a concentration in serum reflects human brown fat activity. *Nat Commun.* 2016;7:11420.
186. Thomou T, Mori MA, Dreyfuss JM, Konishi M, Sakaguchi M, Wolfrum C, et al. Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues. *Nature.* 2017;542(7642):450-5.
187. Kulaj K, Harger A, Bauer M, Caliskan ÖS, Gupta TK, Chiang DM, et al. Adipocyte-derived extracellular vesicles increase insulin secretion through transport of insulinotropic protein cargo. *Nature Communications.* 2023;14(1):709.
188. Zhao R, Zhao T, He Z, Cai R, Pang W. Composition, isolation, identification and function of adipose tissue-derived exosomes. *Adipocyte.* 2021;10(1):587-604.
189. Muller L, Hong CS, Stolz DB, Watkins SC, Whiteside TL. Isolation of biologically-active exosomes from human plasma. *J Immunol Methods.* 2014;411:55-65.
190. Yang XX, Sun C, Wang L, Guo XL. New insight into isolation, identification techniques and medical applications of exosomes. *J Control Release.* 2019;308:119-29.
191. Cheng Y, Qu X, Dong Z, Zeng Q, Ma X, Jia Y, et al. Comparison of serum exosome isolation methods on co-precipitated free microRNAs. *PeerJ.* 2020;8:e9434.
192. Chen J, Li P, Zhang T, Xu Z, Huang X, Wang R, et al. Review on Strategies and Technologies for Exosome Isolation and Purification. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;9:811971.
193. Rech J, Getinger-Panek A, Gałka S, Bednarek I. Origin and Composition of Exosomes as Crucial Factors in Designing Drug Delivery Systems. *Applied Sciences.* 2022;12(23):12259.
194. Koritzinsky EH, Street JM, Star RA, Yuen PS. Quantification of Exosomes. *Journal of cellular physiology.* 2017;232(7):1587-90.
195. Li D, Luo H, Ruan H, Chen Z, Chen S, Wang B, et al. Isolation and identification of exosomes from feline plasma, urine and adipose-derived mesenchymal stem cells. *BMC Vet Res.* 2021;17(1):272.
196. Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, Ghaffari SH. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *Journal of cellular physiology.* 2019;234(5):5451-65.
197. Huang Z, Shi J, Gao Y, Cui C, Zhang S, Li J, et al. HMDD v3.0: a database for experimentally supported human microRNA-disease associations. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D1013-D7.
198. Cui C, Zhong B, Fan R, Cui Q. HMDD v4.0: a database for experimentally supported human microRNA-disease associations. *Nucleic Acids Res.* 2024;52(D1):D1327-D32.
199. Chen Y, Wang X. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(D1):D127-D31.

200. Lukasik A, Wójcikowski M, Zielenkiewicz P. Tools4miRs - one place to gather all the tools for miRNA analysis. *Bioinformatics*. 2016;32(17):2722-4.
201. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:402.
202. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009;136(2):215-33.
203. Chipman LB, Pasquinelli AE. miRNA Targeting: Growing beyond the Seed. *Trends Genet*. 2019;35(3):215-22.
204. Misiewicz-Krzeminska I, Krzeminski P, Corchete LA, Quwaider D, Rojas EA, Herrero AB, et al. Factors Regulating microRNA Expression and Function in Multiple Myeloma. *Noncoding RNA*. 2019;5(1).
205. Gulyaeva LF, Kushlinskiy NE. Regulatory mechanisms of microRNA expression. *Journal of Translational Medicine*. 2016;14(1):143.
206. Catalanotto C, Cogoni C, Zardo G. MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions. *Int J Mol Sci*. 2016;17(10).
207. Zhou Z, Tao Y, Zhao H, Wang Q. Adipose Extracellular Vesicles: Messengers From and to Macrophages in Regulating Immunometabolic Homeostasis or Disorders. *Front Immunol*. 2021;12:666344.
208. Kwan HY, Chen M, Xu K, Chen B. The impact of obesity on adipocyte-derived extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*. 2021.
209. Yao ZY, Chen WB, Shao SS, Ma SZ, Yang CB, Li MZ, et al. Role of exosome-associated microRNA in diagnostic and therapeutic applications to metabolic disorders. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2018;19(3):183-98.
210. Batagov AO, Kurochkin IV. Exosomes secreted by human cells transport largely mRNA fragments that are enriched in the 3'-untranslated regions. *Biology Direct*. 2013;8(1):12.
211. Yue B, Yang H, Wu J, Wang J, Ru W, Cheng J, et al. Characterization and Transcriptome Analysis of Exosomal and Nonexosomal RNAs in Bovine Adipocytes. *Int J Mol Sci*. 2020;21(23).
212. Ji J, Chen R, Zhao L, Xu Y, Cao Z, Xu H, et al. Circulating exosomal mRNA profiling identifies novel signatures for the detection of prostate cancer. *Mol Cancer*. 2021;20(1):58.
213. Melo CA, Melo SA, editors. *Biogenesis and Physiology of MicroRNAs* 2014.
214. Efrain Chavarria-Avila R-EN-H, Milton- Omar Guzmán-Ornelas, Fernanda-Isadora Corona-Meraz, Sandra- Luz Ruíz-Quezada and Mónica Vázquez-Del Mercado. Immunometabolism in Obesity. In: Series IB, editor. *Adiposity - Omics and Molecular Understanding: IntechOpen Book Series*; 2017.
215. Lemcke H, Steinhoff G, David R. Gap junctional shuttling of miRNA--A novel pathway of intercellular gene regulation and its prospects in clinical application. *Cell Signal*. 2015;27(12):2506-14.
216. Ouimet M, Moore KJ. A big role for small RNAs in HDL homeostasis. *J Lipid Res*. 2013;54(5):1161-7.
217. Oses M, Margareto Sanchez J, Portillo MP, Aguilera CM, Labayen I. Circulating miRNAs as Biomarkers of Obesity and Obesity-Associated Comorbidities in Children and Adolescents: A Systematic Review. *Nutrients*. 2019;11(12).
218. Ortega FJ, Mercader JM, Catalan V, Moreno-Navarrete JM, Pueyo N, Sabater M, et al. Targeting the circulating microRNA signature of obesity. *Clin Chem*. 2013;59(5):781-92.

219. Gurunathan S, Kang MH, Qasim M, Khan K, Kim JH. Biogenesis, Membrane Trafficking, Functions, and Next Generation Nanotherapeutics Medicine of Extracellular Vesicles. *Int J Nanomedicine*. 2021;16:3357-83.
220. Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J, et al. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2015;13(1):17-24.
221. Zheng D, Huo M, Li B, Wang W, Piao H, Wang Y, et al. The Role of Exosomes and Exosomal MicroRNA in Cardiovascular Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021;8.
222. Kantharidis P, Hagiwara S, Brennan E, McClelland AD. Study of microRNA in diabetic nephropathy: isolation, quantification and biological function. *Nephrology (Carlton)*. 2015;20(3):132-9.
223. Chen Q, Zhang YD, Wu SN, Chen YX, Liu XJ, Wei HY. [Correlation between serum microRNA-122 and insulin resistance in obese children]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. 2019;21(9):910-4.
224. Wang Y, Jin P, Liu J, Xie X. Exosomal microRNA-122 mediates obesity-related cardiomyopathy through suppressing mitochondrial ADP-ribosylation factor-like 2. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2019;133(17):1871-81.
225. Zhou Y, Tan C. miRNAs in Adipocyte-Derived Extracellular Vesicles: Multiple Roles in Development of Obesity-Associated Disease. *Front Mol Biosci*. 2020;7:171.
226. Ribas J, Ni X, Castanares M, Liu MM, Esopi D, Yegnasubramanian S, et al. A novel source for miR-21 expression through the alternative polyadenylation of VMP1 gene transcripts. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(14):6821-33.
227. Bai X, Bian Z. MicroRNA-21 Is a Versatile Regulator and Potential Treatment Target in Central Nervous System Disorders. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2022;15.
228. Tanase CP, OGREZEANU I, BADIU C. 8 - MicroRNAs. In: Tanase CP, OGREZEANU I, BADIU C, editors. *Molecular Pathology of Pituitary Adenomas*. London: Elsevier; 2012. p. 91-6.
229. Gallardo-Sánchez CA, Rivera-Cameras A, Morán-Moguel MC, Salazar-Páramo M, Dávalos-Rodríguez IP. Aplicaciones clínicas de miR-21: Revisión de la literatura. 2023. 2023;34(2).
230. Kumarswamy R, Volkmann I, Thum T. Regulation and function of miRNA-21 in health and disease. *RNA Biol*. 2011;8(5):706-13.
231. Ghorbani S, Mahdavi R, Alipoor B, Panahi G, Nasli Esfahani E, Razi F, et al. Decreased serum microRNA-21 level is associated with obesity in healthy and type 2 diabetic subjects. *Arch Physiol Biochem*. 2018;124(4):300-5.
232. Kim YJ, Hwang SH, Cho HH, Shin KK, Bae YC, Jung JS. MicroRNA 21 regulates the proliferation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and high-fat diet-induced obesity alters microRNA 21 expression in white adipose tissues. *Journal of cellular physiology*. 2012;227(1):183-93.
233. Guglielmi V, D'Adamo M, Menghini R, Cardellini M, Gentileschi P, Federici M, et al. MicroRNA 21 is up-regulated in adipose tissue of obese diabetic subjects. *Nutr Healthy Aging*. 2017;4(2):141-5.
234. Taroeno-Hariadi KW, Hardianti MS, Sinorita H, Aryandono T. Obesity, leptin, and deregulation of microRNA in lipid metabolisms: their contribution to breast cancer prognosis. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 2021;13(1):10.
235. Mukherjee S, Shelar B, Krishna S. Versatile role of miR-24/24-1*/24-2* expression in cancer and other human diseases. *Am J Transl Res*. 2022;14(1):20-54.

236. Sun Q, Zhang Y, Yang G, Chen X, Zhang Y, Cao G, et al. Transforming growth factor-beta-regulated miR-24 promotes skeletal muscle differentiation. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(8):2690-9.
237. Sun H, Cao Y, Zhao Y, Lu L, Zhou L, Wang L, et al. Chapter 13 - MicroRNAs in Skeletal Muscle Differentiation. In: Sen CK, editor. *MicroRNA in Regenerative Medicine (Second Edition)*: Academic Press; 2015. p. 341-68.
238. Wang S, Liu N, Tang Q, Sheng H, Long S, Wu W. MicroRNA-24 in Cancer: A Double Side Medal With Opposite Properties. *Front Oncol.* 2020;10:553714.
239. Soroosh A, Fang K, Hoffman JM, Law IKM, Videlock E, Lokhandwala ZA, et al. Correction: Loss of miR-24-3p promotes epithelial cell apoptosis and impairs the recovery from intestinal inflammation. *Cell Death Dis.* 2022;13(2):135.
240. Ng R, Wu H, Xiao H, Chen X, Willenbring H, Steer CJ, et al. Inhibition of microRNA-24 expression in liver prevents hepatic lipid accumulation and hyperlipidemia. *Hepatology.* 2014;60(2):554-64.
241. Nunez Lopez YO, Garufi G, Pasarica M, Seyhan AA. Elevated and Correlated Expressions of miR-24, miR-30d, miR-146a, and SFRP-4 in Human Abdominal Adipose Tissue Play a Role in Adiposity and Insulin Resistance. *Int J Endocrinol.* 2018;2018:7351902.
242. Wang C, Jia Q, Guo X, Li K, Chen W, Shen Q, et al. microRNA-34 family: From mechanism to potential applications. *Int J Biochem Cell Biol.* 2022;144:106168.
243. Fu J, Imani S, Wu MY, Wu RC. MicroRNA-34 Family in Cancers: Role, Mechanism, and Therapeutic Potential. *Cancers (Basel).* 2023;15(19).
244. Wang H, Wang F, Wang X, Wu X, Xu F, Wang K, et al. Friend or Foe: A Cancer Suppressor MicroRNA-34 Potentially Plays an Adverse Role in Vascular Diseases by Regulating Cell Apoptosis and Extracellular Matrix Degradation. *Med Sci Monit.* 2019;25:1952-9.
245. Perdoncin M, Konrad A, Wyner JR, Lohana S, Pillai SS, Pereira DG, et al. A Review of miRNAs as Biomarkers and Effect of Dietary Modulation in Obesity Associated Cognitive Decline and Neurodegenerative Disorders. *Frontiers in Molecular Neuroscience.* 2021;14(220).
246. Li M, Fu W, Wo L, Shu X, Liu F, Li C. miR-128 and its target genes in tumorigenesis and metastasis. *Exp Cell Res.* 2013;319(20):3059-64.
247. Lanza M, Cuzzocrea S, Oddo S, Esposito E, Casili G. The Role of miR-128 in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci.* 2023;24(7).
248. Motohashi N, Alexander MS, Shimizu-Motohashi Y, Myers JA, Kawahara G, Kunkel LM. Regulation of IRS1/Akt insulin signaling by microRNA-128a during myogenesis. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 12):2678-91.
249. Roefs MT, Sluijter JPG, Vader P. Extracellular Vesicle-Associated Proteins in Tissue Repair. *Trends Cell Biol.* 2020;30(12):990-1013.
250. Hartwig S, De Filippo E, Goddeke S, Knebel B, Kotzka J, Al-Hasani H, et al. Exosomal proteins constitute an essential part of the human adipose tissue secretome. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.* 2019;1867(12):140172.
251. Lee JE, Moon PG, Lee IK, Baek MC. Proteomic Analysis of Extracellular Vesicles Released by Adipocytes of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) Rats. *Protein J.* 2015;34(3):220-35.
252. Ma Z, Wang G, Chen X, Ou Z, Zou F. Association of STAT3 common variations with obesity and hypertriglyceridemia: protective and contributive effects. *Int J Mol Sci.* 2014;15(7):12258-69.

253. Fu XY. STAT3 in immune responses and inflammatory bowel diseases. *Cell Research*. 2006;16(2):214-9.
254. Wunderlich CM, Hovelmeyer N, Wunderlich FT. Mechanisms of chronic JAK-STAT3-SOCS3 signaling in obesity. *JAKSTAT*. 2013;2(2):e23878.
255. Bukhari SA, Yasmin A, Zahoor MA, Mustafa G, Sarfraz I, Rasul A. Secreted frizzled-related protein 4 and its implication in obesity and type-2 diabetes. *IUBMB Life*. 2019;71(11):1701-10.
256. Horbelt T, Knebel B, Fahlbusch P, Barbosa D, de Wiza DH, Van de Velde F, et al. The adipokine sFRP4 induces insulin resistance and lipogenesis in the liver. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2019;1865(10):2671-84.
257. Guan H, Zhang J, Luan J, Xu H, Huang Z, Yu Q, et al. Secreted Frizzled Related Proteins in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:712217.
258. Wang C, Ha X, Li W, Xu P, Gu Y, Wang T, et al. Correlation of *A2bAR* and *KLF4/KLF15* with Obesity-Dyslipidemia Induced Inflammation in Uygur Population. *Mediators of Inflammation*. 2016;2016:7015620.
259. Bulut GB, Alencar GF, Owsiany KM, Nguyen AT, Karnewar S, Haskins RM, et al. KLF4 (Kruppel-Like Factor 4)-Dependent Perivascular Plasticity Contributes to Adipose Tissue inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2021;41(1):284-301.
260. Man X-F, Hu N, Tan S-W, Tang H-N, Guo Y, Tang C-Y, et al. Insulin receptor substrate-1 inhibits high-fat diet-induced obesity by browning of white adipose tissue through miR-503. *The FASEB Journal*. 2020;34(9):12308-23.
261. Marcadenti A, de Abreu-Silva EO. Different adipose tissue depots: Metabolic implications and effects of surgical removal. *Endocrinol Nutr*. 2015;62(9):458-64.
262. Giralt M, Villarroya F. White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? *Endocrinology*. 2013;154(9):2992-3000.
263. Shen W, Wang Z, Punyanita M, Lei J, Sinav A, Kral JG, et al. Adipose tissue quantification by imaging methods: a proposed classification. *Obes Res*. 2003;11(1):5-16.
264. Chait A, den Hartigh LJ. Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. *Front Cardiovasc Med*. 2020;7:22.
265. Sbarbati A, Accorsi D, Benati D, Marchetti L, Orsini G, Rigotti G, et al. Subcutaneous adipose tissue classification. *Eur J Histochem*. 2010;54(4):e48.
266. Frigolet ME, Gutierrez-Aguilar R. The colors of adipose tissue. *Gac Med Mex*. 2020;156(2):142-9.
267. Shuster A, Patlas M, Pinthus JH, Mourtzakis M. The clinical importance of visceral adiposity: a critical review of methods for visceral adipose tissue analysis. *Br J Radiol*. 2012;85(1009):1-10.
268. Cohen P, Spiegelman BM. Cell biology of fat storage. *Mol Biol Cell*. 2016;27(16):2523-7.
269. Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell*. 2007;131(2):242-56.
270. Foster MT, Pagliassotti MJ. Metabolic alterations following visceral fat removal and expansion: Beyond anatomic location. *Adipocyte*. 2012;1(4):192-9.
271. Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, Kim JI, Kim JB. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016;7:30.
272. J. MR. Biological characteristics of the adipose tissue: adipocyte as an endocrine cell. *Revista Médica Clínica Las Condes*

- . 2011;Volume 23(2):136-44.
273. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest.* 2011;121(6):2094-101.
 274. Salud OMDI. Obesidad y sobrepeso 2020 [
 275. O'Rourke RW. Adipose tissue and the physiologic underpinnings of metabolic disease. *Surg Obes Relat Dis.* 2018;14(11):1755-63.
 276. Goossens GH. The Metabolic Phenotype in Obesity: Fat Mass, Body Fat Distribution, and Adipose Tissue Function. *Obes Facts.* 2017;10(3):207-15.
 277. Fasshauer M, Bluher M. Adipokines in health and disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2015;36(7):461-70.
 278. Longo M, Zatterale F, Naderi J, Parrillo L, Formisano P, Raciti GA, et al. Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *Int J Mol Sci.* 2019;20(9).
 279. Jo J, Gavrilova O, Pack S, Jou W, Mullen S, Sumner AE, et al. Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth. *PLoS Comput Biol.* 2009;5(3):e1000324-e.
 280. Davanzo GG, Castro G, Moraes-Vieira PMM. Immunometabolic regulation of adipose tissue resident immune cells. *Curr Opin Pharmacol.* 2021;58:44-51.
 281. Castoldi A, Naffah de Souza C, Camara NO, Moraes-Vieira PM. The Macrophage Switch in Obesity Development. *Front Immunol.* 2015;6:637.
 282. Kumari M, Heeren J, Scheja L. Regulation of immunometabolism in adipose tissue. *Semin Immunopathol.* 2018;40(2):189-202.
 283. Charriere G, Cousin B, Arnaud E, Andre M, Bacou F, Penicaud L, et al. Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. *J Biol Chem.* 2003;278(11):9850-5.
 284. Loftus RM, Finlay DK. Immunometabolism: Cellular Metabolism Turns Immune Regulator. *J Biol Chem.* 2016;291(1):1-10.
 285. Joseph R, Padraic GF, Emily H. The Pivotal Role of Macrophages in Metabolic Distress. In: Khalid Hussain B, editor. *Macrophage Activation.* Rijeka: IntechOpen; 2019. p. Ch. 2.
 286. Wu H, Ballantyne CM. Metabolic Inflammation and Insulin Resistance in Obesity. *Circulation Research.* 2020;126(11):1549-64.
 287. Hildebrandt X, Ibrahim M, Peltzer N. Cell death and inflammation during obesity: "Know my methods, WAT(son)". *Cell Death & Differentiation.* 2022.
 288. Al-Mansoori L, Al-Jaber H, Prince MS, Elrayess MA. Role of Inflammatory Cytokines, Growth Factors and Adipokines in Adipogenesis and Insulin Resistance. *Inflammation.* 2021.
 289. Freeman AM, Pennings N. Insulin Resistance. *StatPearls.* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.; 2021.
 290. Kern L, Mittenbuhler MJ, Vesting AJ, Ostermann AL, Wunderlich CM, Wunderlich FT. Obesity-Induced TNF alpha and IL-6 Signaling: The Missing Link between Obesity and Inflammation-Driven Liver and Colorectal Cancers. *Cancers.* 2019;11(1).
 291. Yudin R, Aman AM, Rasyid H, Bakri S, Sanusi H, Daud NA, et al. Risk of Dyslipidemia in Obese Young Adult Subjects as Measured by Various Obesity Indices. *J Endocrinol Metab.* 2022;12(3):102-6.

292. Liu F, He J, Wang H, Zhu D, Bi Y. Adipose Morphology: a Critical Factor in Regulation of Human Metabolic Diseases and Adipose Tissue Dysfunction. *Obesity Surgery*. 2020;30(12):5086-100.
293. Mosca S, Araujo G, Costa V, Correia J, Bandeira A, Martins E, et al. Dyslipidemia Diagnosis and Treatment: Risk Stratification in Children and Adolescents. *J Nutr Metab*. 2022;2022:4782344.
294. Klop B, Elte JW, Cabezas MC. Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. *Nutrients*. 2013;5(4):1218-40.
295. Kolb H, Kempf K, Rohling M, Martin S. Insulin: too much of a good thing is bad. *BMC Med*. 2020;18(1):224.
296. Anjom-Shoae J, Keshteli AH, Sadeghi O, Pouraram H, Afshar H, Esmailzadeh A, et al. Association between dietary insulin index and load with obesity in adults. *Eur J Nutr*. 2020;59(4):1563-75.
297. Zakaria NF, Hamid M, Khayat ME. Amino Acid-Induced Impairment of Insulin Signaling and Involvement of G-Protein Coupling Receptor. *Nutrients*. 2021;13(7).
298. Harreiter J, Roden M. [Diabetes mellitus-Definition, classification, diagnosis, screening and prevention (Update 2019)]. *Wien Klin Wochenschr*. 2019;131(Suppl 1):6-15.
299. Sethi JK, Vidal-Puig AJ. Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lipid Res*. 2007;48(6):1253-62.
300. Dong J, Yang S, Zhuang Q, Sun J, Wei P, Zhao X, et al. The Associations of Lipid Profiles With Cardiovascular Diseases and Death in a 10-Year Prospective Cohort Study. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8:745539.
301. Farnier M, Zeller M, Masson D, Cottin Y. Triglycerides and risk of atherosclerotic cardiovascular disease: An update. *Arch Cardiovasc Dis*. 2021;114(2):132-9.
302. Soppert J, Lehrke M, Marx N, Jankowski J, Noels H. Lipoproteins and lipids in cardiovascular disease: from mechanistic insights to therapeutic targeting. *Adv Drug Deliv Rev*. 2020;159:4-33.
303. Furman D, Campisi J, Verdin E, Carrera-Bastos P, Targ S, Franceschi C, et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat Med*. 2019;25(12):1822-32.
304. Nilsson B, Hamad OA, Ahlstrom H, Kullberg J, Johansson L, Lindhagen L, et al. C3 and C4 are strongly related to adipose tissue variables and cardiovascular risk factors. *Eur J Clin Invest*. 2014;44(6):587-96.
305. Copenhaver MM, Yu CY, Zhou D, Hoffman RP. Relationships of complement components C3 and C4 and their genetics to cardiometabolic risk in healthy, non-Hispanic white adolescents. *Pediatr Res*. 2020;87(1):88-94.
306. Nehring SM, Goyal A, Patel BC. C Reactive Protein. *StatPearls*. Treasure Island (FL)2022.
307. Tishkowski K, Gupta V. Erythrocyte Sedimentation Rate. *StatPearls*. Treasure Island (FL)2022.
308. Otto-Ślusarczyk D, Graboń W, Mielczarek-Putka M. [Aspartate aminotransferase--key enzyme in the human systemic metabolism]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2016;70:219-30.
309. Gwaltney-Brant SM. Chapter 8 - Nutraceuticals in hepatic diseases. In: Gupta RC, Lall R, Srivastava A, editors. *Nutraceuticals (Second Edition)*: Academic Press; 2021. p. 117-29.
310. Avgerinos KI, Spyrou N, Bougioukas KI, Kapogiannis D. Effects of creatine supplementation on cognitive function of healthy individuals: A systematic review of randomized controlled trials. *Exp Gerontol*. 2018;108:166-73.

311. Hediger MA, Smith CP, You G, Lee WS, Kanai Y, Shayakul C. Structure, regulation and physiological roles of urea transporters. *Kidney Int.* 1996;49(6):1615-23.
312. Matafome P, Seica R. Function and Dysfunction of Adipose Tissue. *Advances in neurobiology.* 2017;19:3-31.
313. Schrover IM, Spiering W, Leiner T, Visseren FL. Adipose Tissue Dysfunction: Clinical Relevance and Diagnostic Possibilities. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme.* 2016;48(4):213-25.
314. Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA2-2002, Para la prevención, tratamiento y control de las dislipidemias, NOM-037-SSA2-2002 (2002).
315. Li Y, Li Y, Liu J, Fan Y, Li X, Dong M, et al. Expression levels of microRNA-145 and microRNA-10b are associated with metastasis in non-small cell lung cancer. *Cancer biology & therapy.* 2016;17(3):272-9.
316. Garrow JS, Webster J. Quetelet's index (W/H²) as a measure of fatness. *Int J Obes.* 1985;9(2):147-53.
317. Freedman DS, Thornton JC, Pi-Sunyer FX, Heymsfield SB, Wang J, Pierson RN, Jr., et al. The body adiposity index (hip circumference ÷ height(1.5)) is not a more accurate measure of adiposity than is BMI, waist circumference, or hip circumference. *Obesity (Silver Spring).* 2012;20(12):2438-44.
318. Chang Y, Guo X, Chen Y, Guo L, Li Z, Yu S, et al. A body shape index and body roundness index: two new body indices to identify diabetes mellitus among rural populations in northeast China. *BMC public health.* 2015;15:794-.
319. Moosaie F, Fatemi Abhari SM, Deravi N, Karimi Behnagh A, Esteghamati S, Dehghani Firouzabadi F, et al. Waist-To-Height Ratio Is a More Accurate Tool for Predicting Hypertension Than Waist-To-Hip Circumference and BMI in Patients With Type 2 Diabetes: A Prospective Study. *Front Public Health.* 2021;9:726288-.
320. Cho S, Shin A, Choi JY, Park SM, Kang D, Lee JK. Optimal cutoff values for anthropometric indices of obesity as discriminators of metabolic abnormalities in Korea: results from a Health Examinees study. *BMC Public Health.* 2021;21(1):459.
321. Valdez R, Seidell JC, Ahn YI, Weiss KM. A new index of abdominal adiposity as an indicator of risk for cardiovascular disease. A cross-population study. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1993;17(2):77-82.
322. Perona JS, Schmidt Rio-Valle J, Ramirez-Velez R, Correa-Rodriguez M, Fernandez-Aparicio A, Gonzalez-Jimenez E. Waist circumference and abdominal volume index are the strongest anthropometric discriminators of metabolic syndrome in Spanish adolescents. *Eur J Clin Invest.* 2019;49(3):e13060.
323. Amato MC, Giordano C, Galia M, Criscimanna A, Vitabile S, Midiri M, et al. Visceral Adiposity Index: a reliable indicator of visceral fat function associated with cardiometabolic risk. *Diabetes Care.* 2010;33(4):920-2.
324. Amato MC, Giordano C, Pitrone M, Galluzzo A. Cut-off points of the visceral adiposity index (VAI) identifying a visceral adipose dysfunction associated with cardiometabolic risk in a Caucasian Sicilian population. *Lipids Health Dis.* 2011;10:183.
325. Guerrero-Romero F, Rodríguez-Morán M. Abdominal volume index. An anthropometry-based index for estimation of obesity is strongly related to impaired glucose tolerance and type 2 diabetes mellitus. *Arch Med Res.* 2003;34(5):428-32.

326. Vilela BS, Vasques AC, Cassani RS, Forti AC, Pareja JC, Tambascia MA, et al. The HOMA-Adiponectin (HOMA-AD) Closely Mirrors the HOMA-IR Index in the Screening of Insulin Resistance in the Brazilian Metabolic Syndrome Study (BRAMS). *PLoS One*. 2016;11(8):e0158751.
327. Etesami B, Ghaseminezhad S, Nowrouzi A, Rashidipour M, Yazdanparast R. Investigation of 3T3-L1 Cell Differentiation to Adipocyte, Affected by Aqueous Seed Extract of *Phoenix Dactylifera* L. *Rep Biochem Mol Biol*. 2020;9(1):14-25.
328. Du J, Zhao L, Kang Q, He Y, Bi Y. An optimized method for Oil Red O staining with the salicylic acid ethanol solution. *Adipocyte*. 2023;12(1):2179334.
329. Lobb RJ, Becker M, Wen SW, Wong CS, Wiegmanns AP, Leimgruber A, et al. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:27031.
330. Santillana N, Astudillo-Guerrero C, D'Espessailles A, Cruz G. White Adipose Tissue Dysfunction: Pathophysiology and Emergent Measurements. *Nutrients*. 2023;15(7).
331. Cifuentes M, Albala C, Rojas CV. Differences in lipogenesis and lipolysis in obese and non-obese adult human adipocytes. *Biol Res*. 2008;41(2):197-204.
332. Li Q, Spalding KL. The regulation of adipocyte growth in white adipose tissue. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2022;10.
333. Keys A, Fidanza F, Karvonen MJ, Kimura N, Taylor HL. Indices of relative weight and obesity. *J Chronic Dis*. 1972;25(6):329-43.
334. Purnell JQ. Definitions, Classification, and Epidemiology of Obesity. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, et al., editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA)2000.
335. Salmon-Gomez L, Catalan V, Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J. Relevance of body composition in phenotyping the obesities. *Rev Endocr Metab Disord*. 2023;24(5):809-23.
336. Martins CA, do Prado CB, Santos Ferreira JR, Cattafesta M, Dos Santos Neto ET, Haraguchi FK, et al. Conicity index as an indicator of abdominal obesity in individuals with chronic kidney disease on hemodialysis. *PLoS One*. 2023;18(4):e0284059.
337. C. S. Mantzoros KE, E. I. Georgiadis, N. Katsilambros. Conicity Index as a Predictor of Blood Pressure Levels, Insulin and Triglyceride Concentrations of Healthy Premenopausal Women. *Hormone and Metabolic Research*. 1996;28(1): 32-34.
338. Rodriguez-Ayala E, Gallegos-Cabrales EC, Gonzalez-Lopez L, Laviada-Molina HA, Salinas-Osornio RA, Nava-Gonzalez EJ, et al. Towards precision medicine: defining and characterizing adipose tissue dysfunction to identify early immunometabolic risk in symptom-free adults from the GEMM family study. *Adipocyte*. 2020;9(1):153-69.
339. Herrero TV, Sancho, E., Victoria Ramírez Iñiguez de la Torre, & González, Á. A. L. Visceral and dysfunctional adiposity indexes: Relationship with cardiometabolic risk. *Journal of Clinical Trials and Experimental Investigations*. 2023;2(1), 53-59.
340. Reyes-Barrera J, Sainz-Escárrega VH, Medina-Urritia AX, Jorge-Galarza E, Osorio-Alonso H, Torres-Tamayo M, et al. Dysfunctional adiposity index as a marker of adipose tissue morpho-functional abnormalities and metabolic disorders in apparently healthy subjects. *Adipocyte*. 2021;10(1):142-52.
341. Bilgin Gocer D, Bas M, Cakir Bicer N, Hajhamidiasl L. Predicting metabolic syndrome by visceral adiposity index, body roundness index, dysfunctional adiposity index, lipid accumulation product index, and body shape index in adults. *Nutr Hosp*. 2022;39(4):794-802.

342. Muscari A, Antonelli S, Bianchi G, Cavrini G, Dapporto S, Ligabue A, et al. Serum C3 is a stronger inflammatory marker of insulin resistance than C-reactive protein, leukocyte count, and erythrocyte sedimentation rate: comparison study in an elderly population. *Diabetes Care*. 2007;30(9):2362-8.
343. Al-Domi HA, Al Haj Ahmad RM. Association between complement component C3 and body composition: a possible obesity inflammatory biomarker for insulin resistance. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2017;26(6):1082-7.
344. Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA*. 1999;282(22):2131-5.
345. Xu R, Shen P, Wu C, Wan Y, Fan Z, Gao X. BMI, high-sensitivity C-reactive protein and the conversion from metabolically healthy to unhealthy phenotype in Chinese adults: a cohort study. *Public Health Nutr*. 2021;24(13):4124-31.
346. Gil-Campos M, Canete RR, Gil A. Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity. *Clin Nutr*. 2004;23(5):963-74.
347. He L, Xuan W, Liu D, Zhong J, Luo H, Cui H, et al. The role of adiponectin in the association between abdominal obesity and type 2 diabetes: a mediation analysis among 232,438 Chinese participants. *Frontiers in Endocrinology*. 2024;15.
348. Peng J, Chen Q, Wu C. The role of adiponectin in cardiovascular disease. *Cardiovasc Pathol*. 2023;64:107514.
349. Wu O, Lu X, Leng J, Zhang X, Liu W, Yang F, et al. Reevaluating Adiponectin's impact on obesity hypertension: a Chinese case-control study. *BMC Cardiovasc Disord*. 2024;24(1):208.
350. Ryu J, Loza CA, Xu H, Zhou M, Hadley JT, Wu J, et al. Potential Roles of Adiponectin Isoforms in Human Obesity with Delayed Wound Healing. *Cells*. 2019;8(10).
351. Tabb KL, Gao C, Hicks PJ, Hawkins GA, Rotter JI, Chen YI, et al. Adiponectin Isoform Patterns in Ethnic-Specific ADIPOQ Mutation Carriers: The IRAS Family Study. *Obesity (Silver Spring)*. 2017;25(8):1384-90.
352. Kirichenko TV, Markina YV, Bogatyreva AI, Tolstik TV, Varaeva YR, Starodubova AV. The Role of Adipokines in Inflammatory Mechanisms of Obesity. *Int J Mol Sci*. 2022;23(23).
353. Sell H, Laurencikiene J, Taube A, Eckardt K, Cramer A, Horrigths A, et al. Chemerin is a novel adipocyte-derived factor inducing insulin resistance in primary human skeletal muscle cells. *Diabetes*. 2009;58(12):2731-40.
354. Wood S, Jayaraman V, Huelsmann EJ, Bonish B, Burgad D, Sivaramakrishnan G, et al. Pro-inflammatory chemokine CCL2 (MCP-1) promotes healing in diabetic wounds by restoring the macrophage response. *PLoS One*. 2014;9(3):e91574.
355. Lee MJ, Wu Y, Fried SK. A modified protocol to maximize differentiation of human preadipocytes and improve metabolic phenotypes. *Obesity (Silver Spring)*. 2012;20(12):2334-40.
356. Jackson HC, Pheiffer C, Jack B, Africander D. Time- and glucose-dependent differentiation of 3T3-L1 adipocytes mimics dysfunctional adiposity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2023;671:286-91.
357. Baldini F, Fabbri R, Eberhagen C, Voci A, Portincasa P, Zischka H, et al. Adipocyte hypertrophy parallels alterations of mitochondrial status in a cell model for adipose tissue dysfunction in obesity. *Life Sci*. 2021;265:118812.

358. Hasegawa Y, Nakagawa E, Kadota Y, Kawaminami S. Lignosulfonic acid promotes hypertrophy in 3T3-L1 cells without increasing lipid content and increases their 2-deoxyglucose uptake. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2017;30(1):111-8.
359. Yin J, Gao Z, He Q, Zhou D, Guo Z, Ye J. Role of hypoxia in obesity-induced disorders of glucose and lipid metabolism in adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;296(2):E333-42.
360. Reinhardt TA, Sacco RE, Nonnecke BJ, Lippolis JD. Bovine milk proteome: quantitative changes in normal milk exosomes, milk fat globule membranes and whey proteomes resulting from *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Proteomics.* 2013;82:141-54.
361. Kapogiannis D, Boxer A, Schwartz JB, Abner EL, Biragyn A, Masharani U, et al. Dysfunctionally phosphorylated type 1 insulin receptor substrate in neural-derived blood exosomes of preclinical Alzheimer's disease. *FASEB J.* 2015;29(2):589-96.
362. Chou S-Y, Chan L, Chung C-C, Chiu J-Y, Hsieh Y-C, Hong C-T. Altered Insulin Receptor Substrate 1 Phosphorylation in Blood Neuron-Derived Extracellular Vesicles From Patients With Parkinson's Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* 2020;8.
363. Czaja-Stolc S, Potrykus M, Stankiewicz M, Kaska L, Malgorzewicz S. Pro-Inflammatory Profile of Adipokines in Obesity Contributes to Pathogenesis, Nutritional Disorders, and Cardiovascular Risk in Chronic Kidney Disease. *Nutrients.* 2022;14(7).
364. Li Y, Yu S, Li L, Chen J, Quan M, Li Q, et al. KLF4-mediated upregulation of CD9 and CD81 suppresses hepatocellular carcinoma development via JNK signaling. *Cell Death Dis.* 2020;11(4):299.
365. He Z, He J, Xie K. KLF4 transcription factor in tumorigenesis. *Cell Death Discov.* 2023;9(1):118.
366. Wang QS, Xiao RJ, Peng J, Yu ZT, Fu JQ, Xia Y. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomal KLF4 Alleviated Ischemic Stroke Through Inhibiting N6-Methyladenosine Modification Level of Drp1 by Targeting lncRNA-ZFAS1. *Mol Neurobiol.* 2023;60(7):3945-62.
367. Yuan C, Li Z, Zhao Y, Wang X, Chen L, Zhao Z, et al. Follicular fluid exosomes: Important modulator in proliferation and steroid synthesis of porcine granulosa cells. *FASEB J.* 2021;35(5):e21610.
368. Waters PS, McDermott AM, Wall D, Heneghan HM, Miller N, Newell J, et al. Relationship between circulating and tissue microRNAs in a murine model of breast cancer. *PLoS One.* 2012;7(11):e50459.
369. Matveev GA, Khromova NV, Zasytkin GG, Kononova YA, Vasilyeva EY, Babenko AY, et al. Tissue and Circulating MicroRNAs 378 and 142 as Biomarkers of Obesity and Its Treatment Response. *International Journal of Molecular Sciences.* 2023;24(17):13426.
370. Ohlstrom DJ, Sul C, Vohwinkel CU, Hernandez-Lagunas L, Karimpour-Fard A, Mourani PM, et al. Plasma microRNA and metabolic changes associated with pediatric acute respiratory distress syndrome: a prospective cohort study. *Sci Rep.* 2022;12(1):14560.
371. Sandau US, Wiedrick JT, McFarland TJ, Galasko DR, Fanning Z, Quinn JF, et al. Analysis of the longitudinal stability of human plasma miRNAs and implications for disease biomarkers. *Sci Rep.* 2024;14(1):2148.
372. Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods.* 2010;50(4):298-301.

373. Mompeon A, Ortega-Paz L, Vidal-Gomez X, Costa TJ, Perez-Cremades D, Garcia-Blas S, et al. Disparate miRNA expression in serum and plasma of patients with acute myocardial infarction: a systematic and paired comparative analysis. *Sci Rep*. 2020;10(1):5373.
374. Li Y, Zhang L, Liu F, Xiang G, Jiang D, Pu X. Identification of endogenous controls for analyzing serum exosomal miRNA in patients with hepatitis B or hepatocellular carcinoma. *Dis Markers*. 2015;2015:893594.
375. Ourô S, Mourato C, Ferreira MP, Albergaria D, Cardador A, Castro RE, et al. Evaluation of Tissue and Circulating miR-21 as Potential Biomarker of Response to Chemoradiotherapy in Rectal Cancer. *Pharmaceutics*. 2020;13(9):246.
376. Tito C, De Falco E, Rosa P, Iaiza A, Fazi F, Petrozza V, et al. Circulating microRNAs from the Molecular Mechanisms to Clinical Biomarkers: A Focus on the Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Genes (Basel)*. 2021;12(8).
377. Benbaibeche H, Hichami A, Oudjit B, Haffaf EM, Kacimi G, Koceir EA, et al. Circulating mir-21 and mir-146a are associated with increased cytokines and CD36 in Algerian obese male participants. *Arch Physiol Biochem*. 2022;128(6):1461-6.
378. Lischka J, Schanzer A, Hojreh A, Ba-Ssalamah A, de Gier C, Valent I, et al. Circulating microRNAs 34a, 122, and 192 are linked to obesity-associated inflammation and metabolic disease in pediatric patients. *Int J Obes (Lond)*. 2021;45(8):1763-72.
379. Cornejo P-J, Vergoni B, Ohanna M, Angot B, Gonzalez T, Jager J, et al. The Stress-Responsive microRNA-34a Alters Insulin Signaling and Actions in Adipocytes through Induction of the Tyrosine Phosphatase PTP1B. *Cells*. 2022;11(16):2581.
380. Hillari Raj P, Subramanian P, Nehru M, Ayyavoo S, Annamalai N, Prabhu V. Therapeutic Impact of Aerobic Exercise on Adolescents with Obesity and Its Association with Expression of miRNAs and Cytokines: A Clinical Approach. *Medicina (Kaunas)*. 2024;60(3).
381. Li Z, Ma YY, Wang J, Zeng XF, Li R, Kang W, et al. Exosomal microRNA-141 is upregulated in the serum of prostate cancer patients. *Onco Targets Ther*. 2016;9:139-48.
382. Beg F, Wang R, Saeed Z, Devaraj S, Masoor K, Nakshatri H. Inflammation-associated microRNA changes in circulating exosomes of heart failure patients. *BMC Res Notes*. 2017;10(1):751.
383. Chernyshev VS, Rachamadugu R, Tseng YH, Belnap DM, Jia Y, Branch KJ, et al. Size and shape characterization of hydrated and desiccated exosomes. *Anal Bioanal Chem*. 2015;407(12):3285-301.

11. ANEXOS

Anexo 1.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

“Expresión selectiva de microRNAs (*miR-21*, *miR-24*, *miR-34a*, *miR-128-1*) y su asociación con regulación inmunometabólica y el perfil obesogénico en individuos con tejido adiposo disfuncional”

Información para el paciente y forma de consentimiento

Se solicita que lea el siguiente material para asegurarnos que está informado de la naturaleza de este estudio de investigación médica y de cómo participará en el. El reglamento de la ley general de salud requiere el consentimiento informado antes de que participe en este estudio de investigación médica para que pueda entender la naturaleza, beneficios y riesgos de su participación y entonces pueda decidirse a participar o no de manera libre e informada.

Al firmar la forma de consentimiento indicará que ha sido informado y que acepta participar.

Este consentimiento se basa en los lineamientos de las Asociación Médica Mundial “Principios para las investigaciones médicas en seres humanos” referidos en la declaración de Helsinki, Finlandia Junio 1964 y en su última actualización realizada en Washington, 2008.

Se le está solicitando que proporcione una muestra de sangre para ayudar a comprender si en usted se encuentra presente y en qué cantidad unas moléculas llamadas microRNAs y ver si está relacionada con indicadores de obesidad.

OBJETIVO Y REALIZACIÓN DEL ESTUDIO

El objetivo de este estudio es evaluar, comparar e investigar ciertas moléculas y proteínas que componen la sangre. Participarán aproximadamente 180 individuos de México. La participación de cada persona elegida para este estudio consistirá en un examen físico, una toma de muestra sanguínea para evaluar parámetros bioquímicos, así como contestar dos encuestas relativas al estado nutricional.

Para ser elegible en este estudio deberá ser clínicamente sano.

Durante el estudio se hará una visita, en la cual se realizará una exploración física del paciente, además de que se le medirá el peso y la estatura. También se le harán preguntas respecto a su salud general, tratamientos actuales y cualquier problema médico. Las muestras de sangre se obtendrán por punción venosa en el brazo.

Los estudios de laboratorio que se realizarán son: citometría hemática y química sanguínea. La participación en el estudio será sin costo para usted.

RIESGOS E INCONVENIENTES

Las muestras sanguíneas se le tomarán por medio de una aguja.

Este es un procedimiento de rutina cuyo riesgo solo incluye dolor leve en el área de punción.

BENEFICIOS DEL ESTUDIO

Su participación en este estudio puede no beneficiarle directamente. Los beneficios indirectos pueden incluir avance en el conocimiento médico de tal modo que en un futuro los científicos puedan comprender más la fisiopatología o los mecanismos de enfermedad y con ellos diseñar mejores tratamientos para la obesidad.

COMPENSACIÓN

A cada paciente se le entregará una copia de los resultados de los estudios bioquímicos. Los estudios pertinentes a este estudio quedarán a cargo de la unidad investigadora.

PARTICIPACIÓN

Su decisión de participar en este estudio de investigación es completamente voluntaria y puede retirarse en cualquier momento sin perjuicio, sanción o pérdida de beneficios.

CONFIDENCIALIDAD

La confidencialidad de la información relacionada con su muestra sanguínea será protegida en el grado en que lo permita la ley. Para protegerlo contra el riesgo de pérdida de confidencialidad, todas las muestras se marcarán sólo con un número de código y no lo identificarán por su nombre. Los investigadores principales de este estudio tendrán acceso a la información obtenida para fines de análisis y publicación de datos, pero su nombre no será identificado en ningún reporte o publicación resultante de este estudio. Debido a que es necesario otorgar el acceso a esta información a estas partes, no puede otorgarse la confidencialidad absoluta.

RECOPIACIÓN, INVESTIGACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MATERIAL BIOLÓGICO

Estas muestras pueden almacenarse hasta 5 años para utilizarse en el futuro para preguntas científicas de investigación, para entender otros procesos de enfermedad o para otra investigación y desarrollo farmacológico. Usted continuará siendo el propietario de la muestra y conservará el derecho de destruirla en cualquier momento al ponerse en contacto con el investigador responsable.

El investigador será el dueño exclusivo de cualquier dato, descubrimiento o materiales derivados de la muestra y es responsable de la destrucción de las mismas a su solicitud o al final del periodo de almacenamiento,

CONSENTIMIENTO Y LIBERACIÓN

Antes de otorgar mi consentimiento, he sido informado de los métodos y medios de la toma de muestra, así como inconveniencias, peligros y efectos adversos que pueden presentarse en este estudio, también he recibido una copia de esta forma de consentimiento.

Reconozco que he leído y entendido su contenido y he preguntado y recibido la respuesta satisfactoria a cada pregunta que tenía respecto a esta evaluación de investigación y doy mi consentimiento para participar en este estudio, donando muestras de mi sangre y contestando los cuestionarios necesarios. Autorizo la liberación de mis registros médicos para el investigador, comité de ética, y autoridades regulatorias. Al firmar esta forma, no he renunciado a ninguno de mis derechos legales que de otro modo tendría como un participante en un estudio de investigación.

_____	_____	_____	_____
Fecha	Nombre del paciente	Firma	

_____	_____	_____	_____
Fecha	Nombre del paciente	Firma	

_____	_____	_____	_____
Fecha	Nombre del paciente	Firma	

Anexo 2.

Variabilidad de los diámetros de los exosomas según los tamaños medidos y la fuente de los exosomas

Size measured		Method		Exosome source		Reported size, nm		
Geometric	Hydrated	Cryo-TEM	Biofluid/ Cell type	Plasma [10]	Range: 40-200			
				Rat hepatocytes [51]	Mean=57	std=23		
			Cell culture	MLP-29 [51]	Mean=40.9	std=11.2		
				THP-1 [10]	Range: 30-60			
				<i>Dictyostelium</i> [64]	Range: 50-150			
		FF-TEM	Biofluid/ Cell type	Erythrocytes [65]	Range: 50-300			
		Liquid cell AFM	Biofluid/ Cell type	Saliva [48]	Control	Mean=67.4	std=2.9	
				Malaria infected red blood cells [11]	Oral cancer	Mean=98.3	std=4.6	
				MDA-MB-231 cells [66]		Mean=70.6	std=3.92	
				Saliva [49]		Range: 110-561		
					Lateral: 120	Height: 4		
	Desiccated	SEM	Cell Culture	HEK-293T, ECFC, MSC [56]	Range: 30-50			
		TEM	Biofluid/ Cell type	Urine [22]	Mode=45	Range:20-440		
				Placental vesicles [67]	Range: 20-60			
			Cell culture	Serum [68]	Range: 30-100			
				B16-F10 [69]	Range: 50-100			
		AFM	Cell culture	Swan-71 [70]	Range: 95-118			
				P12 [71]	Images with no size quantification			
				MDA-MB-231 cells [66]	Mean = 38	std = 9		
				U87 [50]	Lateral=89	Height = 4		
U251 [50]				Lateral=81	Height = 4			
SKMEL [50]	Lateral=79			Height = 4				
NHA [50]	Lateral=71	Height = 4						
					Mean	Mode	std	
Hydrodynamic	NTA	Biofluid/ Cell type	Serum [17]	126	111	46		
			Serum [55]	-	131.3	-		
			Plasma [55]	-	134.3	-		
			Placental vesicles [67]	250	Range: 40-600			
			Erythrocytes [65]	-	135	-		
			Urine [72]	Female	-	134	54	
				Female	-	131	51	
				Male	-	172	72	
				Male	-	144	54	
			Cell culture	HEK-293T [56]	116	-	27	
		HEK-293T [55]		-	118	-		
		ECFC [56]		113	-	15		
		MSC [56]		107	-	19		
		DLS	Biofluid/ Cell type	Buffy coat [73]	-	54	-	
	Erythrocytes [65]			Mode: 123 on-line SEC Mode: 141 off-line				
	Cell culture		HEK-293T [56]	-	212	168		
			ECFC [56]	-	226	157		
			MSC [56]	-	208	162		
			B16-F10 [69]	-	74	-		
	Swan71 [70]	-	165	-				
					Mean	Mode	std	
Volumetric	Coulter	Biofluid/ Cell type	Serum [68]	120	-	-		
			Uterine fluid and dissociated mucus [74]	100	-	-		
			Erythrocytes [65]	135	-	-		

Líneas celulares: B16-B10 de melanoma de ratón, HEK-293 T de riñón embrionario humano transfectada, MDA-MB-231 de cáncer de mama humano, MLP-29 progenitora de hígado de ratón, P12 de feocromocitoma de rata, SKMEL de melanoma humano, Swan 71 de melanoma humano línea celular de trofoblasto, THP-1 de leucemia monocítica humana, U87 de glioblastoma humano y U251 e de glioblastoma humano.

Abreviaturas. AFM: Microscopía de fuerza atómica, DLS: dispersión dinámica de luz, ECFC: células formadoras de colonias endoteliales, FF-TEM: microscopía de transmisión de electrones de fractura por congelación, MSC: células madre mesenquimales/estromales, NHA: astrocitos humanos normales, NTA: análisis de seguimiento de nanopartículas, SD: desviación estándar, SEC: cromatografía de exclusión por tamaño, SEM: microscopía electrónica de barrido, TEM: microscopía electrónica de transmisión (383).

Anexo 3.

De manera paralela para caracterizar la presencia de exosomas en un modelo celular de TA se realizó la diferenciación de las células 3T3-L1.

La hipertrofia de la línea de preadipocitos 3T3-L1 caracteriza la diferenciación a adipocitos.

La identificación de exosomas se realizó en el siguiente orden:

Primero se obtuvo por ultracentrifugación el FBS libre de exosomas (**Figura 35**).

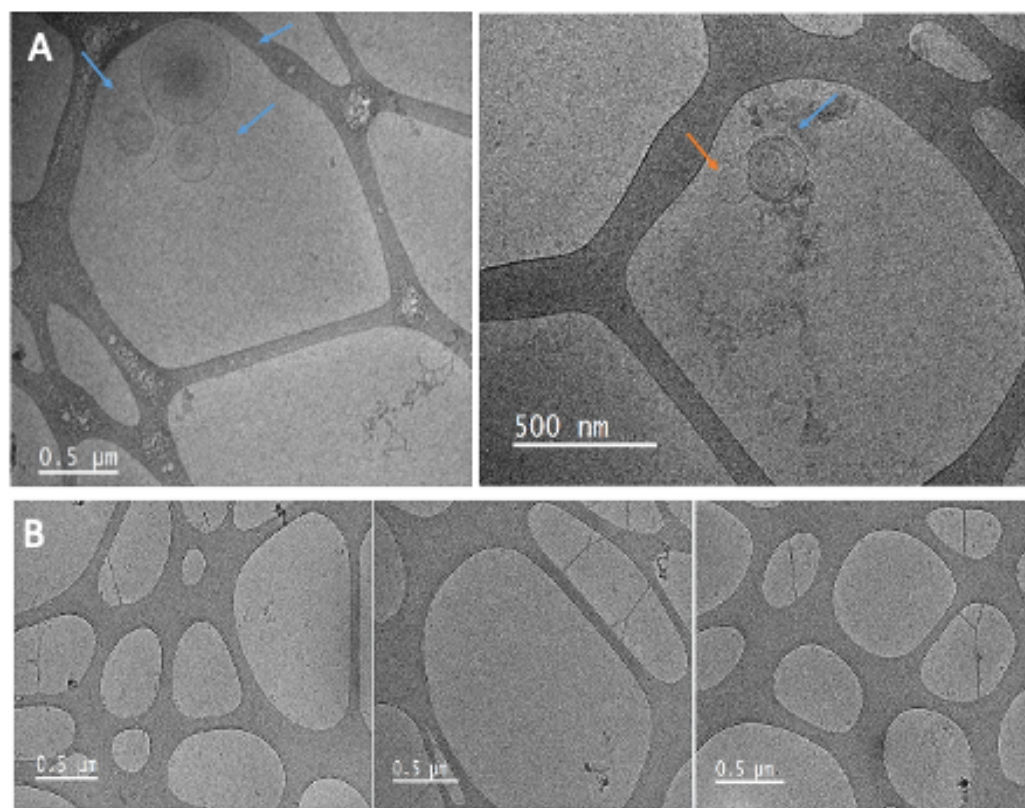


Figura 35 Proceso de obtención de FBS libre de exosomas

A. Microvesículas de 150, 250 y 500 nm. Imagen derecha, dos vesículas de 80 nm (exosoma, flecha naranja) y 250 nm. B. No se observan exosomas. Imágenes por cryo-TEM tomadas en el Servicio de Microscopia de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Los preadipocitos 3T3-L1 cultivados con FBS libre de exosomas al día 20 mostraron morfología compatible con adipocitos maduros, representada por el incremento en número y tamaño de gotas de lípidos en su citoplasma (**Figura 36**). En el escenario de cultivo de preadipocitos primero, la proliferación y diferenciación celular se observan en las imágenes del día 0 al día 4, (**Figura 36A-B**). Y las imágenes documentadas en los días 12 y 20 muestran acumulación de lípidos en el citoplasma de las células (**Figura 36C-D**). Al día 43 se observa el fenotipo de adipocitos maduros similar al TA (**Figura 36E**).

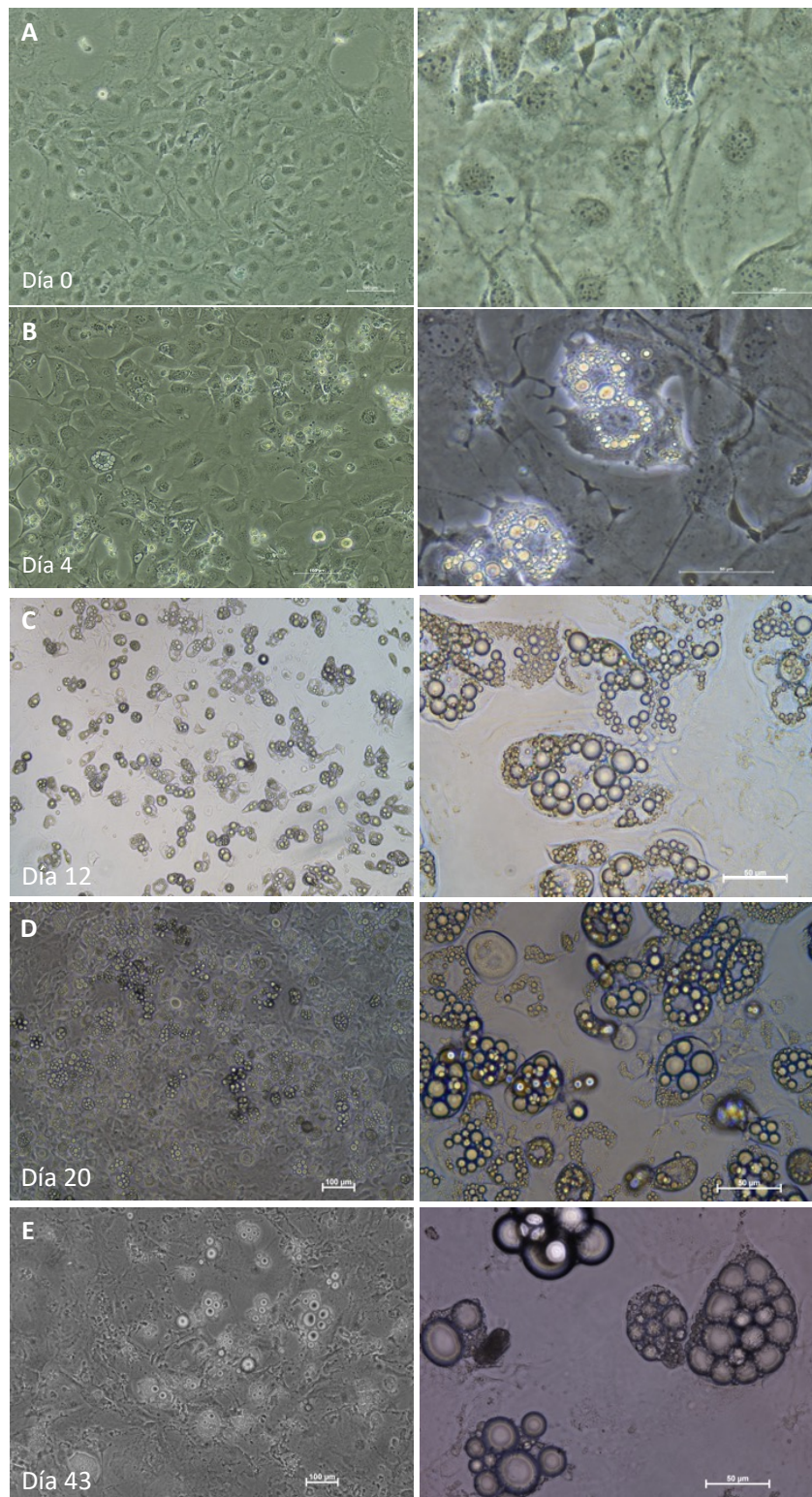


Figura 36 Diferenciación de la línea celular de preadipocitos 3T3-L1

Fotomicrografías de la diferenciación de células 3T3-L, observadas directamente en frascos de cultivo. Técnica de contraste de fases. A. Día 0, medio MDI, fenotipo de preadipocitos. B. Día 4, a las 72 horas con MDI ya se observan pequeñas gotas de lípidos y crecimiento de los adipocitos. Después de se cambió a MDII. C. Día 12 con MDII, el tamaño de las gotas de lípidos aumenta, y se observa fusión entre ellas. D. Día 20 con MDII, incrementa la fusión de las gotas pequeñas. E. Día 43 con MDII, presentan **fenotipo de adipocito maduro**, con una única gota de lípidos. Nikon Inverted Routine Microscope ECLIPSE Ts2. Imágenes del lado izquierdo con escala de 100μm (10x), derecha 50μm (40x).

La disminución en el aporte de oxígeno mantiene la integridad celular mientras que disminuye la vida media de los adipocitos.

De forma alterna el cultivo de células 3T3-L1 a partir del día 19 se realizó en ambiente anaerobio y se observó que la morfología celular a las 2.5 horas se mantuvo estable, mientras que a las 24 horas se observaron células con gotas pequeñas de lípidos y desintegración celular (**Figura 37A-B**). Al día 43 las células se tiñeron con Oil Red O (ORO) en las que se observan diferentes patrones de la acumulación de gotas de lípidos (**Figura 37C**).

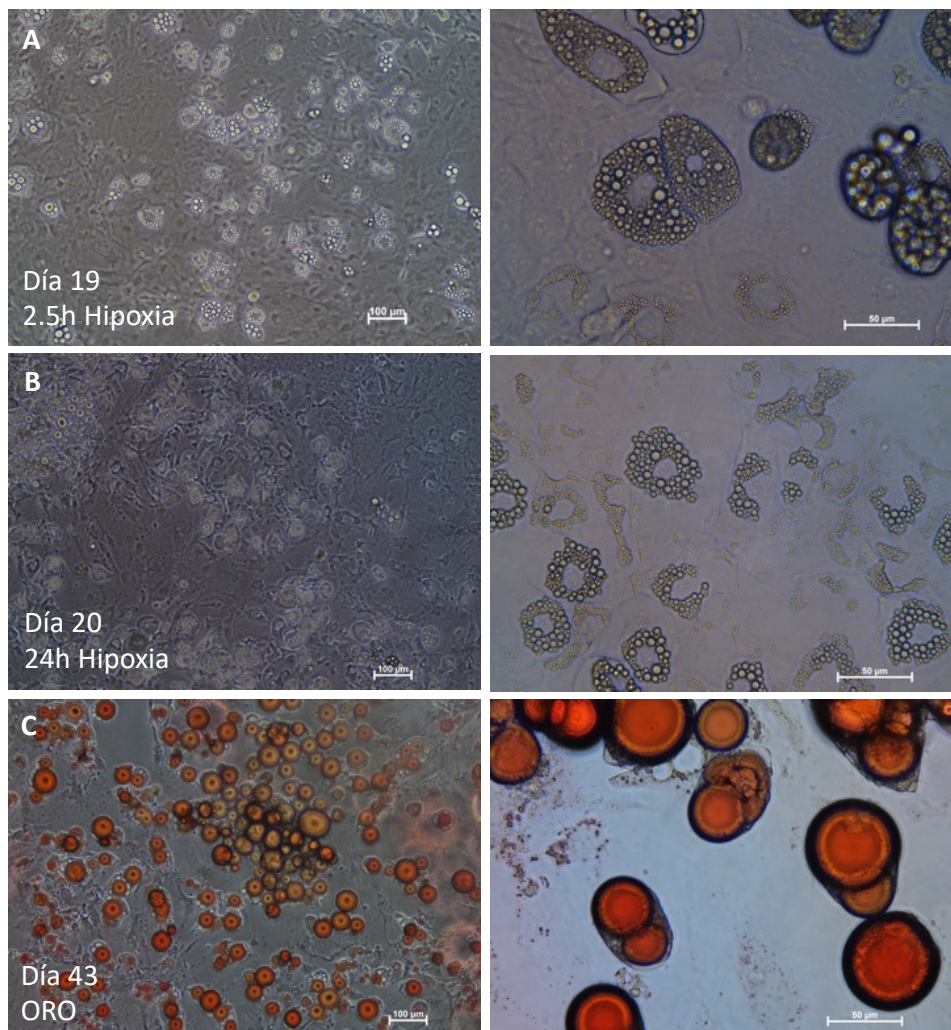


Figura 37 Preadipocitos 3T3-L1 hipóxicos y tinción de ORO

Fotomicrografías de la diferenciación de células 3T3-L en ambiente anaerobio, observadas directamente en frascos de cultivo. Técnica de contraste de fases. A. Día 19: células en ambiente anaerobio por 2.5, no se observa cambio morfológico de los adipocitos. B. Día 20, células en ambiente anaerobio por, se observa cambios en la morfología (flecha naranja). C. Tinción con Oil Red O (ORO) al día 43 en normoxia. Se observa en rojo los diferentes patrones de acumulación de gotas de lípidos. Imágenes del lado izquierdo con escala de 100µm (10x), derecha 50µm (40x).

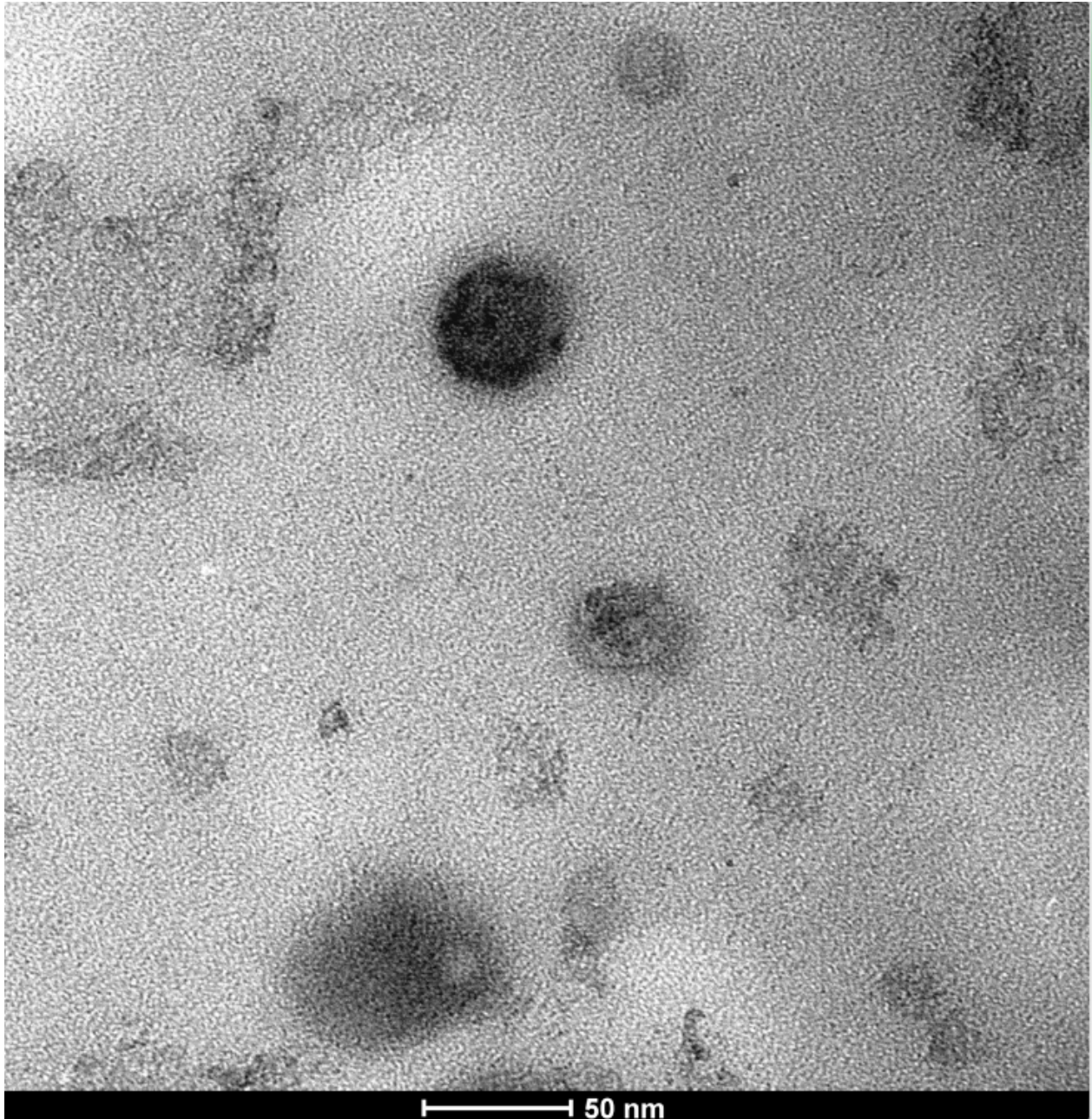
En el proceso de obtención de exosomas en el sobrenadante del cultivo celular, no se obtuvo rendimiento para el análisis de proteínas y *microRNAs*.

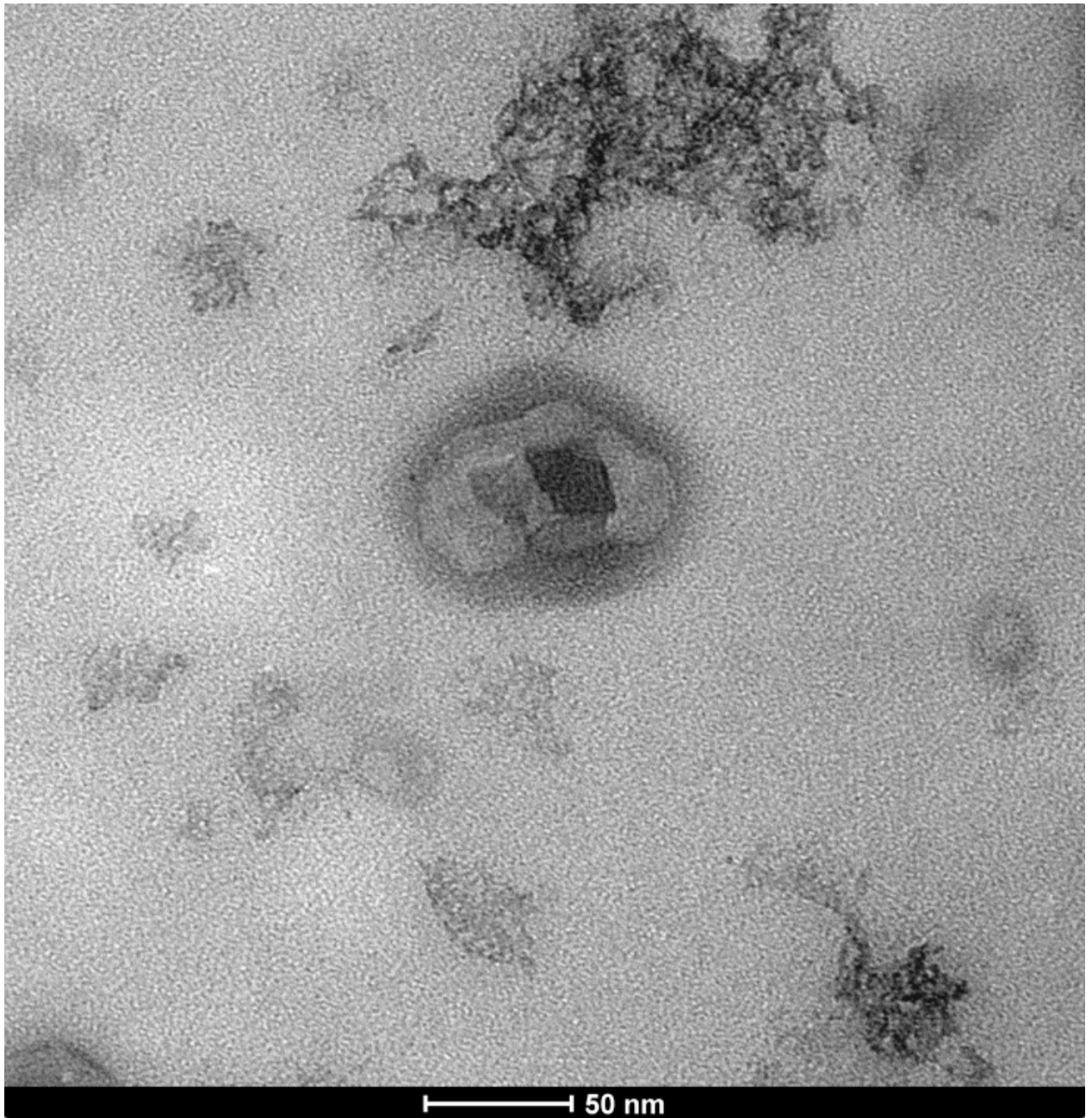
12. FOLIO DE FOTOGRAFÍAS

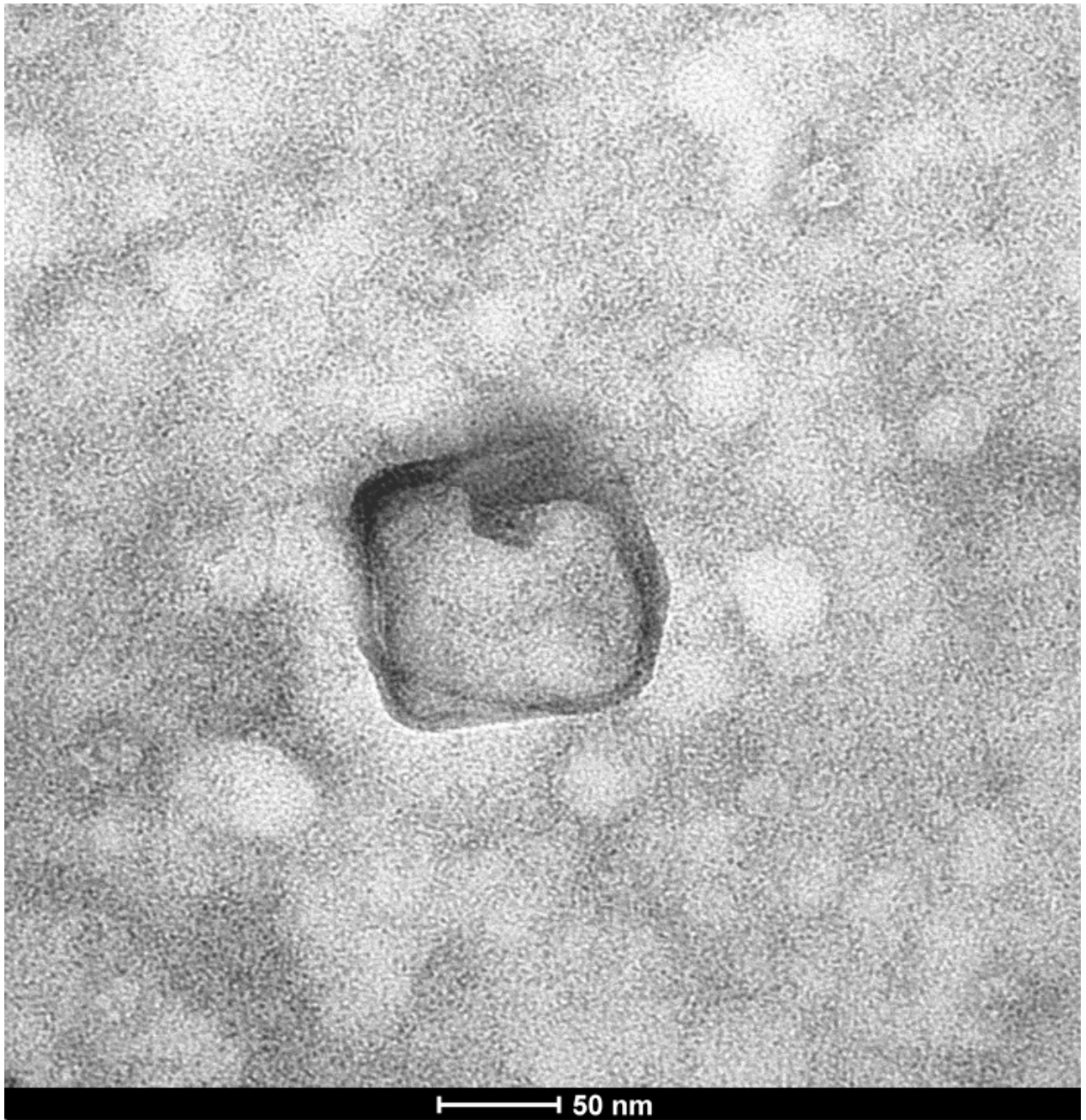
Microscopia Electrónica de trasmisión

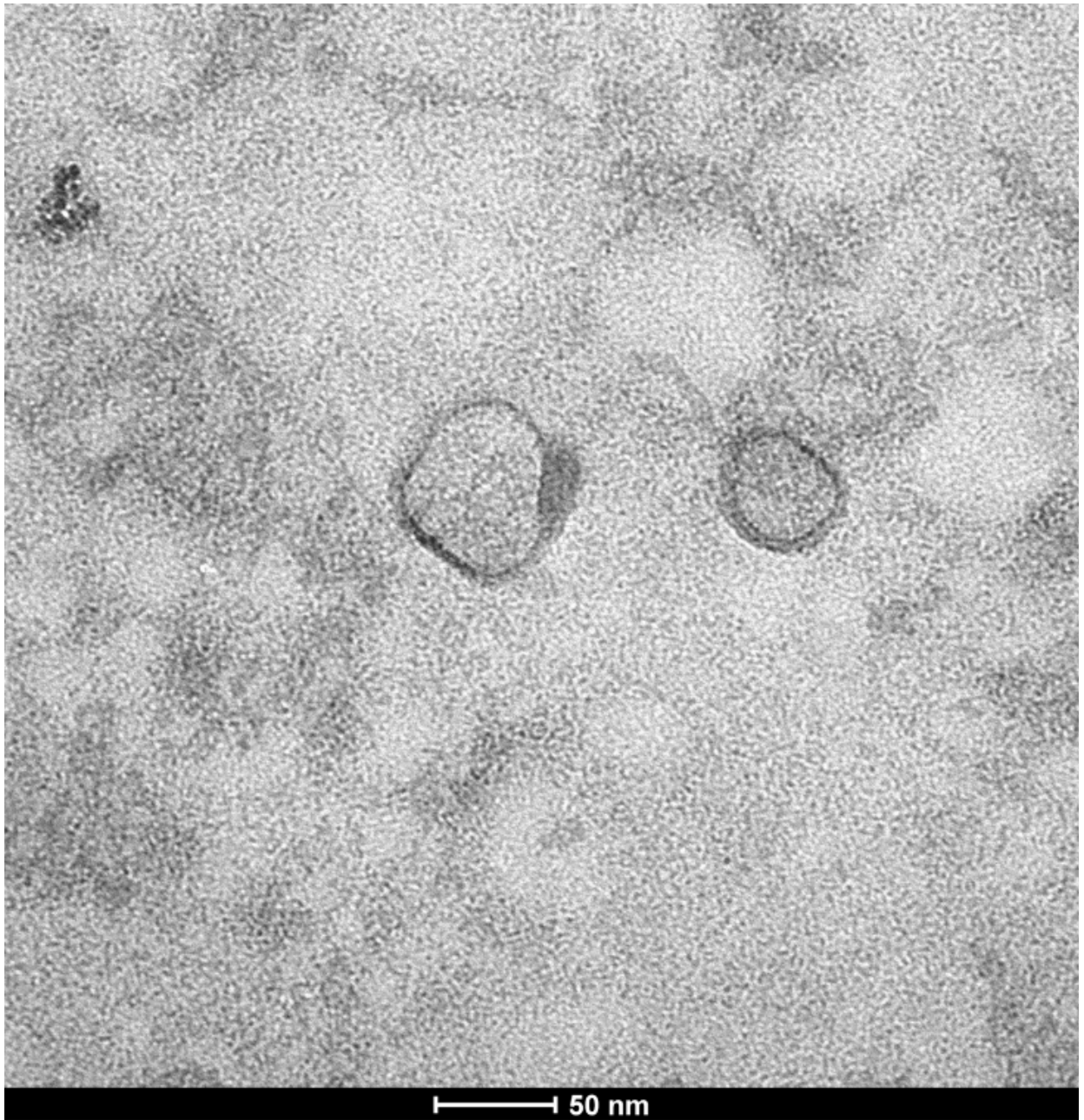
Transmission Electron Microscopy FEI Technology, Model Tecnai Spirit BioTwin, software FEI TIA 4.15. Imágenes tomadas en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

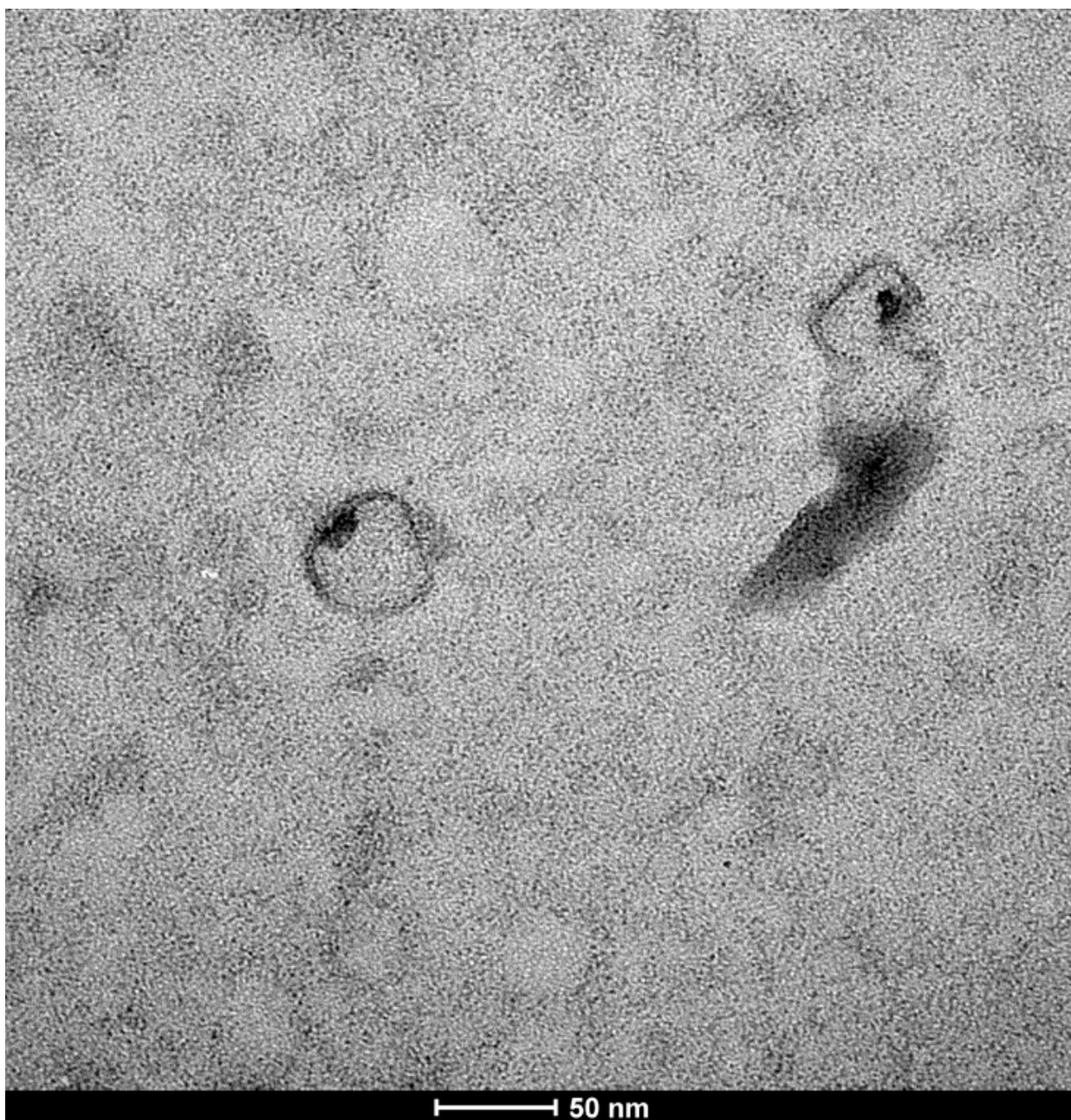
- I. Exosomas de plasma de individuos con normopeso, hombres y mujeres. Aislados por kit comercial.





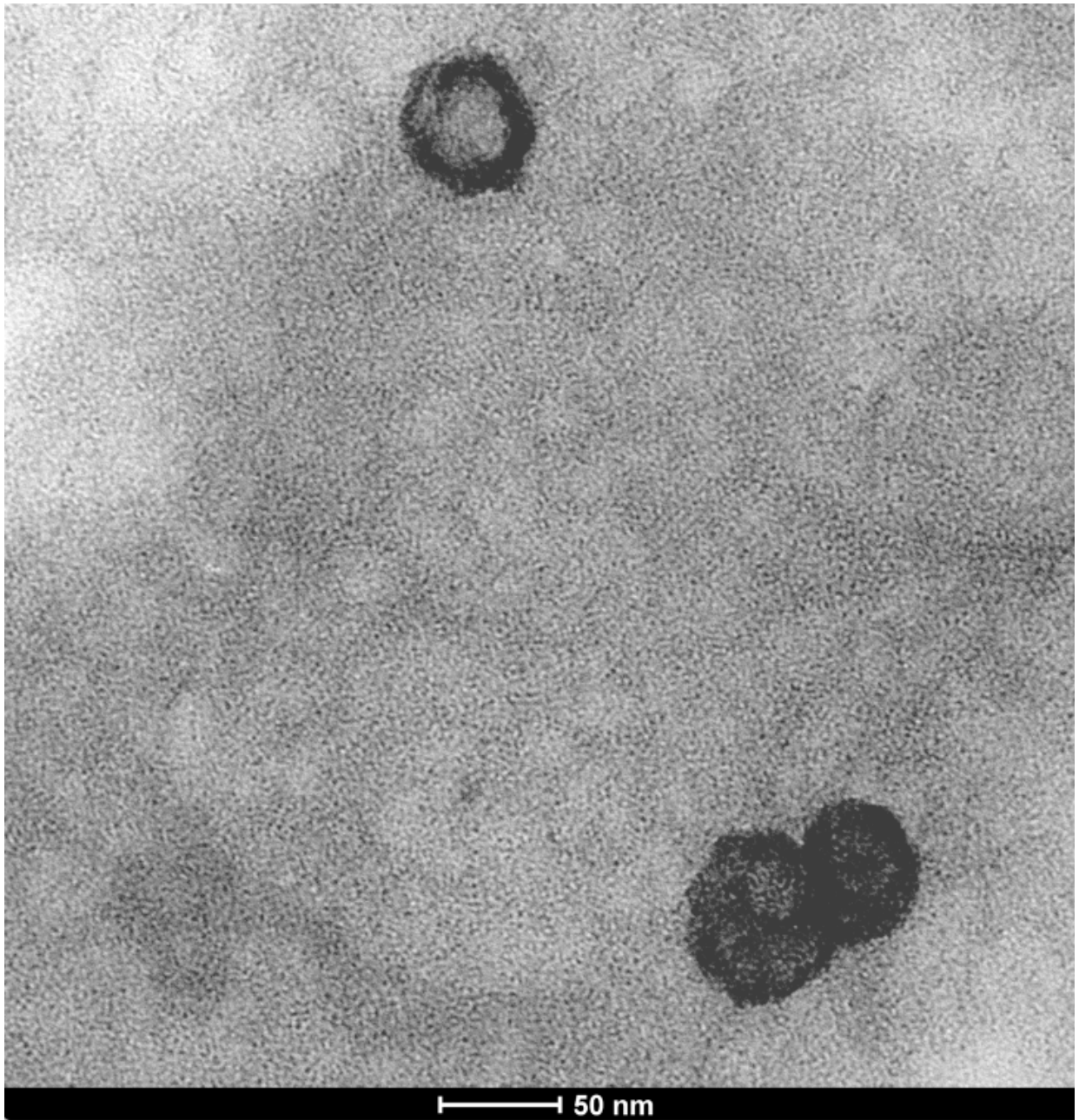


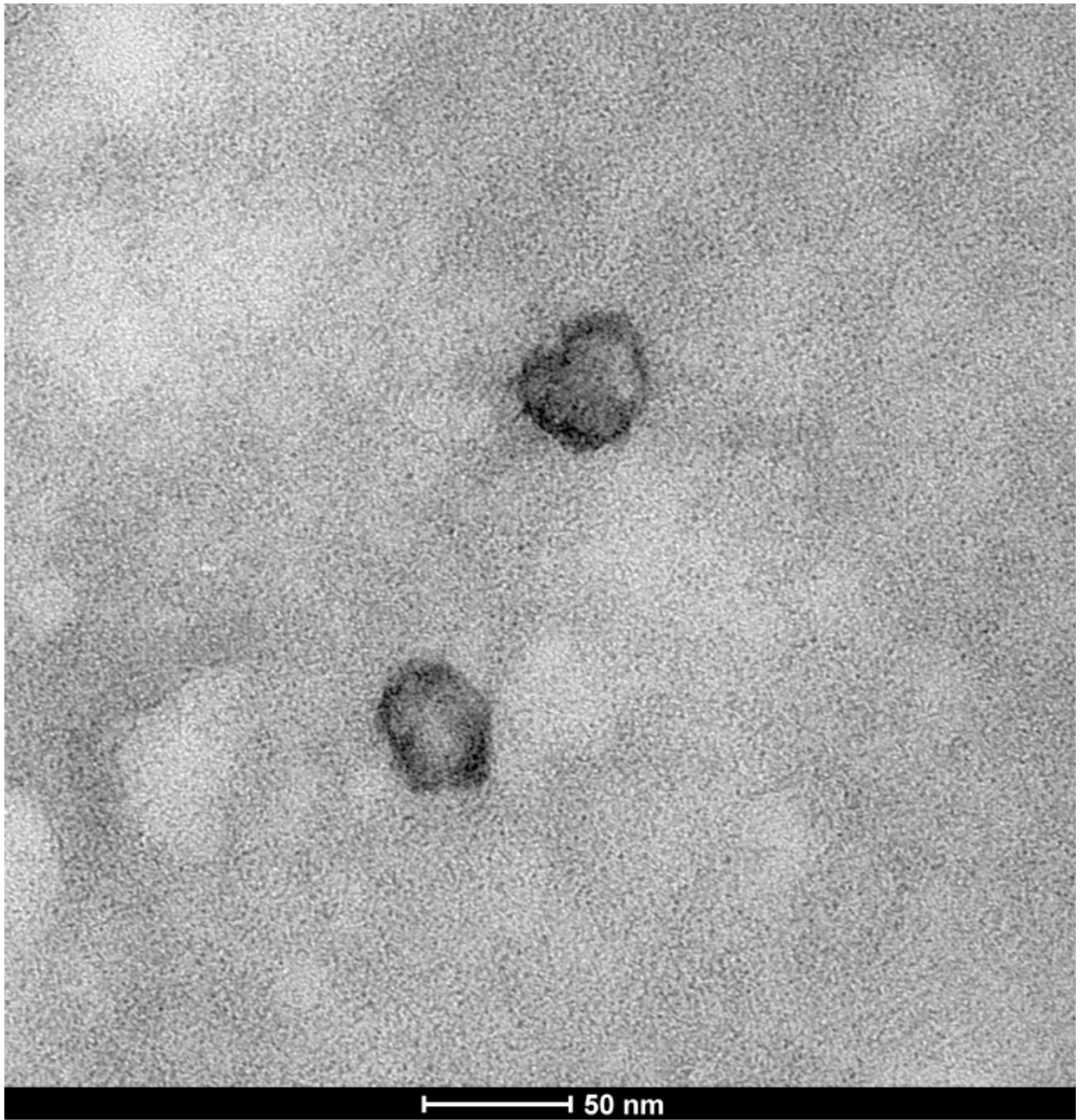


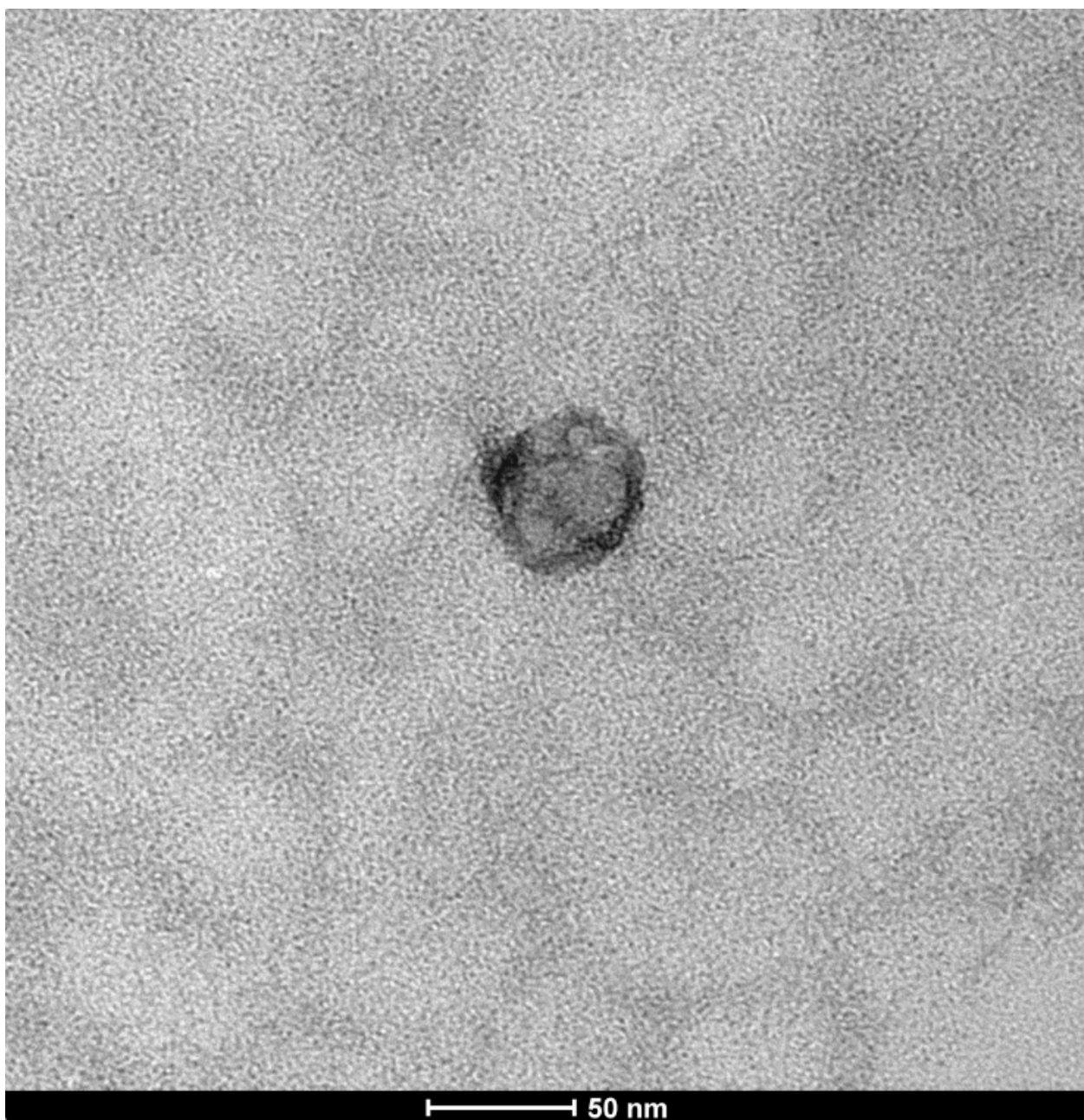


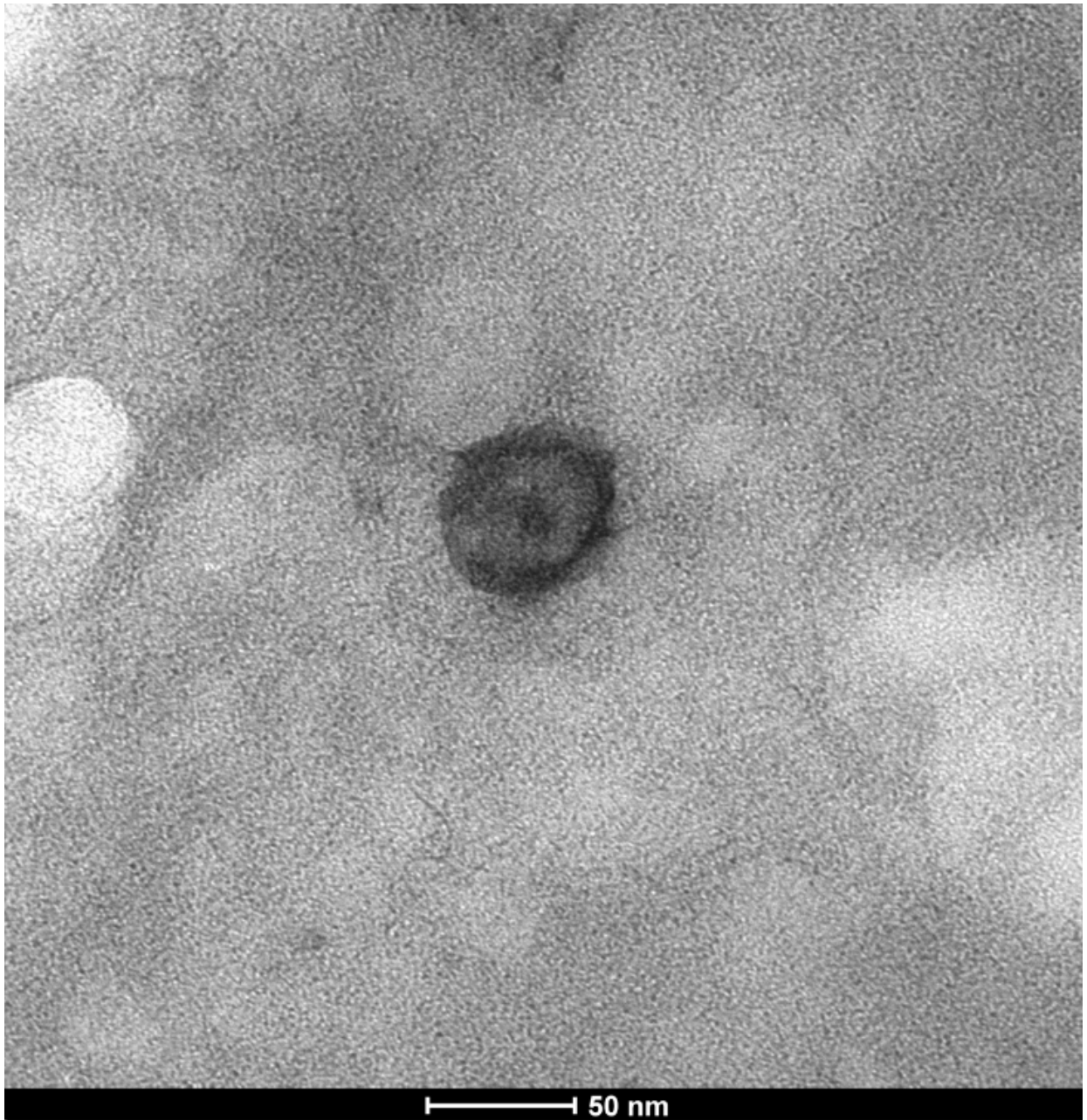
II. Exosomas de plasma de individuos con sobrepeso, hombres y mujeres. Aislados por kit comercial.







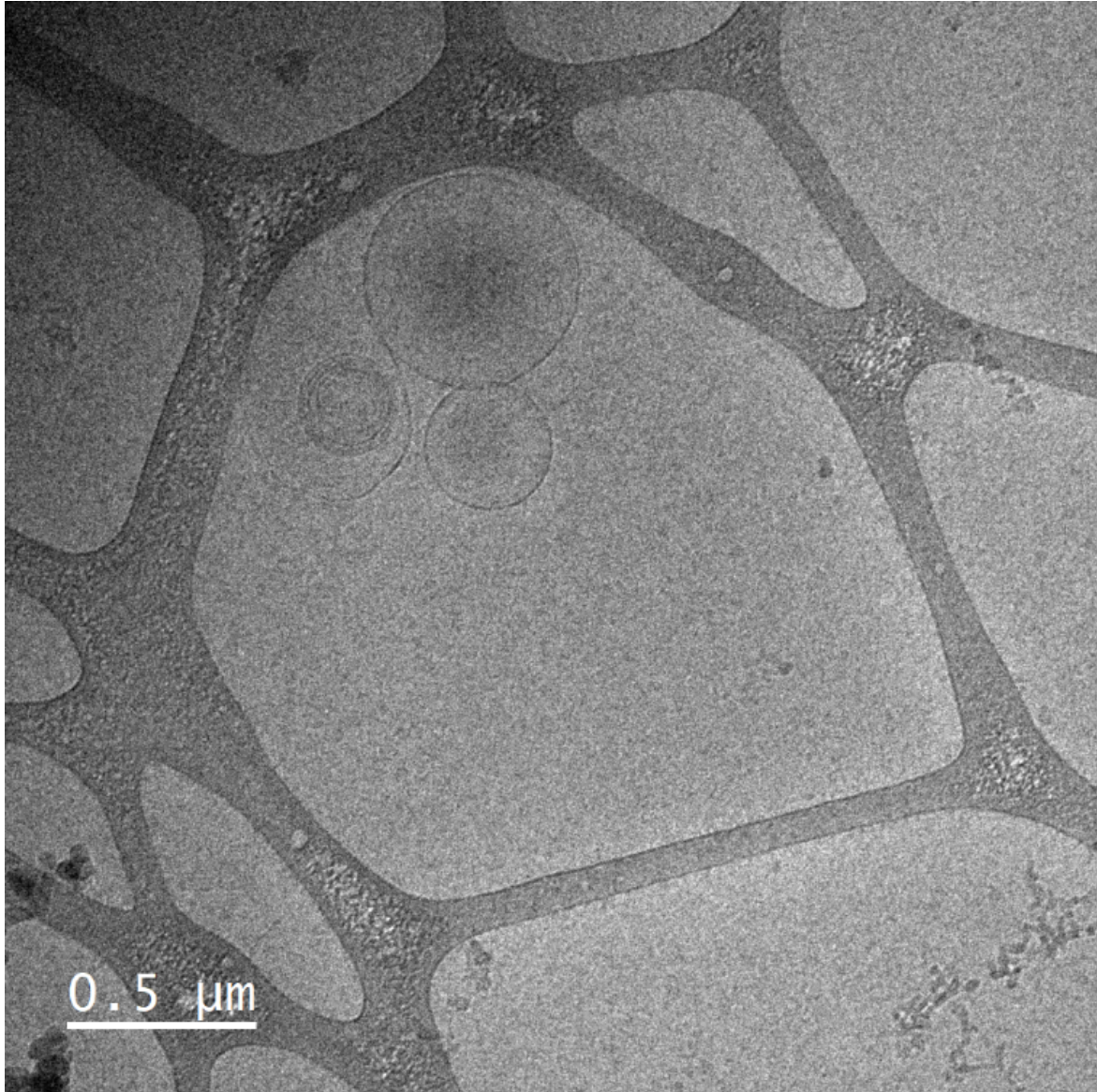


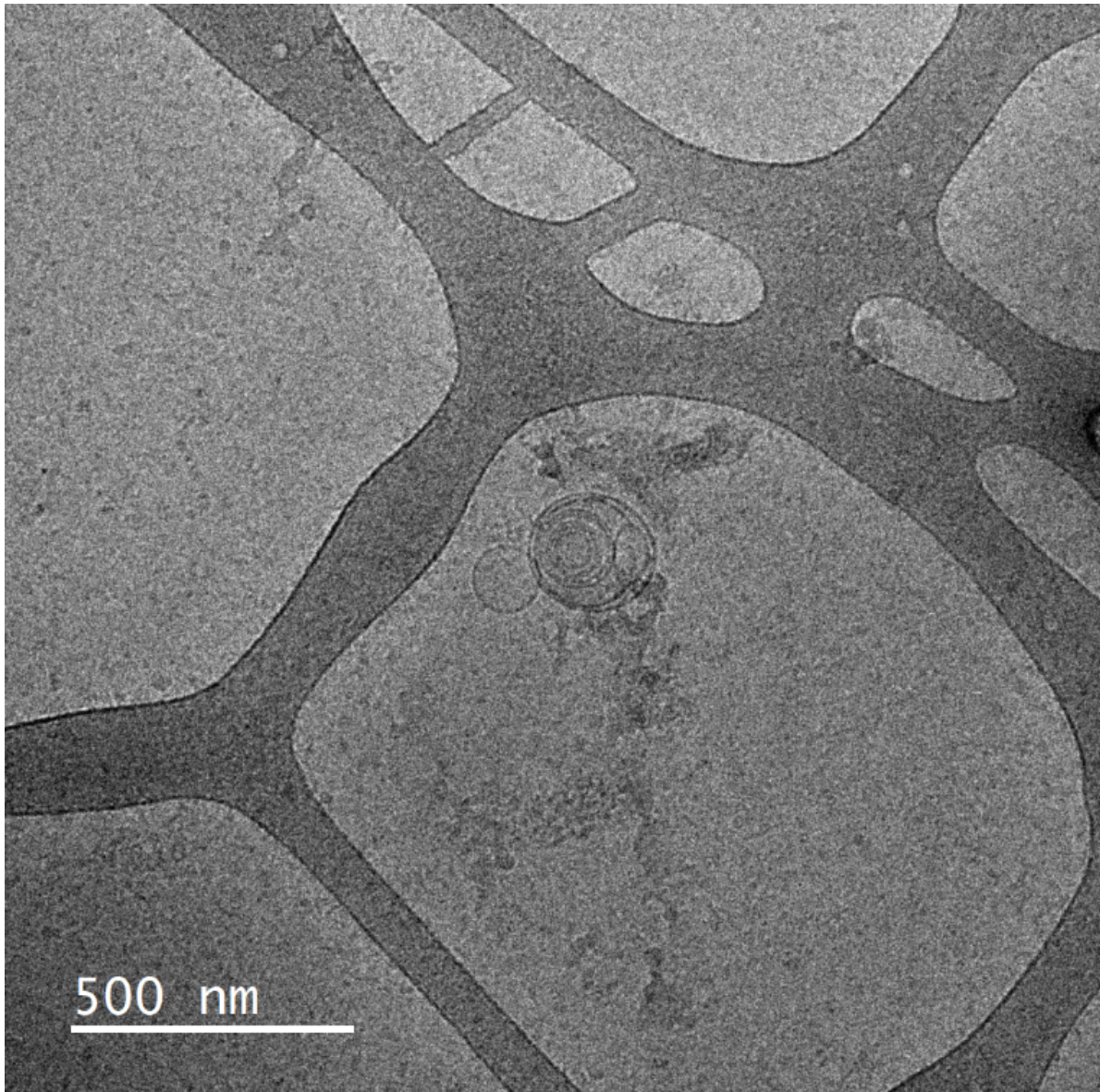


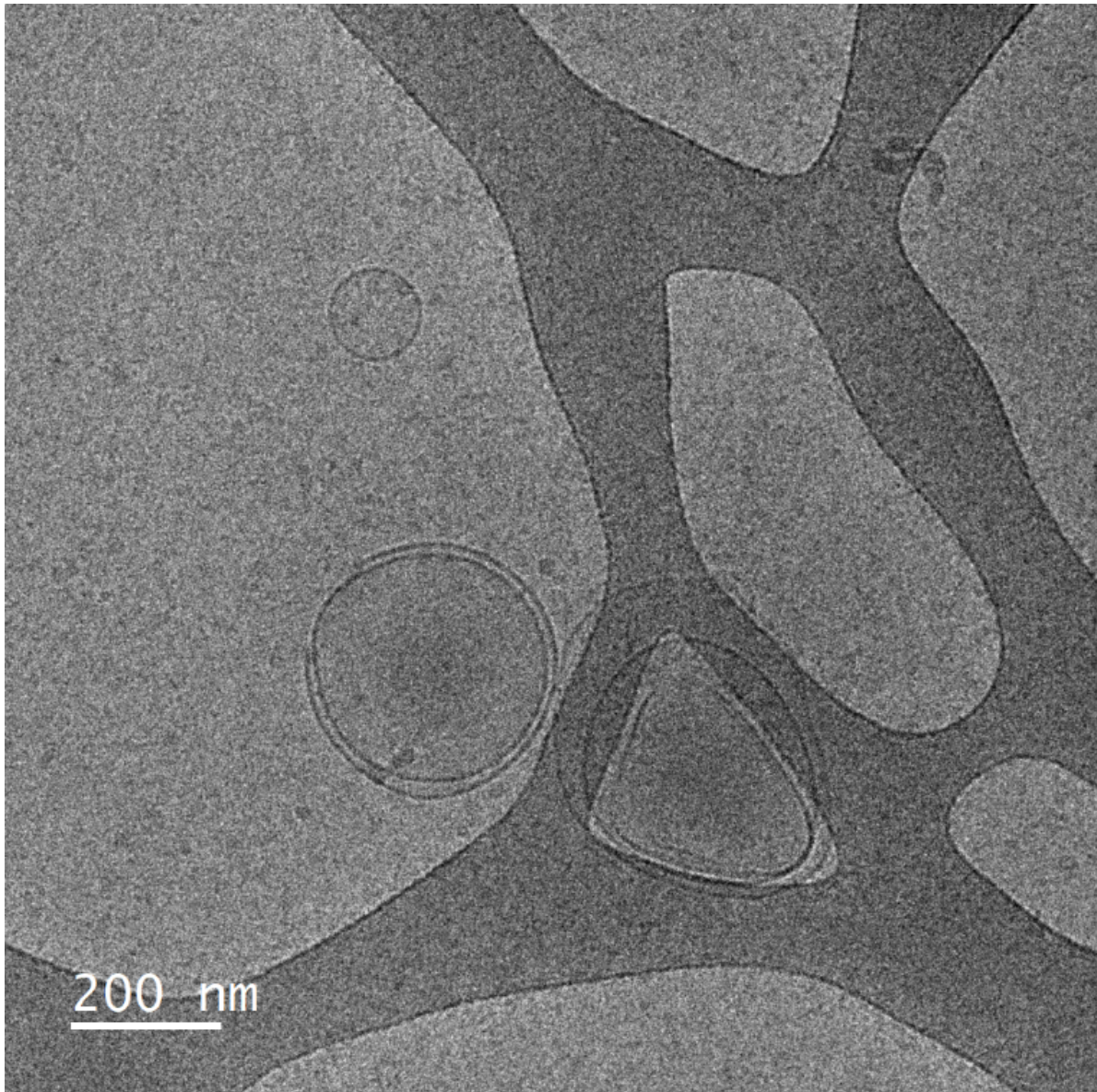
Microscopia Electrónica de transmisión – criogénica

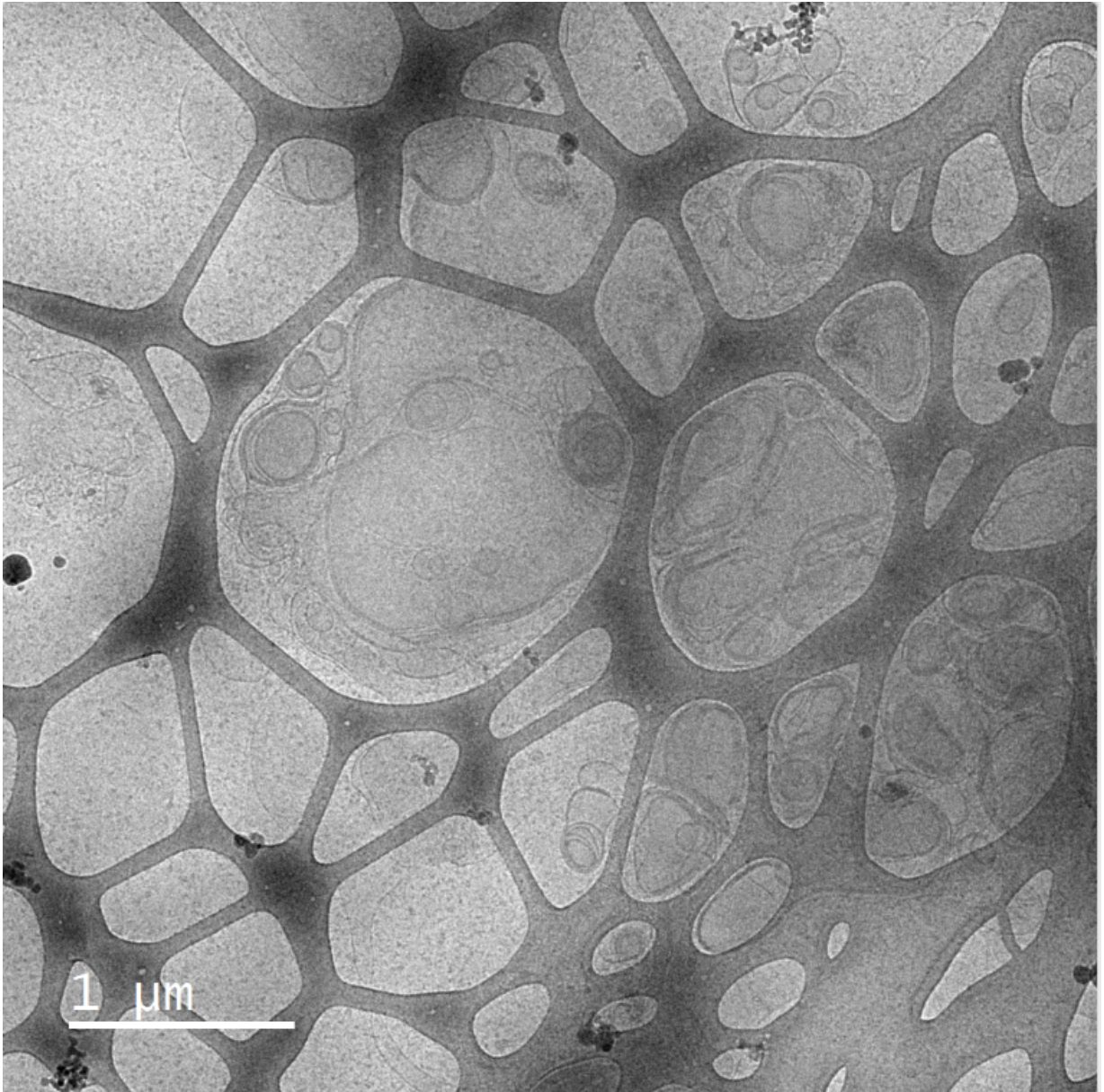
Transmission Electron Cryo-Microscopy (cryo-TEM, Jeol JM-2011, Tokyo, Japan). Imágenes tomadas en el Servei de Microscòpia. Serveis Científic-tècnics de la UAB.

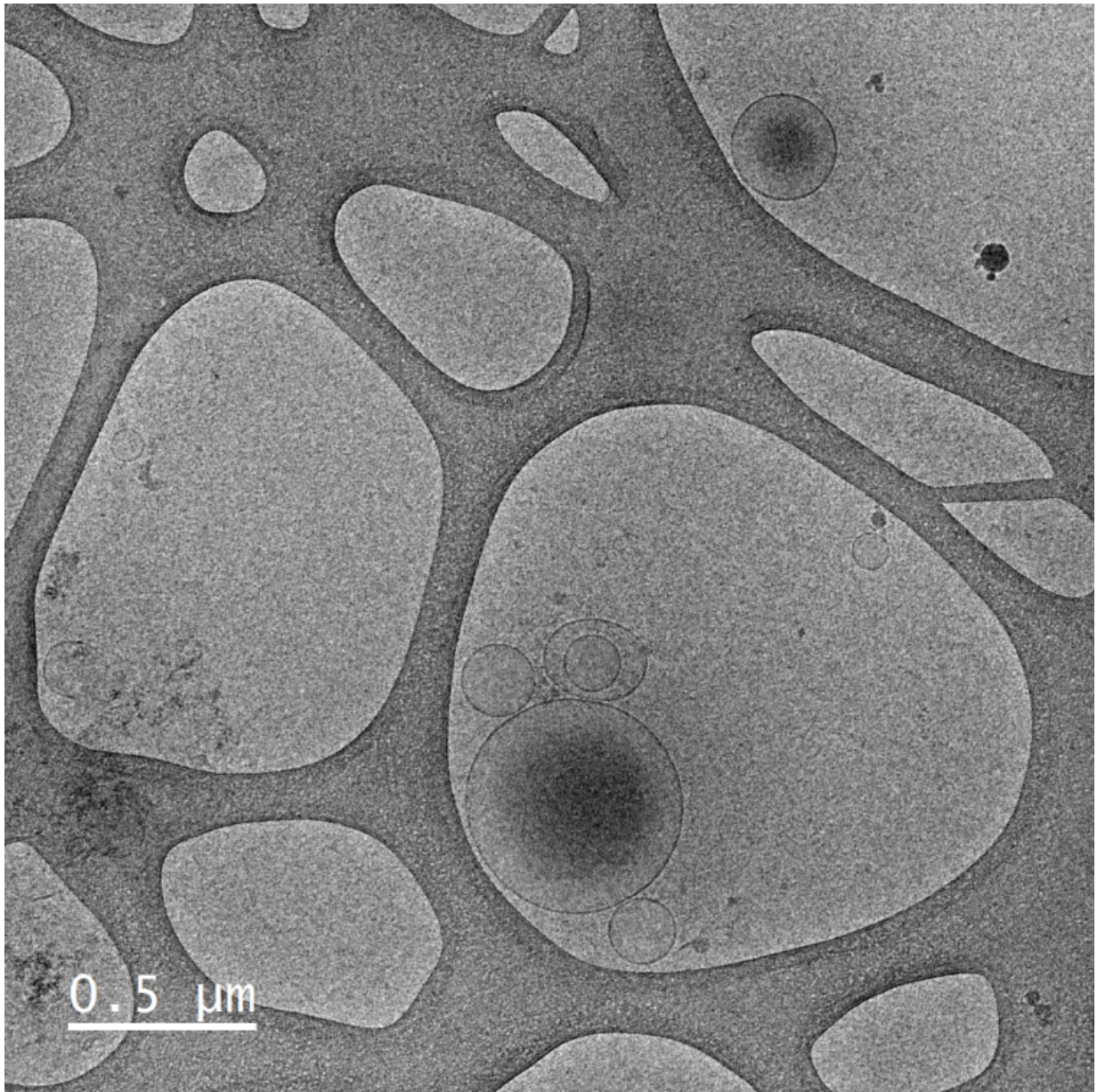
I. Microvesículas de en suero fetal bovino aisladas mediante ultracentrifugación.



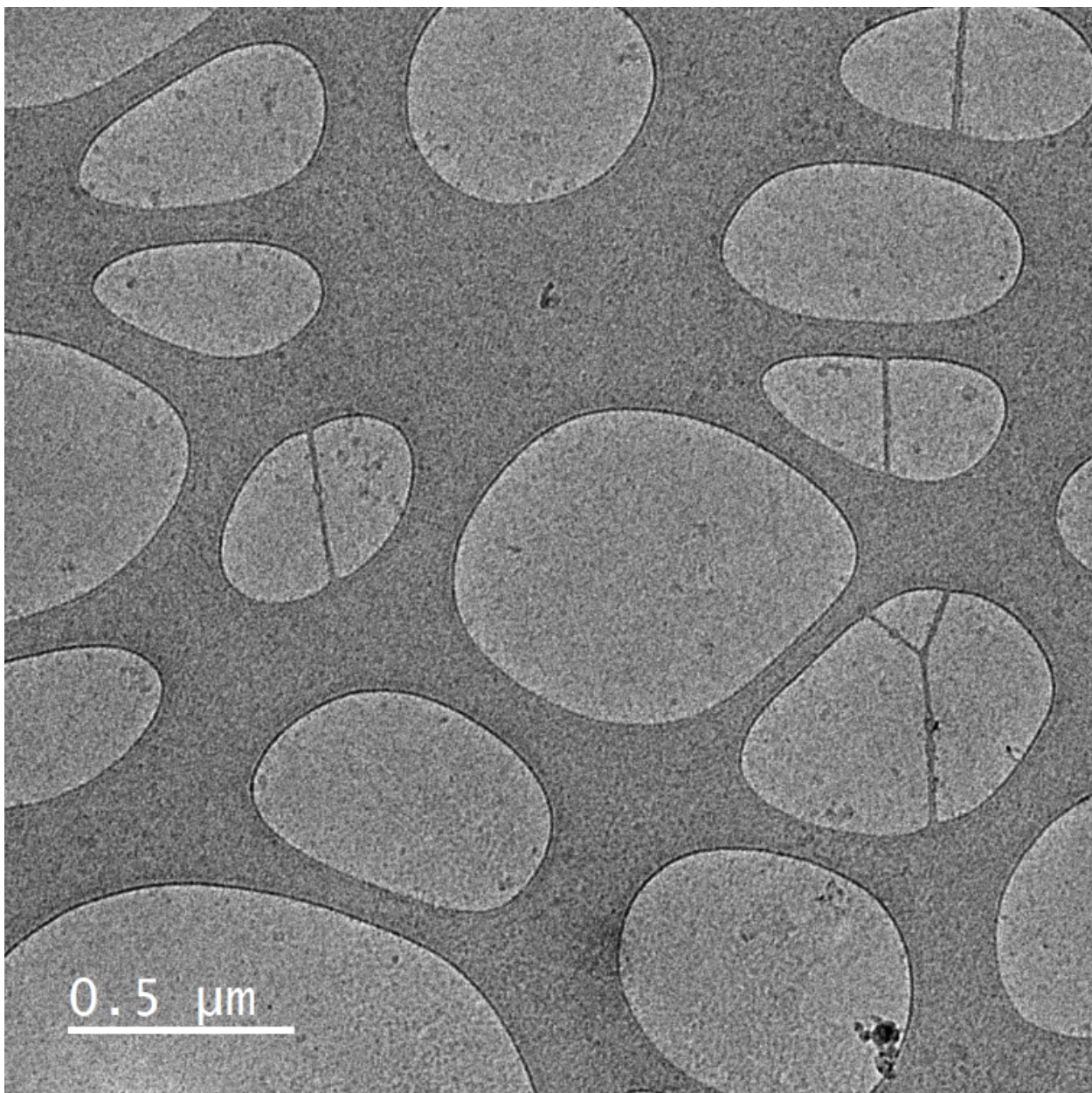


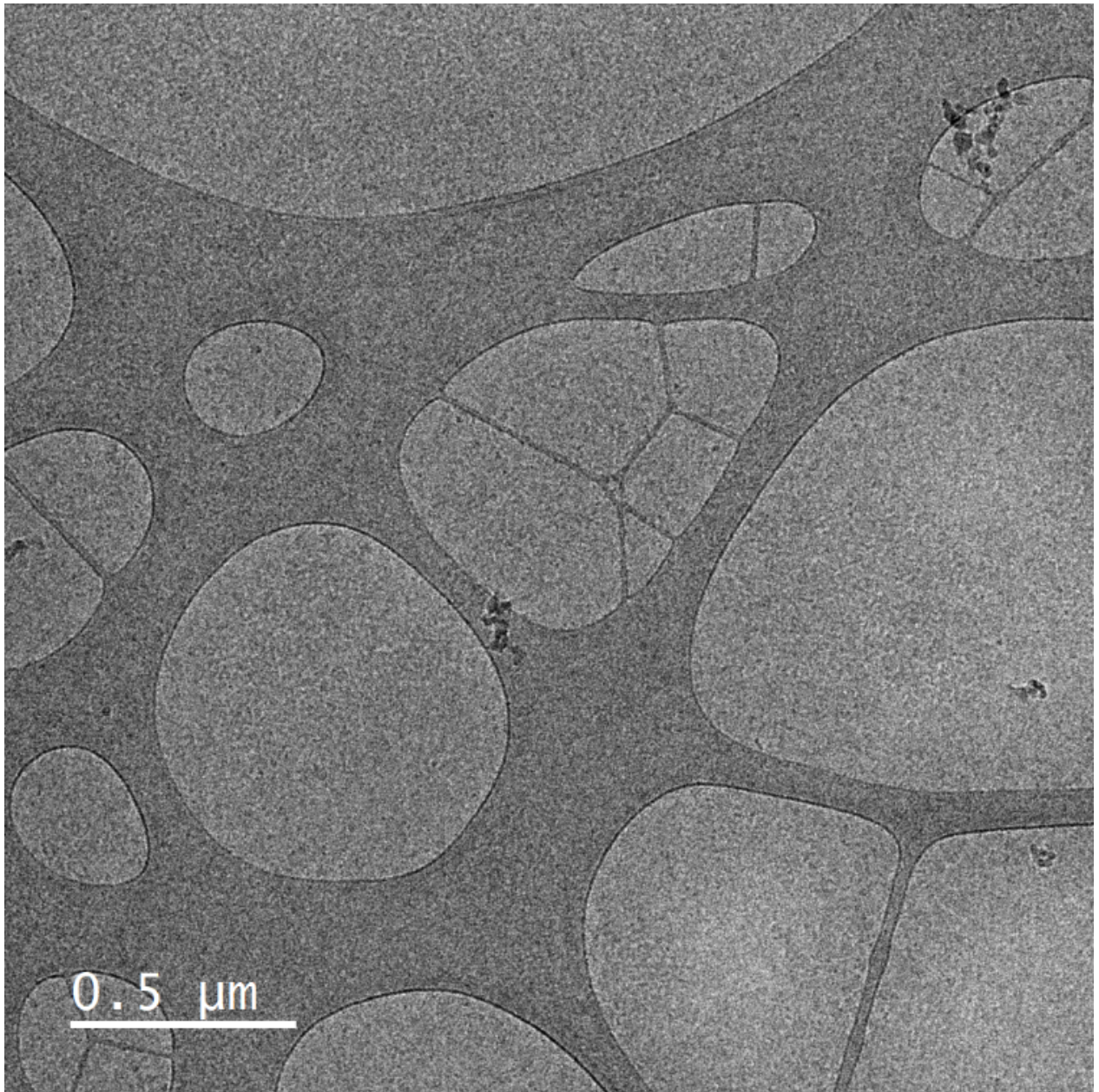


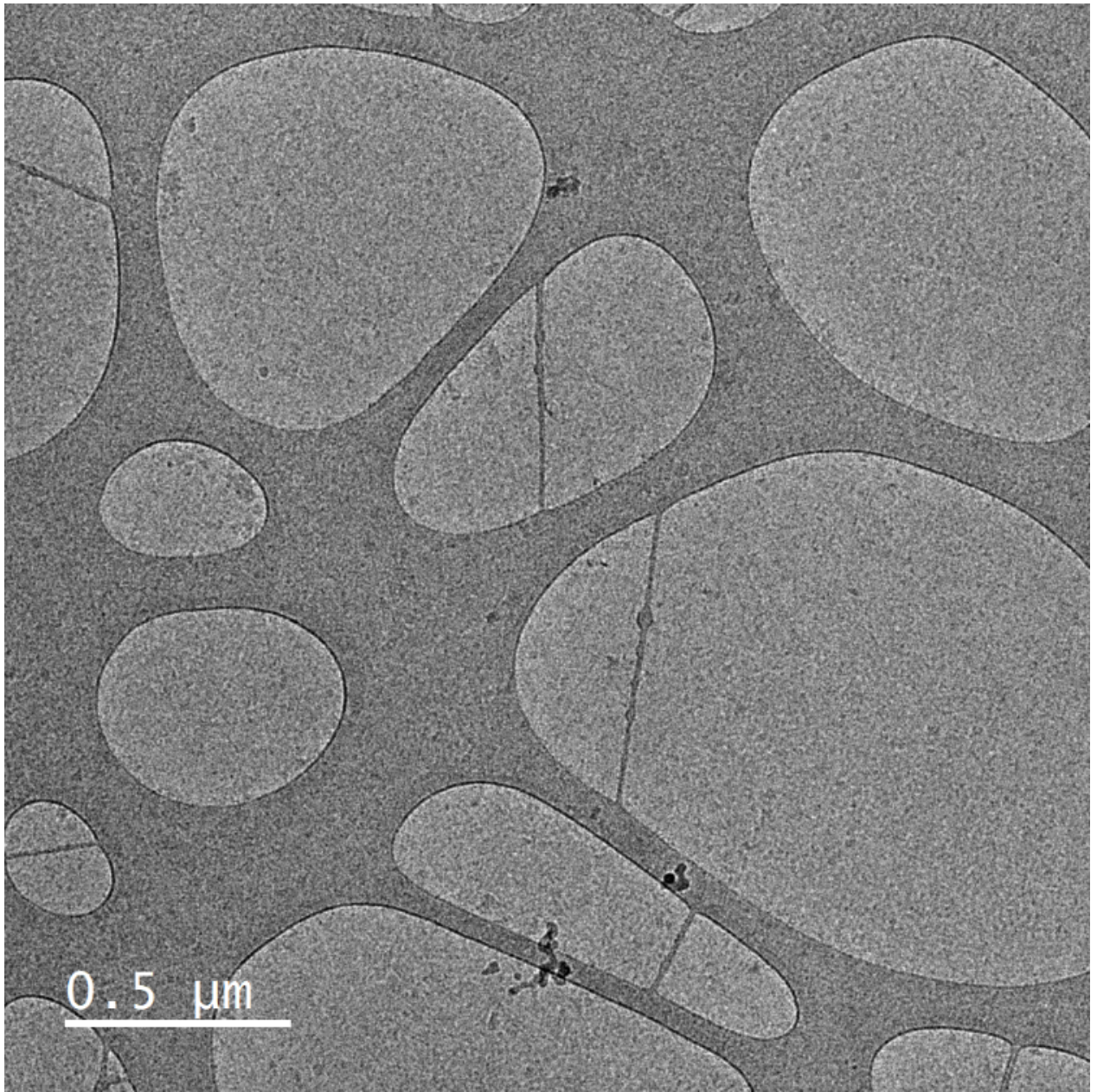


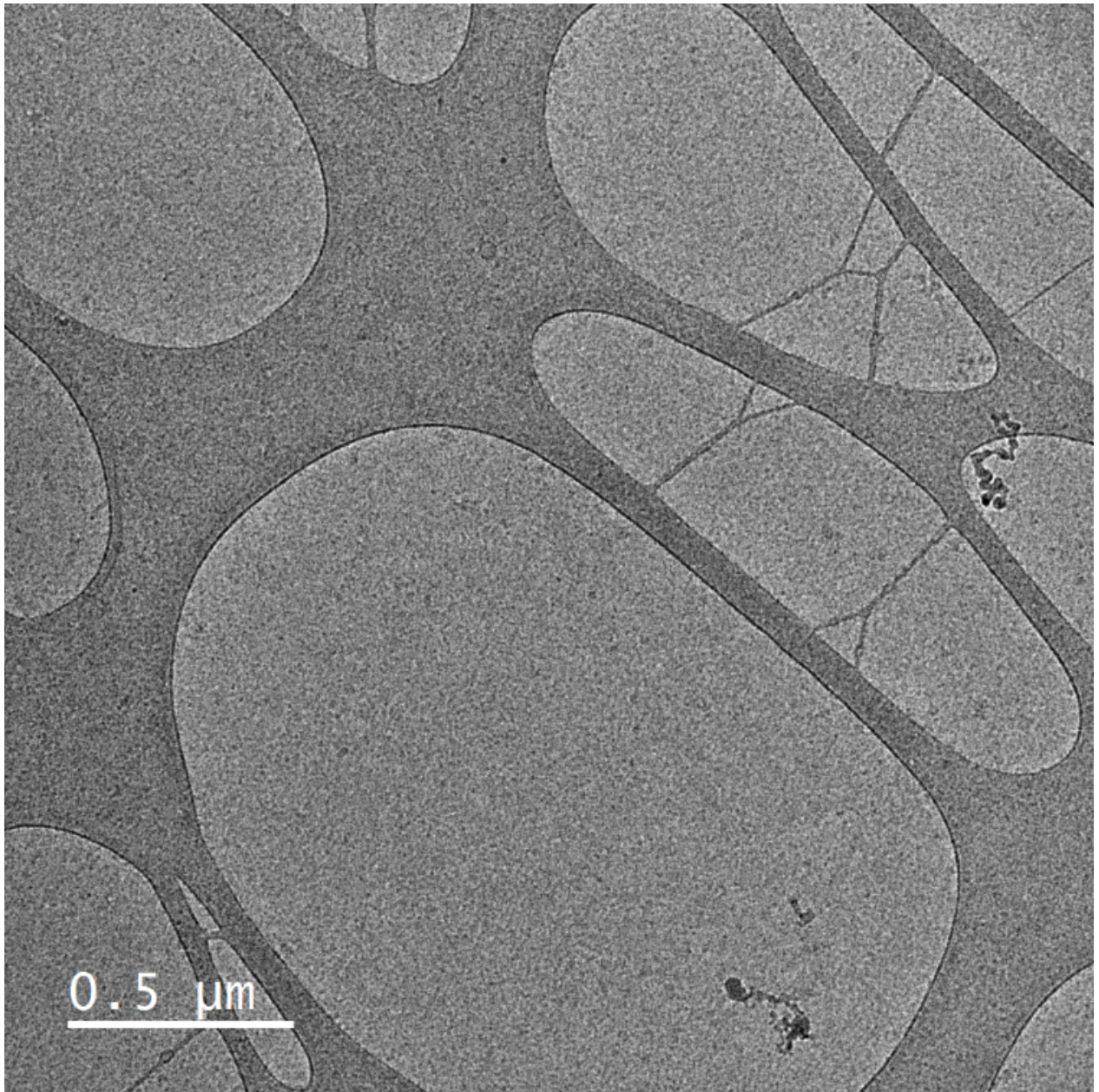


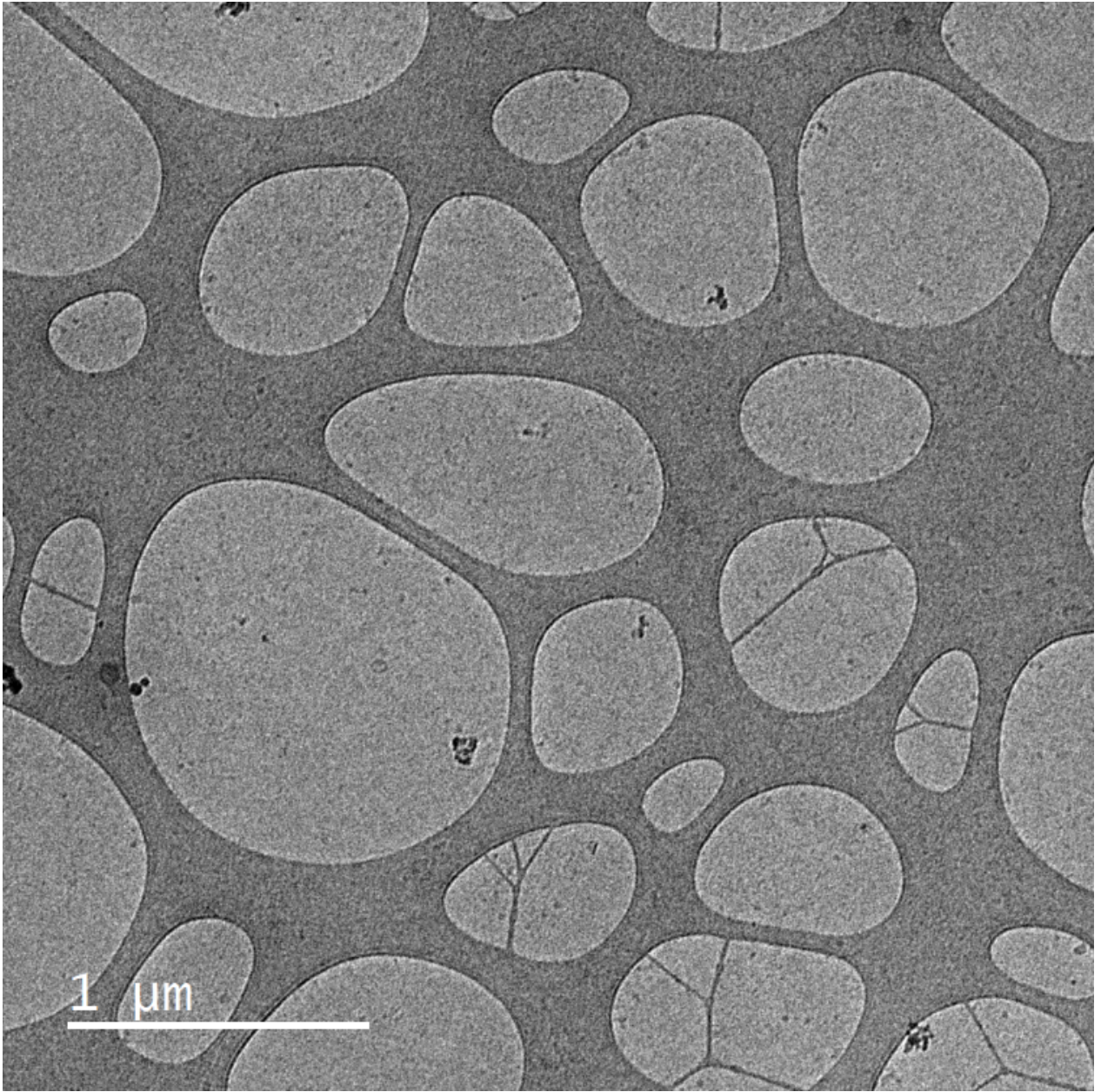
II. Suero fetal bovino libre de exosomas



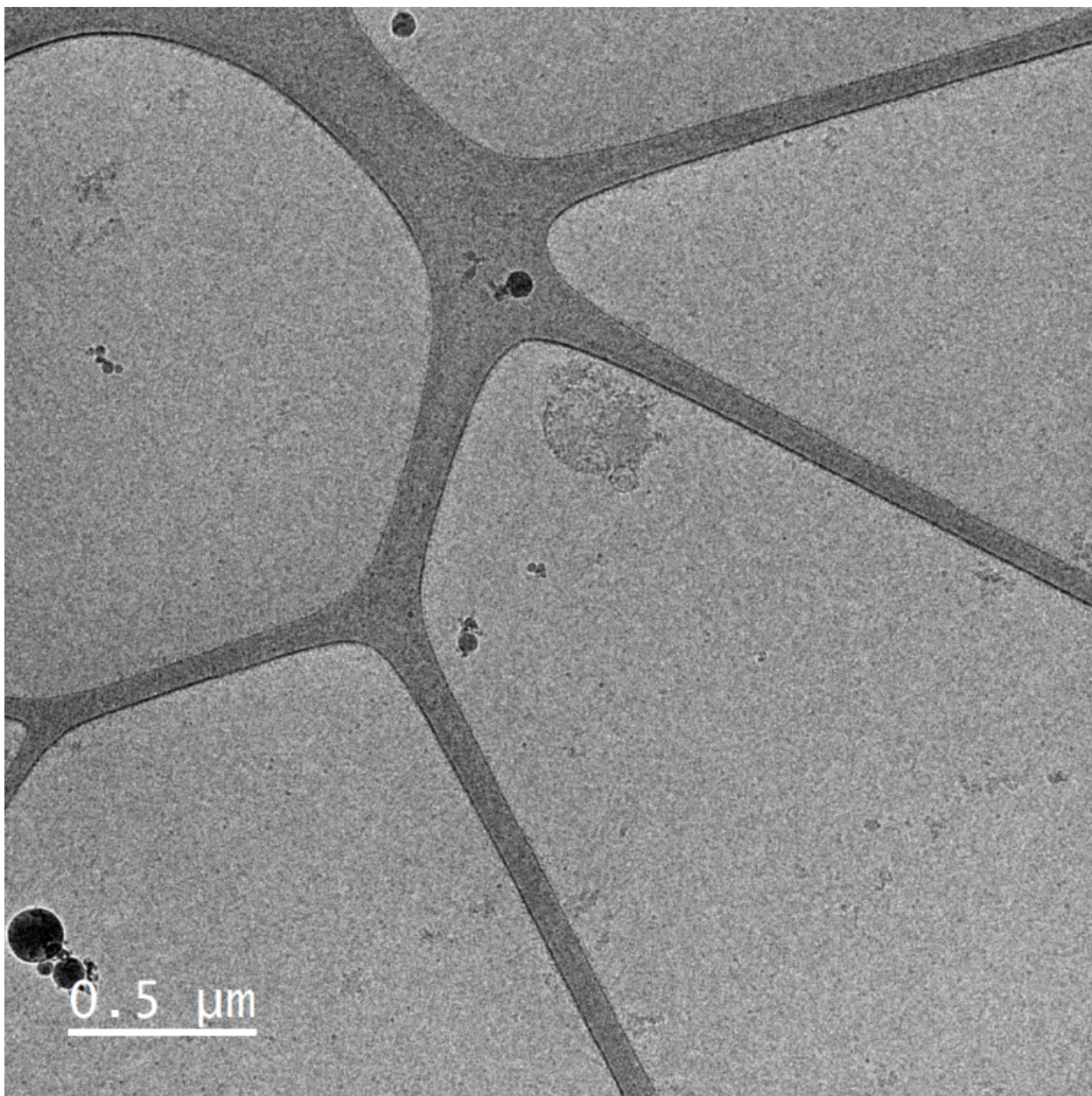


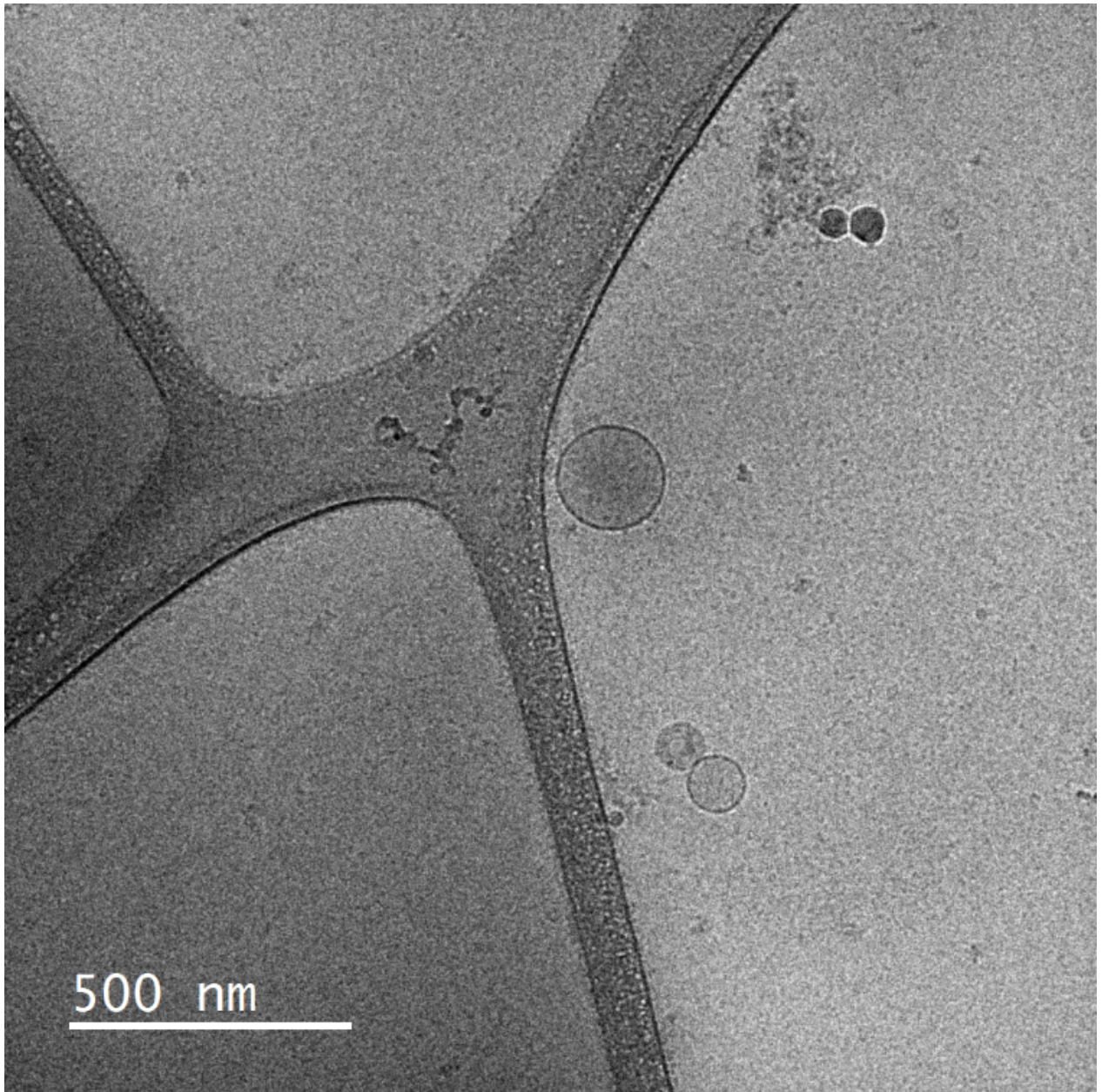






III. Exosomas de suero sanguíneo de individuo normopeso. Aislados por SEC.



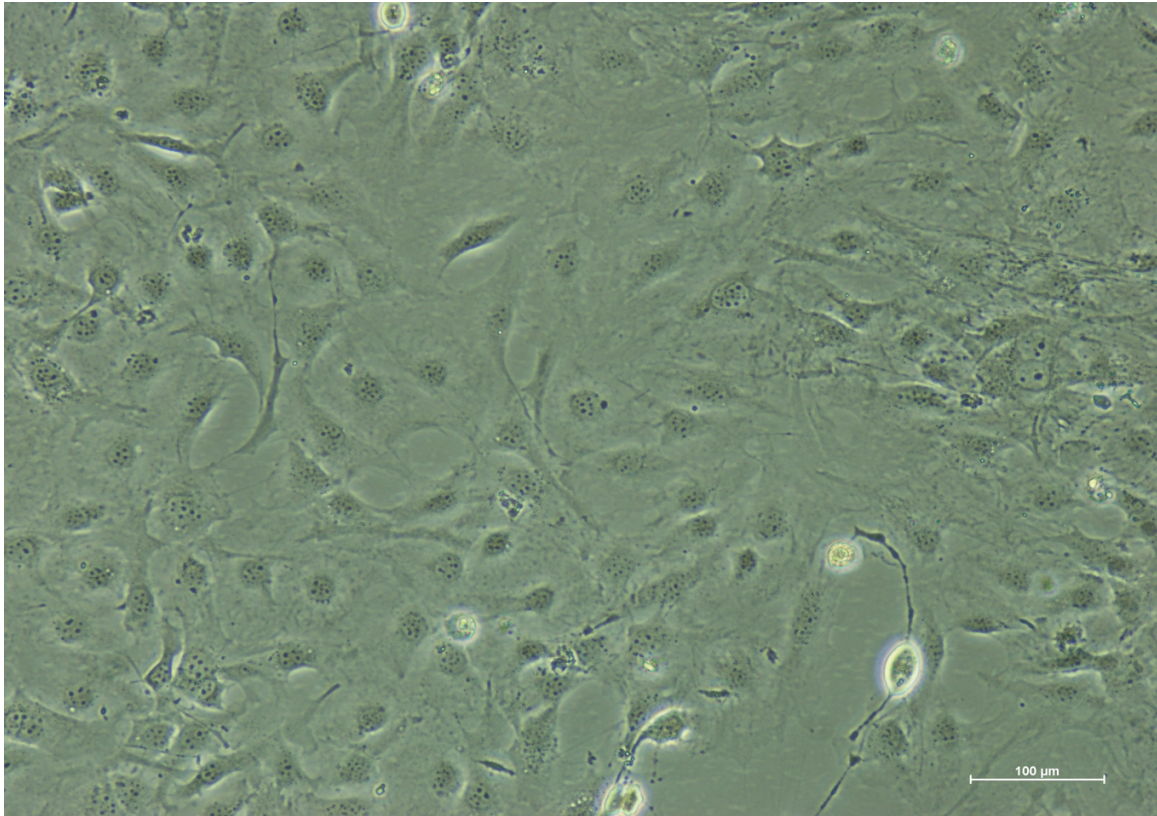


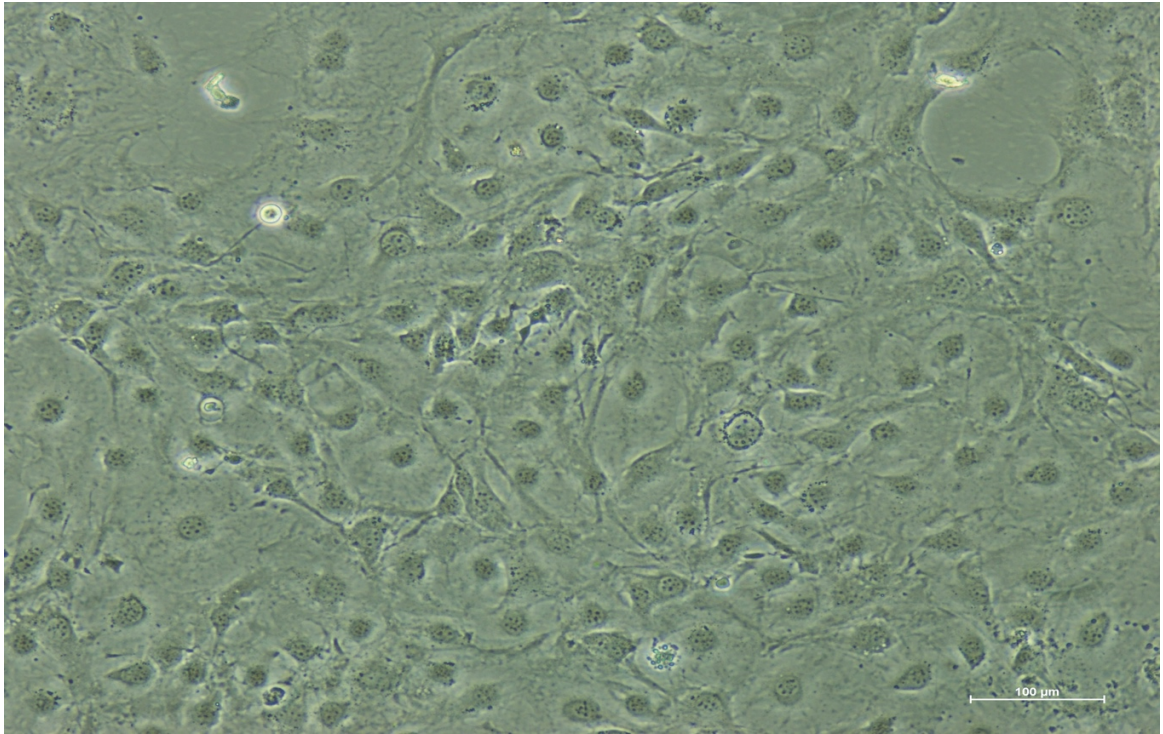
IV. Exosomas de suero sanguíneo de individuo sobrepeso. Aislados por SEC.

Microscopia Óptica

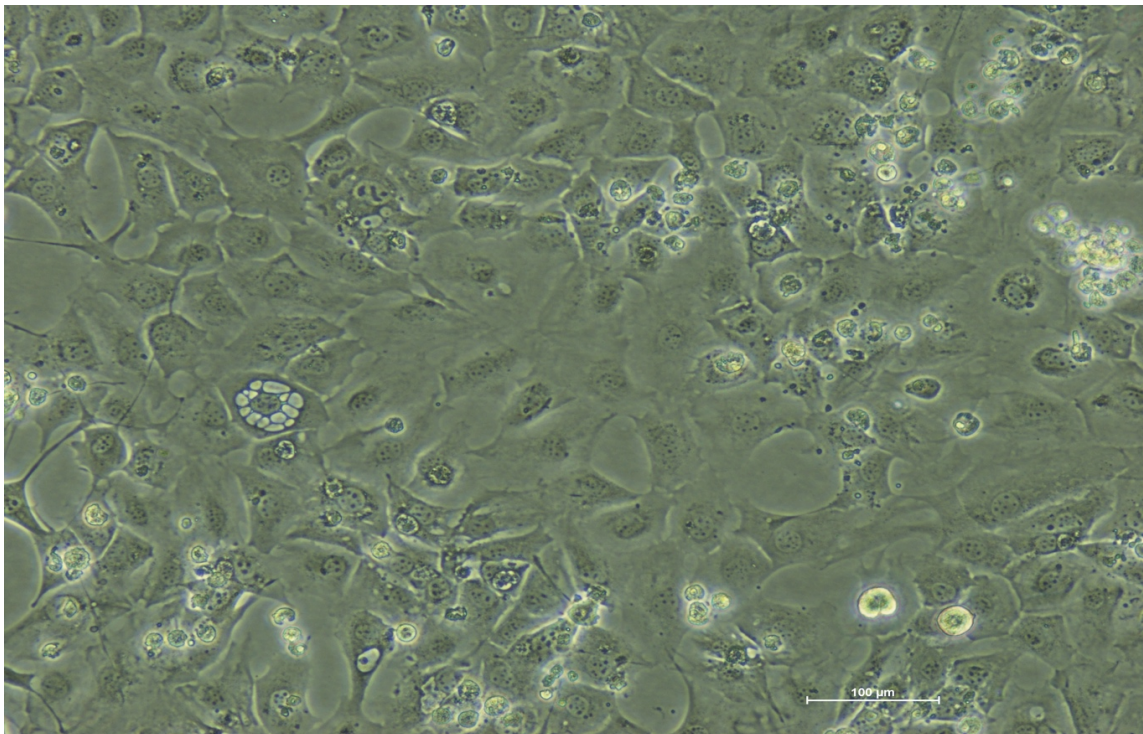
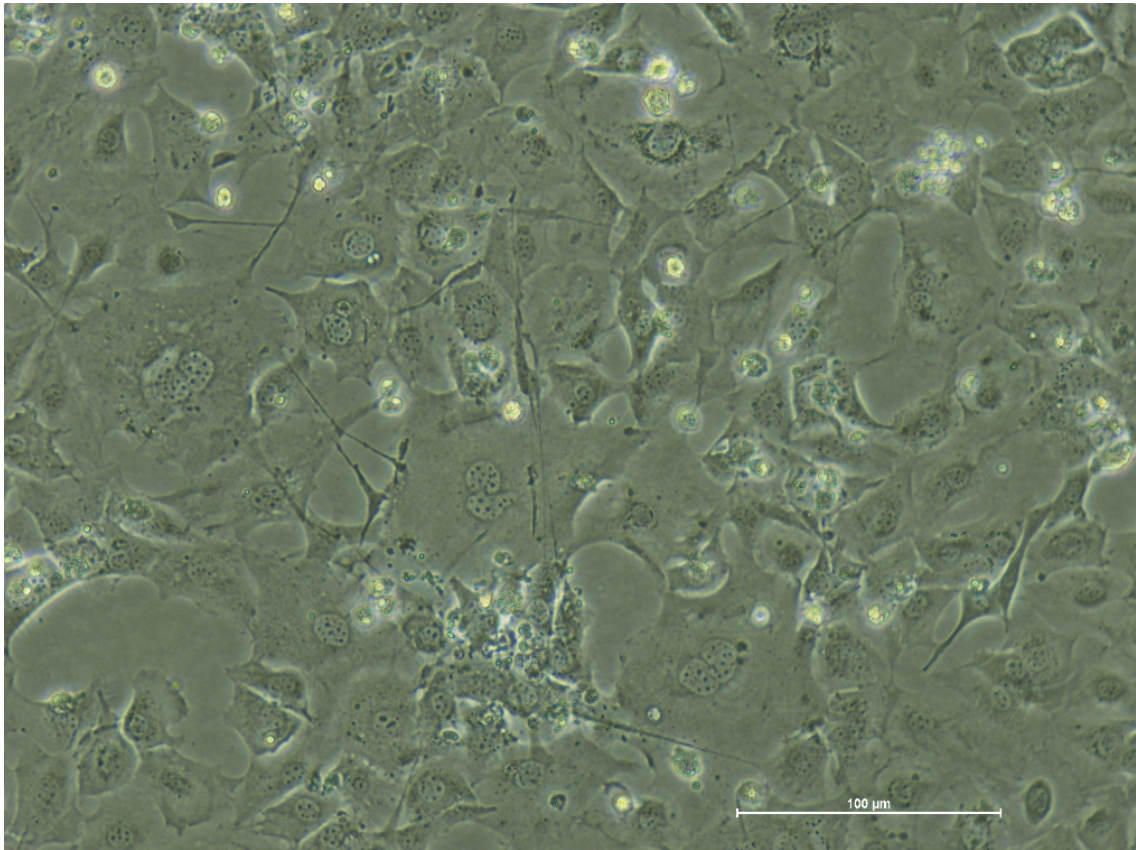
Nikon Inverted Routine Microscope ECLIPSE Ts2. Imágenes tomadas en el Servei de Cultius Cel·lulars, Producció d'Anticossos i Citometria (SCAC).

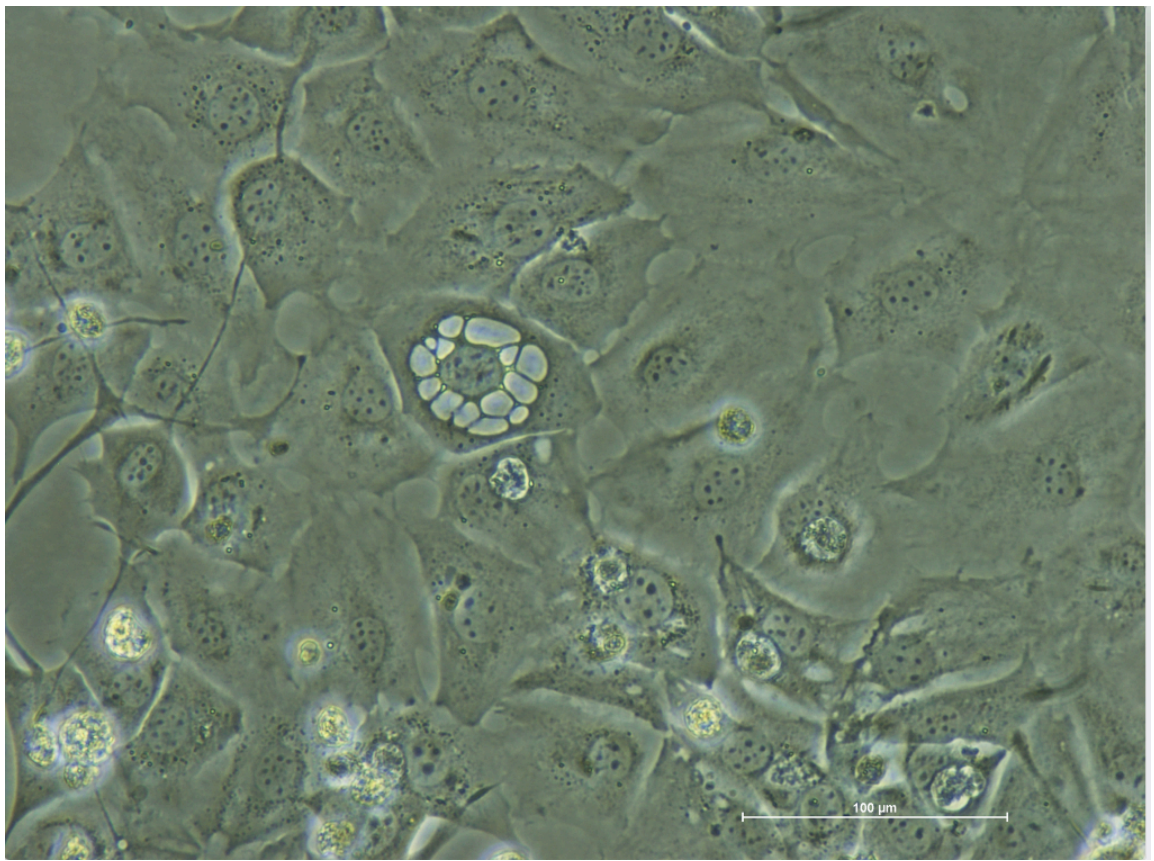
- I. Sección de células 3T3-L1 sin diferenciar con DMEM 10% FBS. Técnica de contraste de fases en campo claro 10X. Día 0.

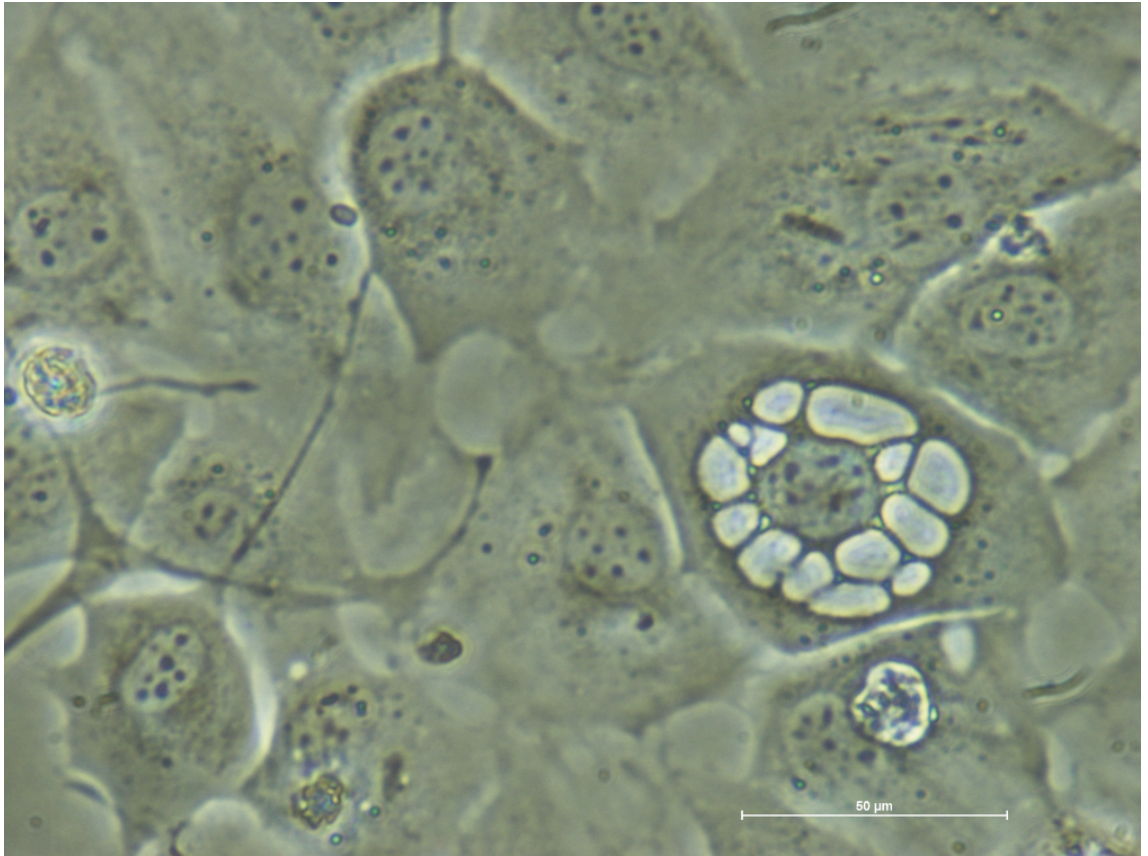




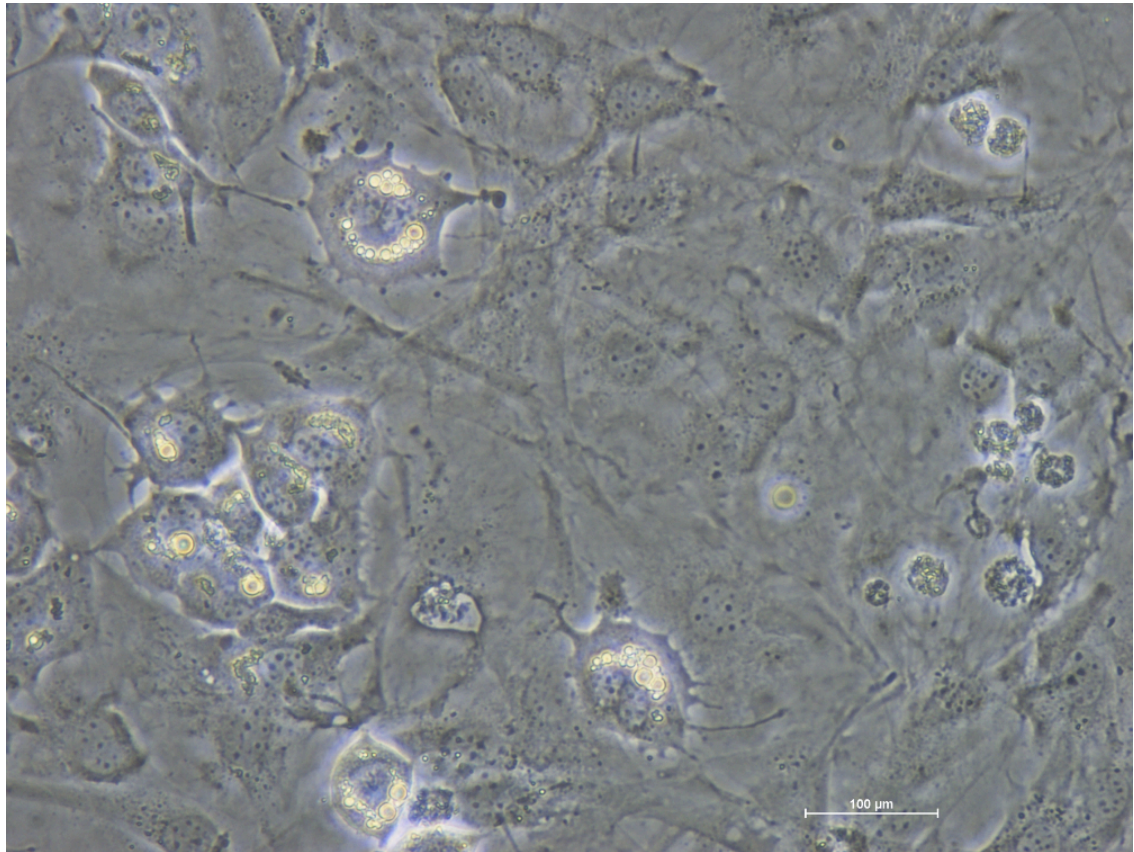
- I. Sección de células 3T3-L1 diferenciadas con **MDI** (medio diferenciación I). Técnica de contraste de fases en campo claro 20X, 20X, 40X y 40X respectivamente. Día 3.

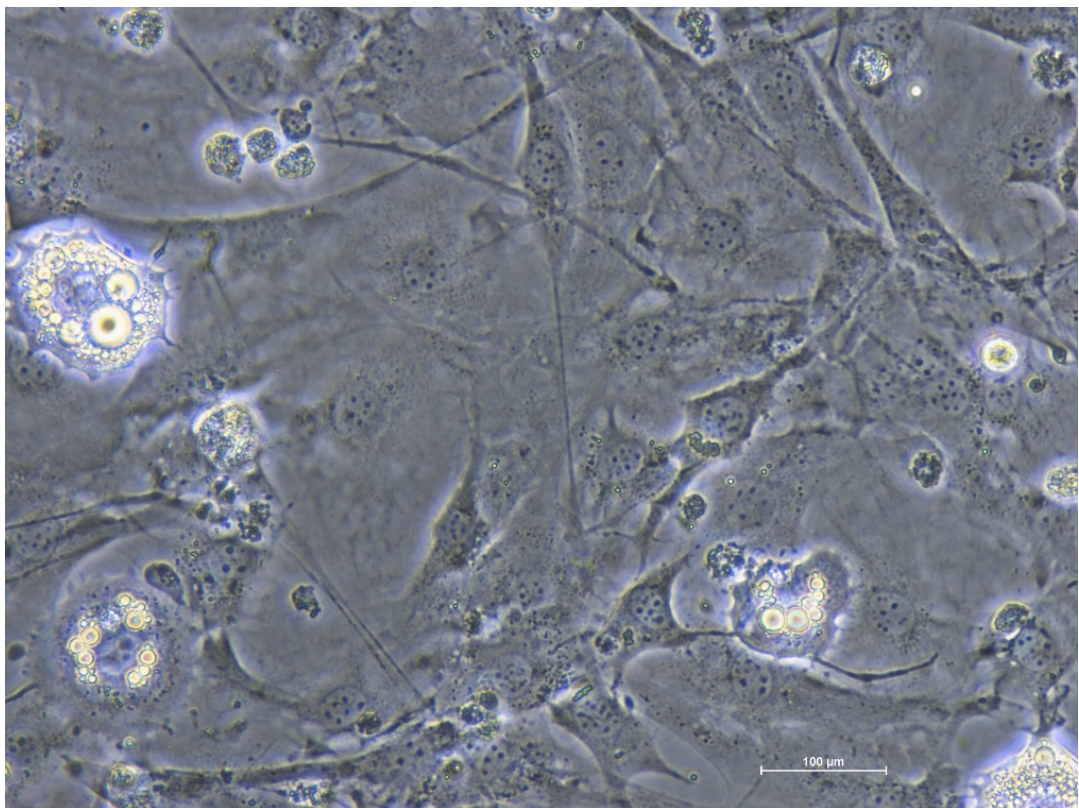
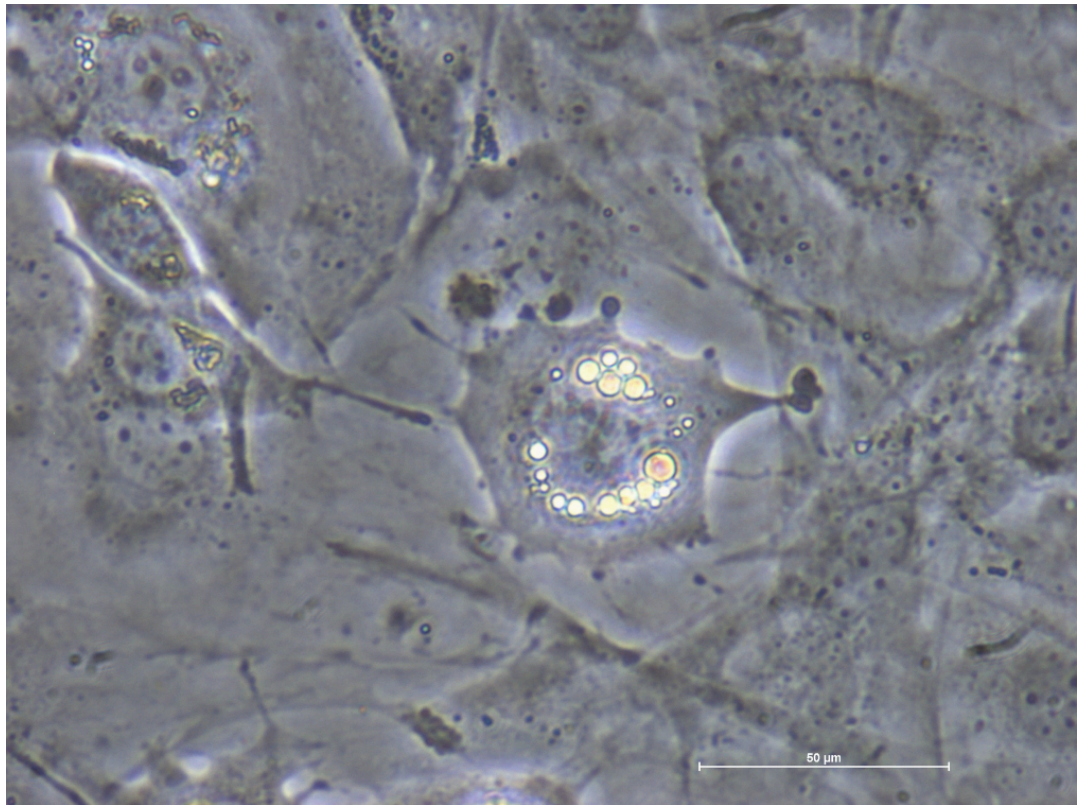




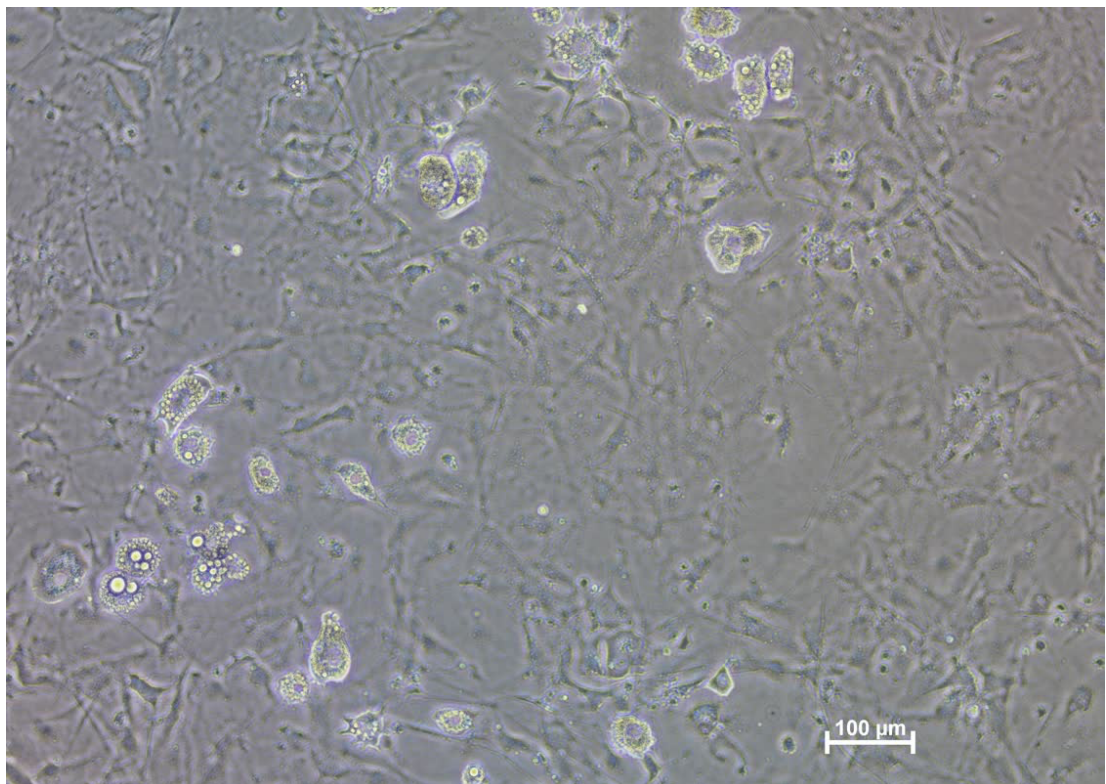
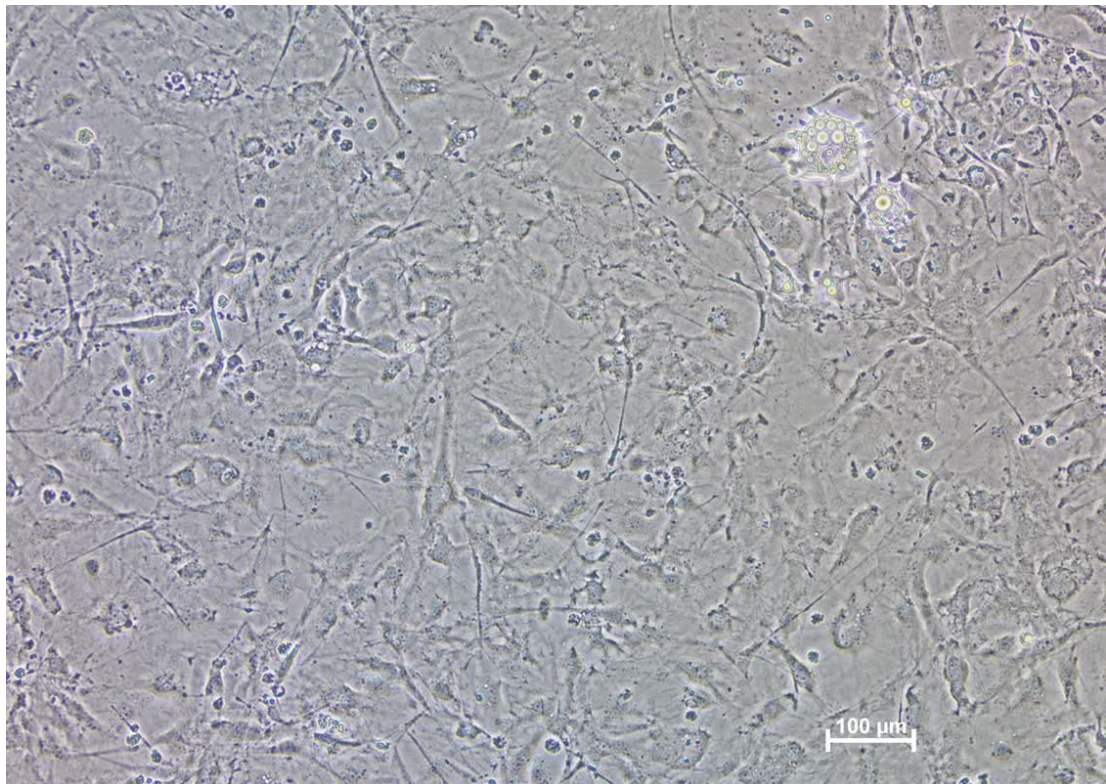


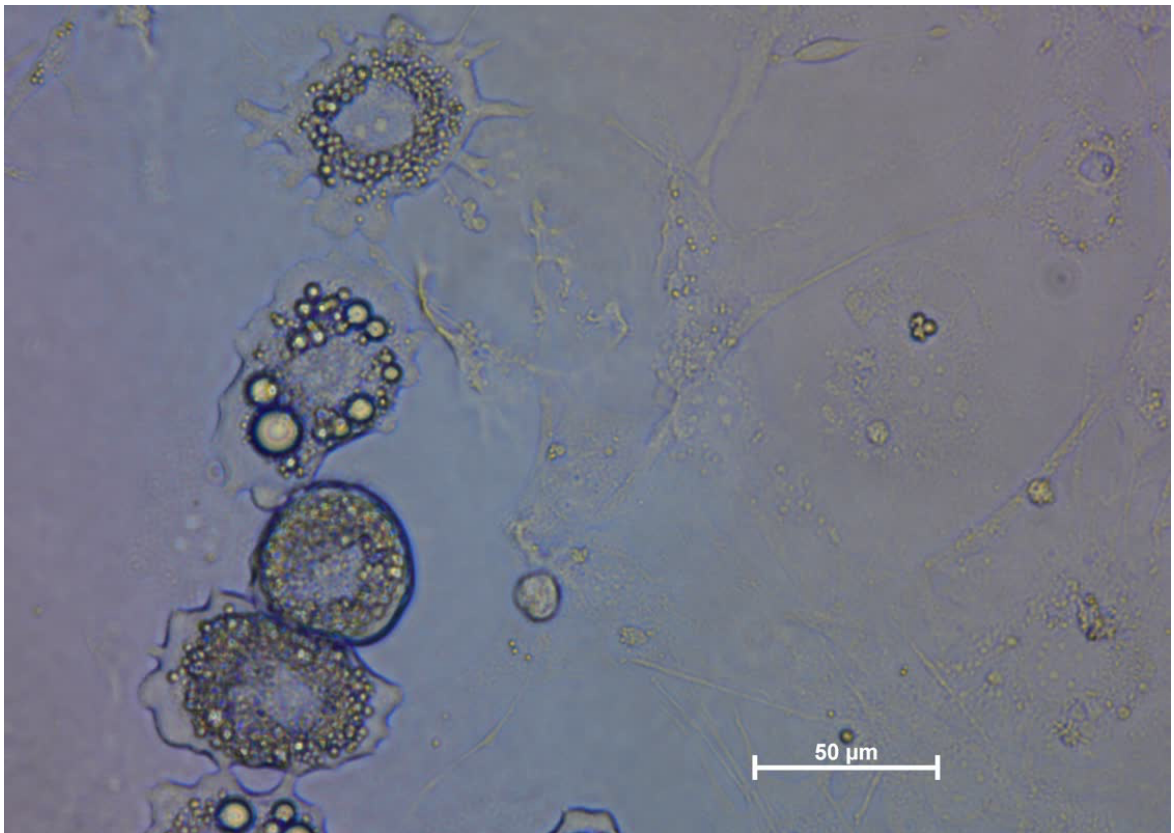
- II. Sección de células 3T3-L1 diferenciadas con **MDII** (medio diferenciación II)
a. Día 7



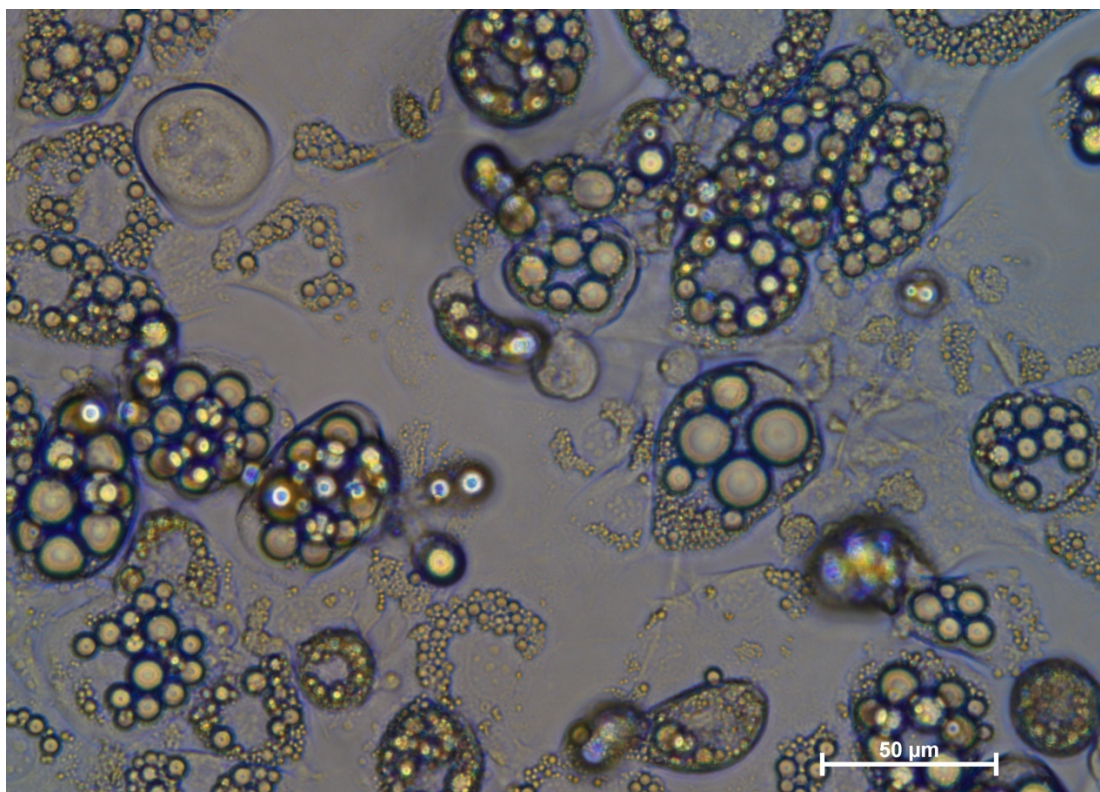
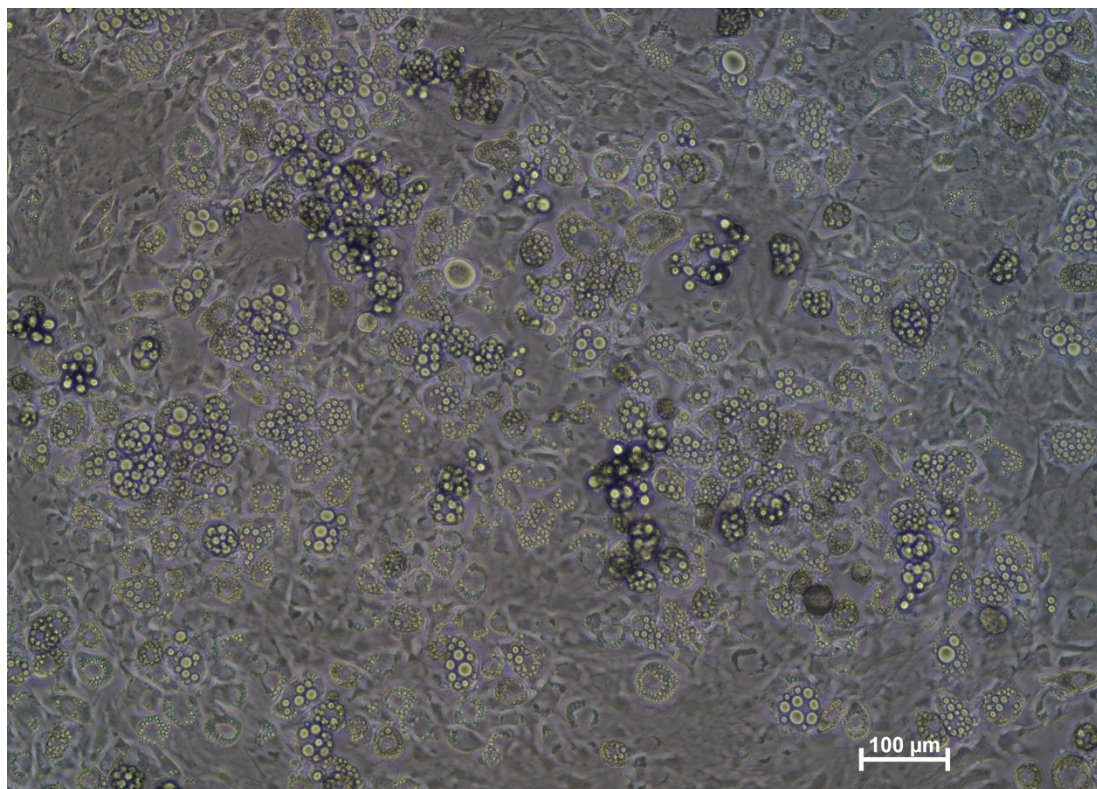


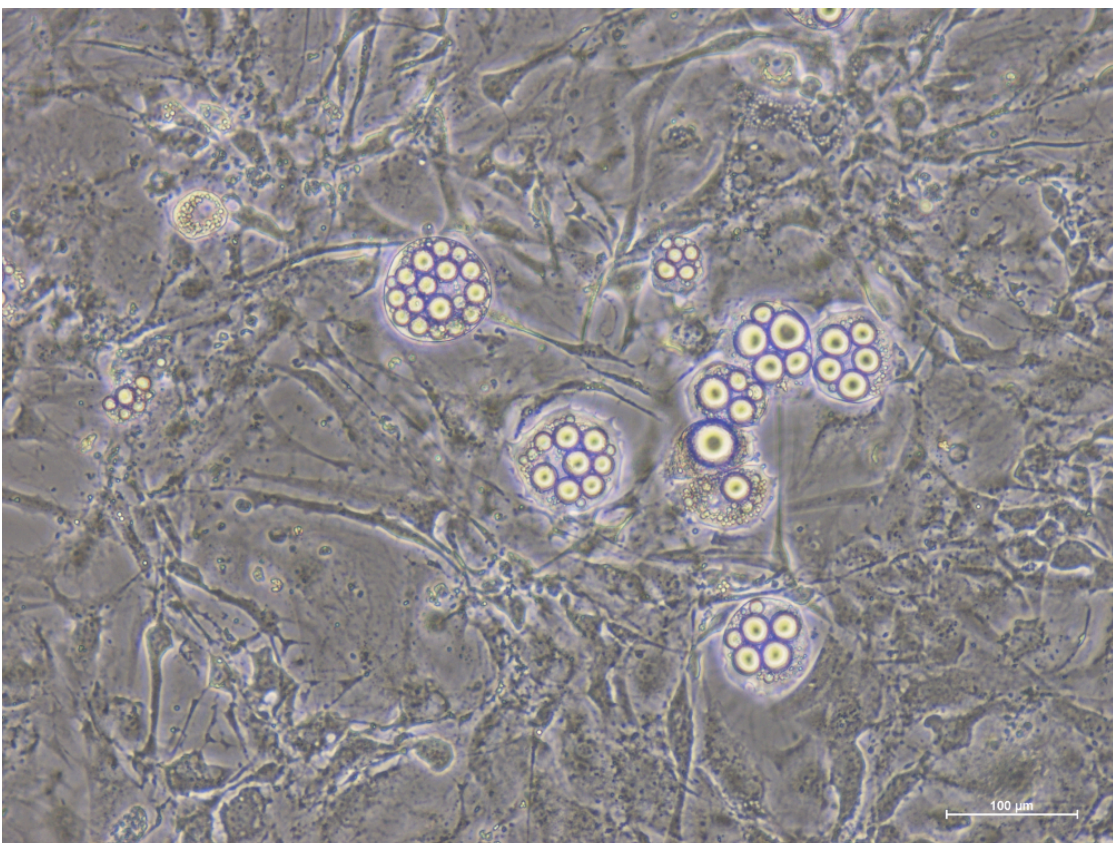
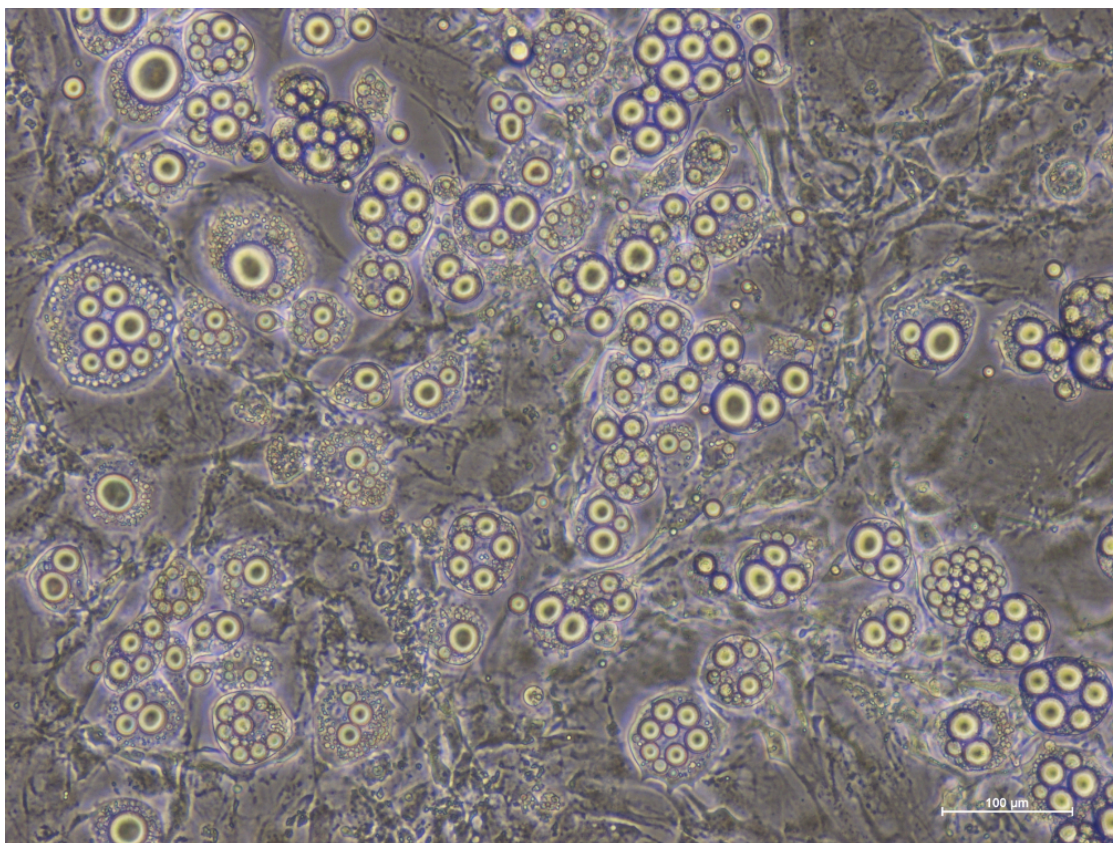
b. Día 12



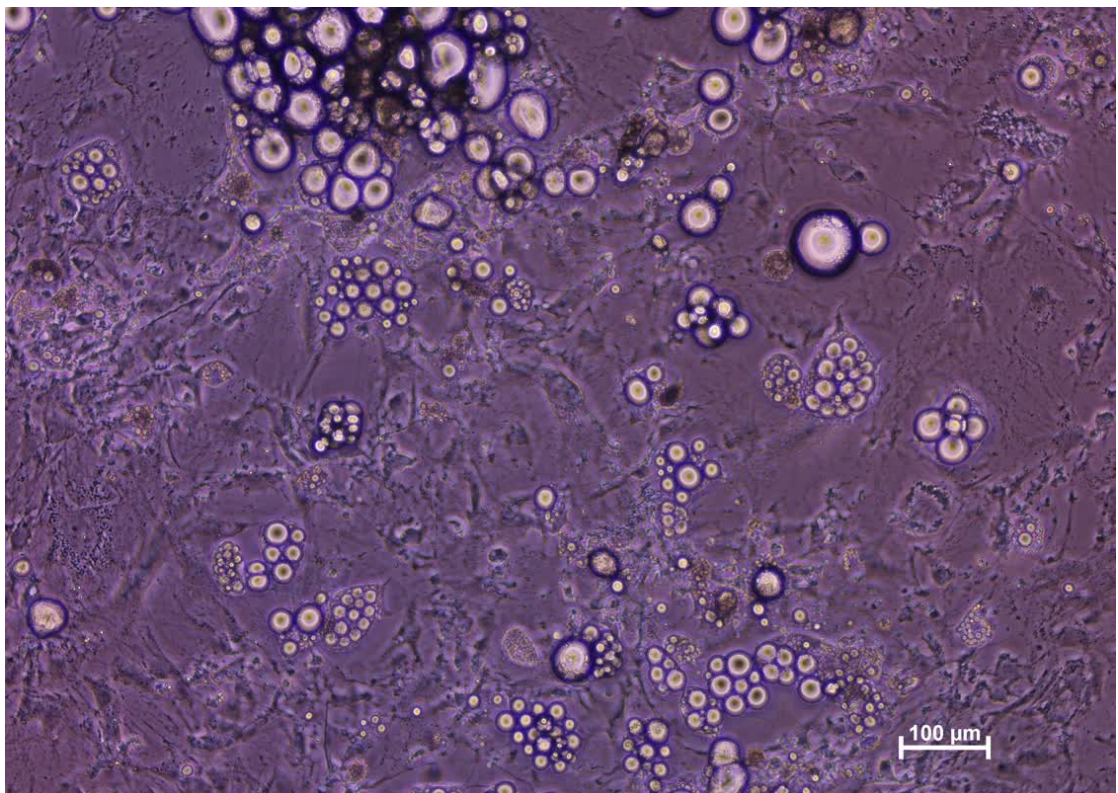
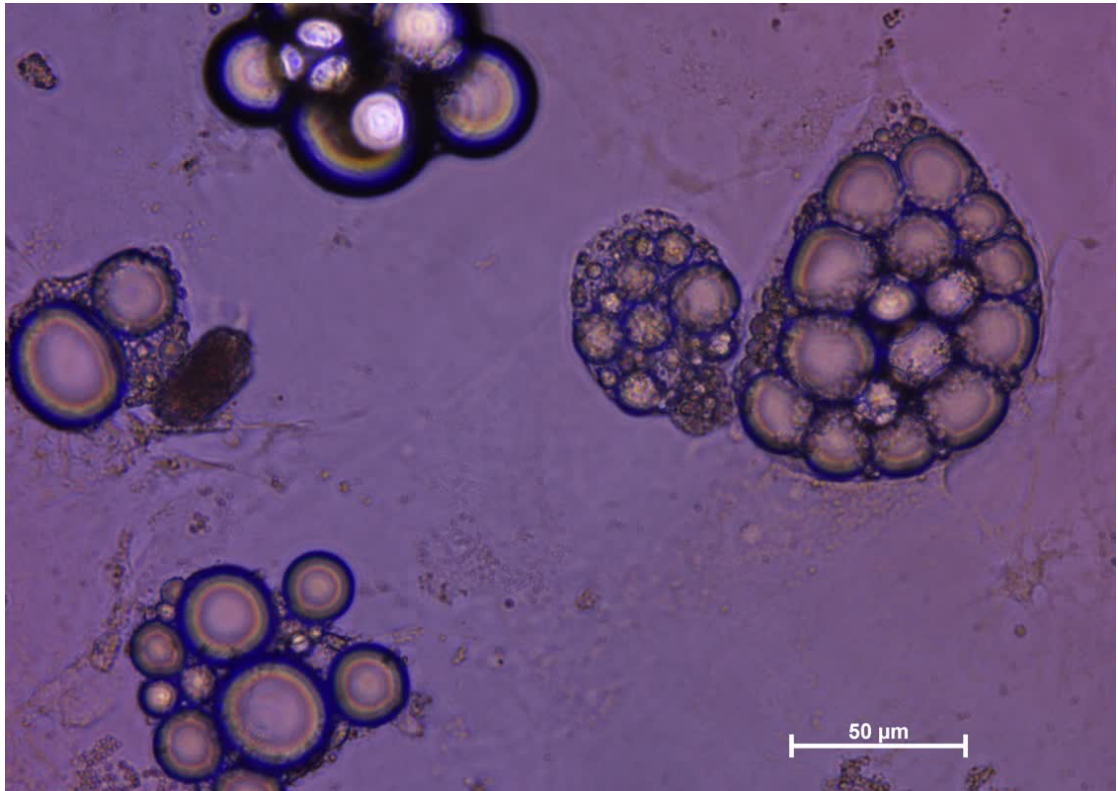


c. Día 20



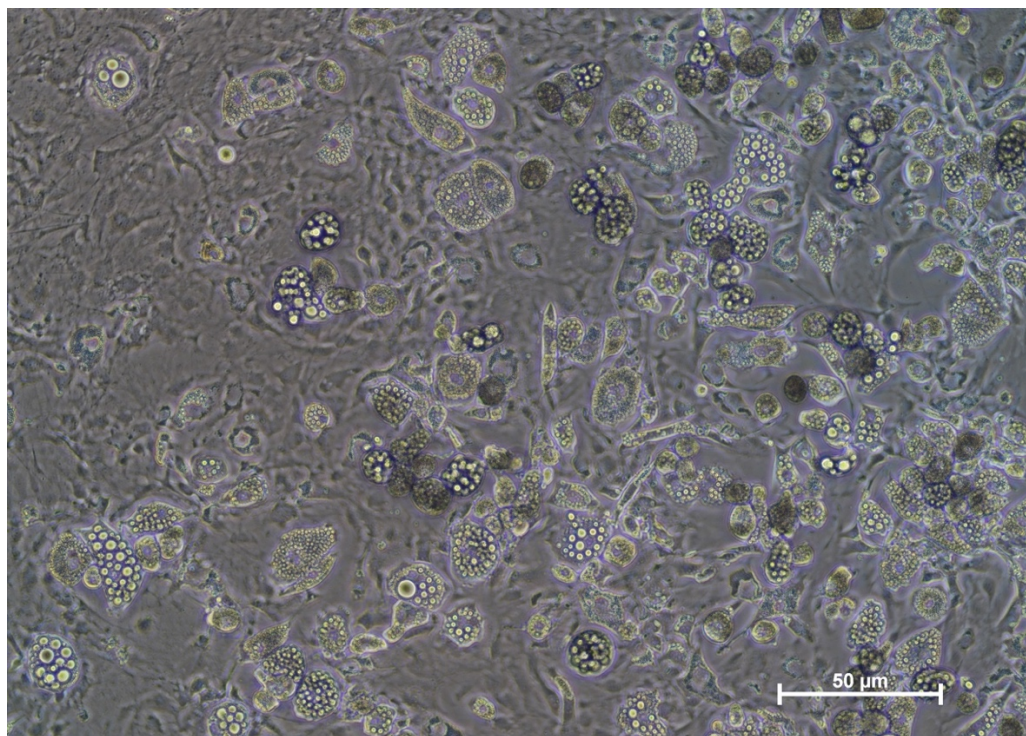


d. Día 43

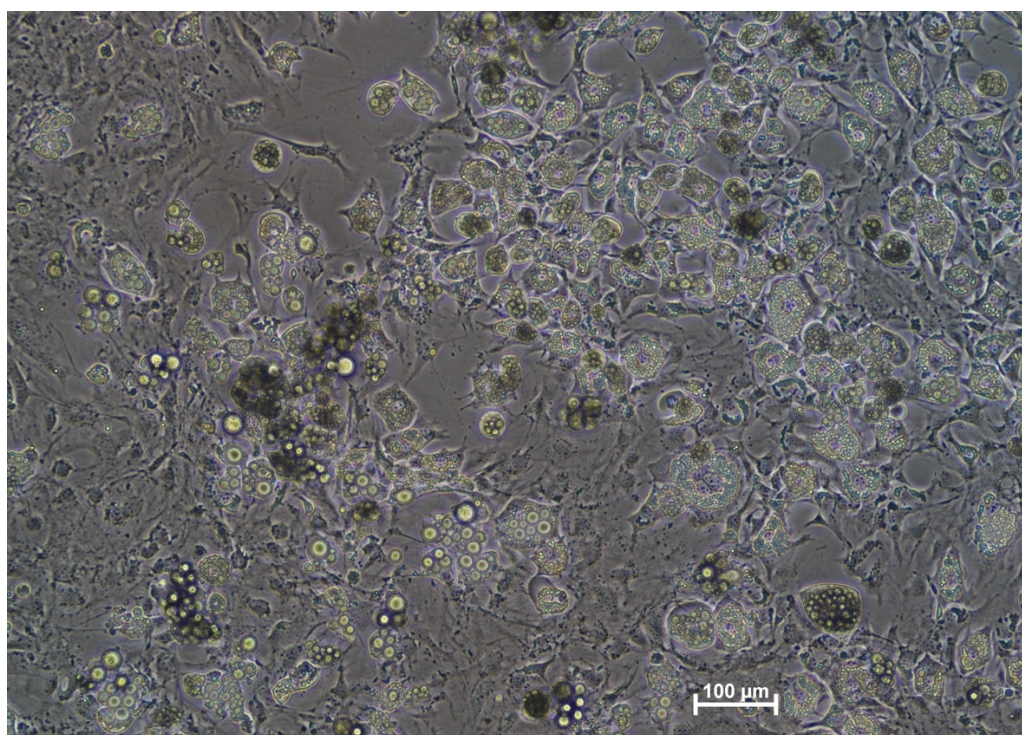


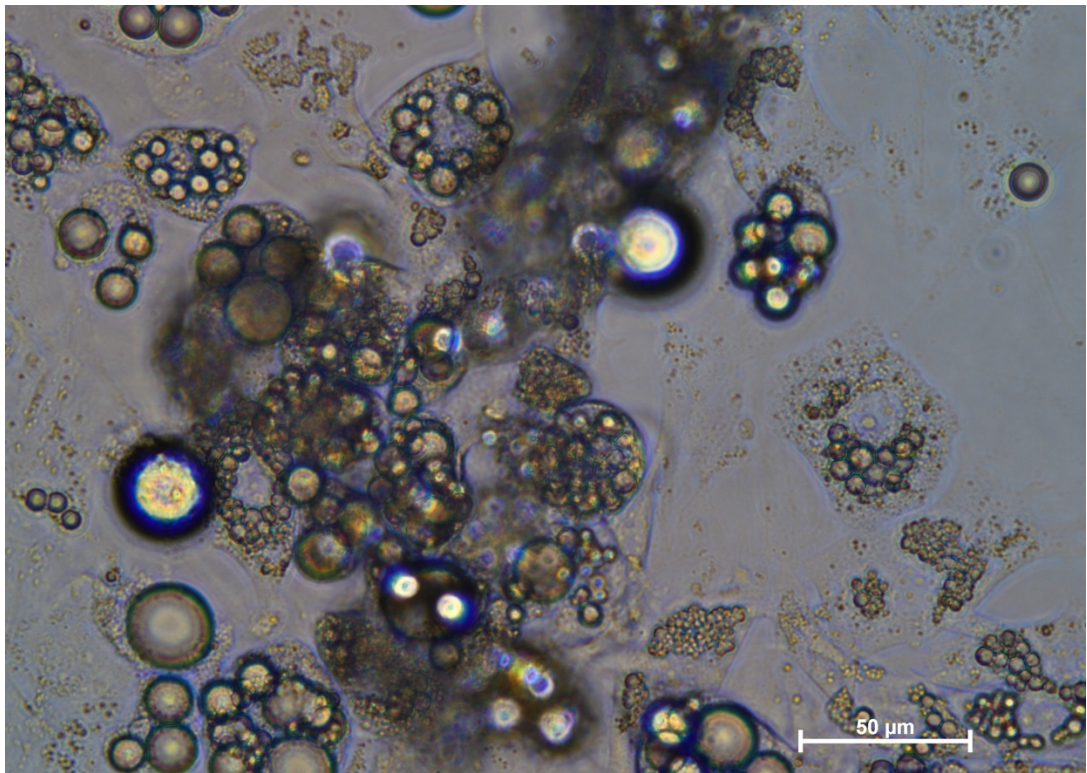
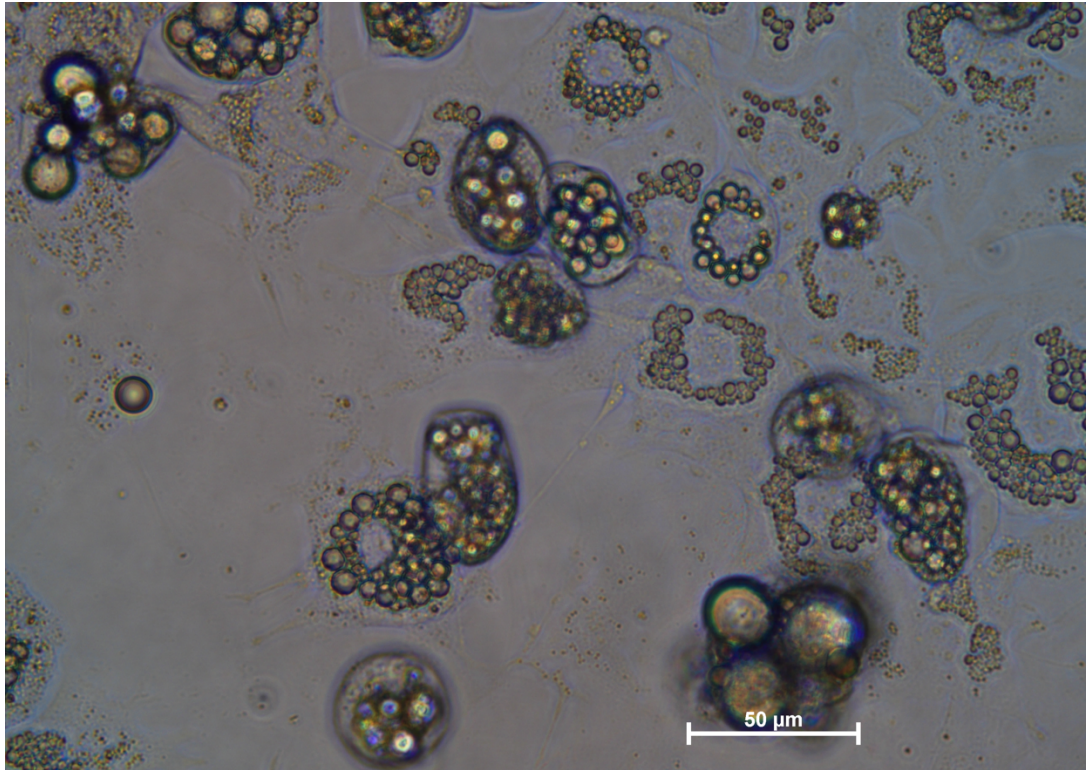
- III. 3T3-L1 diferenciadas con DMEM 10% de FBS + 10 ug/mL Insulina, sometidas a 2:30 horas de hipoxia

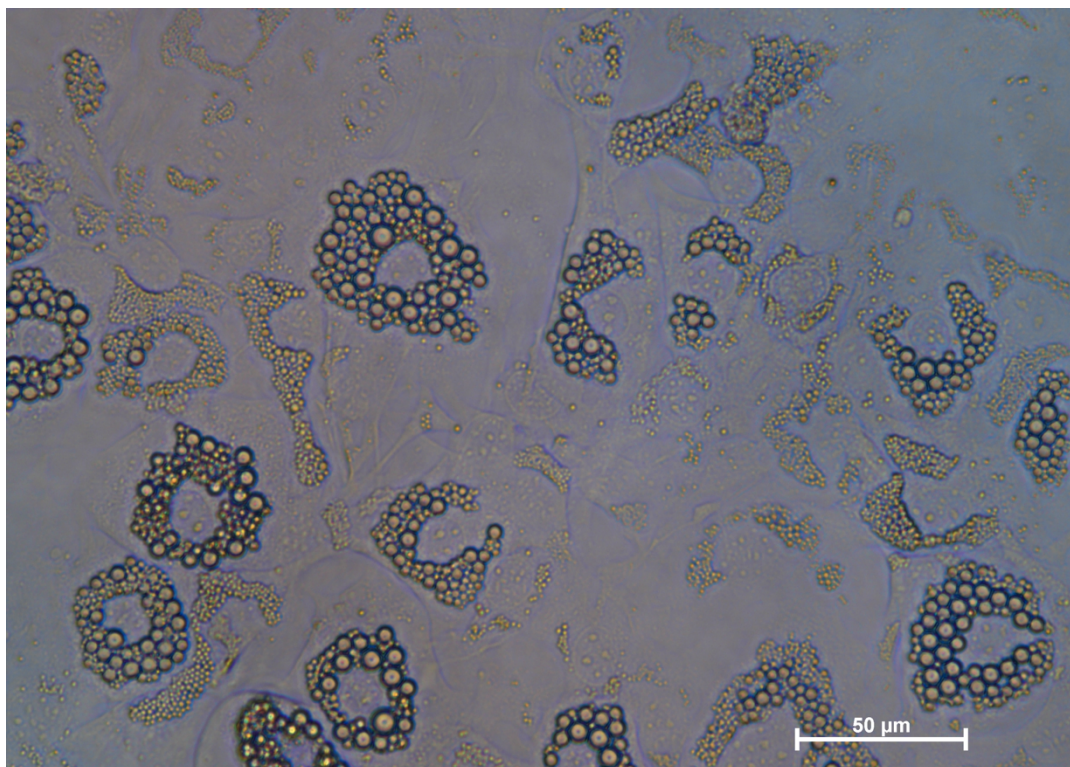




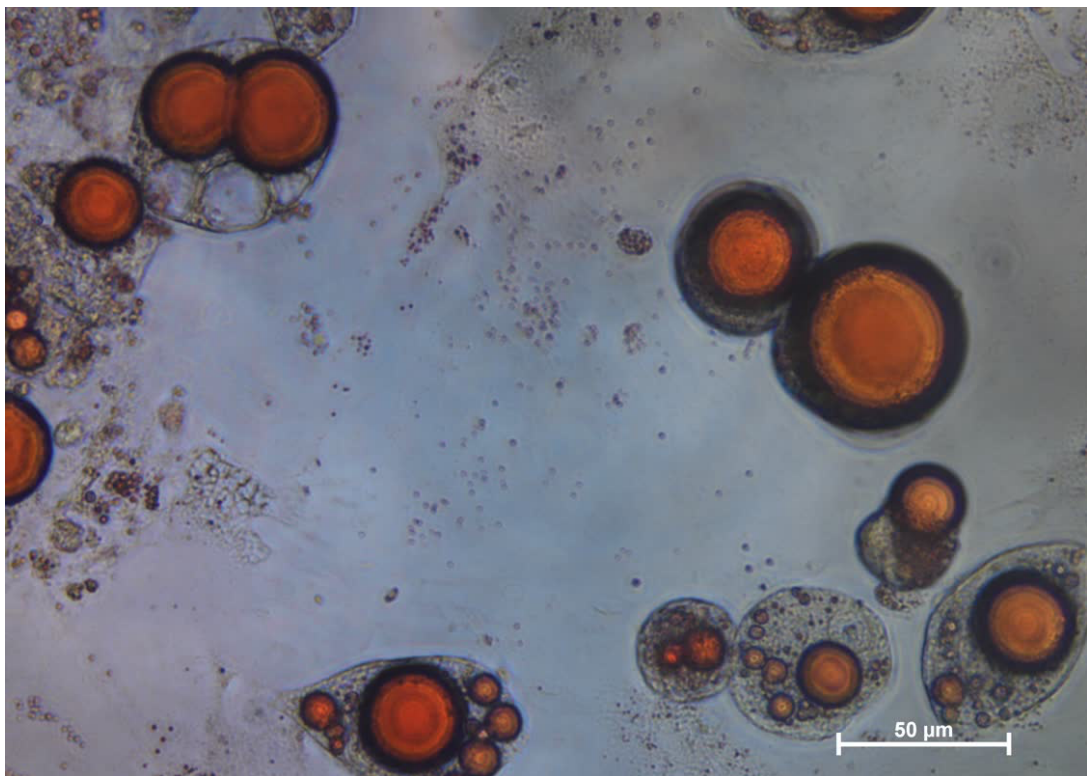
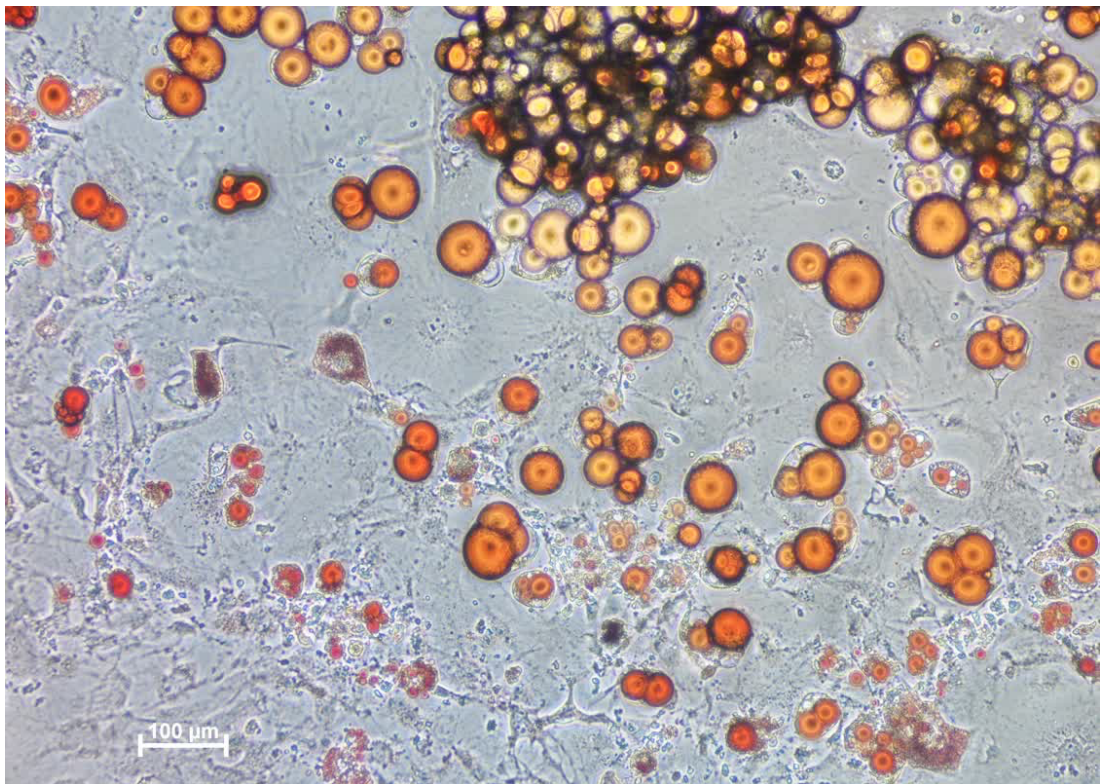
- IV. 3T3-L1 diferenciadas con DMEM 10% de FBS + 10 ug/mL Insulina, sometidas a 24 horas de hipoxia

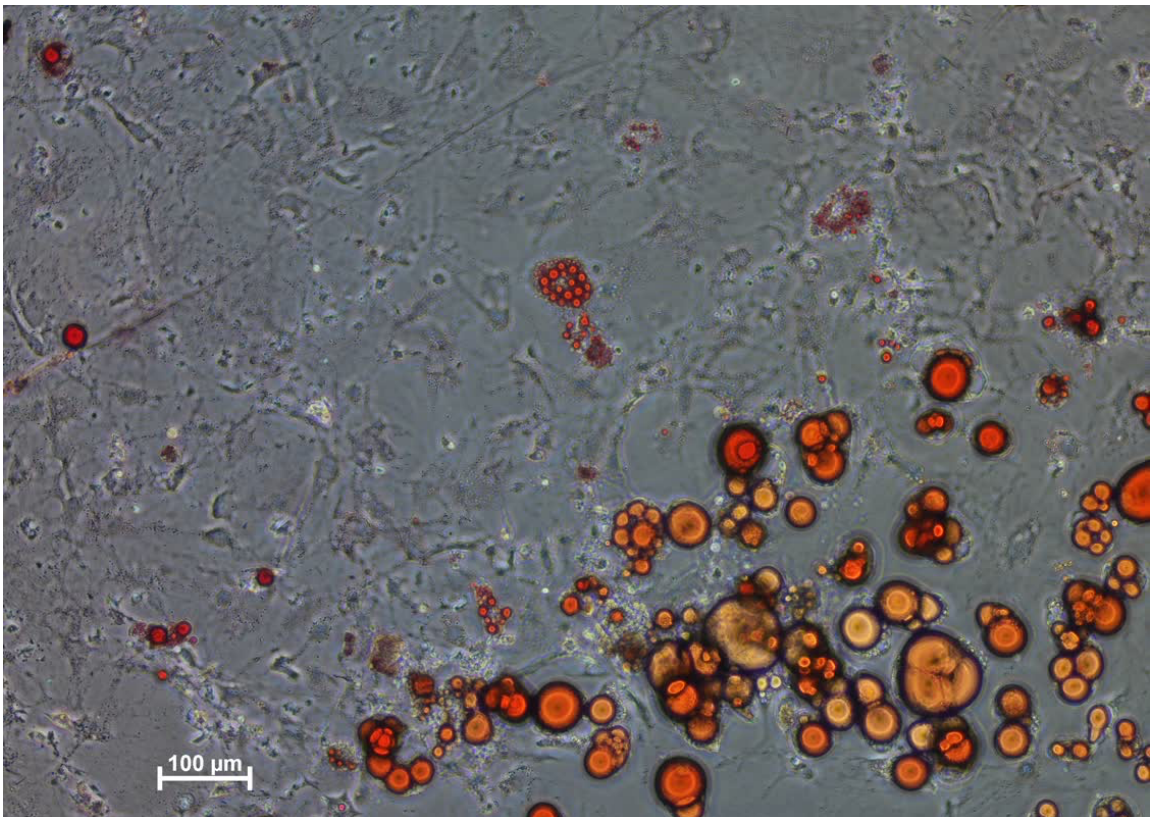


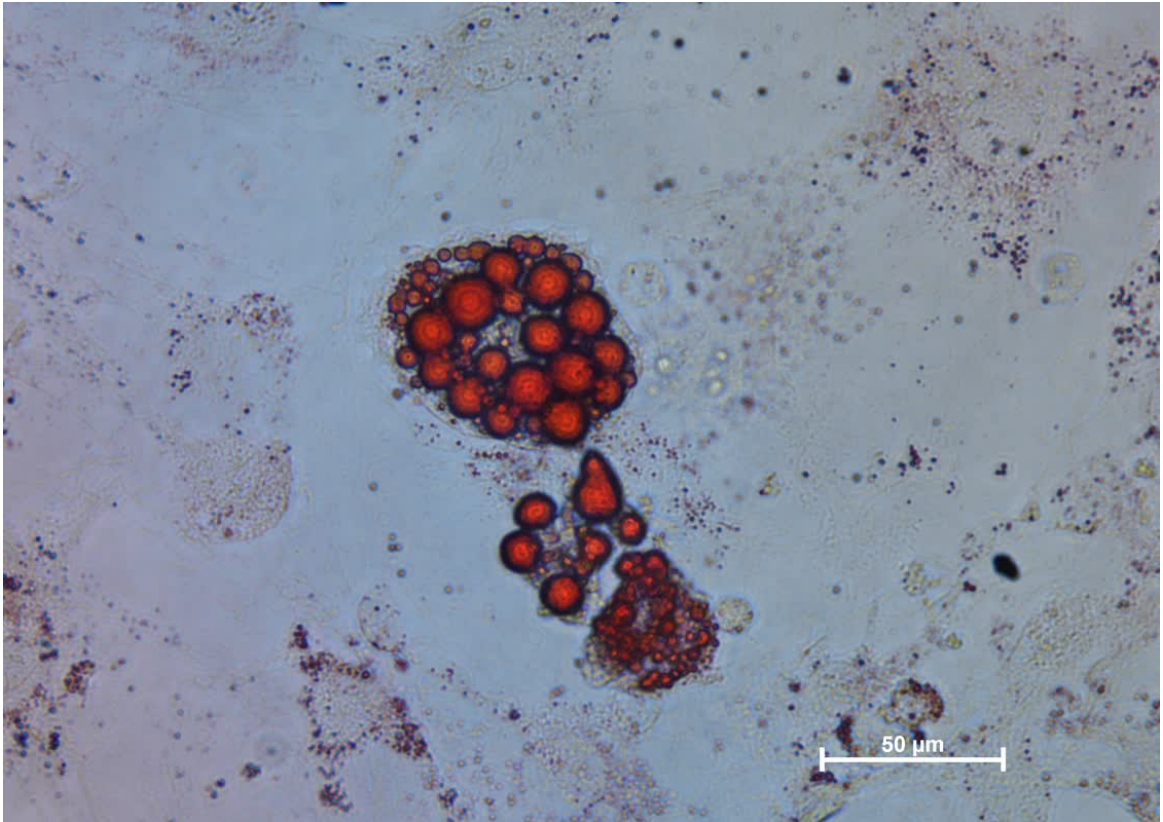




V. 3T3-L1 diferenciadas con MDII teñidas con Oil Red O (ORO). Observadas a 10X y 40X.







13. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Objetivo general: Determinar el perfil de expresión relativa en suero y exosomas de <i>miR-21</i> , <i>miR-24</i> , <i>miR-34a</i> , <i>miR-128-1</i> e identificar la presencia de las proteínas SFRP4, IRS1 y KLF4 en exosomas, y su asociación con niveles séricos de biomarcadores inmunometabólicos y perfil obesogénico en individuos con tejido adiposo disfuncional.								
Objetivos particulares	Semestre							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Elaboración de protocolo de investigación	100%							
1. Clasificar con y sin tejido adiposo disfuncional a los individuos incluidos, de acuerdo con los criterios de estudio, e incluirlos en los grupos que corresponda: referencia, estudio y comparación					100%			
2. Determinar los niveles de biomarcadores inmunometabólicos y perfil obesogénico					100%			
3. Determinar los niveles de oligómeros de adiponectina y quimiocinas en el perfil obesogénico							100%	
4. Identificar y validar la presencia de exosomas en plasma sanguíneo							100%	
5. Identificar y cuantificar los niveles relativos de SFRP4, IRS1 y KLF4 en exosomas y su asociación con el perfil obesogénico							100%	
6. Cuantificar en suero y en exosomas de plasma sanguíneo los niveles de expresión relativa de <i>miR-21</i> , <i>miR-24</i> , <i>miR-34a</i> , y <i>miR-128-1</i>								100%
7. Determinar la asociación de la expresión relativa de <i>miR-21</i> , <i>miR-24</i> , <i>miR-34a</i> , <i>miR-128-1</i> solubles y en exosomas con biomarcadores inmunometabólicos y perfil obesogénico								100%
Redacción y evaluación del manuscrito de tesis								100%
Envío de la publicación								100%
Examen predoctoral								100%