



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR**

**“Regulación de la producción de IL-6 e IGFR-1 por el microRNA Let-7c  
en células endoteliales: papel de la vía AGE-RAGE y el estado de  
hiperinsulinemia”**

**TESIS**

QUE PRESENTA

**LIC. ANDREA FERNANDA ACOSTA GARCIA**

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR**

DIRECTORAS DE TESIS

**DRA. CARLA ERNESTINA ANGULO ROJO †**

**DRA. ESTHER IVONNE LOPEZ-BAYGHEN PATIÑO**

COMITÉ TUTORIAL

**DRA. LETICIA RAMÍREZ MARTÍNEZ**

**DRA. ALMA MARLENE GUADRÓN LLANOS**

**DRA. CAROLINA DEL CARMEN MURÚA LÓPEZ**

Culiacán de Rosales, Sinaloa, México, a Noviembre De 2024.



Dirección General de Bibliotecas  
Ciudad Universitaria  
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios  
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.  
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57  
dgbuas@uas.edu.mx

## UAS-Dirección General de Bibliotecas

### Repositorio Institucional Buelna

#### Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial  
Compartir Igual, 4.0 Internacional



Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Molecular (Laboratorio 19) del Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional a cargo de la Dra. Esther Ivonne López-Bayghen Patiño y bajo la asesoría de la Dra. Leticia Ramírez Martínez. Además de la dirección de la Dra. Carla Ernestina Angulo Rojo, así como la asesoría de la Dra. Alma Marlene Guadrón Llanos y la Dra. Carolina del Carmen Murúa López.

Esta investigación contó con el financiamiento por parte de CONAHCYT FRONTERAS/CF-2023-I-2843.

Para realizar los estudios de Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular, se recibió beca por parte del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnología (CONAHCYT) con numero de CVU 1237484. También se contó con el apoyo de la Coordinación General para el Fomento de la Investigación Científica e Innovación del Estado de Sinaloa (CONFÍE) para realizar la estancia de investigación en CINVESTAV, Unidad Zacatenco el con numero de proyecto SIN-FJT-2024-CO1-00008.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca económica otorgada, fundamental para culminar mis estudios. También a la al programa de Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular de la Facultad de Medicina UAS y a sus Doctores, por permitirme formar parte de este programa y por todo el conocimiento brindado. Así mismo al Depto. de Toxicología del CINVESTAV-IPN por recibirme en una estancia de investigación para realizar la parte experimental del proyecto. Al programa CONFÍE por su aportación para la realizar dicha estancia de investigación.

Mi agradecimiento especial a la Dra. Leticia Ramírez, del Departamento de Toxicología, por su orientación, y paciencia constante a lo largo de este trabajo, su apoyo fue fundamental para el desarrollo de este. A mi directora de tesis, la Dra. Esther López-Bayghen, por recibirme en su laboratorio y por sus valiosos aportes a este proyecto. A la Dra. Alma Guadrón, gracias por brindarme su apoyo y conocimiento. Así como a la Dra. Carolina Murúa por sus valiosas observaciones en este trabajo.

Agradezco profundamente a mi directora de tesis la Dra. Carla Ernestina Ángulo Rojo †. Aprecio enormemente el apoyo, dedicación, sabiduría y motivación que siempre brindó a mi formación durante los últimos tres años, además le agradezco por haberme dado la confianza para pertenecer a su equipo de trabajo. Sin duda, su inspiración y legado, tanto científico como humano, ha dejado una huella imborrable en mi crecimiento personal y profesional.

Quiero agradecer además a Laura Uzeta en coordinación de la MCBM, quien ha mostrado su disponibilidad para brindar apoyo ante cualquier situación y a Lucero Cervantes por facilitar el proceso de estancia en CINVESTAV.

También agradezco a mis compañeros y amigos de laboratorio por apoyarme con sus conocimientos y aportes a lo largo de este proyecto, especialmente a Juliana y Luz del Dpto. de Toxicología, así como a Diana, Alexis, Manuel, Tasuko, Adolfo y Nahomi del Lab. de Neurociencias. Así mismo a mis amigos y compañeros de generación: Itzel, Adrián, Javier, Cinthia, Marco y Jesús, quienes estuvieron compartiendo experiencias y horas de estudio en este proceso. Agradezco a mi compañera Laura Torres y a la Sra. Laura por brindarme hospitalidad y apoyo durante mi estancia en CINVESTAV.

Principalmente quiero agradecer enormemente a mi familia y seres amados, sobre todo a mis padres María y Andrés, por su amor, apoyo incondicional y comprensión durante todo este proceso y durante toda mi vida, así como a mis hermanas Sandra, Lizeth, Anahy y Araceli por motivarme siempre. También quiero agradecer a Brayan por su comprensión, amor y motivación en esta etapa. Ustedes han sido el pilar fundamental para poder alcanzar esta meta.

¡Muchísimas gracias!

## **DEDICATORIA**

A la Dra. Carla Ernestina Ángulo Rojo †, quien fue y será una fuente constante de inspiración y motivación. Esta tesis es el reflejo de su enseñanza y la confianza que depositó en mí.

Su legado vivirá por siempre.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ÍNDICE DE TABLAS .....	vii
I. RESUMEN .....	1
ABSTRACT.....	3
II. INTRODUCCIÓN.....	4
III. ANTECEDENTES .....	5
3.1 INSULINA.....	5
3.1.1 Función .....	5
3.1.2 Fisiología de la insulina .....	5
3.1.4 Vías de señalización de la insulina .....	7
3.1.4.1 PI3K/AKT.....	7
3.1.4.2 MAPK/ERK.....	7
3.2 HIPERINSULINEMIA.....	8
3.2.1 Definición .....	8
3.2.2 Resistencia a la insulina .....	9
3.2.4 Enfermedades relacionadas a la hiperinsulinemia .....	10
3.3 DIABETES MELLITUS TIPO 2.....	13
3.3.1 Complicaciones de la DMT2 .....	13
3.4 ENDOTELIO VASCULAR .....	15

3.4.1 Daño endotelial .....	15
3.5 PRODUCTOS FINALES DE GLICACIÓN AVANZADA .....	16
3.5.1 Formación de AGEs.....	17
3.5.2 Receptor de productos finales de glicación avanzada.....	20
3.5.3 Vía de señalización AGE- RAGE.....	23
3.5.4 Patologías relacionadas a la vía AGE-RAGE.....	23
3.5.5 Vía AGE-RAGE e inflamación .....	24
3.6 MicroRNAs.....	26
3.6.1 Biogénesis de los miRNAs .....	26
3.6.2 Funciones de los miRNAs .....	30
3.7 FAMILIA DE LOS miRNAS LET-7 .....	31
3.7.1 Hsa-Let-7c.....	32
3.8 ANTECEDENTES DIRECTOS .....	34
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	38
V. JUSTIFICACIÓN.....	39
VI. HIPÓTESIS .....	40
VII. OBJETIVOS.....	41
7.1 OBJETIVO GENERAL.....	41
7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	42



8.1 CULTIVO CELULAR Y TRATAMIENTO.....	42
8.2 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR.....	43
8.3 TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS.....	43
8.4 ENSAYO DEL GEN REPORTERO.....	44
8.5 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL.....	44
8.6 CUANTIFICACIÓN DE MicroRNAs POR RT-qPCR.....	45
8.6.1 Retro-transcripción (RT), Síntesis de cDNA.....	45
8.6.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR).....	45
8.7 CUANTIFICACIÓN DE mRNA POR RT-qPCR.....	46
8.8 ENSAYO POR INMUNOADSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA).....	52
8.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	52
IX. RESULTADOS.....	53
9.1 VIABILIDAD DE CÉLULAS HMEC-1 ANTE DIFERENTES ESTÍMULOS.....	53
9.2 EXPRESIÓN DEL miRNA LET-7C EN HMEC-1 Y ACTIVIDAD DE NF-κB AL ACTIVAR LA VÍA AGE-RAGE Y EN ESTADO DE HIPERINSULINEMIA.....	55
9.3 EXPRESIÓN DE mRNA DE <i>IGFR-1</i> E IL-6 (mRNA Y PROTEÍNA) EN HMEC-1 AL ACTIVAR LA VÍA AGE-RAGE Y EN ESTADO DE HIPERINSULINEMIA.....	58
9.4 SEÑALIZACIÓN PARA LA INDUCCIÓN DE IL-6 EN HMEC-1 POR HIPERINSULINEMIA.....	62
9.5 EFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE LET-7C SOBRE LOS NIVELES DE mRNA DE <i>IGFR-1</i> E <i>IL-6</i> EN HMEC-1.....	64

X. DISCUSIÓN.....	67
XI. CONCLUSIONES.....	84
XII. BIBLIOGRAFÍA.....	85
SIGLAS Y ABREVIACIONES .....	105

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Principales vías de señalización de la insulina.....</b>	<b>12</b>
<b>Figura 2. Vías de formación de AGEs. ....</b>	<b>19</b>
<b>Figura 3. Estructura de RAGE. ....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 4. Vías de señalización AGE-RAGE.....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 5. Biogénesis de microARN canónicos y no canónicos.....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 6. Mecanismos de regulación de la expresión génica por el complejo RISC. ....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 7. Biogénesis de la familia Let-7.....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 8. Redes de grupos de ontologías enriquecidas para los objetivos regulados por miRNA Let-7c. ....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 9. Diagrama del sistema de PCR con sonda miRCURY LNA miRNA. ....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 10. Viabilidad de células HMEC-1 tratadas con los diferentes estímulos. ....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 11. Niveles de expresión del miRNA Let-7c en HMEC-1.....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 12. Actividad de NF-<math>\kappa</math>B en HMEC-1.....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 13. Niveles del mRNA de <i>IGFR-1</i> en HMEC-1. ....</b>	<b>59</b>
<b>Figura 14. Niveles del mRNA de IL-6 en HMEC-1.....</b>	<b>60</b>
<b>Figura 15. Niveles de proteína IL-6 en HMEC-1.....</b>	<b>61</b>
<b>Figura 16. Niveles de mRNA de <i>IL-6</i> en HMEC-1 en estado de hiperinsulinemia. ....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 17. Efecto de la sobreexpresión de Let-7c sobre los niveles de mRNA de <i>IGFR-1</i> en HMEC-1. ....</b>	<b>65</b>
<b>Figura 18. Efecto de la sobreexpresión de Let-7c sobre los niveles de mRNA de <i>IL-6</i> en HMEC-1. ....</b>	<b>66</b>

**Figura 19. Efecto de la vía AGE-RAGE sobre los niveles de Let-7c, IGFR-1 e IL-6 mediado por NF-κB en células HMEC-1.....82**

**Figura 20. Efecto de la hiperinsulinemia sobre los niveles de Let-7c, IGFR-1 e IL-6 en células HMEC-1.....83**

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1. Protocolo de la reacción de RT.....</b>	<b>48</b>
<b>Tabla 2. Protocolo de la reacción de qPCR.....</b>	<b>49</b>
<b>Tabla 3. Protocolo de la reacción de RT-qPCR.....</b>	<b>50</b>

## I. RESUMEN

La inadecuada regulación de los niveles plasmáticos de glucosa y la consecuente elevación de insulina pueden llevar a un estado de hiperinsulinemia crónica, resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo 2 (DMT2). En estas condiciones se genera hiperglucemia crónica, que promueve la formación de productos finales de glicación avanzada (AGEs), activando la vía AGE-RAGE y contribuyendo a complicaciones vasculares asociadas a DMT2. El microRNA Let-7c podría estar implicado en la regulación de la vía AGE-RAGE porque regula genes como *IGFR-1* e *IL-6*, moléculas proinflamatorias que contribuyen al daño endotelial, lo que lo convierte en un posible biomarcador y blanco terapéutico. En este estudio, analizamos el efecto de la activación de la vía AGE-RAGE y del estado de hiperinsulinemia sobre los niveles de mRNA de *IL-6* e *IGFR-1* y la posible regulación de Let-7c en este contexto. Para cumplir nuestro objetivo, cuantificamos la expresión de Let-7c y los mRNA de *IGFR-1* e *IL-6* mediante RT-qPCR, en células endoteliales HMEC-1 expuestas a AGE-BSA y en condiciones de hiperinsulinemia, y evaluamos los niveles de la proteína IL-6 mediante ELISA. Encontramos que al activar la vía AGE-RAGE se reducen los niveles del miRNA Let-7c y aumentan los niveles de mRNA de *IGFR-1*, esto mediado por la activación del factor NF- $\kappa$ B, mientras que los niveles del mRNA de *IL-6* disminuyen. En contraste, la hiperinsulinemia eleva la expresión de Let-7c, la actividad de NF- $\kappa$ B disminuye, y aumentan tanto los niveles de mRNA de *IGFR-1* como de IL-6 (mRNA y proteína). Para determinar si Let-7c regula a *IL-6* e *IGFR-1* en células endoteliales, se sobre-expresó Let-7c en HMEC-1, observándose un efecto negativo sobre el mRNA de *IGFR-1* y positivo sobre *IL-6*. Estos hallazgos subrayan la importancia de analizar estos mecanismos moleculares para comprender los daños vasculares observados en complicaciones diabéticas.

**Palabras clave:** Hiperinsulinemia, AGE-RAGE, células endoteliales, Let-7c.

## ABSTRACT

Deficient regulation of plasma glucose and consequent rise in insulin levels can lead to a state of chronic hyperinsulinemia, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus (T2DM). These conditions are characterized by chronic hyperglycemia, which promotes the formation of advanced glycation end products (AGEs), activating the AGE-RAGE pathway and contributing to vascular complications associated with T2DM. The microRNA Let-7c may regulate the AGE-RAGE pathway because it modulates genes of pro-inflammatory molecules such as *IGFR-1* AND *IL-6* that contribute to endothelial damage, making it a potential biomarker and therapeutic target. In this study, we analyzed the effect of activating the AGE-RAGE pathway and the state of hyperinsulinemia on the mRNA levels of *IGFR-1* and *IL-6* and the possible regulation of Let-7c in this context. We quantified the expression of Let-7c and the mRNAs of *IGFR-1* and *IL-6* using RT-qPCR in HMEC-1 endothelial cell line exposed to AGE-RAGEs and hyperinsulinemia, and we evaluated the levels of IL-6 protein using ELISA. We found that activation of the AGE-RAGE pathway reduced Let-7c levels while increasing mRNA levels of *IGFR-1*, mediated by the activation of the NF- $\kappa$ B factor, whereas the mRNA levels of *IL-6* decreased. In contrast, hyperinsulinemia increased Let-7c expression, decreased NF- $\kappa$ B activity, and elevated mRNA *IGFR-1* and *IL-6* (mRNA and protein) levels. To determine whether Let-7c regulates *IGFR-1* and *IL-6* in endothelial cells, Let-7c was overexpressed in HMEC-1, showing a negative regulation of *IGFR-1* mRNA and a positive regulation of *IL-6* mRNA. These findings highlight the importance of further studying these molecular mechanisms to understand the vascular damage observed in diabetic complications.

**Keywords:** Hyperinsulinemia, AGE-RAGE, endothelial cells, Let-7c.



## II. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) es una enfermedad crónica caracterizada por la alteración en la regulación de los niveles plasmáticos de glucosa e insulina. Esta desregulación puede llevar a un estado de hiperinsulinemia crónica y resistencia a la insulina, condiciones que no solo deterioran el metabolismo glucémico, sino que también promueven complicaciones vasculares graves. Uno de los mecanismos subyacentes en estas complicaciones es la hiperglucemia crónica, que favorece la formación de productos finales de glicación avanzada (AGEs). Estos AGEs activan la vía AGE-RAGE de señalización proinflamatoria que tiene una participación clave en el desarrollo de daño endotelial y complicaciones vasculares, principalmente las microvasculares, asociadas a la DMT2.

En los últimos años, se ha sugerido que los microRNAs, pequeñas moléculas reguladoras no codificantes, podrían estar implicados en la modulación de diversas vías de señalización relacionadas con la inflamación y el daño vascular. Entre ellos, el microRNA Let-7c ha surgido como un posible regulador de la vía AGE-RAGE, ya que se ha demostrado que modula genes relacionados con la inflamación y el metabolismo, como el receptor del factor de crecimiento tipo insulina (IGFR-1) y la interleucina-6 (IL-6). Esto posiciona a Let-7c como un potencial biomarcador y objetivo terapéutico en la prevención de complicaciones diabéticas.

El presente estudio se enfoca en analizar el papel de Let-7c en la regulación de la vía AGE-RAGE en células endoteliales, así como su interacción con la hiperinsulinemia, una condición común en pacientes con DMT2 y en aquellos que van a desarrollarla, además de analizar la posible regulación de Let-7c sobre *IGFR-1* e *IL-6*.

### **III. ANTECEDENTES**

#### **3.1 INSULINA**

##### **3.1.1 Función**

La insulina es una hormona peptídica endócrina producida en el páncreas, con estructura tridimensional correspondiente a la de una proteína globular compacta, que tiene como principal función regular la homeostasis de la glucosa, además de ejercer efectos sobre múltiples funciones celulares como el metabolismo de proteínas y lípidos, esto gracias a la unión a su receptor en la membrana plasmática de las células diana desencadenando una serie de cascadas de señalización (1-3). Puntualmente, la insulina es un agente anabólico que favorece la absorción, almacenamiento y síntesis de nutrientes, a la vez que inhibe su descomposición y liberación en la circulación (4). La función de la insulina de promover el transporte de glucosa a través de las membranas celulares se describió por primera vez en 1949 (5) y años más tarde se estableció que esto era posible gracias a la unión a su receptor de superficie celular (6).

##### **3.1.2 Fisiología de la insulina**

La insulina se origina a partir de la proinsulina, una proteína inactiva sintetizada por las células beta de los islotes de Langerhans (7). La escisión del péptido C en la proinsulina desencadena su activación biológica, permitiendo que la insulina se una al receptor correspondiente (7).

La insulina, una vez activada y almacenada en gránulos, se libera por exocitosis en respuesta a la señalización inducida por la entrada de glucosa, la cual genera ATP, cerrando los canales de potasio dependientes de ATP, despolarizando la membrana y abriendo los

canales de calcio dependientes de voltaje, aumentando el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y desencadenando la liberación de insulina al torrente sanguíneo (7). La insulina se libera en la vena porta y llega a los hepatocitos, donde una glucoproteína transmembranal llamada molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario 1 (CEACAM1) elimina el 80% de la insulina secretada, mientras que la insulina restante se dirige a los tejidos sensibles, donde ejerce su acción al unirse a sus receptores (8).

### **3.1.3 Receptores de insulina**

El receptor de insulina (IR) y el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGFR-1) son glicoproteínas tetraméricas formadas por dos subunidades  $\alpha$  N-terminal extracelulares y dos subunidades  $\beta$  C-terminal transmembrana que se unen por enlaces disulfuro (4, 9). La subunidad  $\alpha$  es el dominio extracelular que interactúa con la insulina, por su parte, la subunidad  $\beta$  presenta dominio transmembrana y el dominio intracelular de actividad tirosina cinasa intracelular (10).

Existen dos isoformas del IR gracias al corte por procesamiento alternativo que sufre el transcrito del gen del receptor de insulina: *IR-A* e *IR-B*, estas se expresan de manera diferente en cada órgano y tejido y tienen una afinidad similar por la insulina (11, 12). Ambas isoformas están asociadas con la homeostasis energética en adipocitos, hepatocitos, miocitos y endotelio vascular, sin embargo se ha encontrado diferencia en la expresión y funcionalidad en diferentes tejidos y patologías, por ejemplo *IR-B* es más abundante y se relaciona a funciones metabólicas, mientras que *IR-A* favorece el crecimiento celular en cáncer y se expresa en menor abundancia (3, 13).

### **3.1.4 Vías de señalización de la insulina**

La unión de la insulina a su receptor provoca su autofosforilación en residuos de tirosina induciendo su actividad tirosina cinasa, fosforilando la tirosina de los sustratos del receptor de insulina (IRS) y de las proteínas transformantes que contienen el dominio de homología 2 de Src (SHC); esto desencadena la activación de dos principales vías de señalización intracelulares (Figura 1) con funciones distintas pero interconectadas: la vía PI3K/AKT (vía metabólica) y la vía MAPK/ERK (vía de crecimiento y proliferación celular) (4, 14).

#### *3.1.4.1 PI3K/AKT*

Las proteínas IRS fosforiladas activan la PI3K (Fosfatidilinositol 3-cinasa), que convierte PIP3 (fosfatidilinositol 4,5-bifosfato) en PIP3 (fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato) el cual activa la cinasa PDK1 (cinasa dependiente de fosfoinosítido 1) que a su vez fosforila y activa AKT (proteína cinasa B) (14). La activación de esta vía resulta en los procesos anabólicos por parte de la insulina, donde AKT promueve la traslocación de los transportadores de glucosa, principalmente GLUT4 hacia la membrana celular facilitando la captación de glucosa (4). AKT también activa la glucógeno sintasa, induciendo la síntesis de glucógeno y además inhibe la transcripción de genes asociados a la producción de glucosa en el hígado (14). Adicionalmente, la activación de AKT regula la síntesis de lípidos y proteínas a través de la activación de mTOR (15).

#### *3.1.4.2 MAPK/ERK*

La fosforilación del receptor de insulina también activa la proteína adaptadora Grb2, que a su vez recluta al factor de intercambio SOS, lo que conduce a la activación de Ras, una GTPasa responsable de iniciar la cascada de señalización MAPK, que incluye a RAF, MEK y

ERK (cinasa regulada por señales extracelulares) (14). ERK, una vez activa, fosforila a varios factores de transcripción como AP-1, promoviendo la expresión de genes implicados en el crecimiento y la proliferación celular (16).

La señalización de insulina incluye mecanismos de retroalimentación negativa como la activación sostenida de AKT que puede activar proteínas como mTOR y S6K, las cuales inhiben IRS, restringiendo la señalización de la insulina (17).

## **3.2 HIPERINSULINEMIA**

### **3.2.1 Definición**

Se define a la hiperinsulinemia al estado en el que los niveles de insulina están elevados en plasma con relación a los niveles necesarios para mantener la homeostasis de la glucosa y se puede mostrar elevada en los niveles circulantes de manera basal, en ayunas y/o al inducir la producción posprandial lo que puede provocar una hipersecreción de esta hormona y/o la disminución de su aclaramiento (2). Los valores basales para definir a la hiperinsulinemia no están bien descritos, pero algunos autores han propuesto como rango normal de insulina en ayuno de 3 y 30  $\mu\text{UI/mL}$  (18–180 pmol/L) (18), mientras que otros autores consideran el rango normal de insulina de 0,5-30  $\mu\text{UI/mL}$  (19). Lo cierto es que valores más allá de 6  $\mu\text{UI/mL}$  se consideran ya como elevados y deben monitorearse de cerca.

Las dietas ricas en carbohidratos al igual que la sobrealimentación inducen un aumento en la secreción de insulina y una hiperinsulinemia primaria constante (respuesta a cada comida o colación); en condiciones de sensibilidad a la insulina hay un incremento de la glucólisis en el tejido muscular y la producción de lactato, que al ser liberado a circulación actúa como sustrato para aumentar la gluconeogénesis en el hígado (20).

Se ha sugerido que la hiperinsulinemia es el defecto primario que precede a la resistencia a la insulina (RI) y que coexiste con la hiperglucemia, ambas condiciones responsables del desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) (20, 21). La relación entre la hiperinsulinemia y la RI ha sido motivo de debate, ya que existen dos opiniones al respecto: en primer lugar, está que el páncreas produce más insulina como mecanismo compensatorio por el aumento de glucosa en circulación provocado por una señalización deficiente de la insulina, por otro lado, se sugiere que la hiperinsulinemia puede iniciar y promover la RI (2, 22, 23). Además, en los últimos años se ha propuesto que un defecto de las células  $\beta$  en el páncreas puede causar hiperreactividad a los estímulos nutricionales que puede resultar en concentraciones elevadas de insulina de manera crónica, desencadenar la resistencia a la insulina y coexistir con hiperglucemia (24, 25).

La hiperinsulinemia crónica provoca la disminución del número de receptores de la insulina en la membrana de las células, reduciendo la sensibilidad a la insulina en los tejidos (20). En sujetos con obesidad pero sin diabetes e hipertensión, se ha descrito que la hipersecreción de insulina e hiperinsulinemia son más comunes que la RI, por ello pueden preceder y contribuir al desarrollo de ésta, sugiriendo que la hiperinsulinemia es el defecto primario en lugar de una compensación por la RI (26).

### **3.2.2 Resistencia a la insulina**

Existe un método simple que ha sido validado y utilizado para diagnosticar la RI, el HOMA-IR, (Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance) que fue desarrollado por primera vez en 1985 por Matthews y cols., (27). Este método se basa en la dinámica de interacción entre la glucosa y la insulina, evaluando la función de las células  $\beta$  (HOMA 2) y la RI a partir de concentraciones basales de glucosa e insulina o péptido C (28).

La RI se define como una respuesta disminuida de los tejidos a la insulina, esto provoca que la insulina no pueda realizar su actividad biológica resultando en el exceso de glucosa en circulación (hiperglucemia) (29). Ante esta condición los tejidos alteran sus vías metabólicas en respuesta a la insuficiente producción de energía, contribuyendo a problemas como la incapacidad de inhibir la gluconeogénesis en el hígado y la deficiencia en la supresión de la lipólisis en el tejido adiposo, resultando en obesidad, inflamación, dislipidemia, mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), aterosclerosis, disfunción endotelial e hipertensión (7, 30, 31).

En condiciones de RI se incrementa la secreción de adipocinas como la leptina, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-6 (IL-6) (32). En la obesidad, la acumulación de grasa no solo en tejido adiposo, sino también en el tejido muscular y hepático, contribuyen al desarrollo de RI en estos órganos (33).

#### **3.2.4 Enfermedades relacionadas a la hiperinsulinemia**

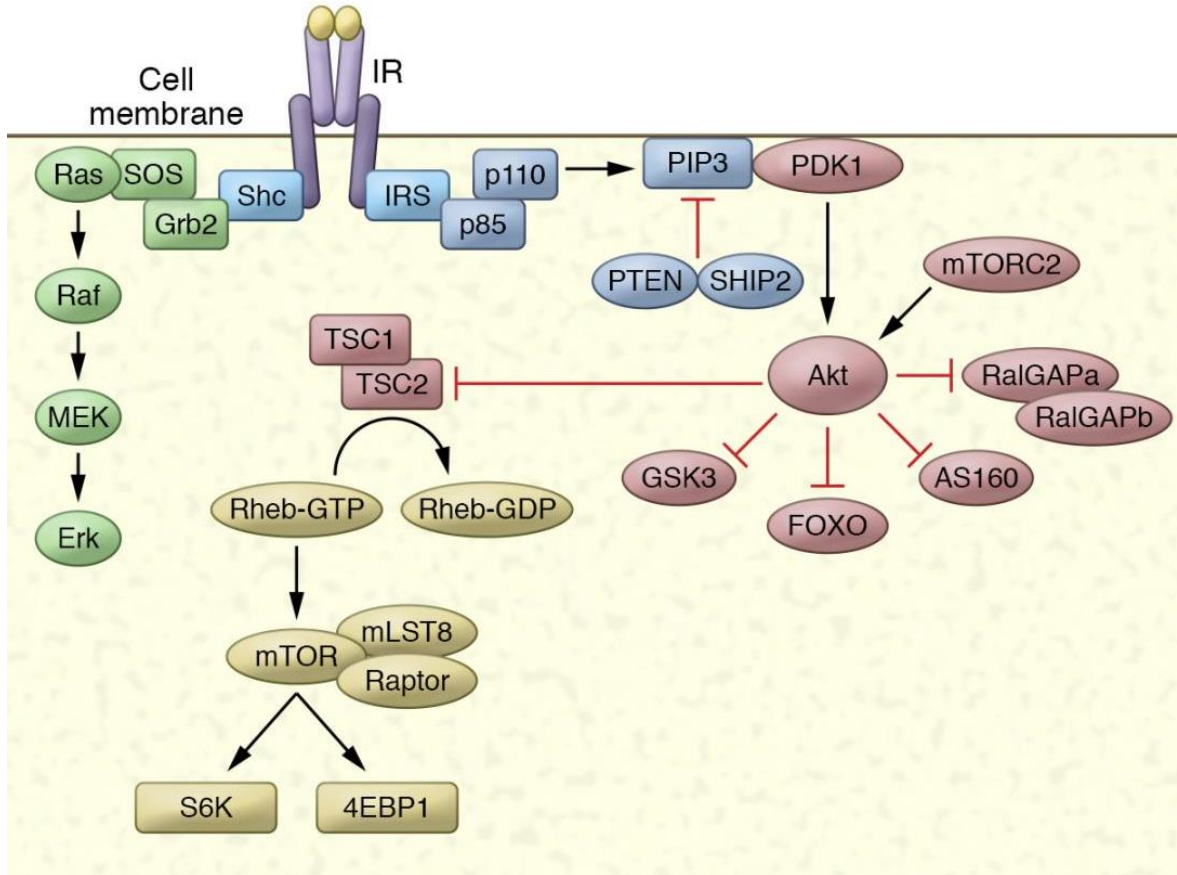
Los niveles de insulina circulante o péptido C y los resultados del índice HOMA-IR se han utilizado para evaluar el riesgo de desarrollar algunos cánceres relacionados con la hiperinsulinemia como el cáncer colorrectal, de mama, hígado, de páncreas, entre otros (34). Por otro lado, en personas con DMT2 se ha propuesto a la hiperinsulinemia como un factor que contribuye a la fisiopatología del deterioro cognitivo leve, al igual que a la progresión y mecanismos moleculares de la enfermedad de Alzheimer (35, 36).

En concreto, la hiperinsulinemia se ha señalado como un indicador temprano de difusión metabólica, ya que actúa agravando la resistencia a la insulina y afectando el almacenamiento

de la grasa y la función de las células  $\beta$ , lo que aumenta significativamente el riesgo de desarrollar DMT2 (26).

La hiperinsulinemia se ha relacionado fuertemente a la inflamación crónica de bajo grado en tejido adiposo y en suero, aumentando los niveles de citocinas proinflamatorias como IL-6, TNF- $\alpha$  y la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1) (37, 38). Además se ha encontrado que la hiperinsulinemia promueve la inflamación de manera directa en células del sistema inmune como los macrófagos y linfocitos T reguladores (39, 40). Se ha propuesto que condiciones como la DMT2 y la hipertensión pueden aumentar el riesgo de enfermedad de Alzheimer, en parte debido a la inflamación inducida por el estado de hiperinsulinemia periférica (41).





**Figura 1. Principales vías de señalización de la insulina.**

La unión de la insulina al receptor desencadena su autofosforilación y la fosforilación de tirosinas en las proteínas del sustrato del receptor (IRS) y otras moléculas de señalización como Shc. Los IRS fosforilados actúan como puntos de unión para otras proteínas de señalización, como PI3K y Grb2. La interacción de PI3K con las fosfotirosinas de IRS-1 activan esta enzima, iniciando una serie de eventos que resultan en la fosforilación y activación de AKT, esta activación es crucial para el transporte de glucosa y síntesis de proteínas, glucógeno y lípidos. La activación de Grb2, dependiente o no de IRS-1 (pero mediada por Shc), lleva a la activación de las vías de MAPK/ERK, que regulan la proliferación y el crecimiento celular. Imagen tomada de Saltiel 2021 (4).

### **3.3 DIABETES MELLITUS TIPO 2**

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) es una enfermedad multifactorial y un trastorno metabólico caracterizado por los niveles elevados de glucosa en sangre, denominada hiperglucemia, provocada por disfunciones sistémicas en la homeostasis metabólica, lo que genera daño a diversos tejidos y órganos a lo largo de su progresión (42). La hiperglucemia es provocada por la RI, por lo que hace que los niveles de glucosa en la sangre sigan aumentando e induciendo una mayor producción de insulina, eventualmente este proceso desencadenará un mal funcionamiento del páncreas y una menor producción de dicha hormona (43).

Según la Federación Internacional de la Diabetes (IDF), se reportó que en el año 2021, aproximadamente 537 millones de personas entre 20 a 79 años vivían con diabetes, de los cuales la DMT2 representa el 90% de los casos (44). Se pronostica que la cifra incremente a 784 millones en el año 2045 (44). En 2022, la prevalencia de diabetes diagnosticada y no diagnosticada fue de 18.3% o aproximadamente 14.6 millones de personas (45).

#### **3.3.1 Complicaciones de la DMT2**

Existen varias complicaciones crónicas asociadas a DMT2 como la depresión, demencia y disfunción sexual (46). En el entorno metabólico, la resistencia a la insulina, la liberación de ácidos grasos libres en exceso y la hiperglucemia crónica en la sangre, contribuyen al desarrollo de angiopatías (daño a los vasos sanguíneos causando enfermedades microvasculares y enfermedades macrovasculares (46, 47). La pared de los vasos sanguíneos se ve afectada por procesos como el estrés oxidativo, la hiperreactividad plaquetaria y la inflamación, causando esta disfunción endotelial que desencadena mecanismos inflamatorios asociados con las complicaciones vasculares (47). Las complicaciones microvasculares son muy frecuentes en personas diabéticas, causando la enfermedad renal diabética, de origen es

multifactorial, además está estimulada por tres mecanismos en conjunto: la lesión por hiperfiltración de la barrera de filtración glomerular, la expansión del mesangio glomerular y el estrés oxidativo (48, 49). La neuropatía diabética es otra de las complicaciones microvasculares, su forma más común es la polineuropatía diabética simétrica y afecta aproximadamente al 50% de los pacientes con DMT2 después de los 10 años de la enfermedad, ésta afecta a los nervios con un patrón dependiente de longitud dañando los más extensos primero, como los de las extremidades inferiores, y se puede observar deterioro en los nervios sensoriales principalmente (49, 50). Otra complicación es la retinopatía diabética, la afección ocular más frecuente en estos pacientes que se caracteriza por una modificación gradual continua en la microvasculatura de la retina resultando en áreas de perfusión retiniana provocando altos niveles de factor de crecimiento endotelial vascular-A, lo que conlleva al desarrollo anormal de nuevos vasos sanguíneos y que puede provocar una hemorragia vítrea (49, 51).

Factores como la resistencia a la insulina, la hiperglucemia y la acumulación de lípidos, se han asociado con un aumento del riesgo relativo de eventos cardiovasculares (52), así que dentro de las complicaciones macrovasculares, se encuentra la enfermedad cardiovascular acelerada, que provoca infarto al miocardio y enfermedad cerebrovascular que puede resultar en accidentes cerebrovasculares (46). Las principales enfermedades cardiovasculares (ECV) relacionadas a DMT2 son: la cardiopatía isquémica, insuficiencia cardiaca (IC), enfermedad arterial coronaria (EAC), enfermedad arterial periférica y accidente cerebrovascular, probando el 50% de las muertes de las personas con DMT2 (52). El efecto cardiovascular a largo plazo puede inducir una disfunción endotelial y un estado proinflamatorio, lo que aporta aún más a la progresión de aterosclerosis en pacientes con ECV (53).

### **3.4 ENDOTELIO VASCULAR**

Es la monocapa de células que rodean el área interna de la luz de los vasos sanguíneos, ejerce una función de barrera entre la pared del vaso y la sangre, por tanto, tiene contacto directamente con los elementos y compuestos de la sangre (54). Regula la adhesión celular, la angiogénesis, las respuestas inflamatorias, la hemostasia, el crecimiento y metabolismo de tejidos, así como la activación de plaquetas y el mantenimiento de la fluidez de la sangre, y protege el estado de los vasos sanguíneos (47). El endotelio expresa receptores como IR, IGFR-1 y receptores híbridos insulina/IGF-1, estos últimos activados también por la insulina pero en concentraciones más altas (55). Además, las células endoteliales son capaces de producir factores proinflamatorios como interleucinas, quimiocinas, interferones, MCP-1, entre (56).

#### **3.4.1 Daño endotelial**

En tejido endotelial, el estado de hiperinsulinemia promueve la inflamación por medio de diferentes mecanismos, como el aumento de la expresión y liberación de la angiopoyetina 2 (ANG-2), que sensibiliza al endotelio al efecto inductor de inflamación (57). Incluso se ha reportado que la insulina puede inhibir la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO) mediante la vía p38 MAPK-cFOS y elevar la inflamación en sujetos resistentes a la insulina con estado de hiperinsulinemia (56). Por otro lado, la RI en las células endoteliales puede contribuir a la inflamación del tejido vascular mediante diversas citocinas proinflamatorias (53).

La hipertensión y la hiperglucemia activan el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) que junto con la hiperinsulinemia ayudan a promover la vasoconstricción y la inflamación (53). La hiperglucemia contribuye al daño vascular por alterar el equilibrio entre la biodisponibilidad de NO y la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), además

de especies reactivas de nitrógeno (RNS), provocando la disfunción endotelial por diversos mecanismos impulsados por dicho desequilibrio, entre ellos el alto flujo de poliol y hexosamina, activación de proteína cinasa C (PKC) y el aumento en la producción de productos finales de glicación avanzada intracelular (AGEs), elevada expresión de receptores para AGEs (RAGE) y sus ligandos, (47).

### **3.5 PRODUCTOS FINALES DE GLICACIÓN AVANZADA**

Los AGEs son moléculas orgánicas heterogéneas que se originan a partir de reacciones no enzimáticas entre glucosa u otros carbohidratos con proteínas o lípidos (58). Estas moléculas se forman lentamente en organismos sanos y durante el envejecimiento. En condiciones como la diabetes, su producción se acelera notablemente (58). Además de sus múltiples propiedades, los AGEs se reconocen como importantes marcadores orgánicos de la glicación en el organismo (58, 59).

Los AGEs pueden formarse de manera endógena como productos de reacciones metabólicas celulares, o de manera exógena a través de la dieta (60). Factores ambientales como el humo de cigarro, las dietas altas en carbohidratos refinados e hipercalóricas, los alimentos cocinados a temperaturas elevadas y el sedentarismo, favorecen la producción de AGEs que pueden dañar proteínas y lípidos celulares (58). Se han identificado más de 20 diferentes AGEs en tejidos humanos y en alimentos (58).

La acumulación de AGEs en el organismo produce una carga metabólica como hiperglucemia e hiperlipidemia, y mediante de la inducción del estrés oxidativo puede activar diversos factores de transcripción, lo que desencadena la producción de mediadores inflamatorios y proinflamatorios, como citocinas y otras proteínas (58). Esta acumulación ha

sido ampliamente estudiada y se ha vinculado con diversas enfermedades, incluida la diabetes y sus complicaciones, como la enfermedad renal y cardiovascular (60-62). El primer producto endógeno de glicosilación temprana descrito fue la hemoglobina glicosilada (HbA1c), identificada en 1968 en sujetos con diabetes mellitus tipo 2 (63).

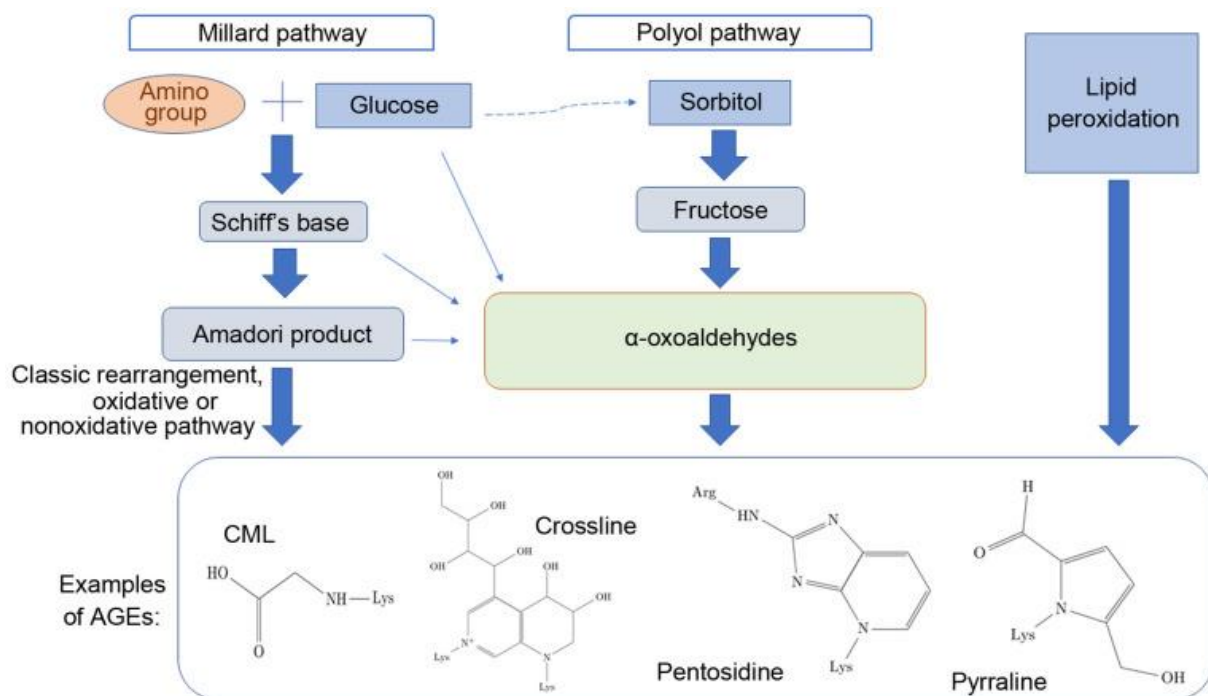
### **3.5.1 Formación de AGEs**

Los AGEs se generan principalmente a través de la condensación no enzimática entre grupos carbonilos de azúcares reductores y grupos amina libres presentes en proteínas, lípidos o ácidos nucleicos, continuando con una serie de reordenamientos añadidos que dan lugar a productos finales irreversibles y estables (64).

Existen varias vías, derivadas de distintos precursores, que conducen a la producción de AGEs, las cuales se representan esquemáticamente en la Figura 2 (65). Una de las rutas más conocidas es la vía Maillard, que consta de varias etapas (65). La primera de estas etapas implica la reacción entre el grupo carbonilo del azúcar reductor y el grupo amino de la proteína, formando una base de Schiff (reversible) (66, 67). Posteriormente, esta base experimenta un reordenamiento que da lugar a los productos de Amadori, los cuales son precursores importantes de AGEs y pueden reorganizarse mediante la vía de Hodge, la cual no solo produce AGEs, sino que también genera múltiples compuestos beneficiosos (66, 67). Es importante mencionar que esta vía se lleva a cabo tanto en organismos vivos así como durante el procesamiento de alimentos (68). Además, la base de Schiff o los precursores del producto de Amadori unidos covalentemente pueden desintegrarse a través de la vía de Namiki en dicarbonilos reactivos, también conocidos como  $\alpha$ -poxaldehídos, que pueden unirse a aminoácidos y dar origen a AGEs (67). Entre los compuestos de Amadori y los AGEs más abundantes y estudiados en los alimentos, destacan la fructoselisina (FL), generada por la

unión de glucosa y lisina, y N $\epsilon$ -(carboximetil)lisina (CML), que se forma ya sea por el reordenamiento a partir de FL o a partir de la reacción entre la lisina con los dicarbonilos glioxal o 3-desoxiglucosona, respectivamente (67).

La formación endógena de los AGEs y sus precursores implica las mismas reacciones no enzimáticas mencionadas anteriormente; sin embargo, a diferencia de la vía exógena, estos procesos ocurren de manera más lenta debido a las bajas temperaturas fisiológicas, además, en la producción endógena de AGEs también intervienen la vía del poliol y la glucólisis (67).



**Figura 2. Vías de formación de AGEs.**

Las tres principales vías de producción de AGEs son: la vía Millard, la ruta del poliol y la peroxidación de lípidos. También se indican los AGEs más abundantes y sus estructuras. Tomada de Kuzan, 2021 (65).



### **3.5.2 Receptor de productos finales de glicación avanzada**

El receptor de productos finales de glicación avanzada (RAGE) es una molécula que pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas de múltiples ligandos, su locus se localiza en el cromosoma 6, cerca del complejo principal de histocompatibilidad clase III y se descubrió por su gran capacidad de unirse a AGEs (58, 60, 69). El gen de RAGE (AGER) tiene 11 exones y 10 intrones cortos (70), la estructura de este receptor se describe en la Figura 3 (71).

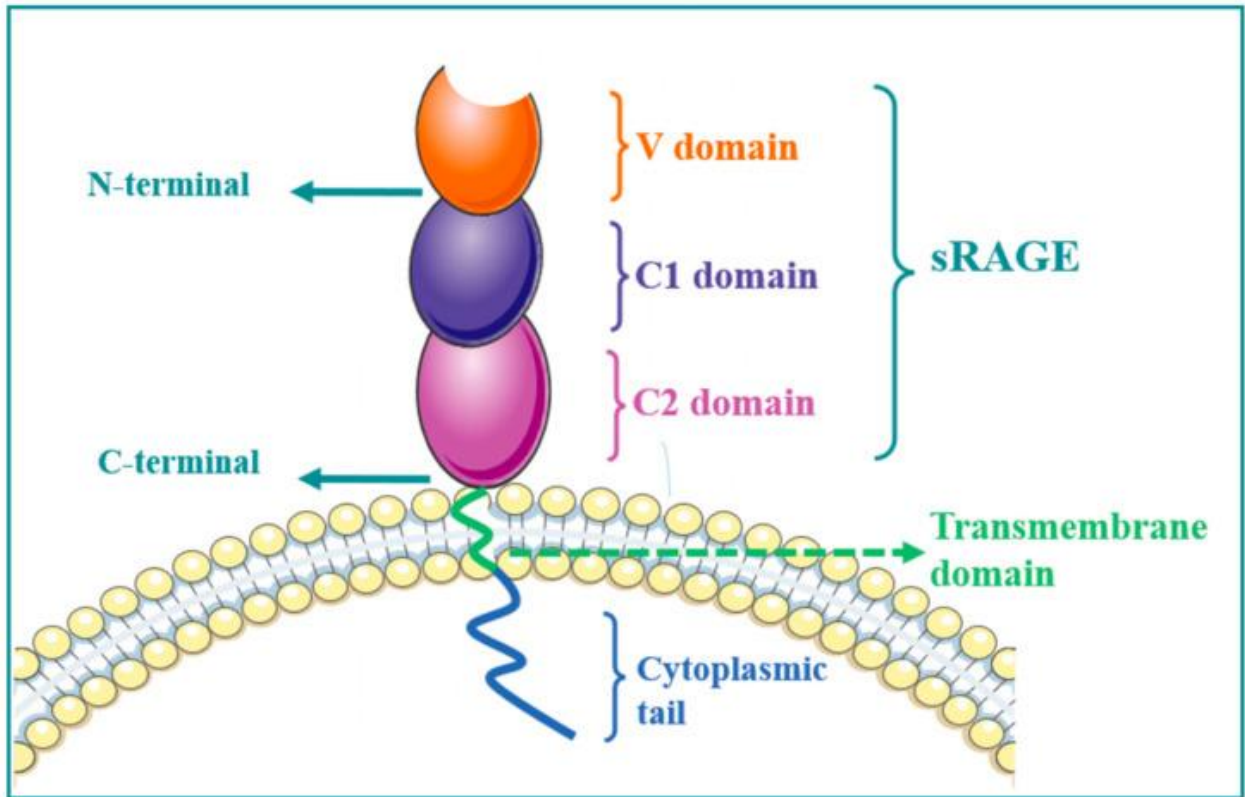
RAGE es un receptor transmembrana expresado por múltiples tipos celulares incluidas las células endoteliales, cardiomiocitos, células epiteliales, y de múltiples ligandos -28 conocidos- que inducen la activación de diversas vías proinflamatorias y pro-oxidativas, las cuales han sido estudiado ampliamente en contexto de DMT2 y otros trastornos metabólicos (69). Algunos de sus ligandos se caracterizan como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) o patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), por esto RAGE se considera un tipo de receptor de reconocimiento de patrones, y específicamente, algunos autores los describen como un receptor tipo Toll (TLR) (69, 72). Los productos resultantes de la activación de RAGE incluyen diversas moléculas proinflamatorias, oxidativas, de adhesión, apoptóticas, angiogénicas y profibróticas (69). Además de reconocer y unir a los AGEs, RAGE puede interactuar con otros ligandos, como el péptido  $\beta$ -amiloide y los colágenos I y IV (71). La unión de los AGEs al receptor celular RAGE aumenta la expresión de este receptor, lo que genera retroalimentación positiva (73).

La isoforma soluble de RAGE (sRAGE) se libera de la membrana celular mediante la acción de las metaloproteinasas de matriz y circula en sangre, donde puede capturar AGEs circulantes, lo que indica su papel protector en procesos fisiopatológicos (72). La isoforma sRAGE carece de función de transmisión de señales debido a la ausencia de sus fracciones

transmembranales e intracelulares, sin embargo, puede unirse de manera competitiva a ligandos de RAGE gracias a su región extracelular en forma de V que contiene los sitios de unión (71).

Como receptor transmembranal, la estructura de RAGE se compone de fracciones extracelulares, hidrofóbicas, transmembranales e intracelulares, y se presenta tanto en forma de moléculas transmembranales como de moléculas solubles (71). Las fracciones intracelulares y de membrana de RAGE tienen la capacidad de unirse a múltiples moléculas de señalización dentro de la célula, regulando así la transducción de señales (71).

Entre las funciones de sRAGE, se incluye el control de los efectos adversos provocados por la unión de AGEs a sus receptores; esta relación AGEs/sRAGE se ha identificado como un biomarcador independiente para diversas enfermedades como la renal y la diabetes, indicando la multifunción de esta vía en diferentes patologías (74).



**Figura 3. Estructura de RAGE.**

Se muestra el dominio extracelular que se divide en tres dominios, V, C1 y C2. Este receptor transmembrana atraviesa la bicapa lipídica, e incluye una cola citoplasmática intracelular. Se le denomina RAGE soluble a la región que se encuentra en la superficie sin el dominio transmembrana y la cola citoplasmática. Tomada de Yue y cols. 2022 (71).

### **3.5.3 Vía de señalización AGE- RAGE**

La unión de AGEs a su receptor activa diversas cascadas de señalización dentro de la célula, por ejemplo, la vía de las MAPK, vía JAK/STAT y PI3K/AKT, las cuales llevan a la activación de factores de transcripción, como el factor nuclear NF- $\kappa$ B, la proteína de unión al elemento de respuesta cAMP (CREB)-1, el factor de respuesta de crecimiento temprano (EGR)-1 y AP-1 (Figura 4) (75). La señalización mediada por RAGE varía según el tipo y concentración del ligando, la cantidad de RAGE en la superficie celular, el tipo de células y sus vías de señalización (76). Así, en cada tejido se pueden activar distintas cascadas mediante la vía AGE-RAGE (76).

### **3.5.4 Patologías relacionadas a la vía AGE-RAGE**

Los AGEs desempeñan un papel patológico importante en diversas enfermedades crónicas, como la DMT2, la insuficiencia renal y aterosclerosis, principalmente por promover las complicaciones microvasculares y macrovasculares mediante su interacción con RAGE (72). Esta interacción en diversos tejidos, como el endotelio, aumenta la resistencia del colágeno a la proteólisis enzimática, lo que resulta en un aumento relativo del colágeno en las paredes arteriales y se traduce en aumento de la rigidez arterial (72).

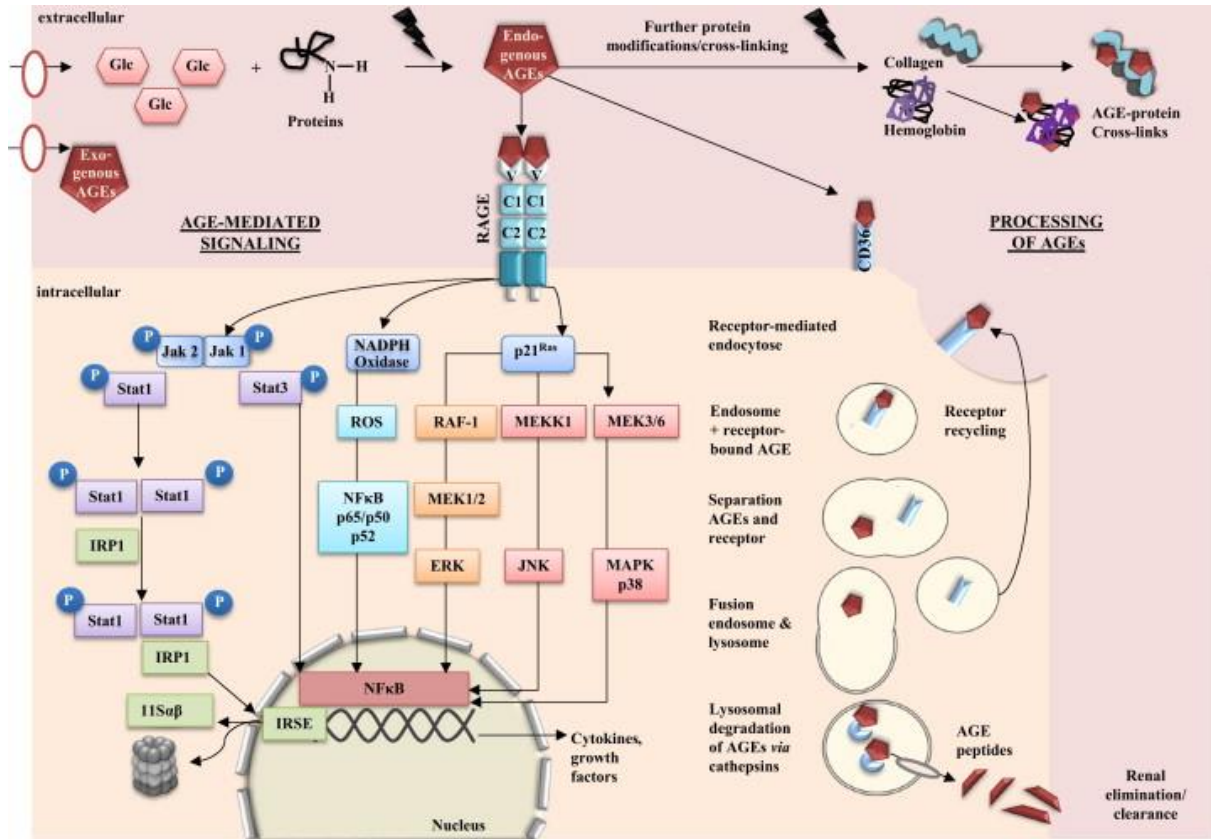
Esta vía también está relacionada con el aumento de estrés oxidativo, lo que provoca reacciones inflamatorias y fibróticas en diversos tejidos, contribuyendo a múltiples trastornos asociados al DMT2, el envejecimiento y las ECV (77). Además, se ha descrito una asociación entre niveles bajos de sRAGE en sangre y un mayor riesgo de enfermedad de las arterias coronarias y progresión de aterosclerosis en personas con y sin diabetes (72). Por otro lado, los niveles altos de sRAGE en hombres sin diabetes se han asociado con una menor incidencia de enfermedad de las arterias coronarias (78).

### **3.5.5 Vía AGE-RAGE e inflamación**

Además de ser expresado en diferentes tipos de células del sistema inmune, incluidos los neutrófilos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos, se ha observado un aumento en los niveles de RAGE en lesiones inflamatorias de diversas patologías y su capacidad para interactuar con múltiples ligandos proinflamatorios ha llevado a considerar a RAGE como un elemento importante en las respuestas inflamatorias (79).

La acumulación de AGEs en circulación sanguínea, como ocurre en la diabetes, provoca una activación continua de las vías de señalización proinflamatorias mediadas por RAGE, que están relacionadas con la NAD(P)H oxidasa, p21ras, MAPK, ERK1/2 y p38 y GTPasas Cdc42/Rac (76). La activación celular se caracteriza por la traslocación de NF- $\kappa$ B al núcleo donde regula la transcripción de genes blanco, incluyendo las moléculas de adhesión de leucocitos ICAM-1 y VCAM-1, así como diversas citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-6 (76). Además, la unión de AGEs a RAGE en las células endoteliales humanas desencadena la vía de señalización Rho, provocando cambios en el citoesqueleto, resultando en una alta permeabilidad vascular, que facilita la trans migración de los leucocitos hacia los tejidos inflamados y contribuye a la disfunción del endotelio (76).

La mayoría de los procesos fisiológicos involucrados en la patogenia la DMT2 y sus complicaciones, están regulados por moléculas encargadas de inhibir o inducir la expresión de genes relacionados en el eje AGE-RAGE y el proceso inflamatorio; algunos de estos genes contienen la información que codifica para microRNAs (80-82).



**Figura 4. Vías de señalización AGE-RAGE.**

La unión de AGEs a RAGE promueve diversas cascadas de señalización, como JAK/STAT, NADPH oxidasa, MAPK, (ERK)-1/2 y JNK. Esta señalización lleva a la activación de factores de transcripción como NF-κB o ISRE, seguido de una mayor síntesis de citocinas y factores de crecimiento. Algunos receptores basureros participan en la endocitosis, lo que provoca la captación dentro de la célula de AGEs y su posterior degradación gracias a la fusión con los lisosomas. Estos AGEs pueden transportarse hacia el sistema renal, en cambio los receptores pueden reutilizarse en otras etapas de endocitosis. Esquema tomado de Ott y cols. 2014 (79).

### **3.6 MicroRNAs**

Los microRNAs (miRNAs) son una clase de RNA monocatenario no codificante, de tamaño que varía entre 17 y 24 nucleótidos y altamente conservados evolutivamente (83, 84). Su función principal se relaciona con la regulación postranscripcional de la expresión génica a través de diversos mecanismos (83). Actualmente se encuentran registradas 1980 entradas de miRNAs distintos para el genoma humano en la base de datos miRbase ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)). El primer miRNA en humano descrito fue el Let-7 en el año 2003 (inicialmente fue identificado en nematodos) (85).

Los miRNAs se clasifican en intragénicos e intergénicos (86). Los miRNAs intragénicos son codificados en la parte intrónica o exónica de los genes codificadores de proteínas, por su parte los miRNAs intergénicos están codificados por genes específicos de miRNA y se localizan en áreas genómicas situadas entre los loci codificadores (86). Existen miRNAs en suero denominados miRNAs circulantes, que son notablemente estables y resisten la degradación por la RNAasa endógena, la mayoría proviene de las células sanguíneas, aunque también se encuentran en diversos tejidos como el pulmón, hígado, riñón y corazón (87). Su estabilidad ha favorecido su uso como biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico de múltiples patologías, entre ellas la ECV, y las variaciones en los niveles séricos de diversos miRNAs pueden promover su uso como posibles dianas terapéuticas (87).

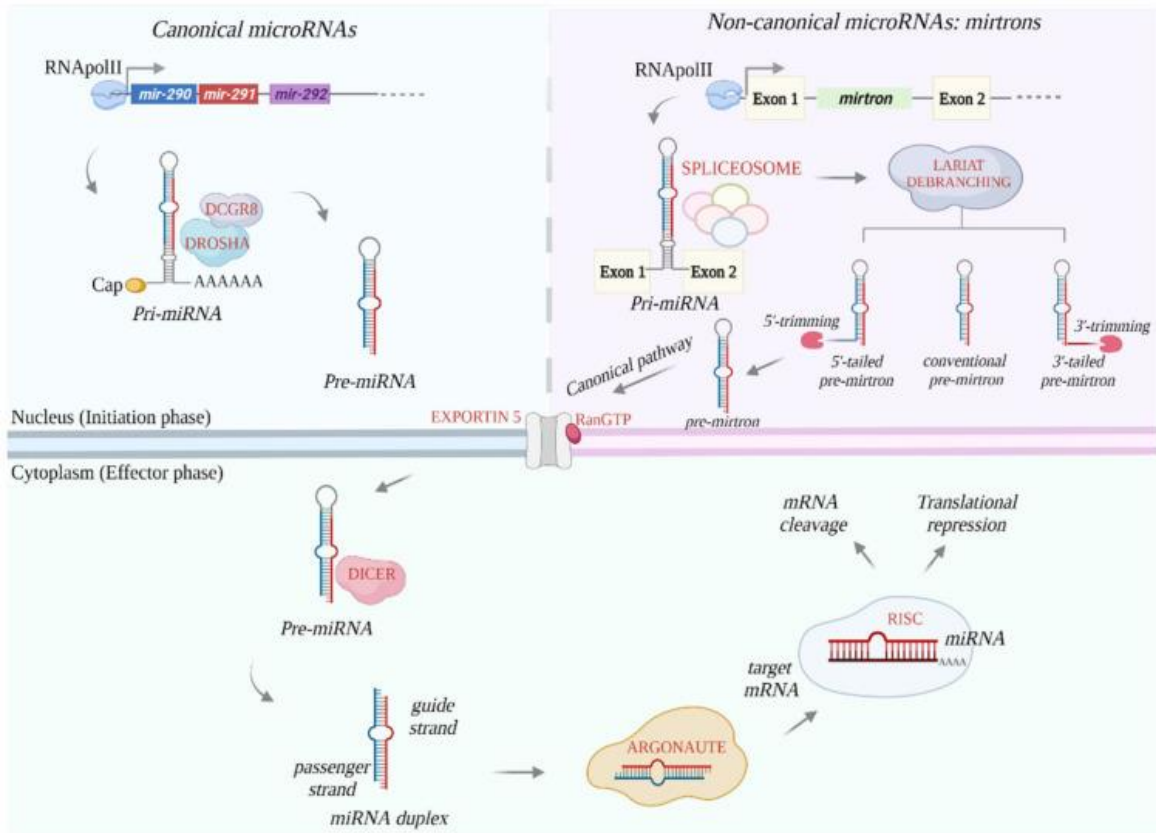
#### **3.6.1 Biogénesis de los miRNAs**

Existen dos vías para la biogénesis de los miRNAs: la vía canónica y la no canónica (se representan en la Figura 5) (88).

La biosíntesis de miRNAs, en la vía canónica, comienza con la transcripción por la RNA polimerasa II (Pol II) en el núcleo, generando un primer producto conocido como pri-miRNA, que presenta una estructura de horquilla (89). Los genes de miRNA pueden ser transcritos como conjuntos de intrones dentro de pre-mRNA que codifican proteínas, otros se transcriben como unidades de genes independientes o pueden codificarse en RNA largos no codificantes (lncRNA) (90). El pri-miRNA se procesa en el núcleo en fragmentos más pequeños por la ribonucleasa DROSHA, la proteína de unión al RNA (RBP), la proteína de la región crítica 8 de DiGeorge (DGCR8) y proteínas asociadas, dando lugar a la formación del precursor de miRNA (pre-miRNA) de aproximadamente 70 nucleótidos, que mediante la Exportina-5 se transfieren del núcleo al citoplasma, donde es cortado por la endonucleasa DICER convirtiéndose en un miRNA de doble cadena simple (dúplex de miRNA), estos se acoplan con un complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) y la proteína Argonaute (AGO), en esta etapa se selecciona la hebra para convertirse en un miRNA maduro (86, 89, 90). Este miRNA maduro puede regular la expresión de los mRNA diana mediante dos mecanismos: degradando el mRNA y/o reprimiendo la traducción del mismo, dependiendo del grado de complementariedad entre ellos (Figura 6) (90).

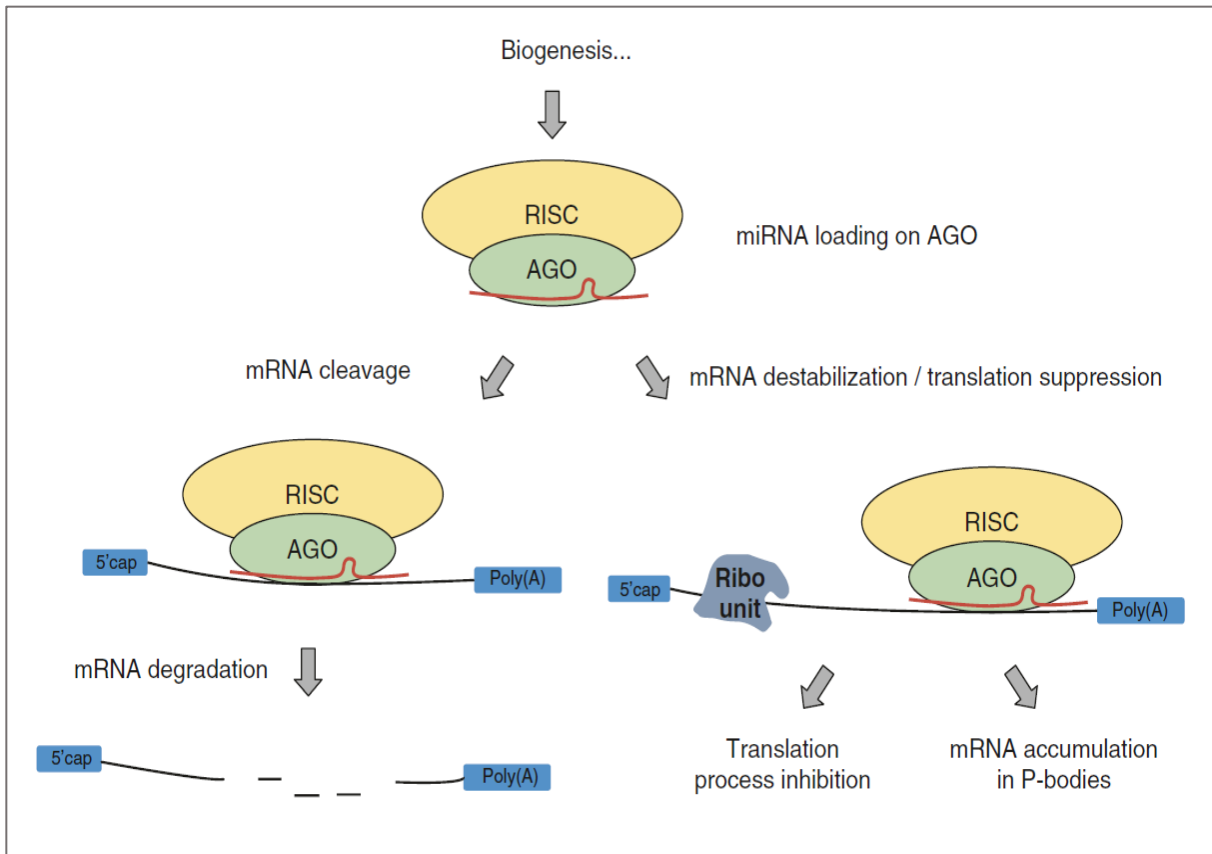
Los miRNAs que se producen por la vía no canónica, son similares en estructura y función a los miRNAs canónicos, pero tienen un proceso de maduración diferente (88). Los mirtrons son un ejemplo de miRNAs no canónicos y son precursores alternativos que se codifican por intrones localizados en regiones codificantes de algunos genes, cuyos pre-miRNAs son producidos por un mecanismo de empalme de intrones, sin utilizar el procesamiento por DROSHA (88).





**Figura 5. Biogénesis de microARN canónicos y no canónicos.**

El rectángulo de la izquierda (azul) muestra de manera general la fase de iniciación de la biogénesis canónica de los miRNAs. El rectángulo derecho (rosa) representa la etapa de inicio de los miRNAs no canónicos (mirtrons), cuyo proceso sucede independiente a DROSHA y necesita enzimas desramificadoras y empalmesomas en el núcleo. El rectángulo de abajo (verde) muestra la función efectora que experimentan ambos miRNAs. Figura tomada de Divisato y cols. 2021 (88).



**Figura 6. Mecanismos de regulación de la expresión génica por el complejo RISC.**

El diagrama muestra las dos formas en las que un miRNA puede mediar la expresión génica, al unirse al mRNA puede inducir degradación de este o inhibir su traducción. Esquema tomado de Georgakilas y cols., 2018 (86).

### 3.6.2 Funciones de los miRNAs

Al igual que la metilación del DNA y la acetilación de histonas, los miRNAs también representan un tipo de modificación epigenética que se ha relacionado y estudiado en múltiples patologías como el cáncer y las cardiopatías (86). De manera similar a los factores de transcripción, un solo miRNA puede regular la expresión de varios genes esto mediante la complementariedad de secuencias, lo que resulta en cambios en el patrón de traducción del mRNA (91, 92). Además, se ha establecido que los miRNAs actúan como reguladores complementarios del RNA en el dogma central de la biología molecular, estableciéndose como una representantes de toda las especies de RNA que afectan negativamente la producción de proteínas al regular la vida del mRNA (91, 93).

El mecanismo de acción de los miRNAs puede generar tanto la inhibición como la expresión génica (92). Estos se unen principalmente a la región no traducida 3'UTR del mRNA, aunque también pueden interactuar con la región 5'UTR e incluso a las regiones promotoras del mRNA, lo que condiciona acción biológica de estas uniones, y si bien, la mayoría de estas pequeñas moléculas inhiben la expresión génica de su mRNA diana actuando como un obstáculo de su traducción, también la unión de un miRNA a la región promotora de un gen puede originar la expresión de éste último (92). Un ejemplo es el miR-324-3p, que ha demostrado inducir la expresión del gen *RelA* a través de la activación de su promotor en células PC12, las cuales son origen neuronal (94).

Los miRNAs controlan una amplia variedad de procesos celulares, como la diferenciación, proliferación, migración y apoptosis (95, 96). Estas moléculas participan en la diferenciación celular por diversas vías: pueden prevenir la diferenciación prematura bloqueando los factores de diferenciación, inducir la proliferación celular actuando sobre los inhibidores del ciclo

celular, facilitar la diferenciación y además pueden colaborar para restringir y modificar el destino de las células derivadas del mismo conjunto de progenitores de manera regulada y transitoria (95).

Por otro lado, se ha identificado la actividad antiproliferativa de los miRNAs, funcionando como supresores de tumores (96). Sin embargo, en presencia de carcinogénesis, estas moléculas pueden inactivarse o alterar sus niveles, además, tienen la capacidad de modificar los niveles de diversos reguladores del ciclo celular afectando la proliferación, diferenciación y apoptosis, controlando así el perfil de expresión de proteínas derivadas de oncogenes dianas y genes supresores de tumores (96).

### **3.7 FAMILIA DE LOS miRNAS LET-7**

Let-7 fue el segundo miRNA descubierto, reconocido por primera vez en nematodos en el año 2000 por Reinhart y cols., tres años más tarde se identificó mediante análisis bioinformático como el primer miRNA caracterizado en humanos (85, 97). Los miembros de la familia Let-7 son codificados por 12 loci y se nombran por una letra que se agrega después del Let-7 y un número al final que significa que existen varios loci en la secuencia, los miembros descritos en humanos son: Let-7a, b, c, d, e, f, g, i y miR-98 y miR-202 (98). Algunos de los miembros de esta familia están localizados de forma individual en regiones cromosómicas, mientras que otros se ubican en grupos, por ejemplo, Let-7g se encuentra en el cromosoma 3 y Let-7i reside en el cromosoma 12 (98). La biogénesis se lleva a cabo por la vía canónica y se describe en la Figura 7 (98).

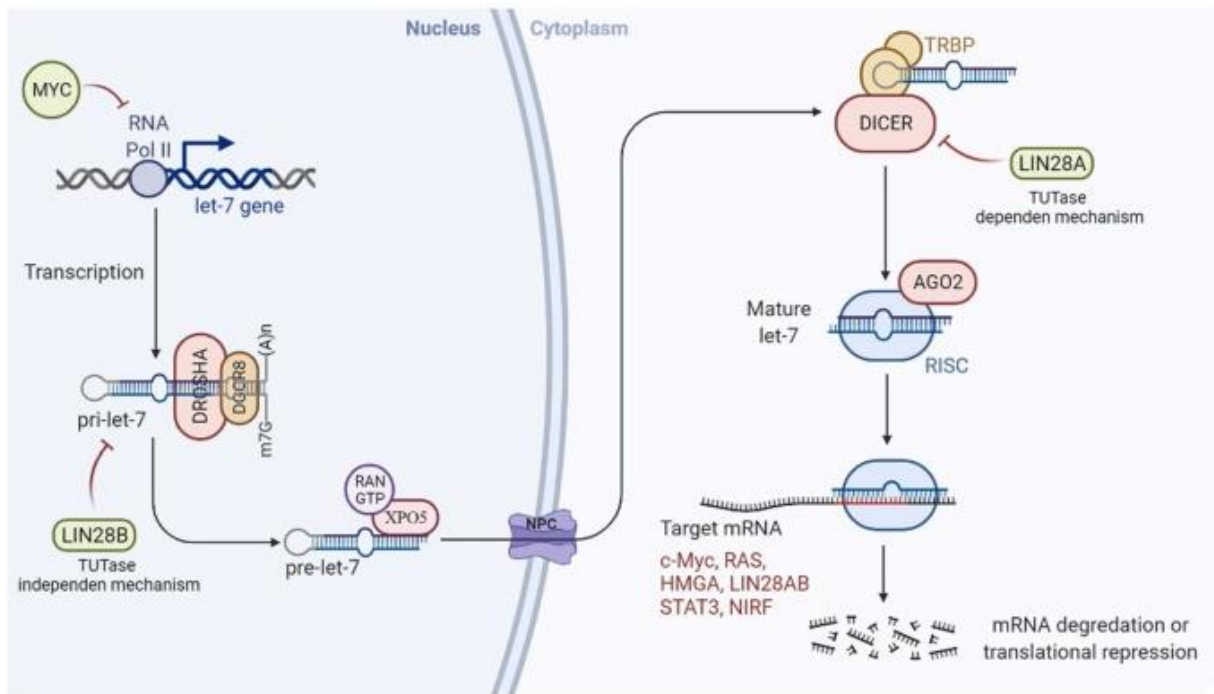
Los miRNAs Let-7 tienen actividad supresora de tumores, y potencial como biomarcadores pronósticos y predictivos se han propuesto para diversas patologías como el

cáncer (99, 100). La principal función de este miRNA es la regulación de la división y diferenciación de células troncales (98). También se han descrito funciones regulatorias inmunitarias de la familia Let-7, tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa (101).

### **3.7.1 Hsa-Let-7c**

Let-7c en humanos (Hsa-let-7c; ID de gen en NCBI: 406885), es un miRNA ubicado en el cromosoma 21q11-21 dentro del gen *LINC00478* y su tamaño es de 84 pares de bases ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)). Let-7c tiene una expresión reducida y ejerce función como supresor de tumores en algunos cánceres a través de la regulación de genes, por ejemplo, *N-RAS*, *C-MYC*, *MMP1*, *PBX2*, *PBX3*, y la sobreexpresión de este miRNA puede aumentar la apoptosis y disminuir la viabilidad celular, además inhibe la proliferación, la invasión y migración de células en contexto de cáncer (100, 102, 103). También se ha descrito su función antitumoral en el adenocarcinoma de pulmón al regular negativamente ANP32E postulándolo como un objetivo potencial terapéutico para este tipo de cáncer (104).

Por otro lado, se ha sugerido el papel de Let-7c como regulador de la diferenciación y función neuronal (105) y se han demostrado las propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras de Let-7c en un modelo murino después de un traumatismo craneoencefálico (106). También se ha propuesto el papel del miRNA Let-7c en la reparación tisular después de lesiones por LPS, actuando como factor protector de la respuesta inflamatoria mediada por NF- $\kappa$ B en contexto de la endometritis (107).



**Figura 7. Biogénesis de la familia Let-7.**

Dentro del núcleo, los genes para Let-7 se sintetizan por la RNA pol II, generando pri-miRNA con una tapa 5' y una cola poliA. Después actúan DROSHA y DGCR8, recortan este pri-Let-7 en el pre-miRNA formando un satélite 3' de dos nucleótidos, para así ser transportado por el complejo XPO5 y la Ran-GTPasa hacia el citoplasma por medio del complejo de poros nucleares (NPC). Fuera del núcleo, el pre-Let-7 se procesa por DICER y su cofactor TRBP eliminando el bucle terminal de pre-Let-7, los dúplex del miRNA Let-7 producidos se disponen en el complejo RISC. Una de las hebras se mantiene unida a RISC formando miRISC, para fungir como guía de Let-7, mientras que la otra cadena nombrada cadena de pasajeros, se degrada por el componente catalítico Ago2. El apareamiento de bases entre Let-7 y los mRNA objetivos guía a RISC hacia la transcripción complementaria, produciendo una inhibición génica por medio de la degradación de mRNA y/o el bloqueo de la traducción (98).

### 3.8 ANTECEDENTES DIRECTOS

Zhu y cols., en el 2012 informaron el papel del eje Lin28/Let-7 en la regulación del metabolismo de la glucosa mediada por RNA en modelo *in vivo* e *in vitro*. Al sobre-expresarse Lin28a/b en ratones hay una mayor tolerancia a la glucosa y resistencia a la diabetes actuando en la inhibición de la familia de Let-7; en cambio, sobre-expresarse Let-7 fue suficiente para inhibir el metabolismo normal de la glucosa, lo que también se observó en el cultivo celular de mioblastos C2C12. Adicionalmente, analizaron la vía señalización insulina-PI3K-mTOR utilizando inhibidores para las moléculas clave, observando que Lin28a promueve la activación de la vía PI3K-mTOR y promueve la captación de glucosa. Por su parte, la sobre-expresión de Let-7 atenúo la señalización inducida por Lin28a tras la estimulación con insulina. Además, analizaron los genes diana de regulación negativa por Let-7 implicados en el metabolismo de la glucosa, como *IGFR-1*, corroboraron que la región 3'UTR de *IGFR-1* es el objetivo de Let-7 para supresión. Por el contrario, un aumento de LIN28B reguló positivamente la proteína IGFR-1 en musculo esquelético *in vivo*. Los autores proponen que la regulación de varios elementos en la vía insulina-PI3K-mTOR podría explicar cómo este proceso controla la sensibilidad a la insulina y el metabolismo de la glucosa, al describir los bucles de retroalimentación negativa (108).

Una investigación realizada por Zhao y cols., en 2019 describió el papel importante de Let-7c en el proceso inflamatorio en contexto de endometritis en cultivos celulares y en modelo de ratón. Dentro de sus principales hallazgos reportaron que la expresión de Let-7c puede estar involucrada en la reparación de tejido y mostraron que este miRNA puede funcionar como un regulador negativo en la respuesta inflamatoria al disminuir la secreción de citocinas proinflamatorias. Por otro lado, se encontró que la sobreexpresión de Let-7c-5p

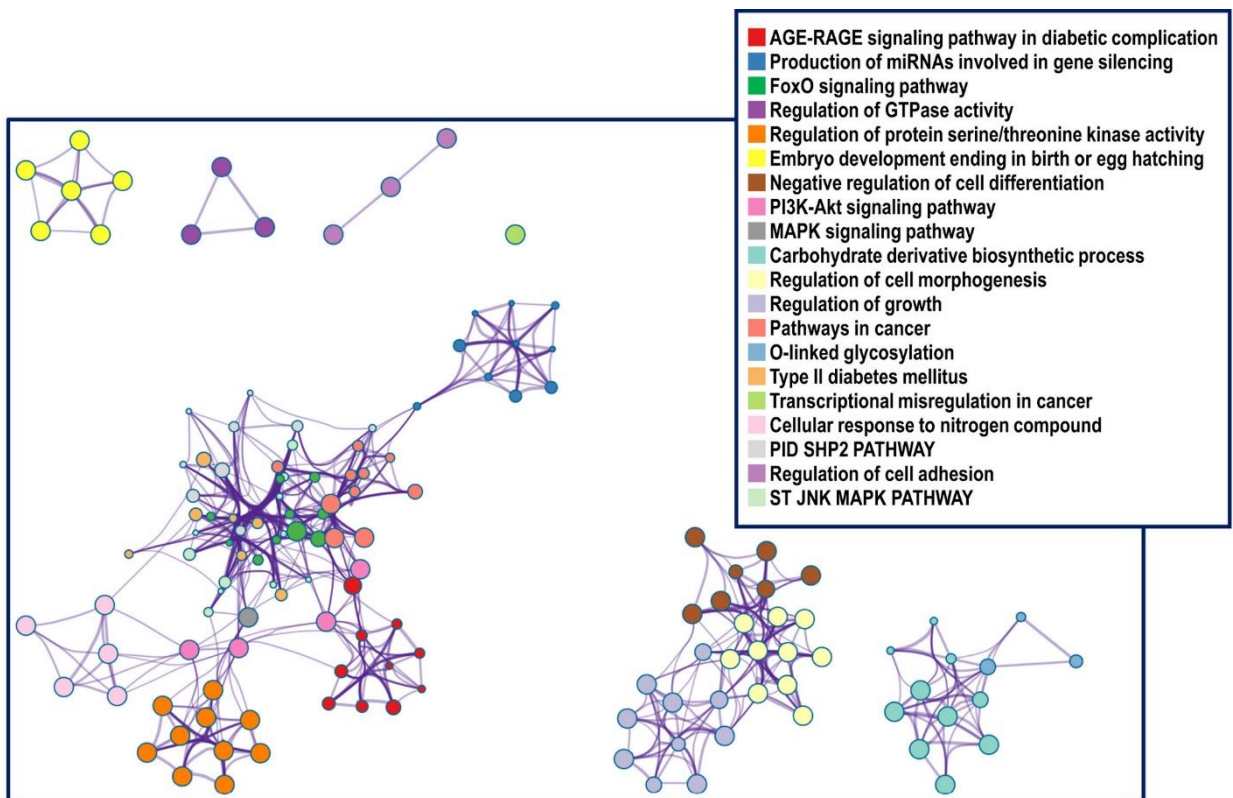
mitiga la expresión de diversas citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 por medio de la supresión indirecta de NF- $\kappa$ B, sugiriendo que este miRNA no actúa directamente en esta molécula, sino que puede tener como objetivo otro elemento que al ser inhibida por Let-7c bloquea la activación de NF- $\kappa$ B, por ejemplo, Ras. Los autores deducen que Let-7c puede ser un factor protector en la respuesta inflamatoria y por lo consiguiente, proponen este miRNA como una prometedora opción terapéutica en un futuro para las enfermedades inflamatorias (107).

Indyk y cols., en 2021, analizaron el proceso de glicación en personas con estadio avanzado de DMT 1 y 2 con el fin de comprobar si existe una relación estrecha entre la aparición de diabetes, complicaciones diabéticas, aterosclerosis e hipertensión y el aumento de AGEs y sus receptores en la circulación sanguínea en pacientes. En este estudio se confirma que los AGEs y sus receptores están involucrados en el desarrollo de la diabetes, ya que estas moléculas correlacionan con biomarcadores comunes de esta enfermedad, como la creatinina, hemoglobina glicosilada y la tasa de filtración glomerular (GFR); también encontraron que los AGEs contribuyen al desarrollo de enfermedades cardiovasculares por su relación entre los parámetros sanguíneos de los pacientes, como colesterol HDL y ácido úrico. Los autores destacan el papel potencial de los AGEs y sus receptores en el mecanismo patogénico de la diabetes, idea interesante que invita a explotar su posible uso como marcadores de diagnóstico debido a su larga vida en el organismo (109).

Pérez y cols., en 2022, dentro de su estudio enfocado en caracterizar la expresión de los miRNA miR-155 y Let-7c circulantes en la población con Síndrome Down y su posible relación con los factores de riesgo para desarrollar la Enfermedad de Alzheimer, realizaron un análisis bioinformático para identificar las vías biológicas relacionadas a miR-55 y Let-7c utilizando el *software* miRDB. Dentro de sus resultados encontraron que Let-7c podría estar



regulando 990 genes y diferentes vías de señalización. Como se muestra en la Figura 8, una de las principales vías diana de Let-7c es la vía de señalización AGE-RAGE importante en complicaciones diabéticas (110) y algunos de los genes que son regulados por Let-7c están relacionados con las respuestas a la insulina y la inflamación como *IGF-1*, *IGFR-1*, *IL-6*, *MAPK8*, entre otros (110).



**Figura 8. Redes de grupos de ontologías enriquecidas para los objetivos regulados por miRNA Let-7c.**

Se observa dentro de las principales vías de señalización reguladas por Let-7c, la vía de AGE-RAGE en complicaciones diabéticas, la producción de miRNAs involucrados en el silenciamiento de genes, algunas vías de crecimiento y diferenciación celular, entre otras. Figura tomada de Pérez, y cols., 2022 (110).

#### **IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) es una enfermedad crónica que afecta a millones de personas en todo el mundo y se asocia con un aumento significativo de la morbilidad y mortalidad debido a sus complicaciones vasculares, tanto cardiovasculares como microvasculares. Estas complicaciones representan uno de los principales retos en el manejo de la enfermedad, ya que persisten incluso en pacientes con un control adecuado de los niveles de glucosa en sangre.

Entre los factores que contribuyen al daño vascular en la DMT2 se encuentran la activación de la vía AGE-RAGE y la hiperinsulinemia, procesos que promueven el estrés oxidativo, la disfunción endotelial y la progresión del daño vascular. Sin embargo, los mecanismos moleculares que median estos efectos aún no están completamente esclarecidos. En particular, el papel de los microRNAs, como Let-7c, en la regulación de estas vías inflamatorias y disfuncionales ha recibido poca atención en el ámbito de la investigación científica y a pesar de que se ha sugerido que Let-7c tiene un papel importante en la progresión de las complicaciones vasculares en la DMT2. Sin embargo, su función específica en la regulación de la vía AGE-RAGE y su impacto en la inflamación y disfunción endotelial no se han estudiado a profundidad. Esta falta de conocimiento limita el desarrollo de estrategias terapéuticas innovadoras y la identificación de biomarcadores para el diagnóstico temprano o el pronóstico de estas complicaciones.

Este problema plantea la necesidad de investigar el papel de Let-7c en la DMT2 para entender mejor sus mecanismos subyacentes y explorar su potencial como blanco terapéutico en el manejo de las complicaciones vasculares asociadas a esta enfermedad.

## V. JUSTIFICACIÓN

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) es una de las principales causas de complicaciones cardiovasculares y microvasculares a nivel mundial, afectando a millones de personas y aumentando significativamente la morbilidad y mortalidad de la población. A pesar de los avances en el manejo de los niveles de glucosa en sangre, la progresión de las complicaciones vasculares sigue siendo un problema crítico. Entender los mecanismos moleculares que subyacen a estas complicaciones es esencial para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que no sólo aborden la hiperglucemia, sino también los factores proinflamatorios y disfuncionales que dañan el endotelio vascular.

En este trabajo investigamos un aspecto poco estudiado de la DMT2: el papel del microRNA Let-7c en la regulación de la vía AGE-RAGE, la hiperinsulinemia y la inflamación endotelial. La activación de la vía AGE-RAGE, junto con la hiperinsulinemia, pueden contribuir al daño vascular en pacientes diabéticos, pero los mecanismos precisos que median estos efectos y la participación de los microRNAs en este proceso no están completamente aclarados. El estudio de Let-7c es particularmente relevante porque este miRNA podría actuar como un modulador central en la inflamación inducida por la hiperglucemia y la hiperinsulinemia, siendo importante identificar el papel de Let-7c en estos procesos; Let-7c podría convertirse en un biomarcador útil para el diagnóstico temprano o el pronóstico de complicaciones vasculares, así como un blanco terapéutico para mitigar la inflamación y preservar la función endotelial en pacientes con DMT2.

## **VI. HIPÓTESIS**

El miRNA Let-7c regula la producción de IL-6 e IGFR-1 en células endoteliales al activarse la vía AGE-RAGE y al activarse la señalización generada por la hiperinsulinemia.

## **VII. OBJETIVOS**

### **7.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto del miRNA Let-7c sobre la producción de IL-6 e IGFR-1 en células endoteliales al activar la vía AGE-RAGE y al generar un estado de hiperinsulinemia.

### **7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Evaluar los niveles de expresión del miRNA Let-7c en células endoteliales al activarse la vía AGE-RAGE y al exponer a las células endoteliales a un estado de hiperinsulinemia.
2. Determinar la expresión de *IL-6* e *IGFR-1* en células endoteliales al activarse la vía AGE-RAGE y en condiciones de hiperinsulinemia.
3. Evaluar el efecto de la sobreexpresión de Let-7c en la producción de IL-6 e IGFR-1 en células endoteliales.

## VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1 CULTIVO CELULAR Y TRATAMIENTO

Se utilizaron células endoteliales microvasculares dérmicas humanas (HMEC-1) donadas por la Dra. Leticia Cedillo Barrón del Depto. de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV). Las células se cultivaron a 37 °C y una atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> en medio MCDB131 con elementos traza y L-glutamina 1.461 g/L (no. cat. M8537, Sigma-Aldrich), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, no. cat. 26140079, Gibco™.), 1 µg/ml de hidrocortisona (no. cat. H0888, Sigma-Aldrich), 1.5 µg/ml de suplemento de crecimiento de células endoteliales (ECGS) (no. cat. 354006, Corning), 60 µg/ml de ampicilina, 150 µg/ml de estreptomycin y 10 µg/ml de gentamicina.

Las células se pasaron al alcanzar un 80% de confluencia mediante tratamiento con tripsina al 0.5% (no. cat. T4549, Sigma-Aldrich) y se sembraron aproximadamente  $3.5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en placas de multipozos de 24 pocillos para los siguientes experimentos.

Para los diferentes tratamientos, se utilizó BSA (Bovine Serum Albumin) a 200 µg/ml (no. cat. 23209, Thermo Fisher), Glucosa AGE-BSA-II a 200 µg/ml (no. cat. ab288150, Abcam) e insulina glargina a 100 µM (Solución inyectable, Aurax). Además, se utilizaron inhibidores de las moléculas MAPK, PI3K y NFκB: U0126 a 5 µM (no. cat. U120, Sigma-Aldrich), PD98059 a 5 µM (no. cat. 513000, Sigma-Aldrich), Wortmanina a 10 nM (no. cat. 19545-26-7, Calbiochem), Ácido Cafeico a 8 µM (no. cat. Ab120862, Abcam) y DMSO como vehículo (Control, no. cat. D2650, Sigma-Aldrich).

Previo a cada tratamiento, se reemplazó el medio de crecimiento por MCDB131 al 0.5% de SFB para sincronizar a las células. Las células se mantuvieron 30 minutos en el medio de supresión con o sin inhibidores previo al tratamiento con BSA, AGE- BSA e insulina.

## **8.2 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR**

Para evaluar que los tratamientos utilizados no tuvieran un efecto citotóxico en las células, se realizó un ensayo de viabilidad por el método de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio) (no. cat. M2128, Sigma-Aldrich). El porcentaje de células viables se estimó después de 24 horas de tratamiento con BSA a (200 µg/ml), Glucosa AGE-BSA-II a tres diferentes concentraciones (20, 100 y 200 µg/ml) e insulina a 100 µM. Posteriormente, se añadieron 20 µl de MTT a cada pocillo de placas de 96 pocillos y se incubó durante 3 horas a 37 °C. Después, se eliminó cuidadosamente el medio y los cristales de formazán se disolvieron con 100 µl de 2-propanol/ácido clorhídrico. La absorbancia se midió a 570 nm utilizando el lector de placas Infinite M200 (TECAN) y los resultados se expresaron como cambio porcentual con respecto al grupo de control (sin tratamiento).

## **8.3 TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS**

Las células HMEC-1 se sembraron en placas de 24 pocillos, después de 24 horas post-siembra se transfectaron las células usando el Hsa-let-7c-5p miScript miRNA Mimic (no. cat. MSY0000064, Qiagen) de *Homo sapiens* con secuencia madura y el Syn-cel-miR-39 Mimic spike-in control de *C. elegans* como control, ambos a diferentes concentraciones (25 nM, 50 nM y 100 nM) por el método de lipofección. La mezcla de transfección constaba de la cantidad indicada de miRNA, 1 µl de Lipofectamine™ 3000 (no. cat. L3000001, Invitrogen), 1 µl de reactivo p3000 y medio Opti-MEM™ I (n. cat. 31985062, Gibco™) según



las recomendaciones del fabricante. La mezcla de transfección se incubó durante 30 min y posteriormente se agregó al cultivo celular, veinticuatro horas después se cosecharon las células y se prosiguió a la extracción de RNA total.

#### **8.4 ENSAYO DEL GEN REPORTERO**

Con el objetivo de censar la activación de NF- $\kappa$ B se realizó un ensayo de gen reportero. Las células HMEC-1 se sembraron en placas de 24 pocillos y se realizó la transfección con 100 ng/ $\mu$ l del plásmido pGL3Luc-5xNF-kappaB construido en nuestro laboratorio (111), 1  $\mu$ l de Lipofectamine™ 3000 (no. cat. L3000001, Invitrogen), 1  $\mu$ l de reactivo p3000 y medio Opti-MEM™ I (n. cat. 31985062, Gibco™) según las recomendaciones del fabricante. La mezcla de transfección se incubó durante 30 min y posteriormente se agregó al cultivo celular, veinticuatro horas después las células fueron tratadas con los diferentes estímulos por 24 horas más. Posteriormente, las células fueron lisadas con el Reporter Lysis 5X Buffer (no. cat. E3971, Promega) para la obtención de proteína tras un ciclo de choque térmico. Finalmente, la activación de NF- $\kappa$ B se determinó utilizando el Sistema de Ensayo de Luciferasa (no. cat. E1501, Promega). Los valores de actividad se normalizaron con respecto al contenido de proteína total obtenida mediante la cuantificación con Bradford (no. cat. 500-0006, Bio-Rad). La luminiscencia se midió a un tiempo de integración de 1000 ms y la absorbancia para cuantificar proteína se midió a 595 nm en el equipo Tecan Infinite M200.

#### **8.5 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL**

A partir de los diferentes tratamientos, se realizó la extracción del RNA (incluyendo los miRNAs totales) total de las células HMEC-1 utilizando Reactivo TRI® (no. cat. T9424, Sigma-Aldrich). Se realizó la separación de fases utilizando cloroformo para después precipitar el RNA total con isopropanol frío, se utilizó etanol al 70% para realizar dos lavados

y se resuspendió el RNA con H<sub>2</sub>O libre de RNAsas. La concentración y pureza del RNA se verificó mediante el Espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher).

## **8.6 CUANTIFICACIÓN DE MicroRNAS POR RT-qPCR**

### **8.6.1 Retro-transcripción (RT), Síntesis de cDNA**

Los miRNAs totales se convirtieron a cDNA utilizando el kit miRCURY LNA RT (no. cat. 339340, Qiagen) que permite la poliadenilación y la transcripción inversa del miRNA, ver Figura 9. La reacción de RT se realizó en un volumen final de 10 µl, el cual contiene 20 ng de RNA total, los componentes y condiciones de la reacción de RT se describen en la Tabla 1.

### **8.6.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR)**

Una vez obtenido el cDNA, se cuantificó el miRNA Let-7c-5p y U6, mediante PCR tiempo real utilizando el sistema miRCURY LNA SYBR Green PCR (no. cat. 339345, Qiagen). Este método permite detectar hasta 10 copias de miRNA utilizando los ácidos nucleicos bloqueados (LNA™), los cuales son análogos de ácidos nucleicos con alta afinidad. La inclusión de LNA en oligonucleótidos aumenta su afinidad de unión al DNA o RNA diana, incrementando la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) del dúplex, mejorando también la especificidad de los oligonucleótidos, permitiendo diferenciar errores de un solo nucleótido y distinguir los miembros cercanos de la misma familia de miRNA (112).

Siguiendo el diseño molecular del fabricante, se utilizaron los cebadores específicos para los miRNAs a estudiar: Hsa-let-7c-5p (no. cat. YP00204767, Qiagen) y U6 snRNA (YP00203907, Qiagen). La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 10 µl, los componentes y condiciones de la reacción de qPCR se describen en la Tabla 2. U6 se utilizó

como control constitutivo, el cual es un tipo de RNA nuclear pequeño (snRNA) altamente conservado entre especies. Las reacciones de qPCR de los miRNAs se realizaron en el termociclador tiempo real StepOnePlus (Applied Biosystems). La curva de disociación (Melt Curve) se usó para demostrar la especificidad de la reacción.

## **8.7 CUANTIFICACIÓN DE mRNA POR RT-qPCR**

Para la RT-qPCR de los genes de interés se utilizó el Kit KAPA SYBR® FAST One-Step (no. cat. KK4651, Sigma-Aldrich). La reacción de RT-qPCR se realizó en un volumen final de 10 µl, los componentes y condiciones de la reacción de qPCR se describen en la Tabla 3. Se utilizaron los cebadores específicos para los miRNAs a estudiar: gen de la *IL-6*, del gen *IGFR-1* (gen blanco de let-7c) y como gen constitutivo utilizó el gen ribosomal *18S*, las secuencias de los cebadores específicos se describen en la Tabla 4. La reacción de RT-qPCR se realizó en un termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems). La cuantificación relativa se estimó utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , el cual emplea directamente los valores de ciclos umbral (CT) generados por el sistema qPCR para realizar el cálculo (113).

① One single cDNA reaction for all miRNA

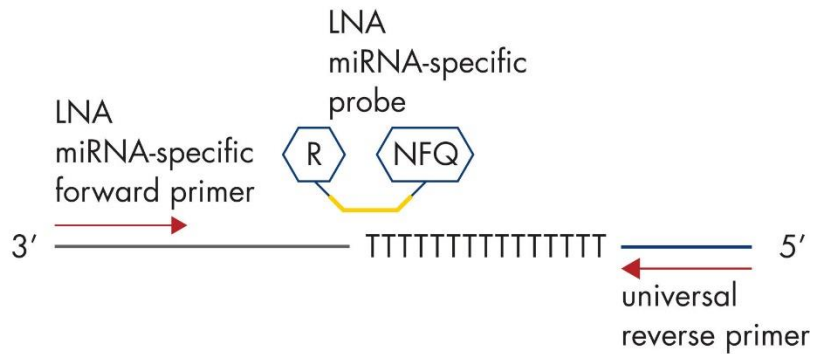
Step 1: polyadenylation



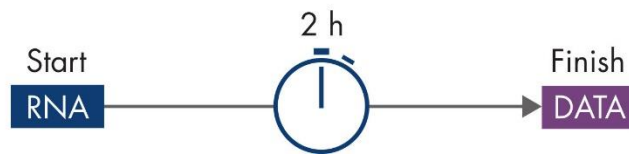
Step 2: reverse transcription



② Real-time PCR amplification with hydrolysis probe detection



③ Short (2 h) workflow with low hands-on time



**Figura 9. Diagrama del sistema de PCR con sonda miRCURY LNA miRNA.**

El sistema de PCR con sonda de miRNA LNA miRCURY para la síntesis de cDNA. Se utiliza un cebador de PCR directo y una sonda de hidrólisis que están mejorados con LNA y son específicos de miRNA (114).

**Tabla 1. Protocolo de la reacción de RT**

<b>Componentes de la reacción de RT</b>		
<b>Componente</b>	<b>Volumen</b>	
5× miRCURY RT Tampón de reacción	1 µl	
Agua libre de RNAsas	4.5 µl	
Mezcla de enzimas 10x miRCURY RT	1 µl	
Molde RNA (5 ng/µl)	4 µl	
<b>Volumen total de la reacción</b>	<b>10 µl</b>	
<b>Condiciones de síntesis de cDNA</b>		
<b>Etapa</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Temperatura</b>
Transcripción inversa	60 min	42°C
Inactivación de la reacción	5 min	95°C
Almacenamiento	∞	4°C

**Tabla 2. Protocolo de la reacción de qPCR**

<b>Componentes de la reacción de qPCR</b>		
<b>Componente</b>	<b>Volumen</b>	
2x miRCURY SYBR Green Master Mix	5 $\mu$ l	
ROX Tinte de referencia	0.3 $\mu$ l	
PCR mezcla de iniciadores	0.25 $\mu$ l	
cDNA molde	2 $\mu$ l	
Agua libre de RNasas	2.45	
<b>Volumen total de la reacción</b>	<b>10 <math>\mu</math>l</b>	
<b>Condiciones de amplificación</b>		
<b>Etapas</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Temperatura</b>
Activación inicial por calor de PCR	2 min	95°C
<b>Ciclos</b>		
Desnaturalización	10 seg	95°C
Alineación/Extensión	60 seg	56°C
Número de ciclos	40	
Análisis de la curva de disociación	-	60–95°C

**Tabla 3. Protocolo de la reacción de RT-qPCR**

<b>Componentes de la reacción de RT-qPCR</b>		
<b>Componente</b>		<b>Volumen 1x</b>
qPCR Master Mix (2X)		5 $\mu$ l
ROX High Reference Dye (50X)		0.2 $\mu$ l
dUTP (10 mM)		0.2 $\mu$ l
KAPA RT Mix (50X)		0.2 $\mu$ l
20 uM oligonucleótido F (20 $\mu$ M)		0.1 $\mu$ l
20 uM oligonucleótido R (20 $\mu$ M)		0.1 $\mu$ l
<b>Volumen de la Mezcla</b>		<b>6 <math>\mu</math>l</b>
Molde RNA (5 ng/ $\mu$ l)		4 $\mu$ l
<b>Volumen total de reacción</b>		<b>10 <math>\mu</math>l</b>
<b>Condiciones de amplificación</b>		
<b>Etapa</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Temperatura</b>
Transcripción inversa	5 min	42°C
Activación de enzima	5 min	95°C
<b>Ciclos</b>		
Desnaturalización	3 s	95°C
Alineación/Extensión	30 s	60°C
Numero de ciclos	<b>40</b>	
Curva de disociación	-	60–95°C

**Tabla 4. Secuencias de los cebadores utilizados en la reacción de RT-qPCR**

<b>Nombre del gen</b>	<b>Secuencia de los cebadores 5' - 3'</b>
<i>18S</i> Forward: <i>18S</i> Reverse:	CGAAGATATGCTCATGTGGT GACCTGGCTGTATTTCCAT
<i>IGFR-1</i> Forward: <i>IGFR-1</i> Reverse:	GCGGCTGGAAACTCTTCTACAAC TGGTCTTCTCACACATCGGCTTCT
<i>IL-6</i> Forward: <i>IL-6</i> Reverse:	GGCACTGGCAGAAAACAACC GCAAGTCTCCTCATTGAATCC



## **8.8 ENSAYO POR INMUNOADSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA)**

Para determinar la concentración de proteína IL-6 en el medio sobrenadante de las células tratadas, se realizó un ensayo de ELISA. Se utilizó el kit DuoSet ELISA (no. cat. DY206, R&D System) ajustando los volúmenes para el uso de placa de multipozos de 384 pocillos Nunc® MaxiSorp™ (no. cat. P6366, Sigma-Aldrich), siguiendo los protocolos proporcionados por el fabricante. La absorbancia asociada con la presencia de IL-6 se adquirió a una longitud de onda a 450 nm con corrección a 540 nm utilizando un lector de microplacas Tecan Infinite M200 (Tecan Group) y las concentraciones finales se calcularon sobre la ecuación de la curva estándar.

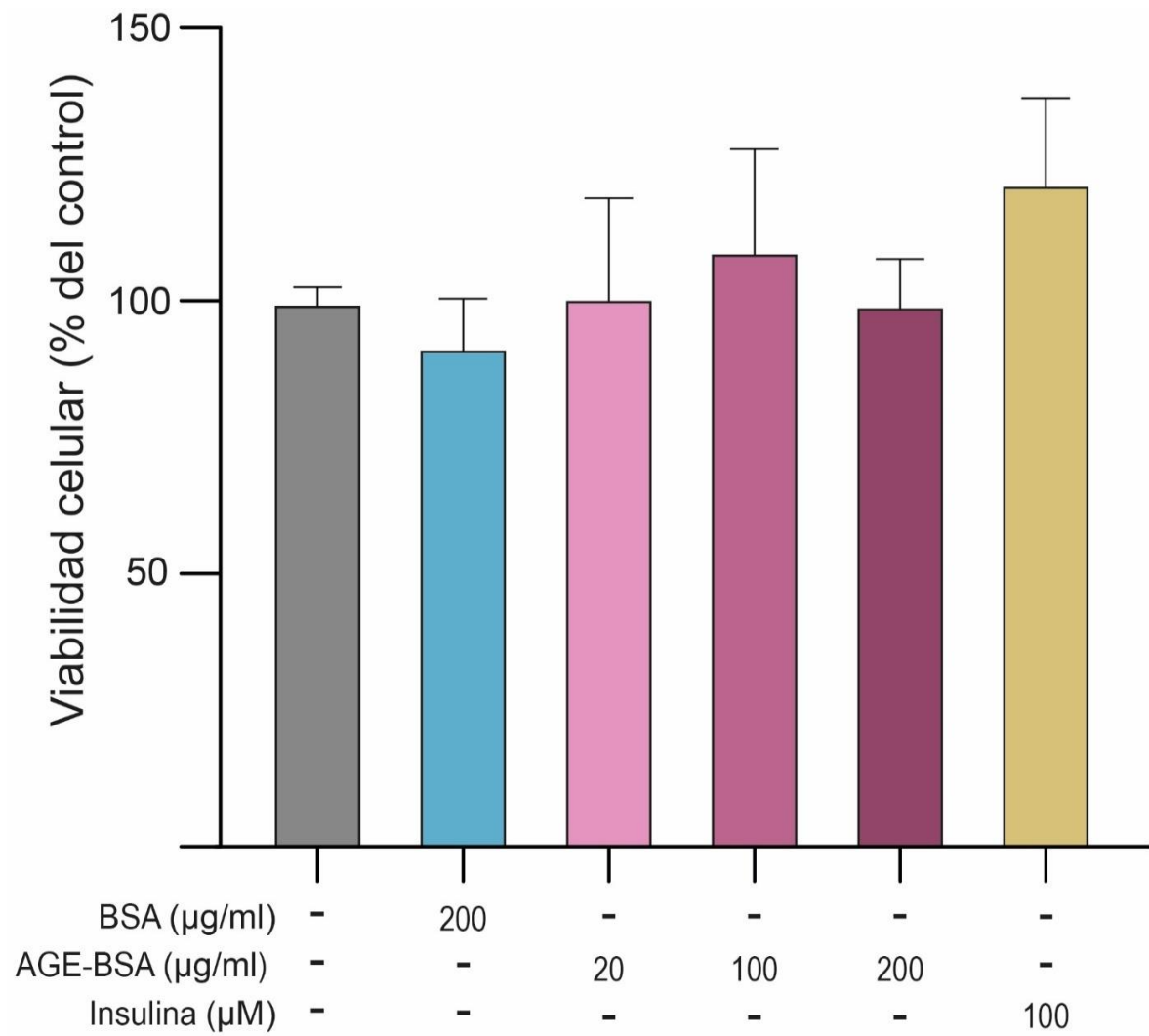
## **8.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para determinar si había diferencias significativas entre las condiciones. Se consideró significancia estadística cuando el valor de P sea  $<0.05$ . Se utilizó la prueba post-hoc de Student-Newman-Keuls (*t*-Student) para determinar qué condiciones eran significativamente diferentes entre sí. El análisis estadístico se realizó en el Software GraphPad Prism versión 8.0.

## **IX. RESULTADOS**

### **9.1 VIABILIDAD DE CÉLULAS HMEC-1 ANTE DIFERENTES ESTÍMULOS**

Se determinó el porcentaje de viabilidad de las células HMEC-1 tratadas durante 24 horas para determinar posible daño citotóxico. Los resultados de los dos ensayos de MTT realizados por triplicado (N=6) muestran que no existe diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de viabilidad entre las condiciones con tratamiento de Insulina y AGES con el grupo no tratado (Figura 10), indicando que los tratamientos no provocan muerte celular en HMEC-1 y éstas pueden responder a los estímulos. Tomando en cuenta estos resultados, se decidió trabajar con la concentración más alta de AGE-BSA (200 µg/ml) para los siguientes experimentos.



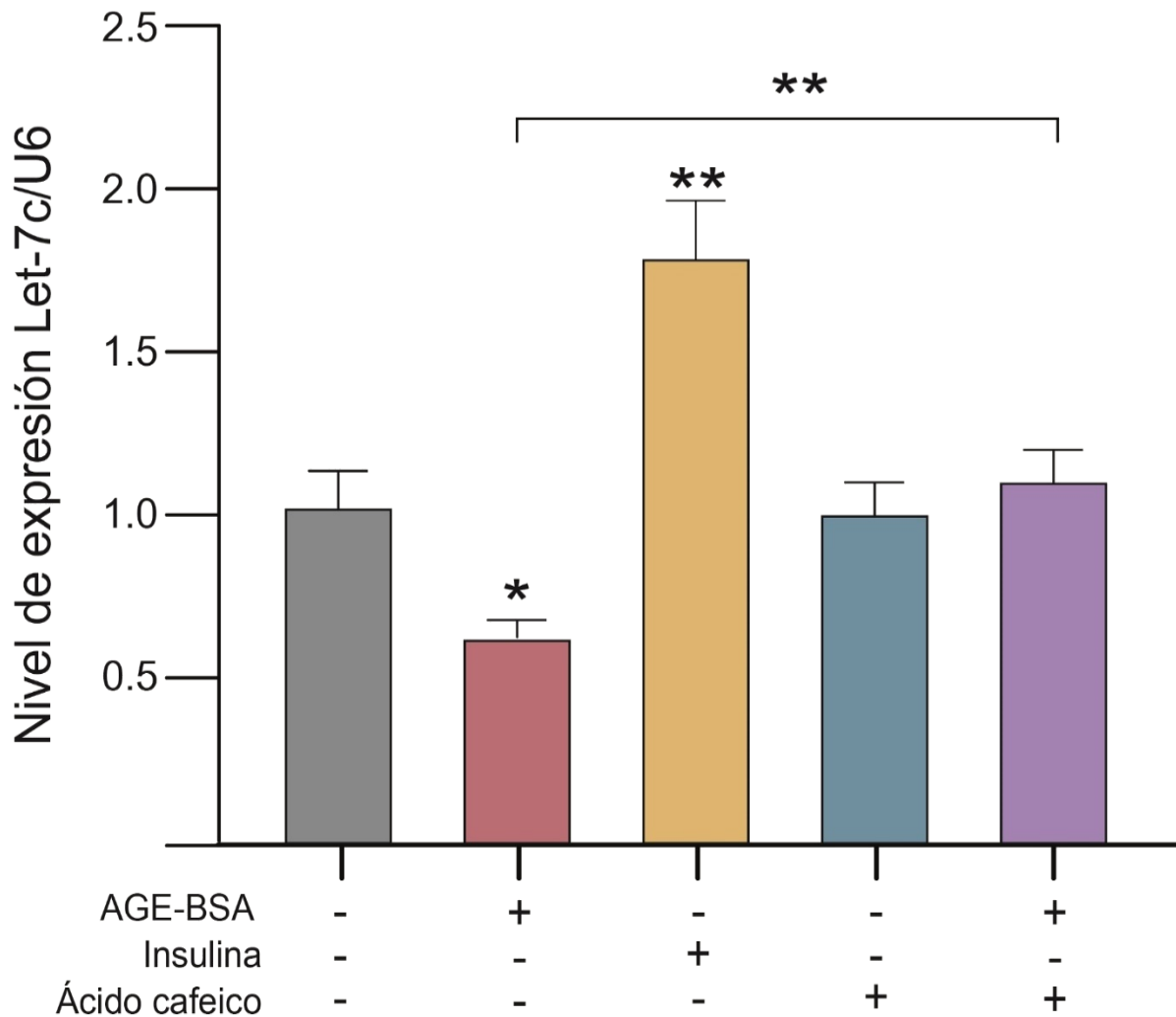
**Figura 10. Viabilidad de células HMEC-1 tratadas con los diferentes estímulos.**

Las células HMEC-1 fueron tratadas con BSA, AGE-BSA e insulina por 24 h. Posteriormente se evaluó la viabilidad mediante un ensayo de MTT. Cada barra indica el promedio de los valores de dos experimentos independientes por triplicado  $\pm$  SEM.

## **9.2 EXPRESIÓN DEL miRNA LET-7C EN HMEC-1 Y ACTIVIDAD DE NF- $\kappa$ B AL ACTIVAR LA VÍA AGE-RAGE Y EN ESTADO DE HIPERINSULINEMIA**

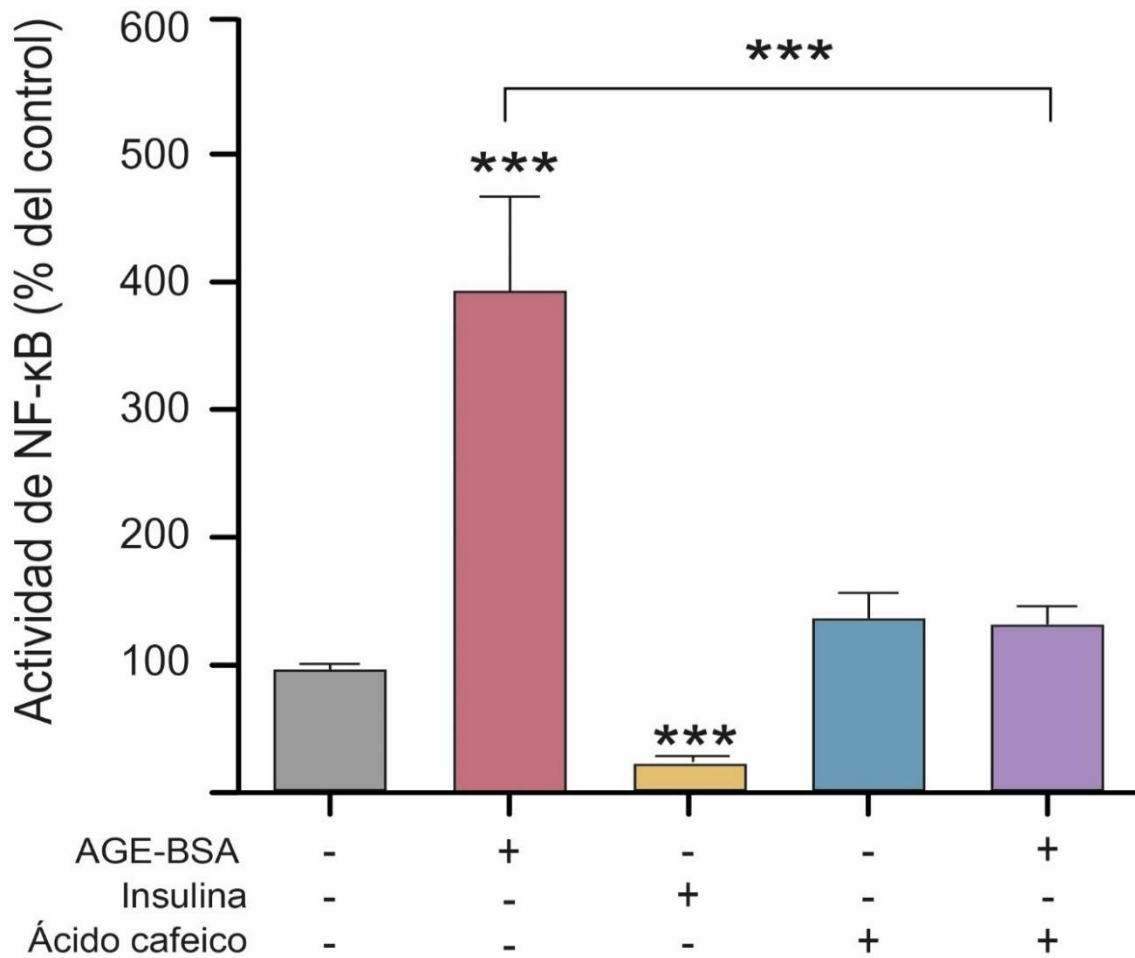
Se cuantificaron los niveles de Let-7c en células HMEC-1 para analizar los efectos sobre su expresión al activar la vía AGE-RAGE con el tratamiento de AGE-BSA (200  $\mu$ g/ml) y en estado de hiperinsulinemia (insulina a 100  $\mu$ M durante 24 horas). Las células no tratadas y tratadas con BSA se utilizaron como controles para el tratamiento de insulina y AGE-BSA, respectivamente.

Como se muestra en la Figura 11, los niveles de expresión del miRNA Let-7c disminuyen significativamente ( $P=0.0178$ ) al activar la vía AGE-RAGE en HMEC-1. Por otro lado, en estado de hiperinsulinemia los niveles de Let-7c aumentan ( $P=0.0012$ ) en estas células. Adicionalmente, con la finalidad de conocer si NF- $\kappa$ B es el factor de transcripción que regula estos cambios en la expresión, se realizó un tratamiento con el inhibidor de NF- $\kappa$ B (ácido cafeico). Los resultados muestran que los niveles de Let-7c se restablecen al inhibir NF- $\kappa$ B ( $P=0.0017$ ) en presencia de AGE-BSA.



**Figura 11. Niveles de expresión del miRNA Let-7c en HMEC-1.**

Las células HMEC-1 fueron tratadas con AGE-BSA (200 µg/ml), Insulina (100 µM), ácido cafeico (8.8 µM) y la combinación de AGE-BSA y ácido cafeico durante 24 h. Posteriormente a la extracción de RNA total, se cuantificó el miRNA Let-7c mediante RT-qPCR y se analizaron los datos con el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  normalizados contra el miRNA endógeno U6. Se consideraron como control las células no tratadas o tratadas con BSA (200 µg/ml) según correspondiera. Cada barra indica el promedio de los valores de tres experimentos independientes por duplicado  $\pm$  SEM, *t*-Student (\* $P \leq 0.05$ ) (\*\* $P \leq 0.01$ ).



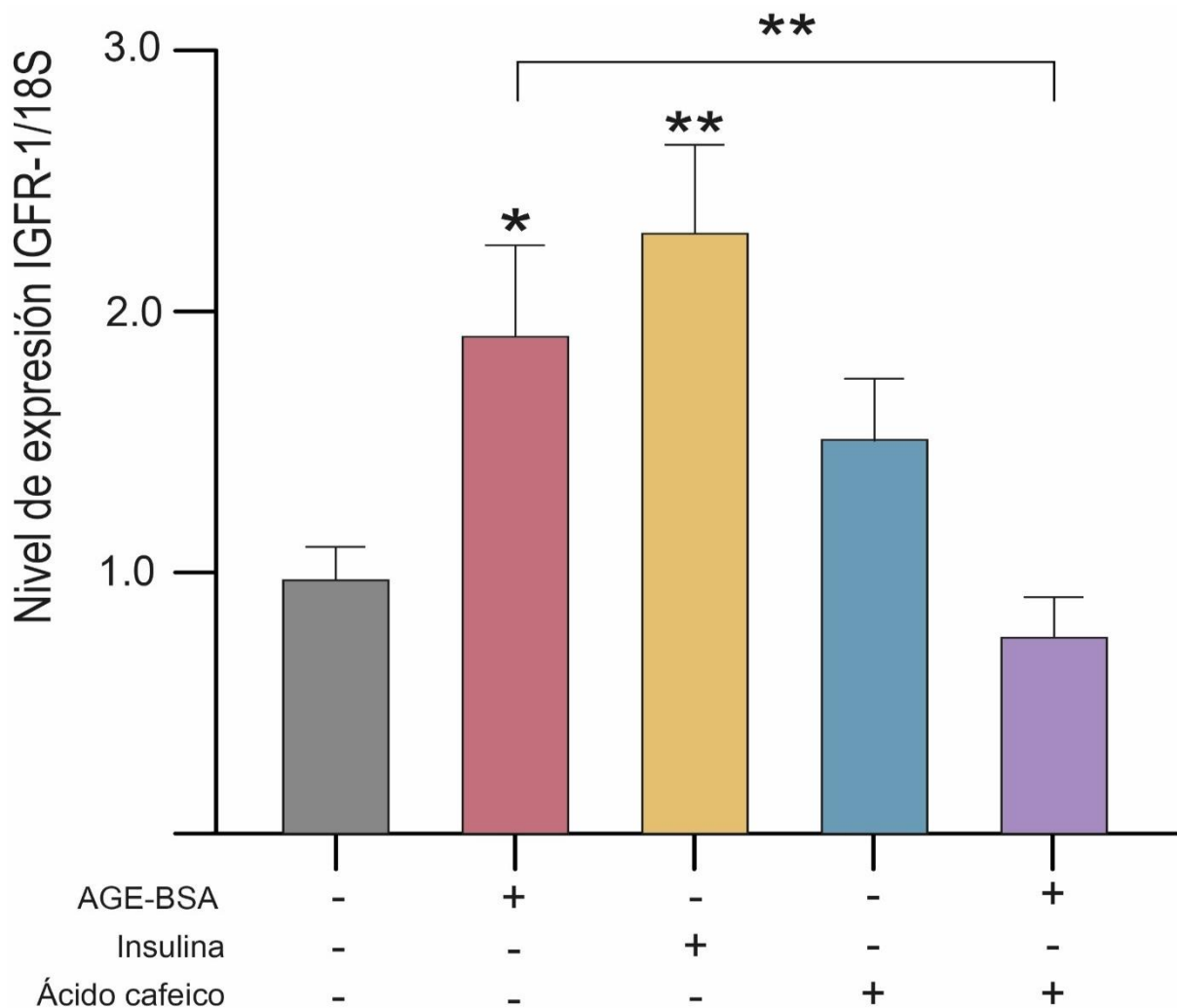
**Figura 12. Actividad de NF-κB en HMEC-1.**

Las células HMEC-1 fueron transfectadas con el plásmido reportero para medir la actividad de NF-κB denominado pGL3Luc-5xNF-kappaB; 24 h después fueron tratadas con AGE-BSA (200 µg/ml), Insulina (100 µM), ácido cafeico (8.8 µM) y la combinación de AGE-BSA y ácido cafeico durante 24 h. Posteriormente, se evaluó la actividad de NF-κB mediante el ensayo de gen reportero. Los datos obtenidos fueron normalizados por cantidad de proteína y se consideraron como control las células no tratadas o tratadas con BSA (200 µg/ml) según corresponda. Cada barra indica el promedio de los valores de dos experimentos independientes por triplicado +/- SEM, *t*-Student (\*\*\*) $P \leq 0.0001$ .

### **9.3 EXPRESIÓN DE mRNA DE *IGFR-1* E *IL-6* (mRNA Y PROTEÍNA) EN HMEC-1 AL ACTIVAR LA VÍA AGE-RAGE Y EN ESTADO DE HIPERINSULINEMIA**

Para cuantificar los niveles del mRNA de los genes *IGFR-1* e *IL-6* (ambos regulados por el miRNA Let-7c) se realizó un ensayo de RT-qPCR con cebadores específicos, como se muestra en las Figuras 13 y 14; tras 24 horas de exposición a los diferentes tratamientos, los niveles de mRNA de *IGFR-1* aumentaron significativamente al activar la vía AGE-RAGE en HMEC-1 (P=0.016). Al inhibir NF- $\kappa$ B con ácido cafeico en células estimuladas con AGE-BSA, los niveles de mRNA de *IGFR-1* se restablecieron (P=0.0041). En cuanto a la hiperinsulinemia, también se observó un aumento significativo en los niveles de expresión de *IGFR-1* (P=0.001) en las células HMEC-1.

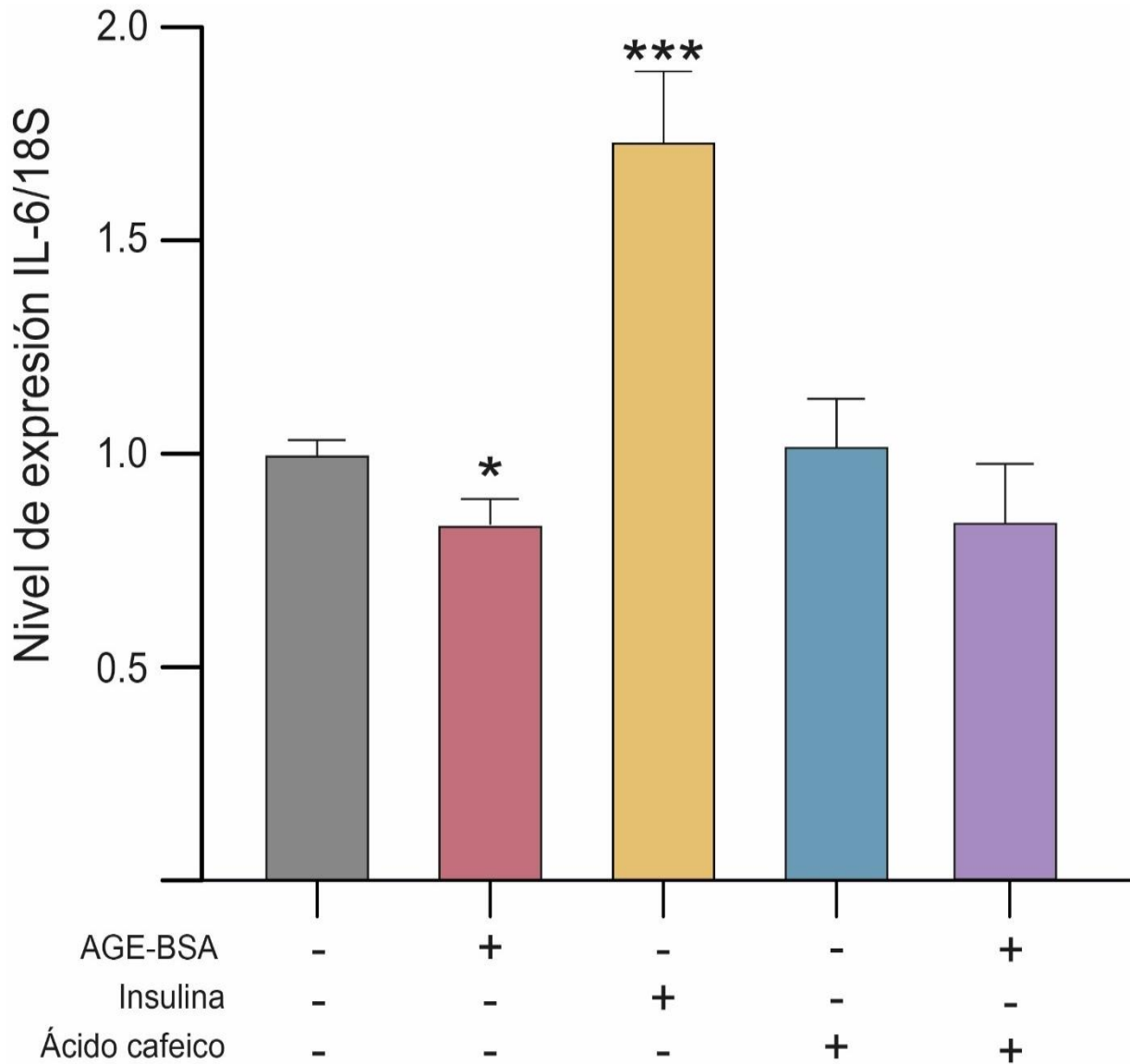
En relación con la expresión de *IL-6*, los resultados revelaron que los niveles de mRNA se redujeron significativamente (P=0.0230) al activar la vía AGE-RAGE, mientras que la proteína IL-6 no mostró cambios y la inhibición de NF- $\kappa$ B con Ac. Cafeico tampoco produjo cambios significativos. Por otro lado, el estado de hiperinsulinemia indujo significativamente a IL-6, tanto su nivel de mRNA (P=0.0002) como en la cantidad de la proteína IL-6 (P=0.0117).



**Figura 13. Niveles del mRNA de *IGFR-1* en HMEC-1.**

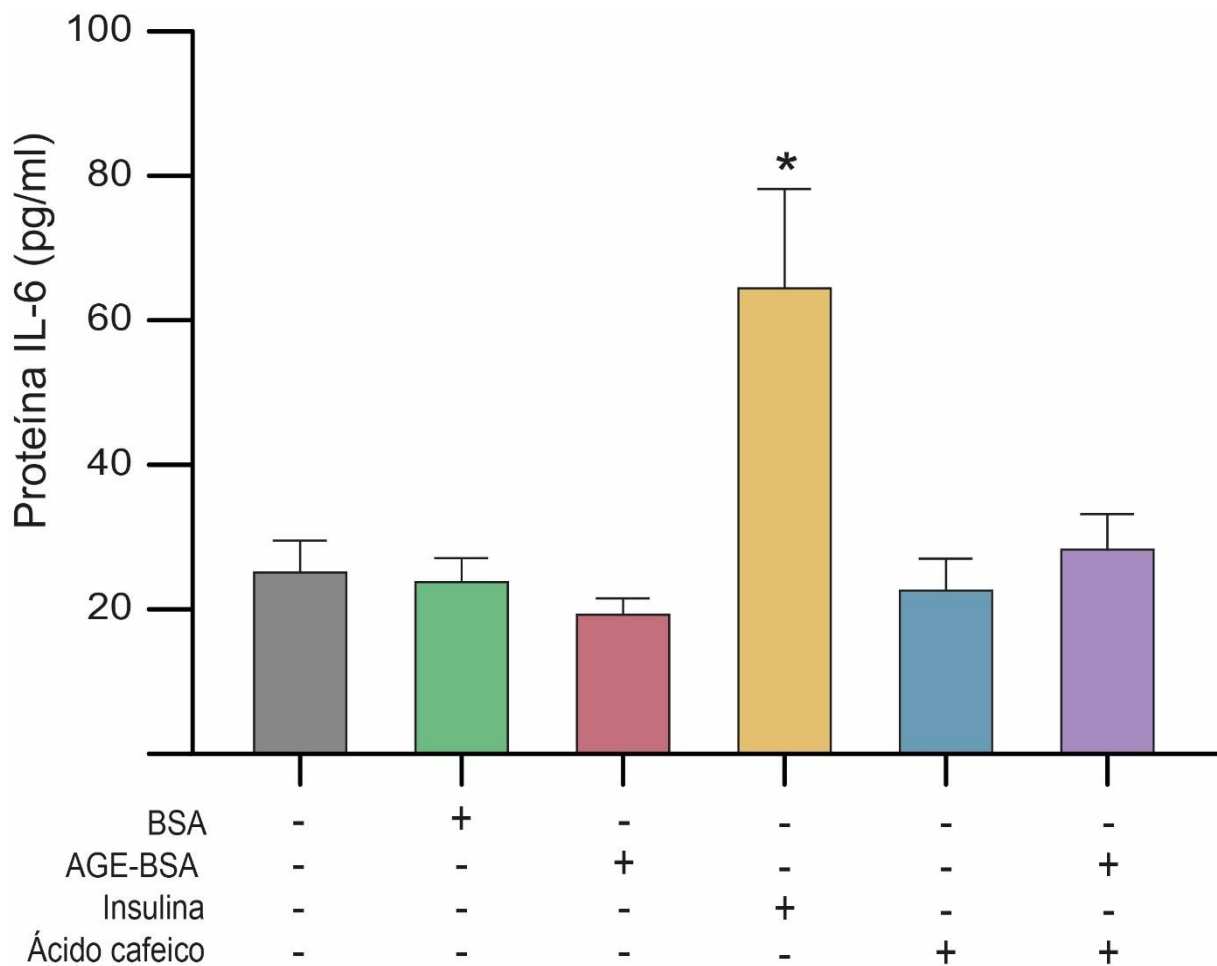
Las células HMEC-1 fueron tratadas con AGE-BSA (200  $\mu\text{g/ml}$ ), Insulina (100  $\mu\text{M}$ ), ácido cafeico (8.8  $\mu\text{M}$ ) y la combinación de AGE-BSA y ácido cafeico durante 24 h. Posteriormente a la extracción de RNA total, se cuantificó el mRNA de *IGFR-1* mediante RT-qPCR y se analizaron los datos con el método  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  normalizados contra el gen endógeno 18S. Se consideraron como control las células no tratadas o tratadas con BSA (200  $\mu\text{g/ml}$ ) según corresponda. Cada barra indica el promedio de los valores de tres experimentos independientes por duplicado  $\pm$  SEM, *t*-Student (\* $P \leq 0.05$ ) (\*\* $P \leq 0.01$ ).





**Figura 14. Niveles del mRNA de *IL-6* en HMEC-1.**

Las células HMEC-1 fueron tratadas con AGE-BSA (200  $\mu\text{g/ml}$ ), Insulina (100  $\mu\text{M}$ ), ácido cafeico (8.8  $\mu\text{M}$ ) y la combinación de AGE-BSA y ácido cafeico durante 24 h. Posteriormente a la extracción de RNA total, se cuantificó el mRNA de *IL-6* mediante RT-qPCR y se analizaron los datos con el método  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  normalizados contra el gen endógeno 18S. Se consideraron como control las células no tratadas o tratadas con BSA (200  $\mu\text{g/ml}$ ) según corresponda. Cada barra indica el promedio de los valores de tres experimentos independientes por duplicado  $\pm$  SEM, *t*-Student (\* $P \leq 0.05$ ) (\*\* $P \leq 0.01$ ), (\*\*\*) $P \leq 0.001$ ).

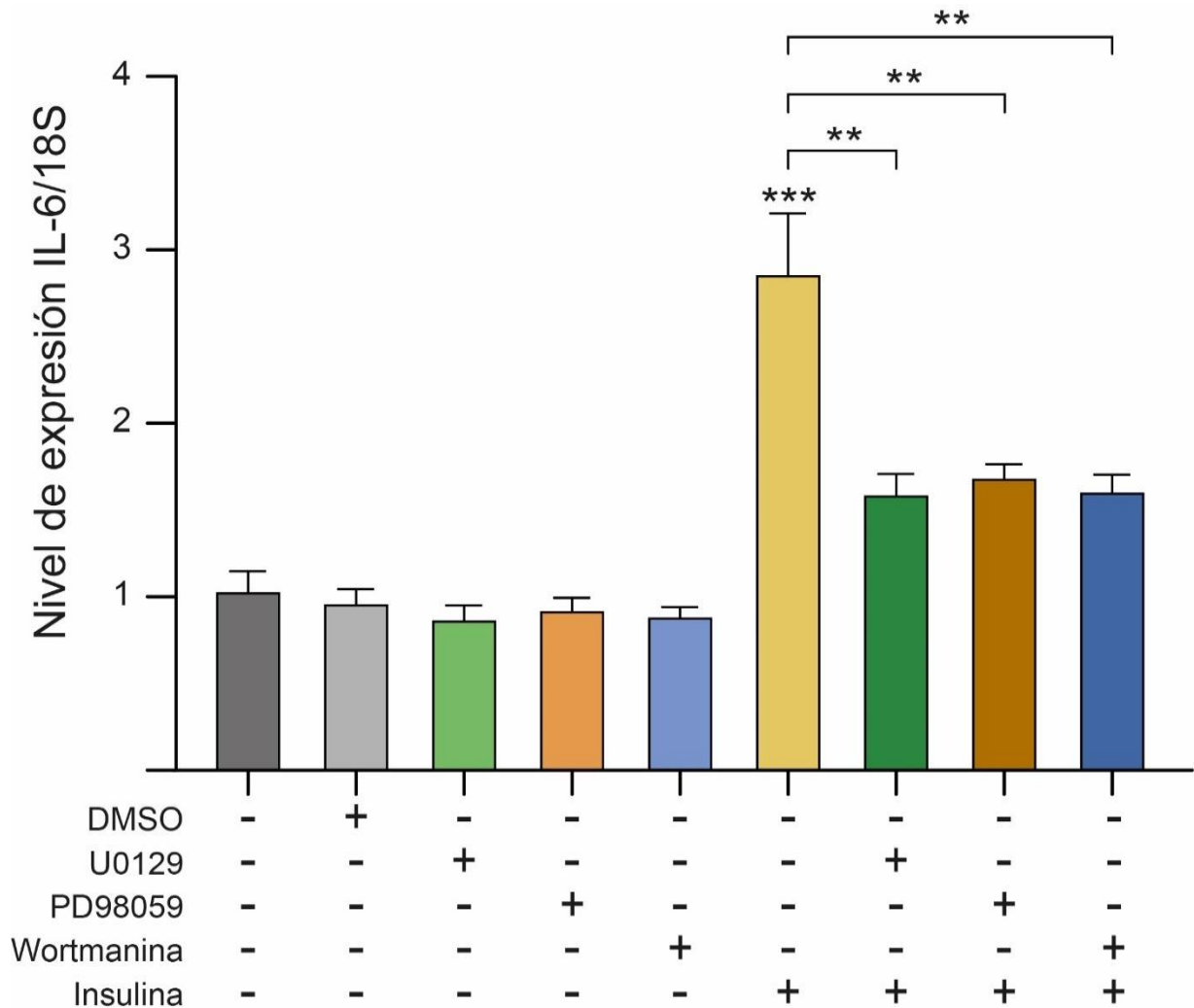


**Figura 15. Niveles de proteína IL-6 en HMEC-1.**

Las células HMEC-1 fueron tratadas con BSA (200  $\mu\text{g/ml}$ ), AGE-BSA (200  $\mu\text{g/ml}$ ), Insulina (100  $\mu\text{M}$ ), ácido cafeico (8.8  $\mu\text{M}$ ) y la combinación de AGE-BSA y ácido cafeico durante 24 h. Posteriormente se recolectó el medio sobrenadante y se cuantificaron los niveles de la proteína IL-6 mediante ELISA. Cada barra indica el promedio de los valores de tres experimentos independientes por duplicado  $\pm$  SEM, *t*-Student (\* $P \leq 0.05$ ).

#### **9.4 SEÑALIZACIÓN PARA LA INDUCCIÓN DE IL-6 EN HMEC-1 POR HIPERINSULINEMIA**

Después de analizar los resultados anteriores, decidimos explorar la posible vía de señalización que está activando la insulina para cambiar los niveles de mRNA de *IL-6*, esto a través a través de la exposición de las células a diferentes compuestos inhibidores de moléculas implicadas en las vías de señalización inducidas tras la activación del receptor de la insulina, como MAPK (U0129 y PD98059) y PI3K (Wortmanina) en HMEC-1. Los resultados de la RT-qPCR para *IL-6* se presentan en la Figura 16 e indicaron que al inhibir MAPK con U0129 y PD98059 en el estado de hiperinsulinemia, los niveles de mRNA de *IL-6* disminuyeron significativamente ( $P=0.0035$  y  $P=0.0050$ , respectivamente). Al inhibir PI3K utilizando Wortmanina en estado de hiperinsulinemia, los niveles de mRNA de *IL-6* también disminuyeron significativamente ( $P=0.0034$ ). Estos resultados indican que el estado de hiperinsulinemia aumenta los niveles de *IL-6* en células endoteliales mediante la activación de las ambas vías MAPK/ERK y PI3K/AKT.



**Figura 16. Niveles de mRNA de *IL-6* en HMEC-1 en estado de hiperinsulinemia.**

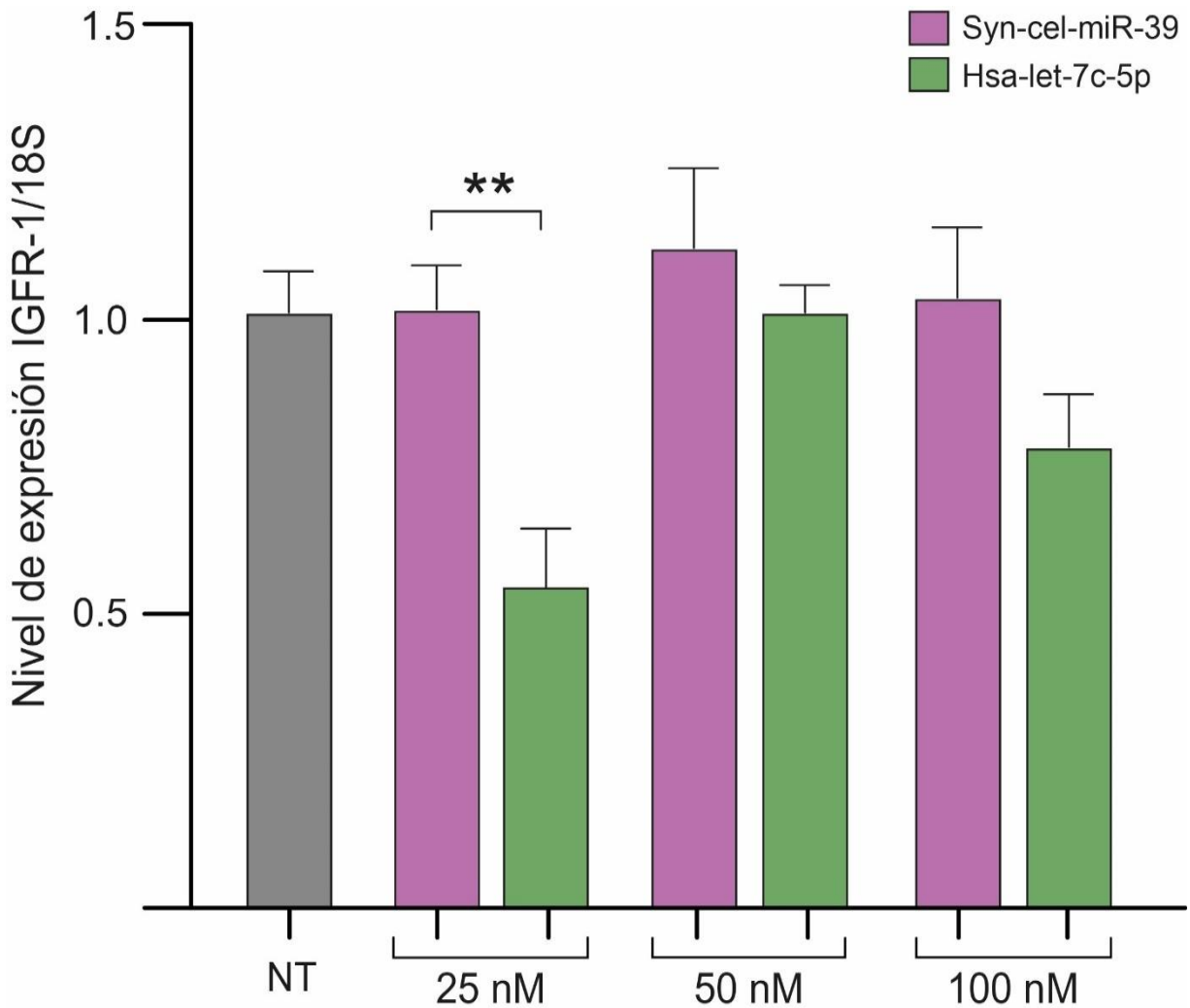
Las células HMEC-1 fueron tratadas con insulina (100  $\mu$ M) y con los inhibidores U0129 (5  $\mu$ M) y PD98059 (5  $\mu$ M) para MAPK, y Wortmanina (10  $\mu$ M) para inhibir PI3K, así como su combinación con insulina por 24 h. Posteriormente a la extracción de RNA total, se cuantificó el mRNA de *IL-6* mediante RT-qPCR y se analizaron los datos con el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  normalizados contra el gen endógeno 18S. Se consideraron como control las células no tratadas o tratadas con DMSO según corresponda. Cada barra indica el promedio de los valores de dos experimentos independientes por triplicado  $\pm$  SEM, *t*-Student (\*\* $P \leq 0.005$ ) (\*\*\*) $P \leq 0.001$ ).

## **9.5 EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE LET-7C SOBRE LOS NIVELES DE mRNA DE *IGFR-1* E *IL-6* EN HMEC-1**

Para conocer el efecto de la sobreexpresión de Let-7c en nuestro modelo de estudio, transfectamos las células con los miRNAs Mimic Hsa-let-7c-5p y, como control, el Syn-cel-miR-39 Mimic spike-in control (miRNA de *C. elegans*), ambos a diferentes concentraciones. Después de 24 horas, analizamos los niveles de mRNA de *IGFR-1* e *IL-6*.

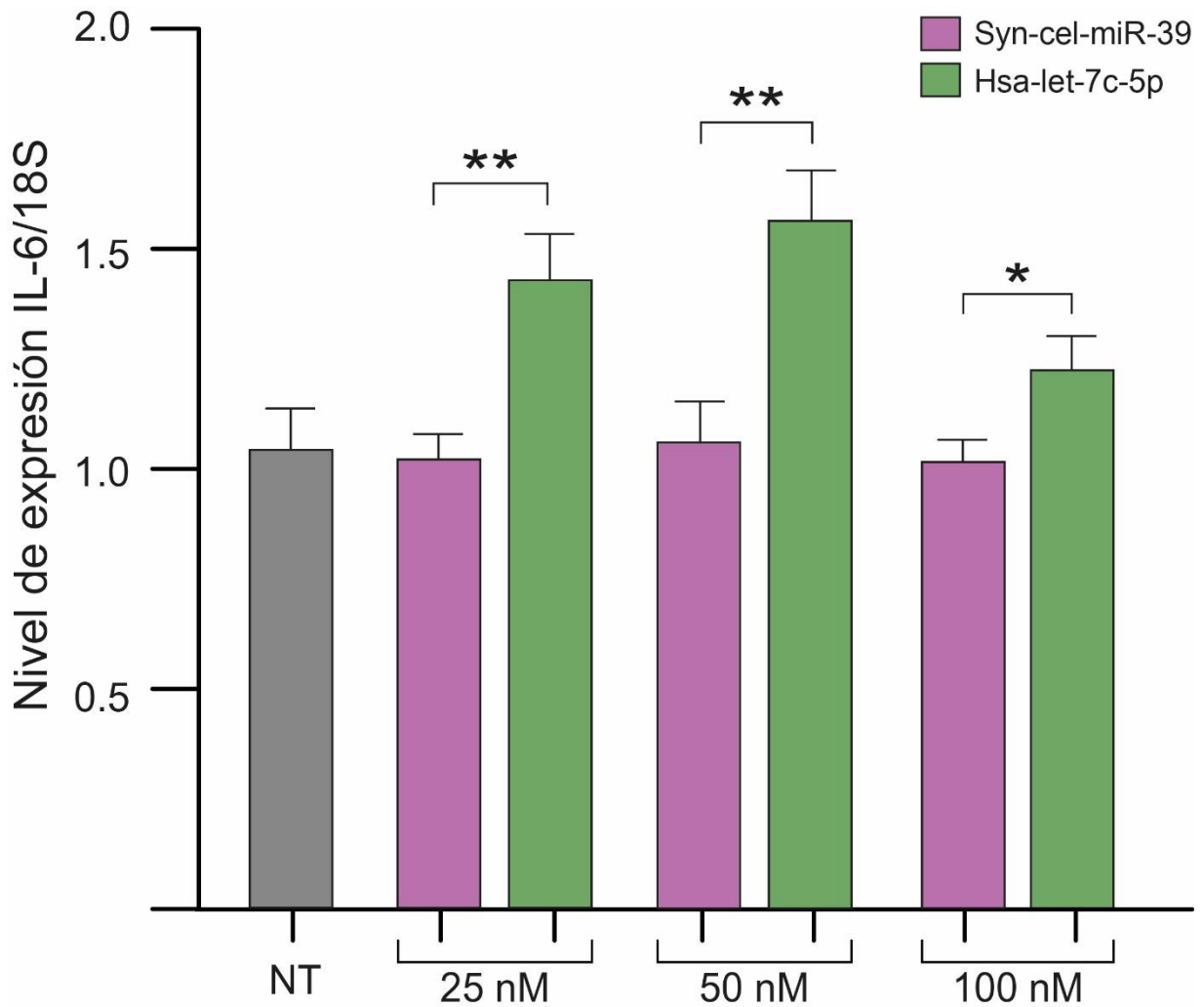
Como se muestra en la Figura 17, los niveles de mRNA de *IGFR-1* disminuyeron significativamente ( $P=0.0011$ ) al sobre-expresar Let-7c a una concentración de 20 nM en células HMEC-1, mientras que no se encontraron cambios estadísticamente significativos tratando a las células con concentraciones de 50 y 100 nM.

En la Figura 18, se observa que la sobre-expresión de Let-7c en HMEC-1 aumentó significativamente los niveles de mRNA de *IL-6* a concentraciones de 20 nM ( $P=0.0016$ ), 50 nM ( $P=0.0016$ ) y 100 nM ( $P=0.0279$ ).



**Figura 17. Efecto de la sobreexpresión de Let-7c sobre los niveles de mRNA de *IGFR-1* en HMEC-1.**

Las células HMEC-1 fueron transfectadas con los miRNAs Mimic Hsa-let-7c-5p y, como control, el Syn-cel-miR-39 Mimic spike-in control (miRNA de *C. elegans*), a diferentes concentraciones por 24 h. Posteriormente a la extracción de RNA total, se cuantificó el mRNA de *IGFR-1* mediante RT-qPCR y se analizaron los datos con el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  normalizados contra el gen endógeno 18S. Cada barra indica el promedio de los valores de dos experimentos independientes por triplicado  $\pm$  SEM, *t*-Student (\*\* $P \leq 0.01$ ). NT, no transfectadas.



**Figura 18. Efecto de la sobreexpresión de Let-7c sobre los niveles de mRNA de *IL-6* en HMEC-1.**

Las células HMEC-1 fueron transfectadas con los miRNAs Mimic Hsa-let-7c-5p y, como control, el Syn-cel-miR-39 Mimic spike-in control (miRNA de *C. elegans*), a diferentes concentraciones por 24 h. Posteriormente a la extracción de RNA total, se cuantificó el mRNA de *IL-6* mediante RT-qPCR y se analizaron los datos con el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  normalizados contra el gen endógeno 18S. Cada barra indica el promedio de los valores de dos experimentos independientes por triplicado  $\pm$  SEM, *t*-Student (\* $P \leq 0.05$ ) (\*\* $P \leq 0.01$ ). NT, no transfectadas.

## X. DISCUSIÓN

La hiperinsulinemia se presenta como un aumento de la insulina en ayuno o postprandial, y puede deberse a una mayor producción de insulina, a una menor eliminación de esta, o ambas (18).

La DMT2 se caracteriza por una insuficiencia relativa de insulina, pero antes de su diagnóstico, la hiperinsulinemia constante y el desarrollo de resistencia a la insulina, pueden indicar quien la desarrollará (22). Se propone que la hiperinsulinemia es el defecto primario que precede a la resistencia a la insulina (RI) y que coexiste con la hiperglucemia, ambas condiciones responsables del desarrollo de la DMT2, esto ha sido respaldado por un número creciente de estudios (22). La resistencia a la insulina promueve la disfunción endotelial, en contexto de DMT2 y sus complicaciones (115) pero también impide que la secreción de insulina mantenga la homeostasis de la glucosa, causando hiperglucemia crónica (116). La hiperglucemia no controlada eleva la concentración de AGEs en la circulación sanguínea, lo que se considera la principal causa de complicaciones microvasculares características de la diabetes, ya que estos productos afectan principalmente la microvasculatura al acumularse en los capilares, donde promueven inflamación y estrés oxidativo, contribuyendo al engrosamiento de las paredes capilares y la disfunción endotelial. Sin embargo, los AGEs también dañan la macrovasculatura al inducir rigidez arterial, inflamación vascular y acumulación de lípidos en las paredes arteriales, efectos que favorecen el desarrollo de enfermedades macrovasculares como la enfermedad coronaria y el accidente cerebrovascular (60, 117). Las células endoteliales vasculares son las más expuestas a los AGEs circulantes, pueden unirse a su receptor y desencadenar diversas respuestas celulares que contribuyen al



desarrollo y progresión de complicaciones vasculares relacionadas con la diabetes (60, 117-119).

Los procesos involucrados en la patogénesis de la DMT2 y sus complicaciones vasculares, pueden ser regulados por moléculas como los miRNAs, incluyendo a *Let-7c*, (87). La vía AGE-RAGE activa en las complicaciones diabéticas, ha sido identificada como la principal vía regulada por *Let-7c* mediante análisis *in silico* (110).

### **La expresión de *Let-7c* disminuye al activar la vía AGE-RAGE en células endoteliales**

Con la finalidad de analizar si existe una relación entre la activación de la vía AGE-RAGE y los niveles del miRNA *Let-7c*, se cuantificaron los niveles de expresión del miRNA *Let-7c* en la línea celular de microvasculatura dérmica (HMEC-1), y se encontró por primera vez que los niveles de *Let-7c* disminuyen al activar la vía AGE-RAGE (Figura 11). Esto puede estar asociado a la regulación negativa dada por la proteína de unión al RNA Lin28 (Lin28a y Lin28b), la cual puede controlar la traducción al unirse directamente a los mRNA y regular la biogénesis de los miRNAs precursores que contienen un motivo de reconocimiento de Lin28, principalmente de la familia *Let-7* (120-122). Acorde a nuestro hallazgo, Iliopoulos y cols. en 2009 demostraron que la activación transitoria de Src en una línea celular de epitelio mamario humano, llevó a una activación sostenida de NF- $\kappa$ B y a una posterior reducción en los niveles de varios miembros de la familia de miRNA *Let-7*. Además, los autores evidenciaron que esta disminución en los niveles de *Let-7* se debió al incremento en la expresión de LIN28B, provocado por la unión de NF- $\kappa$ B a un motivo altamente conservado en el primer intrón del gen *Lin28b* (123).

Para confirmar que la reducción de los niveles de Let-7c estaba asociada con la activación de NF- $\kappa$ B tras la activación de la vía AGE-RAGE en células endoteliales, las células fueron pretratadas con un inhibidor específico de NF- $\kappa$ B (ácido cafeico). Este compuesto inhibe la activación de IKK (I $\kappa$ B kinase), la enzima responsable de fosforilar a I $\kappa$ B, lo que impide la liberación de NF- $\kappa$ B y su translocación al núcleo (124, 125). Nuestros resultados mostraron que, en presencia del inhibidor, la activación de NF- $\kappa$ B a través de la vía AGE-RAGE se atenúa (Figura 12) y los niveles del miRNA Let-7c se restablecen (Figura 11). Esto sugiere que NF- $\kappa$ B regula negativamente a Let-7c en las células HMEC-1, posiblemente a través del eje LIN28/Let-7, como fue descrito por Piskounova y colaboradores en 2011 (120). Así mismo, comprobamos que NF- $\kappa$ B tiene una mayor actividad al estimular la vía AGE-RAGE en células endoteliales como se ha descrito en múltiples investigaciones (126, 127).

### **La expresión de Let-7c aumenta en estado de hiperinsulinemia en células endoteliales**

Las células endoteliales se ven afectadas por alteraciones metabólicas como la hiperglucemia y la hiperinsulinemia, así como por la activación inflamatoria de células y plaquetas provocada por la diabetes (128). Cada vez más estudios han encontrado que los miRNAs están involucrados en la fisiopatología de la resistencia a la insulina y la diabetes, y que contribuyen al desarrollo y progresión de las complicaciones vasculares diabéticas (129). Nuestro estudio reporta por primera vez que los niveles del miRNA Let-7c aumentan en células endoteliales HMEC-1 en condiciones de hiperinsulinemia (Figura 11) indicando un posible papel para este miRNA en procesos metabólicos relacionados a la señalización de la insulina. Frost y Olson en 2011 describieron que la inhibición de la familia Let-7c se asociaba con una mayor sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos en ratones transgénicos, y

resulta en una mejor captación de glucosa; además sugirieron que la familia de Let-7 podría regular múltiples componentes del metabolismo de la glucosa (130).

En un estudio reciente de 2024, Lino y cols., demostraron que la insulina regula la expresión de enzimas implicadas en el procesamiento de los miRNAs en adipocitos (regulación tanto positiva como negativa de diferentes miRNAs), incluyendo varios miembros de la familia de Let-7. Cuantificaron los niveles de Let-7c-5p en vesículas pequeñas extracelulares de adipocitos 3T3-L1 tras la estimulación con insulina. Estas vesículas tienen un diámetro de 50 a 200 nm y contienen lípidos y proteínas, así como RNAs pequeños no codificantes (smRNA) incluidos los miRNAs. Sus resultados muestran un aumento en los niveles de Let-7c tras la estimulación con insulina en comparación al control (131).

Por su parte, Rodríguez en el 2020 cuantificó los niveles de Let-7c en plasma de sujetos con DMT2 y en un grupo control. Los resultados mostraron que los niveles de este miRNA aumentaban significativamente en los sujetos con DMT2 respecto al grupo control, lo que sugiere su posible papel en los procesos metabólicos asociados a esta enfermedad (132). Es posible que este miRNA se encuentre elevado en sujetos con DMT2, dado que se libera rápidamente en la circulación y es estable en el plasma (132). De este modo proponemos que la inducción de Let-7c por insulina podría contribuir a la disminución de la sensibilidad a dicha molécula en las células endoteliales y en consecuencia una captación de glucosa deficiente, este mecanismo puede verse impulsado debido a que el gen del receptor de insulina esta registrado como posible blanco de regulación de Let-7c en la base de datos miRDB.

Adicionalmente, encontramos una disminución de la actividad de NF- $\kappa$ B en células HMEC-1 en condiciones de hiperinsulinemia (Figura 12), un hallazgo que no ha sido

reportado previamente en la literatura para este tipo celular. Sin embargo, un comportamiento similar ha sido documentado en otras células, como lo describieron Dandona y cols., en 2001, quienes analizaron la actividad de NF- $\kappa$ B en células mononucleares extraídas de sujetos obesos no diabéticos a los cuales se les infundió insulina, lo que resultó en una reducción de NF- $\kappa$ B y un aumento de I $\kappa$ B en estas células (133). En un sistema completo, las células responden a la activación de NF- $\kappa$ B induciendo moléculas de adhesión que ayudan la unión y trans migración de leucocitos, incrementando su potencial trombogénico, así como interacciones célula-célula esenciales para la defensa inmunológica y función plaquetaria (134). No obstante, es necesario estudiar más a fondo el efecto de la inhibición de NF- $\kappa$ B tanto en sistemas completos como en sistemas aislados, ya que hasta el momento este comportamiento no ha sido documentado en células endoteliales.

#### **Los niveles de mRNA de *IGFR-1* aumentan mediante la regulación positiva de NF- $\kappa$ B al activar la vía AGE-RAGE en células endoteliales**

La hiperglucemia crónica promueve la producción de AGEs en el organismo, que circulan y contribuyen significativamente al desarrollo de disfunción endotelial en pacientes diabéticos (135). Las células endoteliales tanto de microvasculatura como de la macrovasculatura expresan IGF-1 y su receptor, IGFR-1, siendo crucial el papel del eje IGF-1/IGFR-1 participando en la angiogénesis y en patologías vasculares como la aterosclerosis y la reestenosis (136). Por otro lado, IGF-1 e IGFR-1 desempeñan roles clave en la regeneración endotelial vascular (137). Nuestros resultados muestran por primera vez que al estimular la vía AGE-RAGE en células endoteliales HMEC-1 aumentan los niveles de mRNA de *IGFR-1* a través de la activación del factor NF- $\kappa$ B (Figura 13), lo que sugiere que esta condición contribuye al desarrollo de patologías vasculares, no solo a través del aumento del estrés

oxidativo y la inflamación (138) sino directamente induciendo cambios de expresión génica a nivel transcripcional.

No hay estudios previos que demuestren una regulación positiva de *IGFR-1* por parte de NF- $\kappa$ B; sin embargo, se ha descrito que la fosforilación de este receptor puede depender de NF- $\kappa$ B (139, 140). En 2013, Wang y cols., informaron que los AGEs promueven la calcificación de células del músculo liso aórtico humano *in vitro* mediante la activación de NF- $\kappa$ B y la regulación negativa de la expresión de *IGFR-1*. En su estudio, analizaron la región promotora putativa de *IGFR-1* revelando un posible sitio de unión para NF- $\kappa$ B en las posiciones -230 a -219 con respecto al inicio de la transcripción (141). Aunque sus resultados difieren a los nuestros, es importante señalar que la actividad de NF- $\kappa$ B puede variar según el tipo celular y las condiciones experimentales. Recordemos que esta es en realidad una familia de factores de transcripción, conformados por heterodímeros, y la combinación y regulación de los mismos, tiene efecto sobre las acciones positivas o negativas que resultan del reconocimiento y anclaje a los sitios NF- $\kappa$ B en los promotores de diversos genes (142).

Como se mencionó anteriormente, *IGFR-1* es regulado negativamente por Let-7c, ya que este miRNA tiene sitios de unión potenciales en las regiones 3'UTR del mRNA de *IGFR-1*, una regulación que ha sido documentada en diversos tejidos (143-145). En nuestro estudio, demostramos por primera vez que NF- $\kappa$ B, inducido a través de la vía AGE-RAGE, regula negativamente a Let-7c, lo que puede provocar un aumento en los niveles de mRNA de *IGFR-1*, a través de la activación de NF- $\kappa$ B.

## **Los niveles de mRNA de *IGFR-1* aumentan es estado de hiperinsulinemia en células endoteliales**

La hiperinsulinemia se considera el sello distintivo de la obesidad y la DMT2, pero también promueve la disfunción del endotelio vascular y el posterior desarrollo de enfermedades vasculares (146). A niveles fisiológicos, la insulina regula la función vascular al mantener el equilibrio entre el NO producido por el endotelio y la endotelina-1 (ET-1), encargada de la vasoconstricción (146). Sin embargo, en condiciones de hiperinsulinemia crónica, la insulina puede inducir alta producción de ET-1 y alterar la biodisponibilidad del NO, afectando así el equilibrio entre las vías vasodilatadora y vasoconstrictora (146).

Nuestros resultados muestran que un estado hiperinsulinémico aumenta los niveles del mRNA de *IGFR-1* en las células endoteliales (Figura 13). Este hallazgo ya ha sido descrito por Delafontaine y cols., en 2004 quienes destacaron que el tratamiento con insulina en ratas induce un aumento de la expresión del *IGFR-1*. Además, propusieron que la acción vasodilatadora de la insulina podría ser mediada por su interacción con *IGFR-1*, cuya abundancia es aproximadamente diez veces mayor que la de los IR (136).

Por su parte, Muniyappa y Sowers en el 2012, señalaron que en condiciones de insulina suprafisiológica se generan los receptores híbridos (*IGFR-1/IR*), a los cuales la insulina presenta menor afinidad. Esto sugiere que *IGFR-1* puede modular la señalización a insulina al alterar los niveles de estos receptores híbridos, actuando como modulador de los efectos de las concentraciones elevadas de insulina en el tejido endotelial, así como en células musculares lisas, adipocitos y osteoblastos (147).

Adicionalmente, encontramos que la actividad de NF- $\kappa$ B disminuye en las células endoteliales expuestas a hiperinsulinemia (Figura 12). En el año 2000, Schmidt y Stern discutieron el posible papel de NF- $\kappa$ B en diabetes e hiperinsulinemia, evaluando su efecto tanto positivo como negativo y considerando su uso potencial como objetivo terapéutico. Sin embargo, no se presentó evidencia de que la insulina, por si sola, mejorara la activación de NF- $\kappa$ B; más bien, sugirieron que ese efecto es el resultado de la sinergia entre la insulina, los AGEs, la hiperglucemia y la angiotensina II, características comunes en la diabetes (148). Un año después, Aljada y cols., reportaron la posible inhibición de NF- $\kappa$ B por parte de la insulina en células endoteliales aórticas humanas (HAEC). En su estudio, estas células fueron tratadas con diferentes concentraciones de insulina durante 48 horas, demostrando que la insulina reduce la actividad de NF- $\kappa$ B, lo que sugiere su posible efecto antiinflamatorio (149).

Si bien, los niveles elevados del mRNA de *IGFR-1* no están relacionados a la activación de NF- $\kappa$ B en estado de hiperinsulinemia en células endoteliales, diversas investigaciones han indicado que la insulina es capaz de estimular tanto la síntesis como la activación de la proteína de especificidad 1 (Sp1), así como su localización subcelular y estabilidad (150, 151) a través de los elementos clave en las vías de señalización, como la vía de MAPK (152). En este sentido, se ha demostrado que *IGFR-1* está regulado positivamente por Sp1, debido a que el promotor de *IGFR-1* contiene múltiples sitios de unión a secuencias consenso del núcleo Sp1 (GGGCGG) (153, 154). Sin embargo, es necesario llevar a cabo más experimentos para confirmar este mecanismo en nuestro modelo.

Nuestros resultados respaldan la regulación de Let-7c por NF- $\kappa$ B, ya que, en condiciones de hiperinsulinemia, observamos una disminución en la actividad de este factor, acompañada de niveles elevados del miRNA en células endoteliales. Proponemos que el incremento de

mRNA de *IGFR-1* es el resultado de un mecanismo compensatorio de la célula para mitigar los efectos del exceso de insulina, mediado por otros factores de transcripción distintos a NF- $\kappa$ B como Sp1.

### **La vía AGE-RAGE disminuye los niveles de mRNA de *IL-6* en células endoteliales**

La activación de la vía AGE-RAGE en células endoteliales afecta la homeostasis endotelial, induciendo la producción de ROS, aumentando la actividad de MAPK, promoviendo la producción de ET-1 mediada por NF- $\kappa$ B y AP-1, y activando p38 y ERK1/2 (155). Este conjunto de eventos incrementa el estrés oxidativo y disminuye la expresión de eNOS, lo que culmina en disfunción endotelial (155). Recientemente, se ha establecido una relación entre la vía AGE-RAGE y un efecto proinflamatorio en diversos tejidos y modelos de estudio (156, 157). En endotelio, se ha registrado que la activación de AGE-RAGE conduce principalmente a la activación de NF- $\kappa$ B, un factor clave en la transcripción de las importantes citocinas proinflamatorias, como IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (158).

Seleccionamos a IL-6 para evaluar si la vía AGE-RAGE promueve el proceso proinflamatorio en nuestro modelo. Los hallazgos son particularmente interesantes, ya que demostramos por primera vez que la activación de la vía AGE-RAGE en células endoteliales disminuye los niveles del mRNA de *IL-6* (Figura 14), a pesar del aumento de la actividad de NF- $\kappa$ B. Sin embargo, estudios previos han reportado un efecto opuesto en otros tejidos. Por ejemplo, Rasheed y cols., en 2011, investigaron si la vía AGE-RAGE inducía la expresión de IL-6 e IL-8 en condrocitos humanos con artrosis y también evaluaron la activación de NF- $\kappa$ B, demostrando que los AGEs aumentaban la expresión de estas citocinas en condrocitos y asociaron la activación de NF- $\kappa$ B con la expresión de IL-6 (159). De manera similar, Nonaka



y cols., en 2018 estudiaron los efectos de los AGEs en la expresión de moléculas clave en la inflamación, incluida la IL-6, en fibroblastos gingivales humanos (HGF), encontrando que los AGEs incrementaban el mRNA de *IL-6*, junto con un aumento en la actividad de ERK/MAPK y NF- $\kappa$ B (160). Sin embargo, no descartamos la posibilidad de que la activación de AGE-RAGE fomente el proceso inflamatorio en nuestro modelo, dado que la IL-6 no es la única citocina proinflamatoria que puede contribuir a esta condición en células endoteliales. Se ha descrito que la vía AGE-RAGE en células endoteliales eleva la expresión de TNF- $\alpha$  a través la activación de NF- $\kappa$ B, promoviendo inflamación y el daño endotelial (161, 162).

Un aspecto que generó inquietud en nuestros resultados fue que, a pesar de que se ha registrado que *Let-7c* puede regular negativamente a *IL-6* a nivel postranscripcional (123, 163, 164), al activar la vía AGE-RAGE observamos una disminución tanto en los niveles de *Let-7c* como en los de mRNA de *IL-6*. Esto podría deberse a la regulación de diversas moléculas simultáneamente. Mas adelante se discutirá este comportamiento a detalle.

### **El estado de hiperinsulinemia aumenta los niveles del mRNA y la secreción proteína de IL-6 en células endoteliales**

La hiperinsulinemia precede a la resistencia a la insulina, incluso antes de que aparezcan las manifestaciones clínicas. Por esta razón, es fundamental estudiar esta condición, ya que puede estar promoviendo complicaciones vasculares desde etapas tempranas. La hiperinsulinemia se asocia con inflamación crónica de bajo grado, lo que lleva a un aumento de los niveles circulantes de IL-6, TNF- $\alpha$  y MCP-1 en tejidos adiposos y en la circulación sanguínea (2, 37). Además, esta condición se relaciona con disfunción endotelial y altera la función metabólica (26, 148, 165). Las células endoteliales expresan IL-6 ante estímulos

infecciosos y al estrés celular, y son capaces de reaccionar a la propia IL-6 ya que presentan receptores para esta citocina (IL-6R) en su membrana (166, 167).

Nuestro estudio demuestra, por primera vez, que la hiperinsulinemia incrementa los niveles de mRNA (Figura 14) y proteína de la IL-6 (Figura 15) en células endoteliales microvasculares. Anteriormente, esta relación se ha investigado en diversos tejidos de ratón y humano. Por ejemplo, Pedersen y cols., en 2015 estudiaron ratones sometidos a una infusión de insulina para evaluar sus efectos sobre la expresión de citocinas proinflamatorias en tejido adiposo, encontrando que dicha infusión, en condiciones de glucemia constante, aumentó de 2 a 3 veces los niveles de mRNA de *IL-6* (168). De manera similar, la infusión insulina en humanos estimuló la expresión del gen *IL-6* en tejido adiposo y de la proteína IL-6 en circulación, según lo reportado por Krogh y cols., proponen que la IL-6 circulante proviene del tejido adiposo, aunque no descartan su liberación desde de otros tejidos (169).

En apoyo a estos hallazgos, la insulina puede aumentar la producción de IL-6 a nivel endotelial y, al interactuar simultáneamente con IL-6R, generar un ciclo de retroalimentación que contribuye el estado proinflamatorio vascular. Se ha demostrado que la IL-6 puede actuar por dos vías: la señalización clásica y la trans-señalización (170). Ambas se activan cuando la IL-6 se une a su receptor en la membrana de células endoteliales y según lo informado por Zegeye y cols., en 2018, ambas vías resultan en la activan las rutas de señalización de STAT3, AKT y ERK1/2. Además, la trans-señalización de IL-6 induce la expresión y liberación de la quimiocina proinflamatoria MCP-1 en células endoteliales mediante las vías JAK/STAT3 y PI3K/AKT. Sin embargo, los investigadores demostraron ninguna de las dos vías de señalización de IL-6 es capaz de activar a NF- $\kappa$ B en células endoteliales vasculares (170).

Mostramos que la actividad de NF- $\kappa$ B disminuye en condiciones de hiperinsulinemia en células endoteliales (Figura 12), lo que sugiere que la alta producción de IL-6 observada no es consecuencia de la activación de NF- $\kappa$ B en estas células. Esta inhibición de la actividad de NF- $\kappa$ B por parte de la insulina ya ha sido reportado en modelos no humanos (171, 172), aunque se ha descrito que las vías de señalización en las que se activan las cinasas PKC, AKT y ERK1/2 pueden regular la fosforilación de NF- $\kappa$ B provocando una inhibición en su actividad en diferentes contextos (173, 174).

La expresión de *IL-6* está regulada tanto a nivel transcripcional como en su degradación (175). Aunque NF- $\kappa$ B puede unirse a la región -75 ~ -63 del gen *IL-6* para impulsar su transcripción, también existen sitios de unión para otros factores, como AP-1 (-283 ~ -227) y SP-1 (-123 ~ -119 y -108 ~ -104) (175). Se ha comprobado que la insulina ejerce efectos en las células endoteliales a través de cascadas de señalización que incluyen la activación y traslocación nuclear de ERK1/2 y AKT/PKB, la traslocación nuclear de c-Jun, c-Fos, activando factores de transcripción como AP-1 y SP-1 (176, 177). Estos factores pueden ser los responsables del aumento en los niveles de mRNA de *IL-6* observados en nuestros resultados. Demostramos por primera vez que la señalización de la insulina eleva los niveles de mRNA de *IL-6* en células endoteliales, mediada por las dos vías principales: la vía de MAPK/ERK y PI3K/AKT (Figura 16). Por su parte, Sano y cols., en 2001 demostraron que la activación de MAPK/ERK es un paso necesario para la expresión del gen de *IL-6* inducida por angiotensina II, y que esto ocurre de manera independiente de NF- $\kappa$ B en fibroblastos cardíacos primarios (178). Por su parte, Tessaro y cols., en 2017 utilizaron Wortmanina como inhibidor de PI3K en macrófagos estimulados con insulina, encontrando que la insulina regula positivamente la secreción de IL-6 a través de la activación de PI3K/AKT (179). Estas

investigaciones respaldan nuestros hallazgos en células endoteliales; sin embargo, se requieren más estudios para identificar los factores que promueven la transcripción de *IL-6* en células endoteliales en condiciones de hiperinsulinemia, con el objetivo de identificar posibles interruptores que mitiguen el estado proinflamatorio.

### **La sobreexpresión de Let-7c disminuye los niveles de mRNA de *IGFR-1* en células endoteliales**

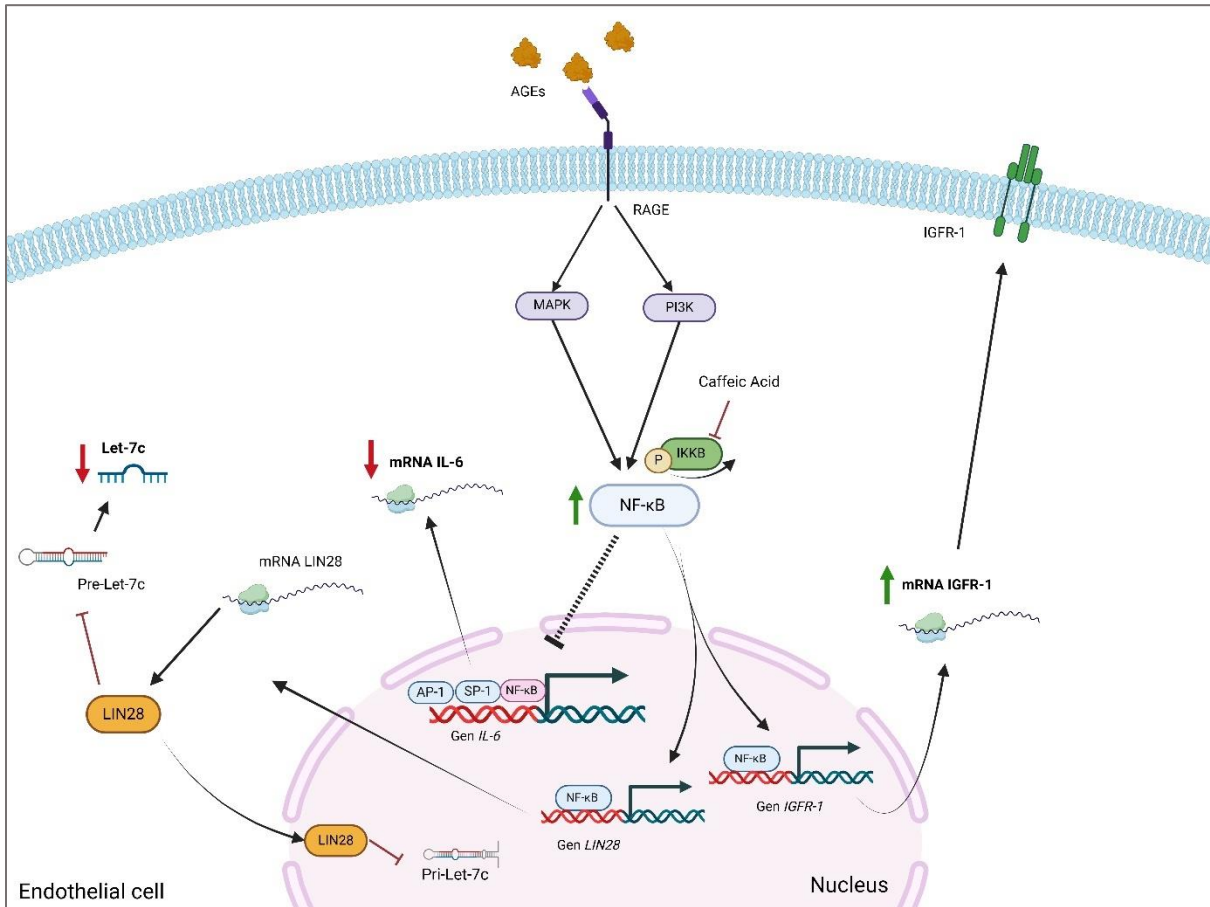
Analizamos el efecto de la sobreexpresión de Hsa-let-7c-5p sobre los niveles de mRNA de *IGFR-1* en células endoteliales como un punto de control, dado a que existe evidencia de que *IGFR-1* es un objetivo regulado de Hsa-let-7c. Esto se debe a la presencia de un sitio de unión complementario al miRNA en la posición 2619-2627 de la región 3'UTR del mRNA de *IGFR-1* (145, 180).

Encontramos por primera vez que en células endoteliales transfectadas con una concentración de 25 nM de Hsa-let-7c-5p los niveles de mRNA de *IGFR-1* disminuían casi un 50% respecto al control (Figura 17). Lo anterior coincide con lo reportado por Kalantzakos y cols., en 2022, quienes evaluaron el impacto de Let-7c-5p y en *IGFR-1* en una línea celular de un tipo de carcinoma renal utilizando una concentración final de 20 nM una tasa reducida de proliferación, migración e invasión en comparación de su control, condiciones en las que *IGFR-1* se encuentra involucrado, además se realizó un análisis de inmunodetección en fase sólida para evaluar el efecto de Let-7c-5p sobre la proteína IGFR-1 al transfectar las células con el miRNA, encontrando que la proteína disminuía significativamente comparada con el control (144).

## **La sobreexpresión de Let-7c aumenta los niveles de mRNA de *IL-6* en células endoteliales**

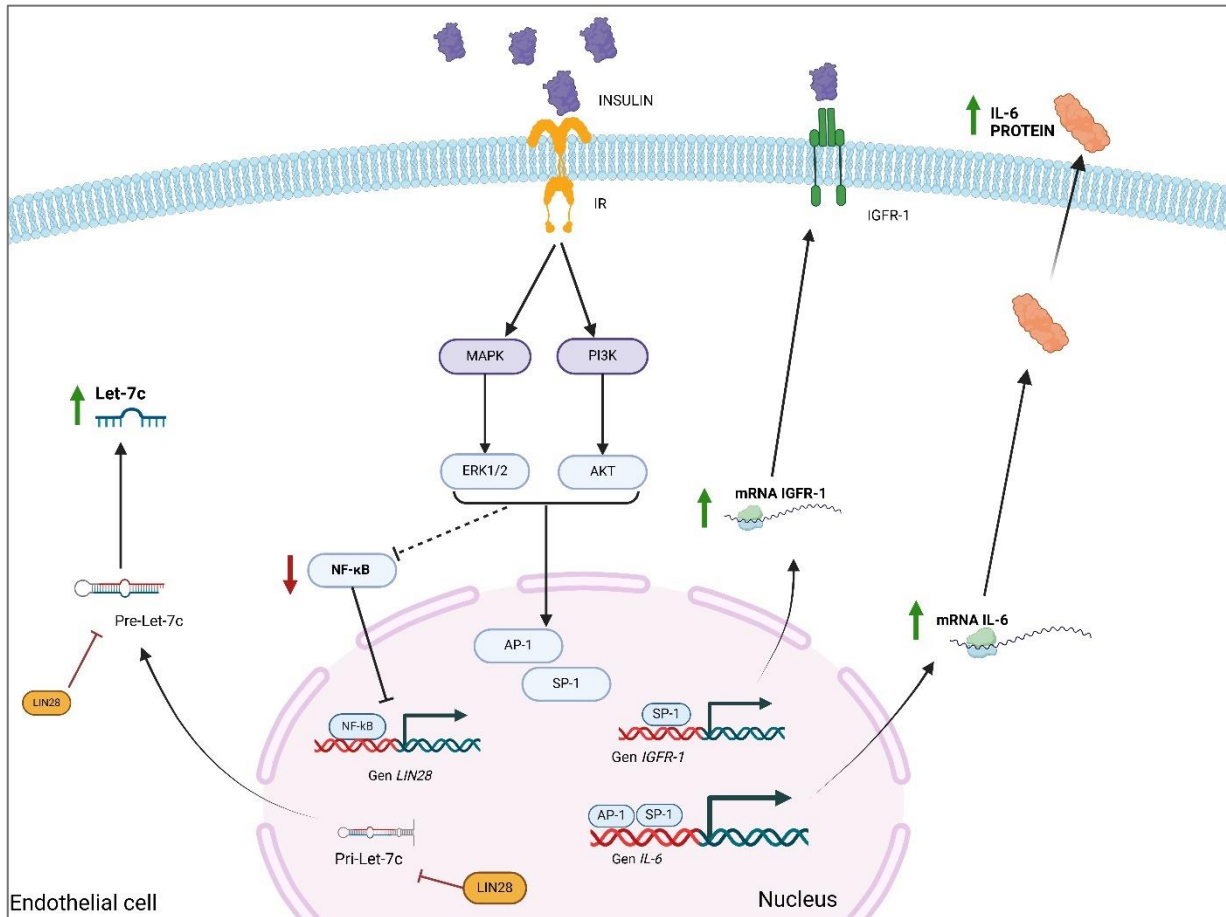
Según la búsqueda realizada en miRDB (<https://mirdb.org/>), una base de datos en línea para la predicción de dianas de miRNAs, hsa-let-7c puede unirse a el sitio 316 de la región 3'UTR del mRNA de *IL-6*. Investigamos el posible papel de Let-7c como regulador de *IL-6* en células endoteliales, evaluando el efecto de la sobreexpresión de este miRNA sobre los niveles de mRNA de *IL-6*. Encontramos la transfección de células endoteliales con hsa-let-7c-5p en las tres concentraciones evaluadas aumentó los niveles de mRNA de *IL-6* (Figura 18), lo que contradice varios estudios previos. Por ejemplo, el trabajo realizado en 2013 por Sung y cols., quienes estudiaron el papel regulador de la familia de Let-7 sobre *IL-6* en células madre mesenquimales (MSC) derivadas de la médula ósea. Ellos demostraron que la sobreexpresión de Let-7c, a través de la transfección de precursores de Let-7c, redujo la expresión de *IL-6*, hallazgo que fue consistente al tratar las células con inhibidores de Let-7c (181). Sin embargo, no descartamos que el miRNA actúe de manera diferente según las condiciones y el tipo celular, ya que la sobreexpresión de Let-7c no ha sido estudiada previamente en células endoteliales. Por otro lado, Kim y cols., en 2013, investigaron el posible mecanismo de regulación de Let-7c sobre *IL-6* y SOCS1 de células detriticas de medula ósea (BM-DC) de un modelo murino mediante la transducción de Let-7c. los resultados mostraron un aumento significativo en el nivel de la proteína IL-6 y una disminución de la expresión de SOCS1. Los autores sugiere que estos datos indican que los niveles elevados de Let-7c podrían ser un mecanismo clave en la supresión de SOCS1, lo que a su vez influye en la producción de citocinas proinflamatorias en CD (182).

La proteína supresora señalización de citocinas 1 (SOCS1) actúa como regulador negativo de la respuesta inflamatoria y, en células endoteliales, puede ayudar a preservar la función endotelial y atenuar la expresión de citocinas, incluyendo IL-6 (183). A través de la base de datos miRDB, confirmamos que *SOCS1* es un gen objetivo de regulación por parte de Let-7c. Nuestro trabajo es el primero en reportar que los niveles elevados de Let-7c inducen la expresión de *IL-6* en células endoteliales, y una explicación lógica es que sea mediante la regulación negativa de SOCS1. No obstante, es necesario probar experimentalmente que este es el caso.



**Figura 19. Efecto de la vía AGE-RAGE sobre los niveles de Let-7c, IGFR-1 e IL-6 mediado por NF-κB en células HMEC-1.**

Los AGEs elevados en el medio extracelular se unen al receptor RAGE en células endoteliales, activando cascadas de señalización como las vías MAPK y PI3K/AKT, que culminan en la activación de factores de transcripción, incluyendo NF-κB y AP-1. NF-κB induce la transcripción de LIN28, proteína que regula negativamente al miRNA Let-7c, disminuyendo sus niveles. Al mismo tiempo, NF-κB promueve la transcripción de IGFR-1 y podría actuar como inhibidor de la transcripción de IL-6. En este contexto, no se descarta un efecto proinflamatorio, ya que no se evaluaron otras citocinas proinflamatorias asociadas a AGE-RAGE, como TNF-α.



**Figura 20. Efecto de la hiperinsulinemia sobre los niveles de Let-7c, IGFR-1 e IL-6 en células HMEC-1.**

La insulina en altas concentraciones en el medio extracelular se une a sus receptores en las células endoteliales, activando las vías de señalización MAPK/ERK y PI3K/AKT, las cuales se propone que pueden inhibir la actividad de NF-κB, y de manera indirecta, reducir la expresión de LIN28, una proteína reguladora negativa de miRNA Let-7c, resultando en niveles elevados del este miRNA. A su vez, MAPK/ERK y PI3K/AKT pueden activar factores de transcripción como SP-1 y AP-1, que inducen la transcripción de IL-6 e IGFR-1. Estos hallazgos sugieren que la hiperinsulinemia ejerce un efecto proinflamatorio en células endoteliales HMEC-1.



## XI. CONCLUSIONES

Los niveles del miRNA Let-7c se reducen al activar la vía AGE-RAGE, debido a la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B que regula negativamente al miRNA Let-7c. Mientras que el estado de hiperinsulinemia aumenta los niveles de este miRNA y disminuye la actividad de NF- $\kappa$ B en células HMEC-1.

La activación de la vía AGE-RAGE aumenta los niveles de mensajero de *IGFR-1* en células endoteliales mediante la activación del factor NF- $\kappa$ B, en cambio los niveles del mRNA de *IL-6* disminuyen. En condiciones de hiperinsulinemia, los niveles de *IGFR-1* aumentan en células endoteliales. Los niveles de IL-6 (mRNA y proteína) también aumentan, a través de las vías de señalización MAPK/ERK y PI3K/AKT contribuyendo el estado proinflamatorio en las células endoteliales.

La sobreexpresión de Let-7c en células endoteliales regula negativamente los niveles del mRNA de *IGFR-1* y aumenta los niveles de mRNA de *IL-6* en células endoteliales.

## XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol Rev.* 2018;98(4):2133-223.
2. Zhang AM, Wellberg EA, Kopp JL, Johnson JD, Johnson M. Hyperinsulinemia in obesity, inflammation, and cancer. 2021;45(3):285.
3. Lawrence MC, Johnson M. Understanding insulin and its receptor from their three-dimensional structures. 2021;52:101255.
4. Saltiel AR, Johnson M. Insulin signaling in health and disease. 2021;131(1).
5. Levine R, Goldstein M. The action of insulin on the distribution of galactose in eviscerated nephrectomized dogs. 1949;179(2):985.
6. House P, Weidemann M, Johnson M. Characterization of an [125I]-insulin binding plasma membrane fraction from rat liver. 1970;41(3):541-8.
7. Kosmas CE, Bousvarou MD, Kostara CE, Papakonstantinou EJ, Salamou E, Guzman EJ. Insulin resistance and cardiovascular disease. 2023;51(3):03000605231164548.
8. Najjar SM, Perdomo G. Hepatic insulin clearance: mechanism and physiology. 2019;34(3):198-215.
9. Pandini G, Frasca F, Mineo R, Sciacca L, Vigneri R, Belfiore A. Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. 2002;277(42):39684-95.
10. Rachdaoui N. Insulin: the friend and the foe in the development of type 2 diabetes mellitus. 2020;21(5):1770.
11. Belfiore A, Malaguarnera R, Vella V, Lawrence MC, Sciacca L, Frasca F, et al. Insulin receptor isoforms in physiology and disease: an updated view. 2017;38(5):379-431.

12. Vigneri R, Goldfine I, Frittitta LJJoei. Insulin, insulin receptors, and cancer. 2016;39:1365-76.
13. Zhang X, Zhu X, Bi X, Huang J, Zhou LJJoMS. The insulin receptor: An important target for the development of novel medicines and pesticides. 2022;23(14):7793.
14. Kolb H, Kempf K, Röhling M, Martin SJBm. Insulin: too much of a good thing is bad. 2020;18:1-12.
15. Manning BD, Cantley LCJC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. 2007;129(7):1261-74.
16. Thiel G, Guethlein LA, Rössler OGJB. Insulin-responsive transcription factors. 2021;11(12):1886.
17. Den Hartogh DJ, Vlatcheski F, Giacca A, Tsiani EJJJoMS. Attenuation of free fatty acid (FFA)-induced skeletal muscle cell insulin resistance by resveratrol is linked to activation of AMPK and inhibition of mTOR and p70 S6K. 2020;21(14):4900.
18. Janssen JAJJjoms. Hyperinsulinemia and its pivotal role in aging, obesity, type 2 diabetes, cardiovascular disease and cancer. 2021;22(15):7797.
19. de Luis DA, Gómez Hoyos E, Ortolá A, Delgado E, Díaz G, Torres B, et al. La variante rs10401670 del gen de la resistina se relaciona con los niveles de resistina circulante, la resistencia a la insulina y la presencia de diabetes mellitus de tipo 2 en los pacientes obesos. 2020;37(2):293-8.
20. Janssen JAJIJoMS. Overnutrition, Hyperinsulinemia and Ectopic Fat: It Is Time for A Paradigm Shift in the Management of Type 2 Diabetes. 2024;25(10):5488.
21. Corkey BEJD. Banting lecture 2011: hyperinsulinemia: cause or consequence? 2012;61(1):4-13.

22. Shanik MH, Xu Y, Skrha J, Dankner R, Zick Y, Roth JJDc. Insulin resistance and hyperinsulinemia: is hyperinsulinemia the cart or the horse? 2008;31(Supplement\_2):S262-S8.
23. Czech MPJNm. Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. 2017;23(7):804-14.
24. Abdul-Ghani M, DeFronzo RAJTJoCE, Metabolism. Insulin resistance and hyperinsulinemia: the egg and the chicken. 2021;106(4):1897-9.
25. James DE, Stöckli J, Birnbaum MJJNRMCB. The aetiology and molecular landscape of insulin resistance. 2021;22(11):751-71.
26. Thomas DD, Corkey BE, Istfan NW, Apovian CMJJotES. Hyperinsulinemia: an early indicator of metabolic dysfunction. 2019;3(9):1727-47.
27. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor B, Treacher DF, Turner RJd. Homeostasis model assessment: insulin resistance and  $\beta$ -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. 1985;28:412-9.
28. Tahapary DL, Pratisthita LB, Fitri NA, Marcella C, Wafa S, Kurniawan F, et al. Challenges in the diagnosis of insulin resistance: focusing on the role of HOMA-IR and Tryglyceride/glucose index. 2022;16(8):102581.
29. Angelidi AM, Filippaios A, Mantzoros CSJTJoCI. Severe insulin resistance syndromes. 2021;131(4).
30. Sinha S, Haque MJL. Insulin resistance is cheerfully hitched with hypertension. 2022;12(4):564.
31. Rivas AM, Nugent KJTAJotMS. Hyperglycemia, insulin, and insulin resistance in sepsis. 2021;361(3):297-302.
32. Rabe K, Lehrke M, Parhofer KG, Broedl UCJMm. Adipokines and insulin resistance. 2008;14:741-51.

33. Petersen KF, Shulman GI. Etiology of insulin resistance. *2006;119(5):S10-S6.*
34. Gallagher EJ, LeRoith DJ. Hyperinsulinaemia in cancer. *2020;20(11):629-44.*
35. Hegde V, Dhurandhar NV, Reddy PH. Hyperinsulinemia or insulin resistance: What impacts the progression of Alzheimer's disease? *2019;72(s1):S71-S9.*
36. Bashir J, Yarube I. Occurrence of mild cognitive impairment with hyperinsulinaemia in Africans with advanced type 2 diabetes mellitus. *2022;12:182-7.*
37. Westerbacka J, Corner A, Kannisto K, Kolak M, Makkonen J, Korsheninnikova E, et al. Acute in vivo effects of insulin on gene expression in adipose tissue in insulin-resistant and insulin-sensitive subjects. *2006;49:132-40.*
38. Westerbacka J, Cornér A, Kolak M, Makkonen J, Turpeinen U, Hamsten A, et al. Insulin regulation of MCP-1 in human adipose tissue of obese and lean women. *2008;294(5):E841-E5.*
39. Püschel GP, Klauder J, Henkel J. Macrophages, low-grade inflammation, insulin resistance and hyperinsulinemia: a mutual ambiguous relationship in the development of metabolic diseases. *2022;11(15):4358.*
40. Han JM, Patterson SJ, Speck M, Ehses JA, Levings MK. Insulin inhibits IL-10-mediated regulatory T cell function: implications for obesity. *2014;192(2):623-9.*
41. Fishel MA, Watson GS, Montine TJ, Wang Q, Green PS, Kulstad JJ, et al. Hyperinsulinemia provokes synchronous increases in central inflammation and  $\beta$ -amyloid in normal adults. *2005;62(10):1539-44.*
42. Demir S, Nawroth PP, Herzig S, Ekim Üstünel B. Emerging targets in type 2 diabetes and diabetic complications. *2021;8(18):2100275.*
43. Magliano DJ, Boyko EJ, Atlas ID. What is diabetes? IDF DIABETES ATLAS [Internet] 10th edition: International Diabetes Federation; 2021.

44. Magliano DJ, Boyko EJ, Atlas ID. Global picture. IDF DIABETES ATLAS [Internet] 10th edition: International Diabetes Federation; 2021.
45. Basto-Abreu A, López-Olmedo N, Rojas-Martínez R, Aguilar-Salinas CA, Moreno-Banda GL, Carnalla M, et al. Prevalencia de prediabetes y diabetes en México: Ensanut 2022. 2023;65:s163-s8.
46. Chong RIV, Vaca ONV, Mieles AMT, Alarcón JMG, Gorozabel CJD, Zambrano MIVJPdCRc-p. Diabetes Mellitus y su grave afectación en complicaciones típicas. 2019;4(2):181-98.
47. Kaur R, Kaur M, Singh JJCd. Endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in type 2 diabetes mellitus: molecular insights and therapeutic strategies. 2018;17(1):1-17.
48. Bonner R, Albajrami O, Hudspeth J, Upadhyay AJPCCiOP. Diabetic kidney disease. 2020;47(4):645-59.
49. Mishriky BM, Cummings DM, Powell JRJPCCiOP. Diabetes-Related Microvascular Complications—A Practical Approach. 2022;49(2):239-54.
50. Patel K, Horak H, Tiryaki E. Diabetic neuropathies. Muscle Nerve. 2021;63(1):22-30.
51. Simó-Servat O, Hernández C, Simó R. Diabetic retinopathy in the context of patients with diabetes. Ophthalmic research. 2019;62(4):211-7.
52. Ma C-X, Ma X-N, Guan C-H, Li Y-D, Mauricio D, Fu S-BJCd. Cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus: progress toward personalized management. 2022;21(1):74.
53. Yun J-S, Ko S-HJM. Current trends in epidemiology of cardiovascular disease and cardiovascular risk management in type 2 diabetes. 2021;123:154838.
54. Krüger-Genge A, Blocki A, Franke R-P, Jung FJIjoms. Vascular endothelial cell biology: an update. 2019;20(18):4411.

55. Li G, Barrett EJ, Wang H, Chai W, Liu ZJE. Insulin at physiological concentrations selectively activates insulin but not insulin-like growth factor I (IGF-I) or insulin/IGF-I hybrid receptors in endothelial cells. 2005;146(11):4690-6.
56. Chistiakov DA, Melnichenko AA, Grechko AV, Myasoedova VA, Orekhov ANJE, pathology m. Potential of anti-inflammatory agents for treatment of atherosclerosis. 2018;104(2):114-24.
57. Chandel S, Sathis A, Dhar M, Giri H, Nathan AA, Samawar SKR, et al. Hyperinsulinemia promotes endothelial inflammation via increased expression and release of Angiopoietin-2. 2020;307:1-10.
58. Perrone A, Giovino A, Benny J, Martinelli FJOm, longevity c. Advanced glycation end products (AGEs): biochemistry, signaling, analytical methods, and epigenetic effects. 2020;2020.
59. Ramasamy R, Shekhtman A, Schmidt AMJEoott. The multiple faces of RAGE—opportunities for therapeutic intervention in aging and chronic disease. 2016;20(4):431-46.
60. Khalid M, Petroianu G, Adem AJB. Advanced glycation end products and diabetes mellitus: mechanisms and perspectives. 2022;12(4):542.
61. Rabbani N, Thornalley PJKi. Advanced glycation end products in the pathogenesis of chronic kidney disease. 2018;93(4):803-13.
62. Yubero-Serrano EM, Pérez-Martínez PJA. Advanced glycation end products and their involvement in cardiovascular disease. SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA; 2020. p. 698-700.
63. Rahbar S, Blumenfeld O, Ranney HMJB, communications br. Studies of an unusual hemoglobin in patients with diabetes mellitus. 1969;36(5):838-43.

64. Twarda-Clapa A, Olczak A, Białkowska AM, Koziółkiewicz MJC. Advanced glycation end-products (AGEs): Formation, chemistry, classification, receptors, and diseases related to AGEs. 2022;11(8):1312.
65. Kuzan AJBR. Toxicity of advanced glycation end products. 2021;14(5):1-8.
66. Jia W, Guo A, Zhang R, Shi LJFC. Mechanism of natural antioxidants regulating advanced glycosylation end products of Maillard reaction. 2022:134541.
67. van Dongen KC, Kappetein L, Estruch IM, Belzer C, Beekmann K, Rietjens IMJF, et al. Differences in kinetics and dynamics of endogenous versus exogenous advanced glycation end products (AGEs) and their precursors. 2022:112987.
68. Liu L, Liu L, Xie J, Shen MJFc. Formation mechanism of AGEs in Maillard reaction model systems containing ascorbic acid. 2022;378:132108.
69. Frimat M, Teissier T, Boulanger EJA. Is RAGE the receptor for inflammaging? 2019;11(17):6620.
70. Rouhiainen A, Kuja-Panula J, Tumova S, Rauvala HJC-BP, Applications RFSBtC. RAGE-mediated cell signaling. 2013:239-63.
71. Yue Q, Song Y, Liu Z, Zhang L, Yang L, Li JJM. Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE): A Pivotal Hub in Immune Diseases. 2022;27(15):4922.
72. Gelžinský J, Mayer Jr O, Seidlerová J, Mateřánková M, Mareš Š, Kordíková V, et al. Soluble receptor for advanced glycation end-products independently influences individual age-dependent increase of arterial stiffness. 2020;43(2):111-20.
73. Du C, Whiddett RO, Buckle I, Chen C, Forbes JM, Fotheringham AKJC. Advanced Glycation End Products and Inflammation in Type 1 Diabetes Development. 2022;11(21):3503.



74. Grysczyńska B, Budzyń M, Formanowicz D, Wanic-Kossowska M, Formanowicz P, Majewski W, et al. Selected atherosclerosis-related diseases may differentially affect the relationship between plasma advanced glycation end products, receptor sRAGE, and uric acid. 2020;9(5):1416.
75. Stirban A, Gawłowski T, Roden MJM. Vascular effects of advanced glycation endproducts: clinical effects and molecular mechanisms. 2014;3(2):94-108.
76. Kierdorf K, Fritz GJ. RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond. 2013;94(1):55-68.
77. Yamagishi S. Role of advanced glycation endproduct (AGE)-receptor for advanced glycation endproduct (RAGE) axis in cardiovascular disease and its therapeutic intervention. 2019;83(9):1822-8.
78. Falcone C, Emanuele E, D'Angelo A, Buzzi MP, Belvito C, Cuccia M, et al. Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products and coronary artery disease in nondiabetic men. 2005;25(5):1032-7.
79. Ott C, Jacobs K, Haucke E, Santos AN, Grune T, Simm AJ. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. 2014;2:411-29.
80. Shao M, Yu M, Zhao J, Mei J, Pan Y, Zhang J, et al. miR-21-3p regulates AGE/RAGE signalling and improves diabetic atherosclerosis. 2020;38(7):965-75.
81. Yin D, Guo Z, Zhang XJ. Identification of biomarkers and prediction of upstream miRNAs in diabetic nephropathy. 2023;14:1144331.
82. Szydełko J, Matyjaszek-Matuszek BJ. MicroRNAs as Biomarkers for Coronary Artery Disease Related to Type 2 Diabetes Mellitus—From Pathogenesis to Potential Clinical Application. 2022;24(1):616.

83. Gerasymchuk M, Cherkasova V, Kovalchuk O, Kovalchuk IJjoms. The role of microRNAs in organismal and skin aging. 2020;21(15):5281.
84. Condrat CE, Thompson DC, Barbu MG, Bugnar OL, Boboc A, Cretoiu D, et al. miRNAs as biomarkers in disease: latest findings regarding their role in diagnosis and prognosis. 2020;9(2):276.
85. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. 2000;403(6772):901-6.
86. Georgakilas G, Perdikopanis N, Hatzigeorgiou AGJmBM, Protocols. Identifying pri-miRNA transcription start sites. 2018:11-31.
87. Zhou S-s, Jin J-p, Wang J-q, Zhang Z-g, Freedman JH, Zheng Y, et al. miRNAs in cardiovascular diseases: potential biomarkers, therapeutic targets and challenges. 2018;39(7):1073-84.
88. Divisato G, Piscitelli S, Elia M, Cascone E, Parisi SJB. MicroRNAs and Stem-like Properties: The complex regulation underlying stemness maintenance and cancer development. 2021;11(8):1074.
89. Shang X, Fang Y, Xin W, You HJJoIR. The application of extracellular vesicles mediated miRNAs in osteoarthritis: current knowledge and perspective. 2022:2583-99.
90. Michlewski G, Cáceres JFJR. Post-transcriptional control of miRNA biogenesis. 2019;25(1):1-16.
91. Liu Z, Shen J, Cai S, Yan F. MicroRNA regulatory network: structure and function: Springer; 2018.
92. Jorge AL, Pereira ER, Oliveira CSd, Ferreira EdS, Menon ETN, Diniz SN, et al. MicroRNAs: understanding their role in gene expression and cancer. 2021;19.

93. Jafari M, Ansari-Pour N, Azimzadeh S, Mirzaie MJPo. A logic-based dynamic modeling approach to explicate the evolution of the central dogma of molecular biology. 2017;12(12):e0189922.
94. Dharap A, Pokrzywa C, Murali S, Pandi G, Vemuganti RJPo. MicroRNA miR-324-3p induces promoter-mediated expression of RelA gene. 2013;8(11):e79467.
95. Galagali H, Kim JKJCoicb. The multifaceted roles of microRNAs in differentiation. 2020;67:118-40.
96. Zacharias F, George D, Michail D, Ioannis P, Marianna T, Arzou B, et al. MicroRNAs determining carcinogenesis by regulating oncogenes and tumor suppressor genes during cell cycle. 2020;9(2):82-92.
97. Pasquinelli AE, McCoy A, Jiménez E, Salo E, Ruvkun G, Martindale MQ, et al. Expression of the 22 nucleotide let-7 heterochronic RNA throughout the Metazoa: a role in life history evolution? 2003;5(4):372-8.
98. Yazarlou F, Kadkhoda S, Ghafouri-Fard SJB, Pharmacotherapy. Emerging role of let-7 family in the pathogenesis of hematological malignancies. 2021;144:112334.
99. Niculae AM, Dobre M, Herlea V, Manuc TE, Trandafir B, Milanesi E, et al. Let-7 microRNAs Are Possibly Associated with Perineural Invasion in Colorectal Cancer by Targeting IGF Axis. 2022;12(10):1638.
100. Chen W, Wang H, Shen Y, Wang S, Liu D, Zhao H, et al. Let-7c-5p down-regulates immune-related CDCA8 to inhibit hepatocellular carcinoma. 2023;23(1):56.
101. Jiang SJCl. Recent findings regarding let-7 in immunity. 2018;434:130-1.
102. Mortazavi D, Sharifi MJC. Antiproliferative effect of upregulation of hsa-let-7c-5p in human acute erythroleukemia cells. 2018;70(6):1509-18.

103. Han HB, Gu J, Zuo HJ, Chen ZG, Zhao W, Li M, et al. Let-7c functions as a metastasis suppressor by targeting MMP11 and PBX3 in colorectal cancer. 2012;226(3):544-55.
104. Wang L, Li J, Li Y, Pang L-BJT, Cell. Hsa-let-7c exerts an anti-tumor function by negatively regulating ANP32E in lung adenocarcinoma. 2020;65:101372.
105. McGowan H, Mirabella VR, Hamod A, Karakhanyan A, Mlynaryk N, Moore JC, et al. hsa-let-7c miRNA regulates synaptic and neuronal function in human neurons. 2018;10:19.
106. Lv J, Zeng Y, Qian Y, Dong J, Zhang Z, Zhang JJB. MicroRNA let-7c-5p improves neurological outcomes in a murine model of traumatic brain injury by suppressing neuroinflammation and regulating microglial activation. 2018;1685:91-104.
107. Zhao G, Zhang T, Wu H, Jiang K, Qiu C, Deng GJI. MicroRNA let-7c improves LPS-induced outcomes of endometritis by suppressing NF- $\kappa$ B signaling. 2019;42:650-7.
108. Zhu H, Shyh-Chang N, Segrè AV, Shinoda G, Shah SP, Einhorn WS, et al. The Lin28/let-7 axis regulates glucose metabolism. 2011;147(1):81-94.
109. Indyk D, Bronowicka-Szydełko A, Gamian A, Kuzan AJSR. Advanced glycation end products and their receptors in serum of patients with type 2 diabetes. 2021;11(1):13264.
110. Pérez-Villarreal JM, Aviña-Padilla K, Beltrán-López E, Guadrón-Llanos AM, López-Bayghen E, Magaña-Gómez J, et al. Profiling of circulating chromosome 21-encoded microRNAs, miR-155, and let-7c, in down syndrome. 2022;10(6):e1938.
111. Hernández-Melchor D, Ramírez-Martínez L, Cid L, Palafox-Gómez C, López-Bayghen E, Ortega AJAn. EAAT1-dependent slc1a3 Transcriptional Control depends on the Substrate Translocation Process. 2022;14:17590914221116574.
112. Lunn M-L, Mouritzen P, Faber K, Jacobsen N. MicroRNA quantitation from a single cell by PCR using SYBR® Green detection and LNA-based primers. Nature Publishing Group US New York; 2008.

113. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin XJB, bioinformatics, biomathematics. An improvement of the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. 2013;3(3):71.
114. Qiagen. miRCURY® LNA® miRNA SYBR® Green PCR Handbook miRCURY LNA RT Kit2019 [Available from: <https://www.qiagen.com/es-es/products/discovery-and-translational-research/pcr-qpcr-dpcr/qpcr-assays-and-instruments/mirna-qpcr-assay-and-panels/mircury-lna-rt-kit>].
115. Muniyappa R, Chen H, Montagnani M, Sherman A, Quon MJ, JoP-E, Metabolism. Endothelial dysfunction due to selective insulin resistance in vascular endothelium: insights from mechanistic modeling. 2020;319(3):E629-E46.
116. Galicia-Garcia U, Benito-Vicente A, Jebari S, Larrea-Sebal A, Siddiqi H, Uribe KB, et al. Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. International journal of molecular sciences. 2020;21(17):6275.
117. Rhee SY, Kim YS, JDM, journal m. The role of advanced glycation end products in diabetic vascular complications. 2018;42(3):188-95.
118. Yang P, Feng J, Peng Q, Liu X, Fan Z, JOM, Longevity C. Advanced glycation end products: potential mechanism and therapeutic target in cardiovascular complications under diabetes. 2019;2019(1):9570616.
119. Villegas-Rodríguez ME, Uribarri J, Solorio-Meza SE, Fajardo-Araujo ME, Cai W, Torres-Graciano S, et al. The AGE-RAGE axis and its relationship to markers of cardiovascular disease in newly diagnosed diabetic patients. 2016;11(7):e0159175.
120. Piskounova E, Polytaichou C, Thornton JE, LaPierre RJ, Pothoulakis C, Hagan JP, et al. Lin28A and Lin28B inhibit let-7 microRNA biogenesis by distinct mechanisms. 2011;147(5):1066-79.

121. McDaniel K, Hall C, Sato K, Lairmore T, Marzioni M, Glaser S, et al. Lin28 and let-7: roles and regulation in liver diseases. 2016;310(10):G757-G65.
122. Mills IV WT, Nassar NN, Ravindra D, Li X, Meffert MKJC. Multi-level regulatory interactions between nf- $\kappa$ b and the pluripotency factor lin28. 2020;9(12):2710.
123. Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl KJC. An epigenetic switch involving NF- $\kappa$ B, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. 2009;139(4):693-706.
124. Pavlíková NJIJoMS. Caffeic acid and diseases—Mechanisms of action. 2022;24(1):588.
125. Jeon Y-D, Kee J-Y, Kim D-S, Han Y-H, Kim S-H, Kim S-J, et al. Effects of Ixeris dentata water extract and caffeic acid on allergic inflammation in vivo and in vitro. 2015;15:1-11.
126. Feng L, Zhu M-m, Zhang M-h, Wang R-s, Tan X-b, Song J, et al. Protection of glycyrrhizic acid against AGEs-induced endothelial dysfunction through inhibiting RAGE/NF- $\kappa$ B pathway activation in human umbilical vein endothelial cells. 2013;148(1):27-36.
127. Adamopoulos C, Piperi C, Gargalionis AN, Dalagiorgou G, Spilioti E, Korkolopoulou P, et al. Advanced glycation end products upregulate lysyl oxidase and endothelin-1 in human aortic endothelial cells via parallel activation of ERK1/2–NF- $\kappa$ B and JNK–AP-1 signaling pathways. 2016;73:1685-98.
128. Edgerton-Fulton M, Ergul AJAJoP-CP. Vascular contributions to cognitive impairment/dementia in diabetes: role of endothelial cells and pericytes. 2022;323(4):C1177-C89.

129. Murakami Y, Toyoda H, Tanahashi T, Tanaka J, Kumada T, Yoshioka Y, et al. Comprehensive miRNA expression analysis in peripheral blood can diagnose liver disease. 2012;7(10):e48366.
130. Frost RJ, Olson EN, Potluri N, et al. Control of glucose homeostasis and insulin sensitivity by the Let-7 family of microRNAs. 2011;108(52):21075-80.
131. Lino M, Garcia-Martin R, Muñoz VR, Ruiz GP, Nawaz A, Brandão BB, et al. Multi-step regulation of microRNA expression and secretion into small extracellular vesicles by insulin. 2024;43(7).
132. Rosas AMR. PERFIL DE EXPRESIÓN DE UN PANEL DE microRNAs ASOCIADOS A LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER EN EL CONTEXTO DE DIABETES MELLITUS TIPO 2: Univesidad Autónoma de Sinaloa; 2020.
133. Dandona P, Aljada A, Mohanty P, Ghanim H, Hamouda W, Assian E, et al. Insulin inhibits intranuclear nuclear factor  $\kappa$ B and stimulates I $\kappa$ B in mononuclear cells in obese subjects: evidence for an anti-inflammatory effect? 2001;86(7):3257-65.
134. Mussbacher M, Salzmann M, Brostjan C, Hoesel B, Schoergenhofer C, Datler H, et al. Cell type-specific roles of NF- $\kappa$ B linking inflammation and thrombosis. 2019;10:85.
135. Papachristoforou E, Lambadiari V, Maratou E, Makrilakis K, et al. Association of glycemic indices (hyperglycemia, glucose variability, and hypoglycemia) with oxidative stress and diabetic complications. 2020;2020(1):7489795.
136. Delafontaine P, Song Y-H, Li Y, et al. Expression, regulation, and function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 binding proteins in blood vessels. 2004;24(3):435-44.
137. Cubbon RM, Kearney MT, Wheatcroft SB, et al. Endothelial IGF-1 receptor signalling in diabetes and insulin resistance. 2016;27(2):96-104.

138. Ren X, Ren L, Wei Q, Shao H, Chen L, Liu NJCd. Advanced glycation end-products decreases expression of endothelial nitric oxide synthase through oxidative stress in human coronary artery endothelial cells. 2017;16:1-12.
139. Murayama T, Nakaoku T, Enari M, Nishimura T, Tominaga K, Nakata A, et al. Oncogenic fusion gene CD74-NRG1 confers cancer stem cell-like properties in lung cancer through a IGF2 autocrine/paracrine circuit. 2016;76(4):974-83.
140. Yang S-J, Chen C-Y, Chang G-D, Wen H-C, Chen C-Y, Chang S-C, et al. Activation of Akt by advanced glycation end products (AGEs): involvement of IGF-1 receptor and caveolin-1. 2013;8(3):e58100.
141. Wang Y, Zhang Z-y, Chen X-q, Wang X, Cao H, Liu S-wJAPS. Advanced glycation end products promote human aortic smooth muscle cell calcification in vitro via activating NF- $\kappa$ B and down-regulating IGF1R expression. 2013;34(4):480-6.
142. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-kappaB signaling in inflammation. Signal Transduct Target Ther. 2017;2:17023-.
143. Hou B, Ishinaga H, Midorikawa K, Nakamura S, Hiraku Y, Oikawa S, et al. Let-7c inhibits migration and epithelial-mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma by targeting IGF1R and HMGA2. 2018;9(10):8927.
144. Kalantzakos TJ, Sebel LE, Trussler J, Sullivan TB, Burks EJ, Sarita-Reyes CD, et al. MicroRNA Associated with the Invasive Phenotype in Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Let-7c-5p Inhibits Proliferation, Migration, and Invasion by Targeting Insulin-like Growth Factor 1 Receptor. 2022;10(10):2425.
145. Liu G-X, Ma S, Li Y, Yu Y, Zhou Y-X, Lu Y-D, et al. Hsa-let-7c controls the committed differentiation of IGF-1-treated mesenchymal stem cells derived from dental pulps by targeting IGF-1R via the MAPK pathways. 2018;50(4):1-14.



146. Mahmoud AM, Szczurek MR, Blackburn BK, Mey JT, Chen Z, Robinson AT, et al. Hyperinsulinemia augments endothelin-1 protein expression and impairs vasodilation of human skeletal muscle arterioles. 2016;4(16):e12895.
147. Muniyappa R, Sowers JRJD. Endothelial insulin and IGF-1 receptors: when yes means NO. 2012;61(9):2225.
148. Schmidt AM, Stern DMJCR. Hyperinsulinemia and vascular dysfunction: the role of nuclear factor- $\kappa$ B, yet again. Am Heart Assoc; 2000. p. 722-4.
149. Aljada A, Ghanim H, Saadeh R, Dandona PJTJoCE, Metabolism. Insulin inhibits NF $\kappa$ B and MCP-1 expression in human aortic endothelial cells. 2001;86(1):450-3.
150. Majumdar G, Harmon A, Candelaria R, Martinez-Hernandez A, Raghov R, Solomon SSJAJoP-E, et al. O-glycosylation of Sp1 and transcriptional regulation of the calmodulin gene by insulin and glucagon. 2003;285(3):E584-E91.
151. Solomon SS, Majumdar G, Martinez-Hernandez A, Raghov R. A critical role of Sp1 transcription factor in regulating gene expression in response to insulin and other hormones. 2008;83(9-10):305-12.
152. Ivanenko K, Prassolov V, Khabusheva EJMB. Transcription factor sp1 in the expression of genes encoding components of mapk, JAK/STAT, and PI3K/Akt signaling pathways. 2022;56(5):756-69.
153. Vanamala J, Reddivari L, Radhakrishnan S, Tarver CJBc. Resveratrol suppresses IGF-1 induced human colon cancer cell proliferation and elevates apoptosis via suppression of IGF-1R/Wnt and activation of p53 signaling pathways. 2010;10:1-14.
154. Beitner-Johnson D, Werner H, Roberts Jr CT, LeRoith D. Regulation of insulin-like growth factor I receptor gene expression by Sp1: physical and functional interactions of Sp1 at GC boxes and at a CT element. Molecular endocrinology. 1995;9(9):1147-56.

155. An Y, Xu B-t, Wan S-r, Ma X-m, Long Y, Xu Y, et al. The role of oxidative stress in diabetes mellitus-induced vascular endothelial dysfunction. 2023;22(1):237.
156. Palanissami G, Paul SFJEoTA-tT. AGEs and RAGE: Metabolic and molecular signatures of the glycation-inflammation axis in malignant or metastatic cancers. 2023;4(5):812.
157. Reynaert NL, Vanfleteren LE, Perkins TNJJoCM. The AGE-RAGE Axis and the Pathophysiology of Multimorbidity in COPD. 2023;12(10):3366.
158. Prasad K, Khan AS, Bhanumathy KKJJoA. Does AGE-RAGE Stress Play a Role in the Development of Coronary Artery Disease in Obesity? 2022;31(01):001-9.
159. Rasheed Z, Akhtar N, Haqqi TMJR. Advanced glycation end products induce the expression of interleukin-6 and interleukin-8 by receptor for advanced glycation end product-mediated activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- $\kappa$ B in human osteoarthritis chondrocytes. 2011;50(5):838-51.
160. Nonaka K, Kajiura Y, Bando M, Sakamoto E, Inagaki Y, Lew JH, et al. Advanced glycation end-products increase IL-6 and ICAM-1 expression via RAGE, MAPK and NF- $\kappa$ B pathways in human gingival fibroblasts. 2018;53(3):334-44.
161. Csiszar A, Ungvari ZJJoP-H, Physiology C. Endothelial dysfunction and vascular inflammation in type 2 diabetes: interaction of AGE/RAGE and TNF- $\alpha$  signaling. 2008;295(2):H475-H6.
162. Gao X, Zhang H, Schmidt AM, Zhang CJJoP-H, Physiology C. AGE/RAGE produces endothelial dysfunction in coronary arterioles in type 2 diabetic mice. 2008;295(2):H491-H8.

163. Lin K, Ye H, Han B, Wang W, Wei P, He B, et al. Genome-wide screen identified let-7c/miR-99a/miR-125b regulating tumor progression and stem-like properties in cholangiocarcinoma. 2016;35(26):3376-86.
164. Law Y-Y, Lee W-F, Hsu C-J, Lin Y-Y, Tsai C-H, Huang C-C, et al. miR-let-7c-5p and miR-149-5p inhibit proinflammatory cytokine production in osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. 2021;13(13):17227.
165. Perkins JM, Joy NG, Tate DB, Davis SNJAJoP-E, Metabolism. Acute effects of hyperinsulinemia and hyperglycemia on vascular inflammatory biomarkers and endothelial function in overweight and obese humans. 2015;309(2):E168-E76.
166. Ataie-Kachoie P, Pourgholami MH, Richardson DR, Morris DLJJocp. Gene of the month: Interleukin 6 (IL-6). 2014;67(11):932-7.
167. Kang S, Tanaka T, Inoue H, Ono C, Hashimoto S, Kioi Y, et al. IL-6 trans-signaling induces plasminogen activator inhibitor-1 from vascular endothelial cells in cytokine release syndrome. 2020;117(36):22351-6.
168. Pedersen DJ, Guilherme A, Danai LV, Heyda L, Matevossian A, Cohen J, et al. A major role of insulin in promoting obesity-associated adipose tissue inflammation. 2015;4(7):507-18.
169. Krogh-Madsen R, Plomgaard P, Keller P, Keller C, Pedersen BKJAJoP-E, Metabolism. Insulin stimulates interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  gene expression in human subcutaneous adipose tissue. 2004;286(2):E234-E8.
170. Zegeye MM, Lindkvist M, Fälker K, Kumawat AK, Paramel G, Grenegård M, et al. Activation of the JAK/STAT3 and PI3K/AKT pathways are crucial for IL-6 trans-signaling-mediated pro-inflammatory response in human vascular endothelial cells. 2018;16:1-10.

171. Pakpour N, Corby-Harris V, Green GP, Smithers HM, Cheung KW, Riehle MA, et al. Ingested human insulin inhibits the mosquito NF- $\kappa$ B-dependent immune response to *Plasmodium falciparum*. 2012;80(6):2141-9.
172. Jayathilake W, Furr M, Risco C, Lacombe VAJVI, Immunopathology. Equine insulin dysregulation causes tissue specific alterations of proinflammatory cytokines and acute phase proteins in a NF- $\kappa$ B independent manner. 2022;253:110500.
173. Kim J-E, Kang T-C. PKC, AKT and ERK1/2-mediated modulations of PARP1, NF- $\kappa$ B and PEA15 activities distinctly regulate regional specific astroglial responses following status epilepticus. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2019;12:180.
174. Gong L, Li Y, Nedeljkovic-Kurepa A, Sarkar FH. Inactivation of NF- $\kappa$ B by genistein is mediated via Akt signaling pathway in breast cancer cells. *Oncogene*. 2003;22(30):4702-9.
175. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto TJCSHpib. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. 2014;6(10):a016295.
176. Fisslthaler B, Benzing T, Busse R, Fleming IJNO. Insulin enhances the expression of the endothelial nitric oxide synthase in native endothelial cells: a dual role for Akt and AP-1. 2003;8(4):253-61.
177. Bamji-Mirza M, Callaghan D, Najem D, Shen S, Hasim MS, Yang Z, et al. Stimulation of insulin signaling and inhibition of JNK-AP1 activation protect cells from amyloid- $\beta$ -induced signaling dysregulation and inflammatory response. 2014;40(1):105-22.
178. Sano M, Fukuda K, Sato T, Kawaguchi H, Suematsu M, Matsuda S, et al. ERK and p38 MAPK, but not NF- $\kappa$ B, are critically involved in reactive oxygen species-mediated induction of IL-6 by angiotensin II in cardiac fibroblasts. 2001;89(8):661-9.

179. Tessaro FH, Ayala TS, Nolasco EL, Bella LM, Martins JOJCP, Biochemistry. Insulin influences LPS-Induced TNF- $\alpha$  and IL-6 release through distinct pathways in mouse macrophages from different compartments. 2017;42(5):2093-104.
180. Ma S, Liu G, Jin L, Pang X, Wang Y, Wang Z, et al. IGF-1/IGF-1R/hsa-let-7c axis regulates the committed differentiation of stem cells from apical papilla. 2016;6(1):36922.
181. Sung S-Y, Liao C-H, Wu H-P, Hsiao W-C, Wu I-H, Jinpu, et al. Loss of let-7 microRNA upregulates IL-6 in bone marrow-derived mesenchymal stem cells triggering a reactive stromal response to prostate cancer. 2013;8(8):e71637.
182. Kim SJ, Gregersen PK, Diamond BJTJoci. Regulation of dendritic cell activation by microRNA let-7c and BLIMP1. 2013;123(2):823-33.
183. Qin L, Huang Q, Zhang H, Liu R, Tellides G, Min W, et al. SOCS1 prevents graft arteriosclerosis by preserving endothelial cell function. 2014;63(1):21-9.

## SIGLAS Y ABREVIACIONES

AGE-BSA: Producto final de glicación avanzada- Albúmina de suero bovino

AGER: Gen del receptor de productos finales de glicación avanzada

AGEs: Productos finales de glicación avanzada

AGO: Proteína Argonaute

AKT: La proteína cinasa B

ANG-2: Angiopoyetina 2

ANOVA: Análisis de la Varianza

AP-1: Proteína activadora 1

ATP: Adenosín Trifosfato

BSA: Albúmina de suero bovino

cAMP: Adenosín monofosfato cíclico

CDC42: El homólogo de la proteína 42 de control de la división celular

cDNA: DNA complementario

CEACAM1: Molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario 1

CML: Carboximetil-lisina

CREB: Proteína de unión al elemento de respuesta cAMP

CT: Umbral de ciclos

DAMPs: Patrones moleculares asociados a daño

DGCR8: Región crítica 8 de DiGeorge

DMSO: Dimetilsulfóxido

DMT2: Diabetes mellitus tipo 2

EAC: Enfermedad arterial coronaria

ECGS: Suplemento de crecimiento para células endoteliales

ECV: Enfermedades cardiovasculares

ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

ERG: Respuesta de crecimiento temprano

ERK: Proteína cinasa regulada por señales extracelulares

ET-1: Endotelina 1

FL: Fructoselisisina

GLUT: Glucotransportador

Grb2: Proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento

GTP: Guanosín trifosfato

HAEC: Células endoteliales aórticas humanas

HbA1c: Hemoglobina A glicosilada

HGF: Fibroblastos gingivales humanos

HMEC-1: Células endoteliales microvasculares dérmicas humanas-1

HOMA-IR: Evaluación del modelo homeostático para la resistencia a la insulina

IC: Insuficiencia cardiaca

ICAM-1: Molécula de Adhesión 1

IDF: Federación internacional de la diabetes

IFN- $\gamma$ : Interferón gamma

IGF-1: Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1

IGFR-1: Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1

IKK: Cinasa I $\kappa$ B

IL-6: Interleucina 6

lncRNA: RNA largos no codificantes

IR: Receptor de insulina

IRS: Proteínas del sustrato del receptor de insulina

ISRE: Elemento de respuesta sensible al interferón.

JAK: Janus cinasa

JNK: Cinasa c-Jun N-terminal

MAPK: Proteínas cinasas activadas por mitógenos

MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos-1

miRNA: MicroRNA

mRNA: RNA mensajero

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio



NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NF- $\kappa$ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de los linfocitos B activados

NO: Óxido nítrico

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PI3K: Fosfatidilinositol 3-cinasa

PKC: Proteína cinasa C

PKD1: Policistina-1

Pol II: RNA polimerasa II

Pre-miRNA: Precursor de miRNA

Pri-miRNA: Transcrito primario de miRNA

RAC1: Sustrato 1 de la toxina botulínica C3 relacionada con Ras

RAGE: Receptor de productos finales de glicación avanzada

RBP: Proteína de unión al RNA de doble cadena

RI: Resistencia a la insulina

RISC: Complejo de silenciamiento inducido por RNA

RNS: Especies reactivas de nitrógeno

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RT: Retro-transcripción

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa

S6K: Proteína ribosomal S6 cinasa beta-1

SEM: Error estándar de la media

snRNA: Pequeños RNA nucleares

SOCS1: Proteína supresora señalización de citocinas 1

SRAA: Sistema renina-angiotensina-aldosterona

sRAGE: Receptor de productos finales de glicación avanzada soluble

SRC1: Coactivadores del receptor de esteroides 1

STAT: Transductor de señal y activador de transcripción

TLR: Receptores tipo Toll

TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa

UTR: Región no traducida

VCAM-1: Molécula de adhesión de células vasculares 1

XPO5: Exportina-5