

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Papel de los RNAs no-codificantes de proteínas en el
metabolismo lipídico intestinal**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Judit Gil Zamorano

DIRECTOR

Alberto Dávalos Herrera

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE BIOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

Papel de los RNAs no-codificantes de proteínas en el metabolismo lipídico intestinal

Judit Gil Zamorano

Director
Alberto Dávalos Herrera

Madrid, 2020

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE BIOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

**Papel de los RNAs no-codificantes de proteínas en el
metabolismo lipídico intestinal**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Judit Gil Zamorano



**INSTITUTO MADRILEÑO DE ESTUDIOS AVANZADOS
EN ALIMENTACIÓN (IMDEA FOOD INSTITUTE)**

Director

Alberto Dávalos Herrera

Madrid, 2020

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE BIOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

**PAPEL DE LOS RNAs NO-CODIFICANTES
DE PROTEÍNAS EN EL METABOLISMO
LIPÍDICO INTESTINAL**

Judit Gil Zamorano



**INSTITUTO MADRILEÑO DE ESTUDIOS AVANZADOS EN
ALIMENTACIÓN (IMDEA FOOD INSTITUTE)**

Madrid, 2020

©Judit Gil Zamorano, 2020

AGRADECIMIENTOS

Llegado este punto puede parecer que estas palabras son las más sencillas, pero no lo son, ya que tan solo en unas pocas líneas, mencionando a todas las personas que han formado parte de mi vida en esta etapa y sin ir de uno en uno resulta complicado mostrar todo lo que siento y mi agradecimiento.

En primer lugar agradecer al Dr. Alberto Dávalos, por darme la oportunidad, valorar mis ganas de trabajar y transformar una casualidad en este avance profesional y personal. También por añadir al duro trabajo que supone la investigación ese entusiasmo que hace querer aprender más y buscar con más ahínco aunque los resultados no siempre sean positivos, porque siempre surge algo interesante por donde seguir avanzando.

Y por llevar un orden, mi compañera de grupo al principio de los tiempos, Josune. Por enseñarme parte de esa sabiduría, por calmar las prisas y mostrarme el trabajo bien hecho y cómo analizar los entresijos de las dichas qPCRs.

Gracias al laboratorio "cachondo" al completo. Por convertir compañeros de trabajo y colaboraciones en amistad con la cual compartir momentos a lo largo de todo este tiempo, tanto tiempo que da para muchos buenos momentos aunque haya habido algunos sinsabores. En especial a mi flor por estar ahí para todos ellos, tanto los buenos como para mis locuras, mis penas y mis repeticiones ¡pero qué cansina soy y qué paciencia has tenido! Solo espero que esta amistad siga más allá y sigamos compartiendo más momentos. Y Francesco, gracias por prestarme tan amablemente ese rinconcito tranquilo desde donde escribir este "Libro Gordo de Petete".

A mi familia de Dislípidas: Diana, Mayka, Almudena, Lorena y Belén. Gracias por hacer tan ameno cada día, por enseñarme que aunque todas somos diferentes podemos compartir grandes momentos; que hay que tener paciencia y cada uno tenemos nuestro ritmo, distintas maneras de pensar y ver la vida, pero que a su vez podemos compartir nuestra pasión... ¡pasión por la comida y las arañas! (ups, debí decir ciencia ¿no?). Gracias a mi pequeño ratoncito que volvió a hacer amena la vuelta al animalario y me ha hecho sonreír tanto; a la jefa, por animarme y escucharme en esos momentos de estrés y agobio haciendo razonable toda esta locura de sentimientos que nos inunda a todos con la tesis; y a la persona más positiva con la que me he topado, porque "Dios proveerá" pero a veces es difícil creer que eso va a ocurrir sin que alguien tan positivo te haga ver lo bueno de cada momento. A Roberto (que se empeña en desayunar sano y acaba comiendo con nosotras), Lamia y Elena que también forman o han formado parte de esos buenos momentos.

Y como no, al resto de compañeros IMDEANOS. Al Director Guillermo Reglero, por su motivación para que nuestro IMDEA "despegue", seguir creciendo y ser más visibles. A toda la gente de administración, nutris, los distintos grupos de investigación, los pacientes informáticos, Rubén, Julia... gracias a todos los que aunque sea me hayan prestado unos "buenos días" o una sonrisa amable, y que contribuyen a ese buen ambiente que nos caracteriza. Quedan muchos recuerdos, desde esas tardes de box en que Silvita y yo escuchábamos la dulce voz de Ruth versus la voz rockera de Josune, la preparación de los espectáculos de laboratorio para los medios, los elogios de Jorge haciéndonos sentir unas supercientíficas, las fiestas organizadas por el comité de festejos Mónica& Victor, las copas de Navidad...

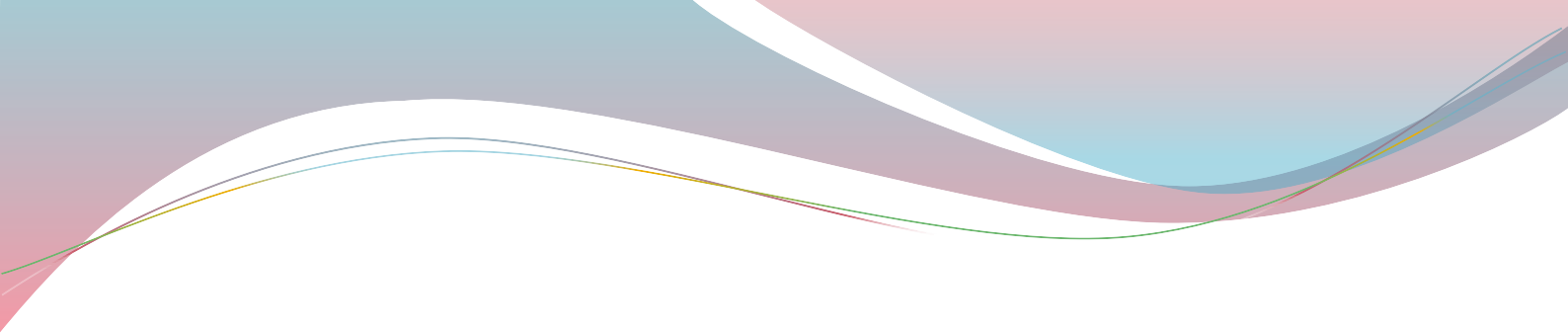
También agradecer a Emilio, Henar y sobretodo a Mila, por acogerme tan gentilmente, enseñarme y ayudarme a procesar todas esas muestras convirtiendo un trabajo tedioso en unas mañanas tranquilas.

A mis amig@s, porque todas las alegrías y los momentos difíciles se llevan mejor compartiéndolos con la gente que te quiere, con unas tortitas y unas risas, de paseo, tomando helados o compartiendo sufrimientos por teléfono. Ya entiendan lo que es la ciencia o cuando pese a que no comprenden que es un microRNA, por qué pasas tantas horas en el laboratorio o por qué sigues después de tanto tiempo, te animan a seguir y terminar. Y especialmente a Eu, porque, aunque no sé cómo pasamos de compañeras a amigas, sí sé que eres una gran amiga que me ha dado esa comprensión, el ánimo y el empujón para seguir cuando solo quería salir corriendo.

A Carlos, porque pese a todo y para todo has estado conmigo apoyándome, levantándome y mostrándome que valgo mucho más de lo que acostumbro a creer.

A mi familia, sobre todo mis padres que me han guiado hasta aquí pensando en lo mejor para mí, en que todo el esfuerzo para avanzar profesionalmente me ayudaría en mi futuro; pero que también me han apoyado en mis decisiones fueran o no correctas, y que siempre van a ser un apoyo y un modelo para mí. Y a mi ángel de la guarda, porque aunque ya no me va a ver ser "doctora" para preguntarme cuando se encuentren malitos, sé que estaría muy orgullosa de esta cataplasma.

***Las personas van y vienen, los momentos moldean quienes somos, nuestro placer y el sufrimiento, y,
aunque el tiempo pasa y a veces arrasa, nos queda un tesoro lleno de recuerdos.***



ÍNDICES

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS	i
ABSTRACT	vii
RESUMEN	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
1. RNA no codificante	3
2. micro-RNAs.....	4
2.1. Biogénesis	6
2.2. Regulación de la biogénesis.....	8
2.3. Mecanismo de acción	10
2.3.1. Regulación postranscripcional.	11
2.3.2. Regulación traduccional.....	12
2.3.3. Capacidad de regulación en el núcleo	12
2.3.4. Regulación mediada por miRNAs según estado y tipo celular.	13
2.4. Localización Intracelular y extracelular de los microRNAs	15
2.5. microRNAs en el metabolismo lipídico	17
2.6. microRNAs en el intestino	23
2.7. microRNAs y terapia	27
2.8. microRNAs, y regulación por dieta y componentes de la dieta.....	30
3. Caco-2 y organoides intestinales como modelo celular 3D	33
4. El modelo animal de ratón <i>Dicer-knockout</i> específico de intestino	36
II. OBJETIVOS.....	39

III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	43
1. Material y métodos utilizados con los modelos <i>in vivo</i>	45
1.1. Modelos murinos y protocolo de desarrollo	45
1.2. Genotipado y caracterización de los ratones	47
1.3. Grupos experimentales y tratamientos	49
1.3.1. <i>Screening</i> de microRNAs	49
1.3.2. Cinética	50
1.3.3. Primera cohorte de animales <i>knockout</i> y <i>wild type</i>	51
1.3.4. Segunda cohorte de animales <i>knockout</i> y <i>wild type</i>	51
1.4. Recolección de muestras	52
1.5. Análisis de lípidos plasmáticos.....	53
1.6. Perfil de lipoproteínas plasmáticas.....	53
1.7. Análisis de lípidos en tejidos.....	53
2. Material y métodos utilizados con los modelos de aproximación <i>in vitro</i>	54
2.1. Células Caco-2 diferenciadas	54
2.2. Organoides intestinales	55
2.3. Tratamiento con micelas postprandiales.....	56
2.4. Análisis de la secreción de apolipoproteínas.....	57
3. Extracción y procesamiento del RNA	57
3.1. Extracción de RNA y análisis de integridad.....	57
3.2. RNA-Seq	58
3.3. Síntesis del DNA complementario y PCR cuantitativa a tiempo real.....	59
4. Extracción y análisis de proteínas	65
5. Procesamiento, representación y análisis estadístico de los datos.....	66

IV. RESULTADOS	69
1. Papel de los microRNAs en el enterocito y metabolismo lipídico	71
1.1. Generación y caracterización del modelo animal.....	71
1.2. Análisis de lípidos plasmáticos.....	75
1.3. Perfil de lipoproteínas plasmáticas.....	76
1.4. Análisis de lípidos intestinales y hepáticos	77
1.5. Análisis de los genes relacionados con el metabolismo lipídico.	82
1.5.1. Arrays de expresión génica	82
1.5.2. Validación de genes	83
1.5.3. Análisis de la expresión proteica.....	85
1.5.4. Búsqueda de miRNAs candidatos de unión a los genes cuya expresión se ve modificada	86
2. Caracterización de miRNAs intestinales regulados por una dieta hipercalórica y en lipemia postprandial.....	88
2.1. Experimentos "Long", "Short" y "Pulse".....	88
2.2. Selección de los miRNAs candidatos.	96
3. RNA-Seq de los experimentos "Short" y "Pulse"	97
4. Verificación de las variaciones de expresión de miRNAs intestinales en muestras de cinética	98
5. RNA-Seq de miRNAs procedentes de enteroides	102
6. Validación de miRNAs intestinales en cohorte 1	103
7. Análisis de la expresión de microRNAs a lo largo del intestino y en función del sexo.....	105
8. Análisis de los miRNAs candidatos <i>in vitro</i>	113
9. Análisis de las posibles vías implicadas.	117

V.	DISCUSIÓN	119
VI.	CONCLUSIONES	141
VII.	BIBLIOGRAFÍA.....	145
VIII.	ANEXOS.....	189
	1. Tablas suplementarias.....	191
	2. Figuras suplementarias	227

ÍNDICE DE FIGURAS

Introducción

- **Figura 1.** Resumen de la biogénesis canónica de los miRNAs. 7
- **Figura 2.** Diferentes sitios de unión en función del emparejamiento Watson-Crick entre la región semilla del miRNA y la región 3'UTR del mRNA diana. 11
- **Figura 3.** miRNAs en función de su localización y su forma de transporte. 16
- **Figura 4.** Resumen de los principales miRNAs involucrados en el metabolismo de lípidos. . 19
- **Figura 5.** Expresión de miRNAs específica de tipo de célula intestinal. 25
- **Figura 6.** Interacción huésped-microbiota a través de miRNAs 26
- **Figura 7.** Aplicación terapéutica de los miRNAs. 28
- **Figura 8.** Estructura y tipos celulares principales en el epitelio intestinal de mamíferos. 34
- **Figura 9.** Sistema de cruzamiento para la obtención del ratón KO condicional mediante el sistema Cre/loxP. 36
- **Figura 10.** Alteraciones intestinales encontradas en ratones KO para Dicer1 respecto al animal *wild type*. 38

Material y Métodos

- **Figura 11.** Representación esquemática del sistema de cría para la obtención de los animales de experimentación 46
- **Figura 12.** Parámetros de ciclado para cada genotipado. 48
- **Figura 13.** Diferentes productos de PCR en función del genotipo. 49
- **Figura 14.** Condiciones de ciclado PCR cuantitativa a tiempo real en el programa SDS 2.4 del equipo 7900 HT. 63
- **Figura 15.** Condiciones ciclado PCR cuantitativa a tiempo real en el programa *QuantStudio 12K Flex v1.1.2*. 64

Resultados

- **Figura 16.** Fotografías representativas del genotipado de los animales, tomadas con el sistema de fotodocumentación de geles *Avegene* (BioNova científica). 72
- **Figura 17:** Western Blot para el análisis de la proteína DICER en muestras de intestinos de los ratones que conforman las cohortes de experimentación. 73
- **Figura 18.** Datos de peso en función del sexo y genotipo. 73
- **Figura 19.** Fotografías del fenotipo de los ratones. 74

• Figura 20. Análisis de la expresión del mRNA de genes relacionados con el linaje de las células componentes del endotelio intestinal en animales WT vs. KO.	75
• Figura 21. Medida de lípidos plasmáticos.	76
• Figura 22. Perfil de lipoproteínas plasmáticas.	77
• Figura 23. Cuantificación de triglicéridos intestinales y hepáticos.	79
• Figura 24. Cuantificación del colesterol intestinal y hepático.	80
• Figura 25. Cuantificación de fosfolípidos intestinales y hepáticos.	81
• Figura 26. <i>Volcano plots</i> para los genes estudiados.	83
• Figura 27. Validación de los genes candidatos.	84
• Figura 28. Niveles de proteína de los genes seleccionados.	86
• Figura 29. Análisis de los miRNAs comunes entre las herramientas de predicción utilizadas para cada gen.	87
• Figura 30. Análisis de los miRNAs modificados en los diferentes estudios temporales.	88
• Figura 31. Representación de los miRNAs comunes a los diferentes experimentos.	96
• Figura 32. Cinética de expresión para cada miRNA seleccionado.	99
• Figura 33. Cinética de expresión para cada miRNA excluido.	102
• Figura 34. Validación de los cambios de expresión de cada miRNA seleccionado en función del sexo.	104
• Figura 35. Análisis de la expresión para cada miRNA a lo largo del intestino, colon e hígado.	105
• Figura 36. Validación de los cambios de expresión de cada miRNA seleccionado en el duodeno.	108
• Figura 37. Validación de los cambios de expresión de cada miRNA seleccionado en el yeyuno.	109
• Figura 38. Validación de los cambios de expresión de cada miRNA seleccionado en el íleon.	110
• Figura 39. Validación de los cambios de expresión de cada miRNA seleccionado en el colon.	111
• Figura 40. Validación de los cambios de expresión de cada miRNA seleccionado en el hígado.	112
• Figura 41. Secuenciación masiva de microRNAs en células Caco-2.	113
• Figura 42. Cinéticas de expresión de los miRNAs candidatos en Caco-2 diferenciadas.	114
• Figura 43. Validación de los cambios de expresión de cada miRNA seleccionado en células Caco-2 diferenciadas.	115

- **Figura 44.** Validación de los cambios de expresión de cada miRNA seleccionado en enteroides derivados de ratones hembras y machos. 116
- **Figura 45.** *Heatmap* de las vías implicadas en función de los genes diana. 118

Anexos

- **Figura suplementaria 1.** Ejemplos representativos de resultados del análisis de integridad de las diferentes muestras de RNA extraídas. 227
- **Figura suplementaria 2.** Cuantificación de lípidos hepáticos en función del genotipo y diferenciando por sexos. 228
- **Figura suplementaria 3.** Representación mediante *heatmap* de la expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) de los genes implicados en el metabolismo de lipoproteínas y colesterol. 229
- **Figura suplementaria 4.** Secreción de apolipoproteínas en el medio basolateral de células Caco-2 diferenciadas sobre placas Transwell®. 230
- **Figura suplementaria 5.** Expresión relativa de diferentes genes clave en el metabolismo lipídico en células Caco-2 diferenciadas sobre placas Transwell®. 230
- **Figura suplementaria 6.** Expresión relativa de diferentes genes clave del metabolismo energético en enteroides derivados de ratón. 231

ÍNDICE DE TABLAS

Materiales y Métodos

- **Tabla 1.** Lista y secuencias de los *primers* usados en el genotipado de ratones. 47
- **Tabla 2.** Listado de reactivos usados en el genotipado de los ratones. 48
- **Tabla 3.** Componentes de la reacción de retrotranscripción. 59
- **Tabla 4.** Secuencias de oligos (*primer sets*) para el estudio de genes relacionados con la composición e identidad del intestino. 60
- **Tabla 5.** Secuencias de los oligos usados para la determinación de la expresión de genes del metabolismo lipídico y de lipoproteínas. 61
- **Tabla 6.** Secuencias de los oligos usados para la determinación de la expresión de los miRNAs candidatos 62
- **Tabla 7.** Composición de la reacción de PCR a tiempo real..... 63

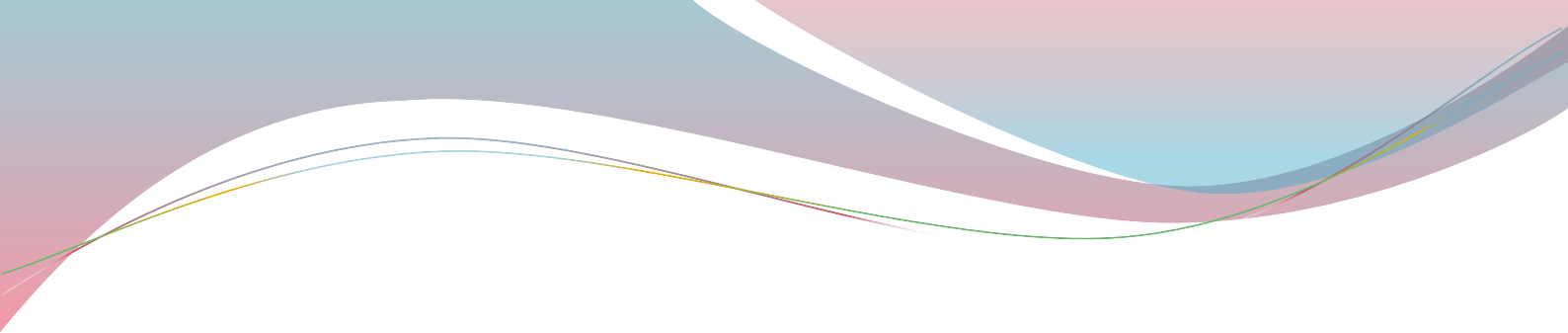
Resultados

- **Tabla 8.** miRNAs intestinales significativamente alterados tras tratamiento largo ("Long", 20 semanas) con dieta hipercalórica. 89
- **Tabla 9.** miRNAs intestinales significativamente alterados tras tratamiento corto ("Short", 4 días) con dieta hipercalórica. 94
- **Tabla 10.** miRNAs intestinales significativamente alterados a las dos horas tras tratamiento con carga oral de aceite de oliva suplementado con colesterol ("Pulse", 2 horas)..... 95
- **Tabla 11.** Lista de miRNAs candidatos. 97
- **Tabla 12.** Informe BGI de miRNAs intestinales diferencialmente expresados en los experimentos "Short" y "Pulse" 97
- **Tabla 13.** miRNAs diferencialmente expresados en enteroides tratados. 103

Anexos

- **Tabla suplementaria 1.** Datos de la dieta aterogénica comercial para roedores TD 02028. 191
- **Tabla suplementaria 2.** Lista de genes incluidos en *Lipoprotein Signaling and Cholesterol Metab RT 2 Profiler PCR Array*. on 191
- **Tabla suplementaria 3.** Tabla de genes según el diseño de la matriz..... 192

- **Tabla suplementaria 4.** miRNAs comunes para los genes candidatos entre las diferentes herramientas de predicción utilizadas..... 193
- **Tabla suplementaria 5.** miRNAs intestinales alterados tras el tratamiento largo (20 semanas) con dieta hipercalórica..... 196
- **Tabla suplementaria 6.** miRNAs intestinales alterados tras el tratamiento corto ("Short", 4 días) con dieta hipercalórica. 199
- **Tabla suplementaria 7.** miRNAs intestinales alterados tras carga oral de aceite de oliva suplementado con colesterol ("Pulse", 2 horas)..... 203
- **Tabla suplementaria 8.** Recuento *reads* normalizado para cada miRNA..... 207
- **Tabla suplementaria 9.** miRNAs diferencialmente expresados en enteroides tratados. ... 210
- **Tabla suplementaria 10.** Resultados de múltiples comparaciones por el método de Bonferroni para el análisis *Two-way ANOVA* de la validación de los miRNAs candidatos en duodeno de animales WT de la cohorte 2. 212
- **Tabla suplementaria 11.** Resultados de múltiples comparaciones por el método de Bonferroni para el análisis *Two-way ANOVA* de la validación de los miRNAs candidatos en yeyuno de animales WT de la cohorte 2..... 215
- **Tabla suplementaria 12.** Resultados de múltiples comparaciones por el método de Bonferroni para el análisis *Two-way ANOVA* de la validación de los miRNAs candidatos en íleon de animales WT de la cohorte 2..... 218
- **Tabla suplementaria 13.** Resultados de múltiples comparaciones por el método de Bonferroni para el análisis *Two-way ANOVA* de la validación de los miRNAs candidatos en colon de animales WT de la cohorte 2..... 221
- **Tabla suplementaria 14.** Resultados de múltiples comparaciones por el método de Bonferroni para el análisis *Two-way ANOVA* de la validación de los miRNAs candidatos en hígado de animales WT de la cohorte 2..... 224



ABREVIATURAS

ABCA1: *ATP-binding cassette Subfamily A member 1*
 Abca2: *ATP-binding cassette Subfamily A member 2*
 ABCB11: *ATP-binding cassette Subfamily B member 11*
 ABCG1: *ATP-binding cassette transporter G1*
 Acaca: Acetil-CoA carboxilasa α
 Acc: Acil-CoA carboxilasa
 Acyl: ATP citrato liasa
 AGO2: Proteína Argonauta 2
 Ahr: Receptor de hidrocarburos arilos (*Aryl hydrocarbon receptor*)
 ALDO-A: Aldolasa A
 AMPK: *AMP-activated protein kinase*
 ANGPTL3: *Angiopoietin-like 3*
 ApoA1: Apolipoproteína A1
 Apoa4: Apolipoproteína A-IV
 Apob: Apolipoproteína B
 Apoc3: Apolipoproteína C-III
 ApoE3: Apolipoproteína E3
 BHT: Butilhidroxitolueno
 BSA: albúmina de suero bovino (*Bovine Serum Albumine*)
 CCR4:NOT: *CCR4 (carbon catabolite repressor 4)-NOT (Negative on TATA)*
 cDNA: ADN complementario (*complementary desoxirribonucleic acid*)
 CEBPB: *CCAAT/enhancer-binding protein beta*
 ChREBP: *Carbohydrate-responsive element-binding protein*
 Cnbp: *Cellular nucleic acid binding protein*
 CPT1A: Carnitina palmitoiltransferasa 1a
 CROT: Carnitina O-octaniltransferasa
 Crp: *C-reactive protein, pentraxin-related*
 CSDC2: *Cold Shock Domain Containing C2*
 Cyb5r3: *Cytochrome b5 reductase 3*
 CYP2E1: Citocromo P450 2E1 (*Cytochrome P450 Family 2 Subfamily E Member 1*)
 Cyp51: Citocromo P450

Cyp7a: Colesterol 7 α -hidroxilasa

DDX5: *DEAD box protein 5*

DMEM/F12: *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12*

DGAT2: Diacilglicerol O-aciltransferasa 2

DGCR8: proteína de unión al RNA (*DiGeorge síndrome Critical Region 8*)

DNA: ácido desoxirribonucleico (*desoxirribonucleic acid*)

dsRNA: RNA de doble cadena (*double-stranded RNA*)

eIF4F: Factor de iniciación del complejo de inicio de la traducción

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

ES o ESC: células madre embrionarias (*Embryonic stem cells*)

FA: ácidos grasos (*Fatty acids*)

FDR: tasa de falsos descubrimientos (*False Discovery Rate*)

FFA: ácidos grasos libres (*Free Fatty Acids*)

FAS: FASN: *Fatty acid synthase*

Foxo3: Factor de transcripción Fox (*forkhead box*) O3

FXR: *Farnesoid X receptor*

GPAM: *glycerol-3-phosphate acyltransferase 1, mitochondrial*

GPC-6: Glucosa 6-fosfatasa (*Glucose-6-phosphatase*)

GTPasa Ran: Guanosina trifosfatasa Ran

HADBDH: *Hydroxyacyl-Coenzyme A Dehydrogenase/3-Ketoacyl-Coenzyme A*

HDL: Lipoproteínas de alta densidad (*High Density Lipoprotein*)

HFD: dieta rica en grasas (*High Fat Diet*)

HMGCoA-R: *Hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase*

HMGCS1: 3-hidroxi-3-metilglutaril- CoA sintasa 1 (*Hydroxymethylglutaryl coA syntase*)

Hmgcs2: gen *3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2*

HNF-alfa: factor nuclear de hepatocitos alfa

Hsp70: proteína de shock térmico de 70 KDa (*Heat shock proteins*)

Hsp90: proteína de shock térmico de 90 KDa (*Heat shock proteins*)

Idi1: Isopentenil difosfatasa delta isomerasa 1

INSIG1: *Insulin induce gene 1*

IRS1: *Insulin receptor substrate 1*

IRS-2: *Insulin receptor substrate 2*

Lep: *Leptin*

LDLR: *Low Density Lipoprotein Receptor*

Lipe: *Lipase, hormone sensitive*

Lgr5: *Leucine rich repeat containing G protein coupled receptor 5*

LPGAT1: *Lisofosfatidilgliceril aciltransferasa 1*

LPR6: *Low-density lipoprotein-receptor-related protein 6*

LXR: *Receptor X hepático (Liver X receptor)*

MCPIP1: *Proteína quimioatrayente de monocitos (Monocyte chemotactic protein-induced protein-1)*

miR: *miRNA, microRNA*

mRNA: *ARNm, ARN mensajero (messenger RNA)*

MSMO1: *methylsterol monooxygenase 1*

Mvk: *Mevalonato quinasa*

Myt-1: *Myelin transcription factor 1*

MWIR: *Mammalian-wide interspersed repeat sequences*

NF-κB: *Factor de transcripción nuclear kappa B*

NF-Y: *Nuclear transcription factor Y*

Nr0b2: *Nuclear receptor subfamily 0, group B, member 2*

Oct4: *Proteína 4 de unión a octámeros (Octamer-binding transcription factor 4)*

Olr1: *Oxidized low-density lipoprotein (lectin-like) receptor 1*

Osbpl1a: *Oxysterol binding protein-like 1A*

PABPC: *proteína de unión a poli-A citoplasmática (Cytoplasmic poli(A) binding protein)*

PAZ: *dominio de unión al RNA, de Piwi/Argonaute/Zwille*

PBMC: *célula mononuclear de sangre periférica (Peripheral Blood Mononuclear Cell)*

PBS: *Phosphate Buffered Saline*

PCK1: *Phosphoenolpyruvate carboxykinase*

PepT1: *Transportador de oligopéptidos 1.*

PGC-1α: *PPARGC-1α, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*

PI3K: *Fosfatidilinositol 3-quinasa (Phosphatidylinositol 3-kinase)*

PPAR: *Peroxisome proliferator-activated receptor*

Prkaa2: *Protein kinase, AMP-activated, alpha 2 catalytic subunit*

RRIID: dominio de la RNasa (*RNase III domain*)

RIP-140: *Receptor-interacting protein 140*

RISC: Complejo silenciador inducido por RNA (*RNA-induced silencing complex*)

RNA: ARN, ácido ribonucleico (*Ribonucleic acid*)

RT: *Reverse Transcription*

RT-qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real (*Real-time quantitative PCR*)

RXR: Receptor X retinoide

SR-BI o SCARB1: *Scavenger receptor class B type 1*

SCD1: Esteaoril-CoA desaturasa 1 (*Stearoyl-Coenzyme A desaturase 1*)

SDS: Dodecil sulfato de sodio (*Sodium Dodecyl Sulfate*)

shRNAs: *Short hairpin RNA*

Sirt1: Sirtuina 1 desacetilasa

snoRNA: RNA nucleolar pequeño (*small nucleolar RNA*)

SNPs: polimorfismos de un solo nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphisms*)

Soat1: *Sterol O-acyltransferase 1*

Sox2: factor de transcripción Sox2, también conocido como SRY-box 2 (*Sex determining Region Y-box 2*)

Sqle: *Squalene epoxidase*

SRC: *Steroid Receptor Coactivator*

SREBP: *Sterol Regulatory Element Binding Protein*

Srebf1 y Srebf2: *Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 1 y 2*

Stard3: *START domain containing 3*

TG: Triglicéridos

TNF- α : factor de necrosis tumoral (*Tumor Necrosis Factor*)

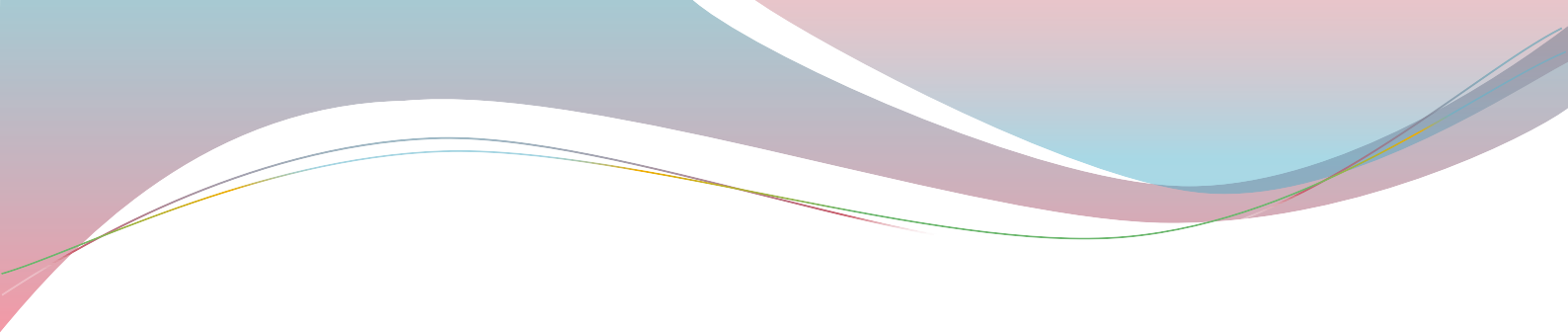
TRBP: proteína TAR de unión al RNA (*TAR RNA binding protein*)

tRNAs: RNAs de transferencia

UTR: Región no traducida (*untranslated región*)

VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad (*Very Low Density Lipoprotein*)

ZEB1: *Zinc finger E-box-binding homeobox 1*



ABSTRACT

Role of Non-coding RNAs on Intestinal Lipid Metabolism

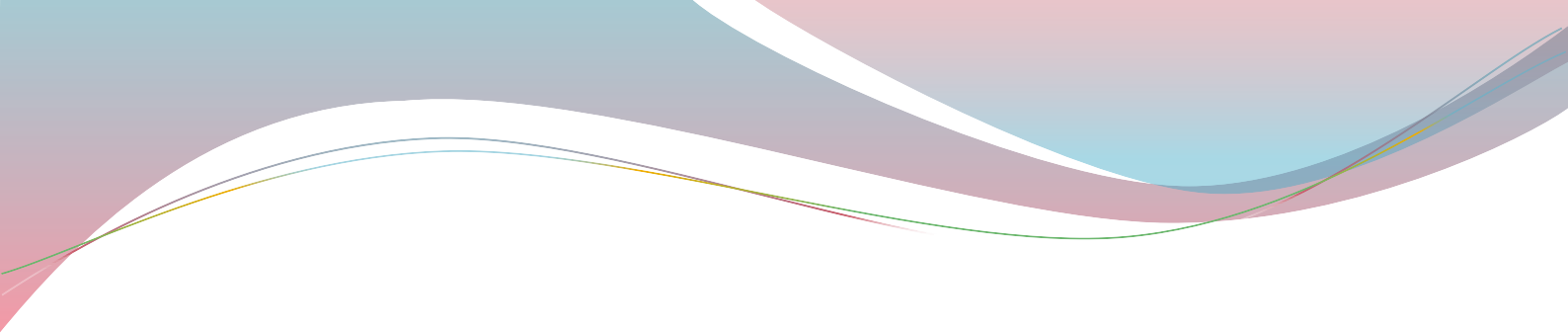
An unbalanced diet is one of the main contributors to metabolic disorders and cardiovascular diseases. Despite the great advances made on prevention and treatment of dyslipidemias, researchers try to develop new therapies for their treatment as well as to reduce lipid absorption. MicroRNAs (miRNAs) are key elements in gene expression modulation at post-transcriptional level. They are located within the cells and extracellularly, act as signaling molecules, reflect physiological changes and are altered in a variety of diseases. In addition, their ability to simultaneously regulate different genes shows the relevance of the activity of miRNAs in the regulation of biological processes, both in homeostasis and in the development of diseases. Although their role in the regulation of cholesterol and lipid metabolism in different tissues has been previously established, their function at intestinal level is still elusive.

In this work, we addressed the importance of miRNAs at the intestinal level using a knockout (KO) mouse model (*Mus musculus*) for intestine-specific Dicer1, by crossing two lines of transgenic mice, *Dicer1*^{loxP/loxP} mice with *Villin-cre* mice. Therefore, a conditional-spatial KO has been generated, in which controlled expression of the Cre recombinase gene is under the Villin promoter, evaluating the role of miRNAs in the enterocyte and lipid metabolism. To evaluate this, analysis of gene expression by real-time PCR was performed using an array of genes involved in the lipoproteins and cholesterol metabolism. We observed a decrease in the majority of genes included in the array, with the exception of *Soat-1*, *Olr-1* and *Hmgcs2*. The study of protein expression - by Western blot - of these three genes confirmed the increment observed for OLR-1 and HMGCS2. Through different bioinformatic tools, miRNAs that target these genes were identified for their evaluation. On the other hand, the KO mouse model was characterized in relation to weight and different intestinal markers, as well as its response under conditions of postprandial lipemia, performing an analysis of plasma, intestinal, and hepatic lipids. The KO animals showed a lower weight, a decrease in markers of integrity maintenance and maturation status of the intestine, as well as an alteration in the processing of triglycerides.

In addition, we studied miRNAs potentially regulated by a hypercaloric diet and under conditions of postprandial lipemia. For this, we used wild type male mice to perform a screening after different exposure times. Postprandial lipemia conditions were induced with a unique oral gavage of olive oil enriched with cholesterol ("Pulse"). For the "Short" and "Long" term treatments, a hypercaloric diet was administered to the animals during 4 days and 20 weeks, respectively. The intestine samples screening of those three experiments was carried out by RT-qPCR using panels of mature microRNAs and, for the "Pulse" and "Short" experiments, by

massive sequencing (RNA-Seq). Based on the treatment, we finally selected 44 miRNAs from the differentially expressed miRNAs. The kinetic expression of these microRNAs was further analyzed by RT-qPCR from small intestine samples obtained at different times after an oral treatment with cholesterol-enriched olive oil in WT males. We limited the experimental times to two and four hours and finally selected nine candidate miRNAs. In addition, the study of the expression of miRNAs by RNA-Seq in treated enteroids led us to select three additional candidates, which were validated together with the previous ones in two cohorts that included animals of both sexes. In the first cohort, 2 hours after oral gavage, we detected differences in the expression according to sex and this variability led us to consider the study in the different intestinal sections. We analyzed the expression of the selected miRNAs in males and females at 2 and 4 hours after treatment, differentiating the small intestine into the duodenum, jejunum and ileum, and including colon and liver for comparison. Next, the candidate miRNAs were evaluated using *in vitro* models. We use differentiated Caco-2 and enteroids. For both approaches, the more abundant miRNA profiles, assayed by RNA-seq, resembled the profile of small intestine microRNAs, except for the let-7 family in the case of differentiated Caco-2. The response to postprandial lipids of the 13 candidates in these models differed from that observed *in vivo*, but it is important to consider the weaknesses of both models. In the case of differentiated Caco-2 cells, the variability in structural and functional properties did not recapitulate the intestinal cellular heterogeneity. In the case of enteroids, the inaccessibility of the apical part to the exposed postprandial micelles may have impaired their response. Therefore, although Caco-2 and enteroids are valuable *in vitro* tools, some modifications need to be considered in order to accurately recreate physiological conditions.

We conclude that dietary lipids modify some intestinal miRNAs involved in the regulation of lipid metabolism. However, the variability in the results between the different experimental cohorts and *in vitro* models reduces the possibility of establishing firm candidates that respond to lipids in a robust manner and calls for further research.



RESUMEN

Papel de los RNAs no-codificantes de proteínas en el metabolismo lipídico intestinal

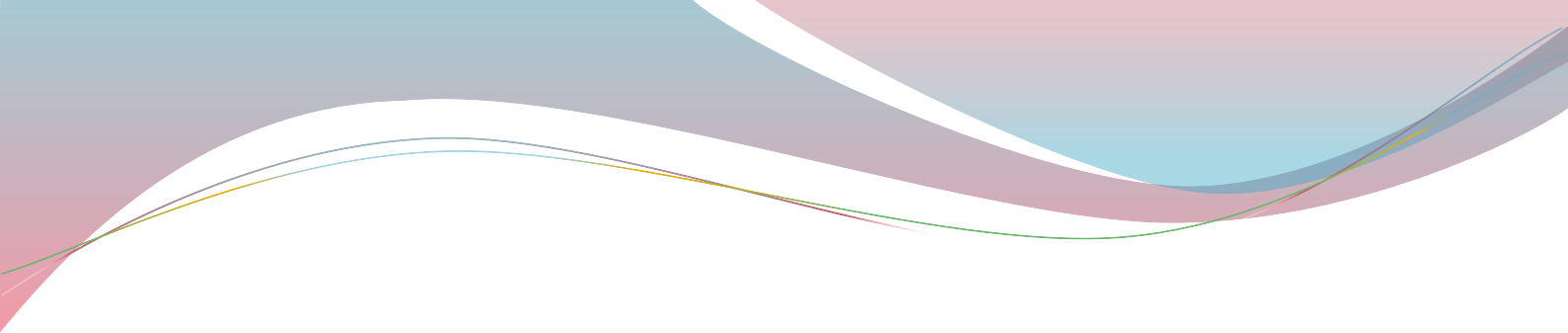
La dieta desequilibrada es uno de los principales orígenes de las alteraciones metabólicas y la enfermedad cardiovascular. Pese a los avances en la prevención y el tratamiento de las dislipidemias, se intentan desarrollar nuevas terapias para su tratamiento o para reducir la absorción de lípidos. Los microRNAs (miRNAs) son elementos clave en la modulación de la expresión génica a nivel postranscripcional. Se localizan intracelular y extracelularmente, sirviendo como moléculas de señalización, siendo capaces de reflejar cambios fisiológicos y verse alterados en gran variedad de enfermedades. Además, su capacidad para regular simultáneamente diferentes genes da idea de la importancia de la actividad de los microRNAs en la regulación de multitud de procesos biológicos, tanto en la homeostasis como el desarrollo de la enfermedad.

Aunque su papel en la regulación del metabolismo del colesterol y lípidos en diferentes tejidos se ha determinado con anterioridad, su conocimiento a nivel intestinal todavía es limitado. En este trabajo investigamos la importancia de los microRNAs a nivel intestinal utilizando un modelo de ratón (*Mus musculus*) *knockout* para *Dicer1* específico de intestino, a través del cruce de dos líneas de ratones transgénicos (ratones *Dicer1^{loxP/loxP}* con ratones *Villin-cre*). Con estos cruces se generó un KO condicional-espacial en el cual se produce la expresión controlada del gen de la recombinasa Cre bajo el promotor *Villin*, evaluándose el papel de los miRNAs en el enterocito y el metabolismo lipídico. Para ello se realizó un análisis de la expresión génica por PCR a tiempo real utilizando un *array* de genes implicados en el metabolismo de lipoproteínas y colesterol. Observamos una disminución de la mayoría de genes incluidos en el *array*, exceptuando *Soat-1*, *Olr-1* y *Hmgcs2*. El estudio de la expresión proteica mediante *Western blot* para estos tres genes confirmó el aumento observado para OLR-1 y HMGCS2. Mediante diferentes herramientas informáticas se identificaron miRNAs candidatos para su evaluación, y que tienen como diana estos genes. Por otro lado se caracterizó el modelo animal KO en relación al peso y diferentes marcadores intestinales, así como su respuesta en condiciones de lipemia postprandial, realizando un análisis de los lípidos plasmáticos, intestinales y hepáticos. Los animales KO presentaron un menor peso, una disminución en los marcadores del mantenimiento y estado de maduración del intestino, así como una alteración en el procesamiento de los triglicéridos de la dieta.

Paralelamente estudiamos los posibles miRNAs regulados por una dieta hipercalórica y en condiciones de lipemia postprandial, utilizando animales macho *wild type* para la realización de un *screening* a diferentes tiempos de exposición. Las condiciones de lipemia postprandial se recrearon con una carga oral de aceite de oliva enriquecido con colesterol ("Pulse"), mientras que para los tratamientos a corto y largo plazo se administró una dieta hipercalórica a los animales durante 4 días ("Short") y 20 semanas ("Long") respectivamente. El *screening* de las muestras de intestino delgado de los 3 experimentos se realizó mediante paneles de microRNAs maduros por RT-qPCR, y al mismo tiempo, para los experimentos "Pulse" y "Short" mediante secuenciación masiva (RNA-Seq). De los miRNAs diferencialmente expresados en relación con el tratamiento seleccionamos 44 microRNAs. Para verificar y estudiar la cinética de expresión de estos microRNAs se analizó su expresión por RT-qPCR en muestras de intestino delgado obtenidas a diferentes tiempos tras realizar una carga oral con aceite de oliva enriquecido en colesterol, en machos WT. Acotamos los tiempos de experimentación a dos y cuatro horas, y seleccionamos 9 miRNAs candidatos. A su vez, el estudio de la expresión de miRNAs por RNA-Seq en enteroides tratados nos llevó a la selección de 3 candidatos adicionales, que se validaron junto a los anteriores en dos cohortes de animales que incluían animales de ambos sexos. En la primera cohorte, a 2 horas tras la carga oral, detectamos diferencias de expresión en función del sexo y una variabilidad que nos llevó a considerar el estudio en las diferentes secciones intestinales. Así, analizamos la expresión de los microRNAs seleccionados en machos y hembras a 2 y 4 horas, diferenciando el intestino delgado en duodeno, yeyuno, e íleon, e incluyendo el colon e hígado para su comparación.

A continuación, se evaluaron los candidatos en modelos *in vitro*. Utilizamos tanto células Caco-2 diferenciadas como enteroides. Para ambas aproximaciones el perfil de microRNAs más abundantes se asemejó al perfil de microRNAs de intestino delgado, exceptuando la familia let-7 en el caso de Caco-2 diferenciadas. La respuesta a lípidos postprandiales de los 13 candidatos en estos modelos difirió a la observada *in vivo*, pero han de considerarse las debilidades de ambos modelos para analizar los resultados obtenidos. Esto es, en el caso de Caco-2 diferenciadas, la variabilidad en las propiedades estructurales, funcionales y que no recapitula la heterogeneidad celular intestinal; y en el caso de los enteroides, la inaccesibilidad de la parte apical para su exposición a micelas postprandiales. Por ello, pese a que Caco-2 y enteroides constituyen aproximaciones *in vitro* valiosas, se han de seguir realizando modificaciones sobre ambos modelos para recrear más fielmente las condiciones fisiológicas.

Concluimos que los lípidos de la dieta modifican algunos miRNAs del intestino posiblemente implicados en la regulación del metabolismo lipídico. No obstante, existe una variabilidad en los resultados de expresión entre las diferentes cohortes experimentales y modelos *in vitro* que reduce la posibilidad de establecer candidatos firmes que respondan a lípidos de manera robusta.



INTRODUCCIÓN

1. RNA NO CODIFICANTE

El **Proyecto Genoma Humano** que comienza en 1990 y se completa en 2003 buscaba secuenciar y mapear el genoma humano, publicando que el número estimado de genes codificantes para proteínas humanas se reduce a ~21,000. Sorprendentemente sólo el ~1,5% del genoma humano está compuesto por secuencias codificantes (Lander, 2011), por lo que el genoma humano codifica una gran cantidad de transcritos no codificantes para proteínas.

El **proyecto ENCODE** (*ENCyclopedia Of DNA Elements*) es un consorcio público de investigación que tiene como objetivo la identificación de todos los elementos funcionales de la secuencia del genoma humano y de ratón, incluidos genes, pseudogenes, transcritos, regiones reguladoras de la transcripción, estados de la cromatina y patrones de metilación del DNA, a fin de utilizar esa información para comprender la biología de la salud y enfermedad humanas (Feingold *et al.*, 2004; Birney *et al.*, 2007; Myers *et al.*, 2011).

El **consorcio GENCODE** (la anotación del genoma humano de referencia para el proyecto ENCODE) incluye 20,687 genes codificantes para proteínas, que cubren el 2.94% del genoma, y tiene como objetivo identificar todas las características genéticas en el genoma humano mediante combinación de análisis computacional, anotación manual y validación experimental (Harrow *et al.*, 2012).

Dentro de los **RNAs no codificantes** (ncRNAs) se encuentran aquellos ncRNAs que tienen un papel en la traducción y *splicing* tal como el ribosomal (rRNA), de transferencia (tRNA) y RNAs nucleares (snRNA), y los RNAs reguladores (como los miRNAs) que tienen un papel regulador desde el punto de vista epigenético al estar implicados en la modificación de la expresión de los genes más allá de la regulación ejercida como consecuencia de la secuencia lineal de nucleótidos de DNA.

Dentro de éstos últimos se encuentran:

- Los RNAs pequeños, que incluyen: los **microRNAs** (miRNAs), que se generan por la acción secuencial de las proteínas Drosha y Dicer, y que forman un complejo de silenciamiento (RISC) capaz de unirse a secuencias complementarias induciendo la represión postranscripcional, ya sea por desestabilización de la transcripción, represión de la traducción o ambas; los RNAs interferentes pequeños (**siRNAs**), que derivan de RNAs bicatenarios largos y median la supresión postranscripcional de transposiciones y transposones contribuyendo a la defensa antiviral; los RNAs que interactúan con Piwi (**piRNAs**), los cuales derivan de precursores de cadena sencilla, no dependen de

proteínas tipo RNasa III y su función principal es silenciar elementos transponibles en células de la línea germinal (Ha and Kim, 2014); los fragmentos de RNA derivados de tRNA (**tRF**), algunos de los cuales se generan en respuesta al estrés celular (Fu *et al.*, 2009), son fragmentos derivados de transcritos de tRNA; los RNAs nucleolares pequeños (**snoRNAs**) funcionan como moléculas guía durante las modificaciones químicas postranscripcionales del rRNA y están implicados en tumores malignos; los RNAs nucleares pequeños (**snRNA**) funcionan en el nucleoplasma y se dividen en dos clases por sus características anatómicas (Matera *et al.*, 2007).

- Los RNAs largos no codificantes (**lncRNAs**) son transcritos no codificantes de más de 200 nt de longitud que se transcriben por la RNA polimerasa II. Pueden funcionar de múltiples maneras: moléculas guía, potenciadores, mediando la patogénesis de enfermedades, y han surgido numerosos ejemplos de su implicación funcional en diversos procesos celulares (Dinger *et al.*, 2008; Gupta *et al.*, 2010; Broadbent *et al.*, 2011).
- RNAs potenciadores (**eRNAs**) y RNAs asociados a promotores (**PARs**). Los RNAs potenciadores son transcritos no codificantes de unos 800 nt que funcionan como activadores transcripcionales, mientras que los PARs están asociados con activación y represión transcripcional (Lam *et al.*, 2014).

2. MICRO-RNAs

El concepto de microRNA surgió inicialmente con el descubrimiento en *Caenorhabditis elegans* de *lin-4* por Victor Ambros, Rosalind Lee y Rhonda Feinbaum (Feinbaum *et al.*, 2004). Estos autores encontraron que el gen *lin-4*, implicado en el desarrollo larval de *C.elegans*, no codifica para una proteína sino que genera dos pequeños transcritos de unos 22 y 61 nucleótidos poseedores de zonas complementarias a la zona 3'UTR del gen *lin-14*, lo que sugería la existencia de un mecanismo molecular de regulación negativa de la traducción de *lin-14* (Wightman *et al.*, 1993). Los microRNAs están presentes en un amplio rango de especies, tanto de plantas como animales, algunos de los cuales están altamente conservados (Lagos-Quintana *et al.*, 2001). La abundancia, patrones de expresión y la conservación evolutiva de algunos de estos miRNAs da a entender que tienen amplias funciones reguladoras (Lau *et al.*, 2001; Lee and Ambros, 2001). Desde el descubrimiento de *lin-4* se han ido descubriendo en otras especies miRNAs que poseen patrones de expresión dependientes del tipo celular y tejido, sugiriendo un papel crítico de estos miRNAs en la especificación del tejido y linaje celular (Lagos-Quintana *et al.*, 2002).

Dada la importancia del mantenimiento de las funciones biológicas frente a las perturbaciones ambientales y alteraciones genéticas, la función de los microRNAs en la represión postranscripcional de los genes ayudaría a conferir solidez a los procesos biológicos. Es decir, actuarían atenuando posibles transcripciones aberrantes o alteraciones en el número de copias, considerándose importantes para el desarrollo normal y la fisiología, ayudando así a la robustez en los sistemas animales (Stark *et al.*, 2005; Ebert and Sharp, 2012).

El mecanismo de actuación de estos RNAs requiere que la región 5' del miRNA, denominada secuencia semilla, interaccione con la región 3'UTR de su RNA mensajero (mRNA) diana para reprimir su expresión (Lewis *et al.*, 2003; Friedman *et al.*, 2009). No obstante se han encontrado sitios de unión en otras regiones génicas (Xu *et al.*, 2014), tales como regiones 5'UTR (Lytle *et al.*, 2007; Ørom *et al.*, 2008; Grey *et al.*, 2010), regiones promotoras, intrones y secuencias codificantes (Tay *et al.*, 2008; Reczko *et al.*, 2012).

Aunque de manera general la unión específica de los miRNAs con sus sitios diana da como resultado el silenciamiento del gen, se ha demostrado que también son capaces de activar la expresión génica bajo ciertas condiciones (Bhattacharyya *et al.*, 2006; Vasudevan *et al.*, 2007; Mortensen *et al.*, 2011). Esto lo consiguen de manera directa o indirecta al ejercer una regulación múltiple de las redes génicas implicadas en diversas respuestas celulares o procesos biológicos (Curtale *et al.*, 2019).

Teniendo en cuenta esto y que, según análisis computacional, más de un tercio de los genes humanos codificantes de proteínas pueden ser modulados directamente por miRNAs (Lewis *et al.*, 2005), se enfatiza el alcance de su impacto en las redes reguladoras de genes, al ser capaz un solo miRNA de reprimir la producción de cientos de proteínas de manera indirecta o directa (Lim *et al.*, 2005; Selbach *et al.*, 2008). Además, múltiples miRNAs se pueden dirigir al mismo gen diana (Wu *et al.*, 2010) o co-regular varios genes que codifican para proteínas que actúan en el mismo módulo/red funcional (Uhlmann *et al.*, 2012).

Pero la actividad biológica de los microRNAs no se limita a la regulación intracelular, sino que se ha demostrado que pueden encontrarse extracelularmente (Valadi *et al.*, 2007; Makarova *et al.*, 2016). Los miRNAs secretados al espacio extracelular pueden actuar como moléculas de señalización capaces de mediar las comunicaciones entre células (Chen *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2013), actuando como reguladores endocrinos, autocrinos y/o paracrinos (Valadi *et al.*, 2007; Matsuda *et al.*, 2016; Bayraktar *et al.*, 2017). Además de su presencia en diferentes fluidos biológicos, pudiendo reflejar cambios fisiológicos (Gilad *et al.*, 2008; Iftikhar and Carney, 2016),

los niveles de miRNAs también pueden verse alterados en gran variedad de enfermedades. El cambio en sus niveles, característico en suero o plasma, se puede relacionar con las alteraciones observadas en tejidos específicos, lo que los convierte en potenciales biomarcadores no invasivos (Ng *et al.*, 2009; Nelson Hayes and Chayama, 2016; Wang *et al.*, 2016).

Además, dado que regulan la expresión génica en multitud de procesos biológicos actuando sobre la traducción y estabilidad de los RNA mensajeros, su implicación en los procesos fisiológicos y enfermedad (Tüfekci *et al.*, 2014) los convierten en posibles herramientas de utilidad terapéutica (Asadzadeh *et al.*, 2019).

2.1. Biogénesis

La **biogénesis canónica** de los microRNAs es la vía predominante. Se inicia en el núcleo con la generación del pri-miRNA (**Figura 1**) a partir del procesamiento de los genes para miRNAs por la RNA polimerasa (Pol) II (Y. Lee *et al.*, 2004), salvo excepciones como es el caso de un agrupamiento de miRNAs en el cromosoma 9 (C19MC) y los miRNAs humanos con elementos promotores basados en Alu, tRNA o MWIR, que requieren la Pol III para su transcripción (Borchert *et al.*, 2006). Las secuencias de miRNA se ubican en varios contextos genómicos, aunque la mayoría de los miRNAs canónicos están localizados en intrones, también los hay derivados de secuencias intergénicas o codificados por regiones exónicas (Ha and Kim, 2014). En ocasiones, varios loci de miRNAs están muy próximos entre sí, constituyendo una unidad de transcripción policistrónica donde los microRNAs se transcriben en un transcrito largo denominado cluster y se consideran una familia de miRNAs (Tanzer and Stadler, 2004; Yu *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2009; Marco *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2013).

El complejo microprocesador formado por la proteína DGCR8 y la ribonucleasa nuclear de tipo III Drosha (Lee *et al.*, 2003; Gregory *et al.*, 2004) procesan el pri-miRNA mediante la escisión en la base de la estructura en horquilla de éste, generándose el pre-miRNA. DGCR8 reconoce la modificación m6A (N⁶-metiladenosina) y otros motivos dentro del pri-miRNA (Alarcón *et al.*, 2015), mientras que dos dominios de la RNasa III de Drosha forman un dímero intramolecular para crear un centro de procesamiento que contiene dos sitios catalíticos. Uno de estos sitios (RIIIDa) corta la cadena 3' mientras que el otro (RIIIDb) corta la cadena 5', lo que produce la escisión y genera una protuberancia corta de unos 2 nt en la región 3' del pre-miRNA (Han *et al.*, 2004).

El pre-miRNA generado es exportado al citoplasma mediante el complejo Exportina 5 y GTPasa Ran (Exp-5:RanGTP) (Okada *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2011) para ser procesado por la endonucleasa tipo RNasa III Dicer (Bernstein *et al.*, 2001; Knight and Bass, 2001).

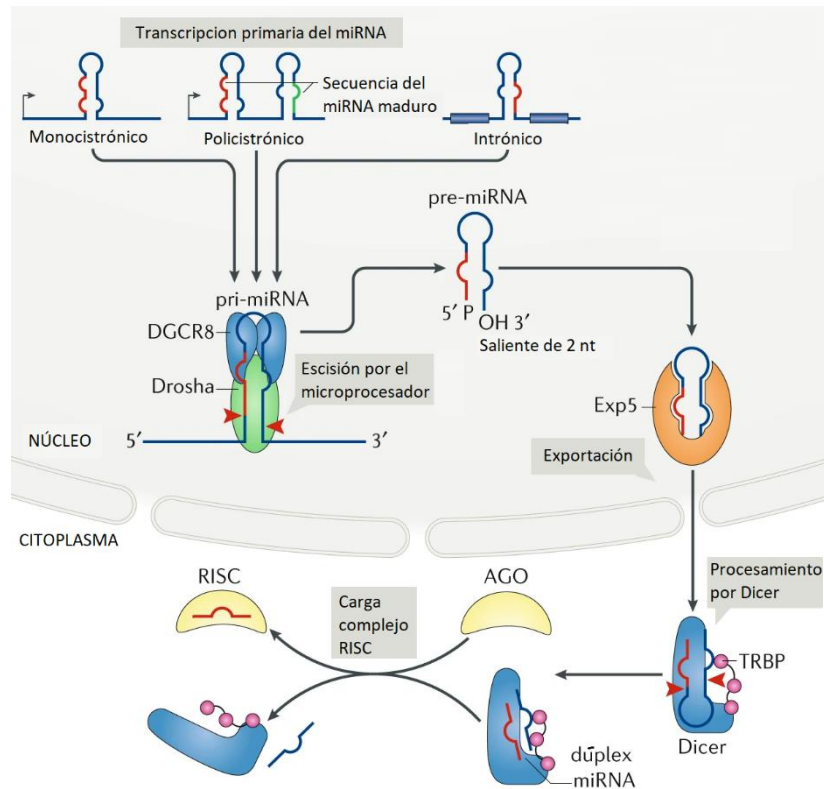


Figura 1. Resumen de la biogénesis canónica de los miRNAs.

Adaptada de Treiber, Treiber, and Meister 2019.

El dominio PAZ de Dicer reconoce el saliente de 2 nt en 3' (generado por el complejo microprocesador nuclear) y el extremo 5' fosforilado del RNA de doble cadena (dsRNA) colocando el RNA para la escisión a 22 nucleótidos desde el extremo 5' (Park *et al.*, 2011; Gu *et al.*, 2012; Taylor *et al.*, 2013). Dicer interactúa con la proteína TRBP, que contiene tres dominios de unión al dsRNA (Chendrimada *et al.*, 2005), para escindir el bucle terminal y liberar el dúplex de miRNA maduro (Zhang *et al.*, 2004). Además, TRBP se requiere para la asociación con la proteína AGO2 (familia de proteínas Argonauta) y la formación del complejo efector RISC (Liu *et al.*, 2004; Meister *et al.*, 2004; Kawamata and Tomari, 2010), que se dirigirá a los RNA complementarios monocatenarios para la degradación (RISC, complejo silenciador inducido por RNA). El ensamblaje de RISC sigue dos pasos principales: carga y maduración. El primer paso es la carga del dúplex miRNA en proteínas AGO, que está mediada por el complejo Hsc70/Hsp90 y requiere hidrólisis de ATP (Iwasaki *et al.*, 2010; Kobayashi and Tomari, 2016). En la maduración

del RISC, la cadena “pasajera” se descarta y la hebra guía (el microRNA maduro) permanece unida a AGO y funciona en el RISC maduro para reconocer los objetivos transcripcionales.

En la **biogénesis de miRNAs no canónica** existen vías alternativas (Yang and Lai, 2011), que evitan una parte de los pasos de biogénesis mencionados anteriormente, con la implicación de diferentes combinaciones de proteínas. Podemos encontrar biogénesis de miRNAs independientes de Drosha/DGCR8, como es el caso de los mirtrones (Ruby *et al.*, 2007), RNAs pequeños derivados de tRNAs, shRNAs y snoRNA (Babiarz *et al.*, 2008, 2011; Cole *et al.*, 2009; Haussecker *et al.*, 2010); y biogénesis de microRNAs independiente de Dicer, como es el caso del miR-451 (Yang *et al.*, 2010), en la cual se requiere que AGO2 complete la maduración del pre-miRNA dentro del citoplasma (Cheloufi *et al.*, 2010).

2.2. Regulación de la biogénesis

A nivel transcripcional, la regulación de la biogénesis de microRNAs tiene mecanismos reguladores similares a los de cualquier gen codificante para proteínas, siendo responsable en parte de los patrones específicos de expresión espacial y temporal que exhiben muchos miRNAs. Estos mecanismos incluyen duplicaciones, deleciones (Imam *et al.*, 2012), o la aparición de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en genes que codifican para miRNAs, afectando a su biogénesis o la especificidad con su diana (Abelson *et al.*, 2005; Saunders *et al.*, 2007; Mullany *et al.*, 2015). Así como la regulación de la expresión mediante factores de transcripción, como por ejemplo ocurre en células madre embrionarias con Oct4/ Sox2/ Nanog/ Tcf3, capaces de controlar la transcripción de 81 miRNAs maduros distintos (Marson *et al.*, 2008), o en la inducción de expresión del miR-34a por p-53 tras daño en el DNA (Tarasov *et al.*, 2007; Leung and Sharp, 2010), o también en la represión recíproca entre el represor transcripcional ZEB1 y los miR-141 y miR-200c en la diferenciación epitelial e invasión de células cancerosas (Burk *et al.*, 2008).

Además, los mecanismos epigenéticos, como la metilación del DNA y las modificaciones de histonas, también contribuyen a la regulación de los genes de miRNAs (Scott *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2010). Los miRNAs que ejercen una función supresora en células cancerosas se regulan a la baja a través de la hipermetilación de islas CpG del gen correspondiente, mientras que los miRNAs con actividad pro-tumoral a menudo aumentan su expresión a través de la hipometilación de islas CpG. Un ejemplo de esto se ha observado en el desarrollo de cáncer de mama humano debido a la hipermetilación aberrante de hsa-miR-9-1 (Lehmann *et al.*, 2008).

También existe una regulación del procesamiento primario del miRNA en función de los niveles y la actividad de las diferentes proteínas. DGCR8 y Drosha se regulan mutuamente, Drosha regula negativamente DGCR8 a través de la escisión de su mRNA y DGCR8 regula positivamente Drosha por estabilización de la proteína (Han *et al.*, 2009). De modo que cuando la actividad del microprocesador está desregulada el conjunto de microRNAs se altera, como ocurre, por ejemplo, en las células madre embrionarias (ES) del ratón knockout para *Dgcr8*, las cuales no producen miRNAs esenciales para silenciar la auto-renovación de las células ES, dando lugar a defectos en la proliferación o diferenciación (Wang *et al.*, 2007).

Otro punto de regulación tiene que ver con la exportación del pre-miRNA al citoplasma. La eliminación de Exportina-5 reduce los niveles de miRNAs sin que se produzca una acumulación del pre-miRNA, lo que sugiere que no solo se encarga de la exportación del pre-miRNA al citoplasma sino que lo protege de la digestión exonucleolítica (Yi *et al.*, 2003). Por ejemplo, Exp-5 se induce durante la entrada en el ciclo celular mediado por PI3K, y la inhibición de la inducción interfiere con la elevación global de miRNAs dando lugar a un defecto de proliferación (Yi *et al.*, 2003).

La regulación del paso del precursor a miRNA maduro puede ocurrir de varias maneras. Se puede alterar a través de las interacciones con proteínas ya que una disminución de su cofactor TRBP conduce a la desestabilización de Dicer, produciéndose defectos en el procesamiento del pre-miRNA (Chendrimada *et al.*, 2005). Otro ejemplo de regulación a este nivel se realiza a través de la endonucleasa MCPIP1, la cual suprime la biosíntesis de miRNAs a través de la escisión del bucle de los pre-miRNAs, antagonizando con el procesamiento de Dicer y dando como resultado una rápida degradación de los fragmentos escindidos (Suzuki *et al.*, 2011).

La regulación del procesamiento de miRNAs está, además, sujeta a mecanismos específicos como las proteínas SMAD, que regulan la maduración de los miRNAs mediada por Drosha (Davis *et al.*, 2008); la asociación de p53 con el cofactor DDX5 de Drosha, que mejora el procesamiento de ciertos pri-miRNAs para disminuir la tasa de proliferación celular tras producirse daño del DNA (Leung and Sharp, 2010); o la regulación de let-7 por Lin-28 tanto a nivel de procesamiento del pri-miRNA como en la formación del miRNA maduro en células madre embrionarias (Viswanathan *et al.*, 2008).

2.3. Mecanismo de acción

Aunque se han descrito uniones a regiones del mRNA como la 5' UTR o regiones codificantes, éstas son minoritarias y **el mecanismo de acción** generalizado para los microRNAs implica su unión a una secuencia específica de la región 3'UTR de sus mRNAs diana. De hecho, los genes diana tienen regiones 3'UTR más largas que están enriquecidas en sitios conservados evolutivamente, mientras que los genes que tienden a expresarse de manera ubicua y están involucrados en procesos celulares básicos, evitan la regulación mediada por miRNAs limitando la longitud del 3'UTR y evitando de forma selectiva las secuencias diana (Farh *et al.*, 2005; Stark *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2009; Zhang and Su, 2009).

El dominio en el extremo 5' de los miRNAs que comprende las posiciones 2 a 7 se conoce como secuencia semilla ("*seed sequence*") y es determinante en la complementariedad con las secuencias diana. Existen diferentes métodos y criterios de predicción de dianas de microRNAs, como PicTar, MiRanda, MicroRNA.org o mirBase (Krek *et al.*, 2005; Miranda *et al.*, 2006; Betel *et al.*, 2008; Griffiths-Jones *et al.*, 2008). Básicamente la predicción de mRNAs diana se realiza en función de la complementariedad con la región semilla del miRNA, aunque el emparejamiento suplementario con los nucleótidos 13-16 del miRNA también contribuye a la unión con el mRNA (Broughton *et al.*, 2016), pudiendo compensar una falta de coincidencia en éste con la región semilla para crear un sitio funcional (Grimson *et al.*, 2007; Bartel, 2009).

Hay aplicaciones web disponibles tales como TargetScan (http://www.targetscan.org/vert_72/), cuyo algoritmo combina la termodinámica de interacciones RNA:RNA con análisis de secuencias comparativas para predecir las posibles dianas de miRNAs en función de la existencia de "sitios canónicos" (que contienen la secuencia de bases exacta para las bases de la secuencia semilla del miRNA) y "sitios no canónicos" (en los que el emparejamiento entre la región semilla y el RNA mensajero no coincide completamente) (Lewis *et al.*, 2005; Agarwal *et al.*, 2015). En función del emparejamiento Watson y Crick con la región 5' del miRNA (**Figura 2**) existen varios tipos de sitios de unión: sitio "*6-mer*" que empareja perfectamente los 6 nucleótidos de la secuencia semilla del miRNA, sitio "*7mer-8mer*" que comprende la coincidencia de la región semilla complementada con la coincidencia del nucleótido 8 de la secuencia semilla, sitio "*7mer-A1*" es un emparejamiento 6-mer de la región semilla flanqueado por una adenosina en la secuencia objetivo que complementa con el nucleótido 1 del miRNA, y "*8mer site*" que comprende el emparejamiento a la región semilla complementado tanto por el nucleótido 8 como por el A1 (Friedman *et al.*, 2009).

Se consideran pertenecientes a la misma familia aquellos miRNAs que presentan secuencias idénticas en los nucleótidos 2-8 del miRNA maduro (como es el caso de la familia let-7), y los que comparten un origen evolutivo común pero divergen en la secuencia semilla (ej. miR-141 y miR-200c, ambos pertenecientes a la superfamilia de miR-200) (Ha and Kim, 2014).

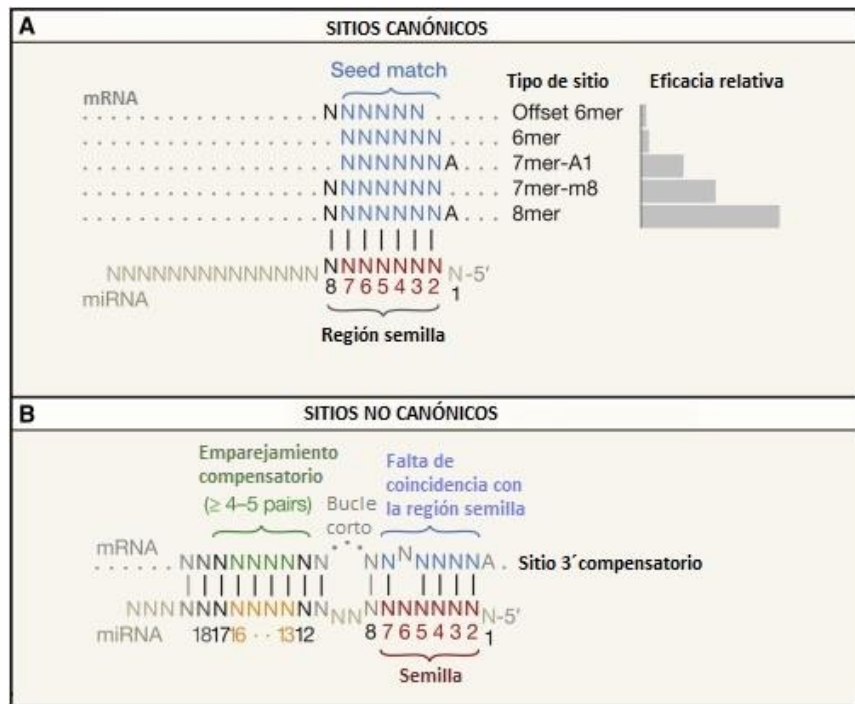


Figura 2. Diferentes sitios de unión en función del emparejamiento Watson-Crick entre la región semilla del miRNA y la región 3'UTR del mRNA diana.

Adaptada de Bartel 2018.

Un sitio 6mer es una coincidencia exacta con las posiciones 2-7 del miRNA maduro (región semilla). El sitio 7mer-A1 posee una coincidencia exacta con las posiciones 2-7 del miRNA maduro (semilla) seguido de una "A". El sitio 7mer-m8 tiene coincidencia exacta con las posiciones 2-8 del miRNA maduro (la semilla + posición 8) El sitio 8mer contiene y coincide exactamente con las posiciones 2-8 del miRNA maduro seguido de una "A".

2.3.1. Regulación postranscripcional.

En general, los estudios muestran los efectos del silenciamiento génico mediado por microRNAs al producirse la represión de la traducción y/o degradación del mRNA diana por la desestabilización del mismo debida a la deadenilación y pérdida de la región CAP en 5' ("decapping") (Wu *et al.*, 2006; Eulalio *et al.*, 2009).

Para realizar su función, los miRNAs (hebra guía) se asocian con las proteínas AGO para formar el complejo de silenciamiento inducido por miRNA (miRISC) (Kawamata and Tomari, 2010). Las

proteínas GW182, que son esenciales para la formación del complejo de silenciamiento en animales, interactúan con las proteínas argonauta a través de un dominio amino-terminal y con la proteína PABPC unida a la cola de poli-A del mRNA a través de un dominio silenciador carboxi-terminal (Huntzinger and Izaurralde, 2011).

Tras la actuación del complejo CCR4:NOT deadenilasa, se produce la eliminación de la estructura CAP en 5' por las enzimas Cdp1:Cdp2 que hace que el mRNA sea susceptible a la degradación 5'→3' catalizada por la exoribonucleasa 1 (Xrn1) (Rehwinkel *et al.*, 2005; Behm-Ansmant *et al.*, 2006; Zekri *et al.*, 2009).

2.3.2. Regulación traduccional

Los miRNAs pueden actuar reprimiendo la traducción del gen en una etapa temprana, al alterar la función del complejo de iniciación eIF4F, como se ha observado en células S2 de *Drosophila* y células HeLa humanas (Pillai *et al.*, 2005; Djuranovic *et al.*, 2012; Meijer *et al.*, 2013). No obstante, existen evidencias de un mecanismo posterior a la iniciación en el que la represión se produce antes de la finalización de la cadena polipeptídica naciente, como es el caso del miRNA de lin-4, que permite la biogénesis normal de lin-14 pero inhibe la elongación y/o finalización de la traducción (Olsen and Ambros, 1999; Petersen *et al.*, 2006; Lytle *et al.*, 2007).

La mayoría de estudios se centran en la inhibición de la expresión génica mediada por miRNAs, aunque también se han reportado casos en los que, bajo condiciones específicas, ocurre regulación positiva de la expresión génica. Éste es el caso por ejemplo del microRNA let-7 asociado a Ago-2 y FXR1, que activa la traducción durante la detención del ciclo celular pero la reprime en células proliferativas (Vasudevan *et al.*, 2007). También se ha observado que miR-16 en asociación con Ago-2 y FXR1 forma un complejo de activación de Myt1 endógeno en el núcleo de ovocitos inmaduros de *Xenopus laevis*, y que, de manera similar, el miR-369-3p activa el mRNA de TNF α en células humanas G0 (Truesdell *et al.*, 2012; Bukhari *et al.*, 2016).

2.3.3. Capacidad de regulación en el núcleo

Los componentes del complejo miRISC también se han localizado en el núcleo (Ritland Politz *et al.*, 2009; Nishi *et al.*, 2013), donde regulan tanto las tasas de transcripción como los niveles postranscripcionales del mRNA. Por ejemplo, se sabe que el miR-373 se dirige a las secuencias promotoras e induce la expresión génica de E-cadherina y CSDC2 (Place *et al.*, 2008), y que el miR-522 interacciona en el núcleo con el promotor de CYP2E1 suprimiendo su transcripción y, a

su vez, suprimiendo la traducción del citocromo P450 2E1 (Miao *et al.*, 2016). También se han encontrado miRNAs que activan la transcripción de un gen de manera indirecta al activar *enhancers*, como el miR-24-1, que promueve la transcripción mediante unión y activación de *enhancers* específicos en el núcleo, mientras reprime sus genes diana en el citoplasma (Xiao *et al.*, 2017).

2.3.4. Regulación mediada por miRNAs según estado y tipo celular.

Para una completa comprensión de los mecanismos fisiológicos y patológicos es fundamental caracterizar el perfil de expresión de los microRNAs en los tejidos y tipos celulares. De este modo, se puede asociar la regulación mediada por un miRNA en un tipo celular y en un estado determinado en función de su abundancia y localización (Lin *et al.*, 2011; Shu *et al.*, 2017). Por ejemplo, el miR-22 se ve alterado en función del destino celular de las células madre mesenquimáticas entre la adipogénesis y osteogénesis, observándose que sus niveles disminuyen durante el proceso de diferenciación adipogénica pero aumentan durante la diferenciación osteogénica (S. Huang *et al.*, 2012).

Un ejemplo de evaluación de la expresión de miRNAs dependiente de tipo celular es FANTOM5 (del inglés Functional Annotation of the Mammalian Genome), un atlas integrado de expresión de miRNAs y sus promotores en células primarias de mamíferos (De Rie *et al.*, 2017). Incluye promotores de 1,375 miRNAs humanos y 804 murinos mostrando una fuerte conservación de secuencias entre especies. Además, correlaciona los niveles de expresión de miRNAs primarios y maduros anotados en miRBase, confirmando la expresión del 95 y 98% de los pre-miRNAs, humanos y de ratón, respectivamente. El atlas abarca 121 tipos de células humanas distintas y calcula un índice de especificidad del tipo celular análogo al índice de especificidad tisular realizado por Ludwig y colaboradores en 2016. Existen, por ejemplo, miRNAs altamente específicos en hepatocitos como el miR-122-5p, el miR-142-5p en leucocitos o el miR-205-5p en células epiteliales; mientras otros como el miR-100-5p y miR-29a-3p se expresan ampliamente pero desaparecen en leucocitos y células madre respectivamente. El atlas también proporciona evidencia de la regulación diferencial de miRNAs parálogos en diferentes tipos de células y tejidos, como por ejemplo, el mir-128-1 que se expresa en la mayoría de muestras, mientras su parálogo mir-128-2 está altamente enriquecido en cerebro (De Rie *et al.*, 2017).

Anteriormente, un estudio de Landgraf y colaboradores en 2007 mostró el resultado de la secuenciación de 256 bibliotecas de RNAs pequeños de 26 sistemas orgánicos diferentes y tipos de células de humanos y roedores. Los autores encontraron, por ejemplo, la expresión específica

de miR-122 en el hígado, del miR-9 en cerebro o el miR-7 en la glándula pituitaria (Landgraf *et al.*, 2007).

Tissue Atlas (<https://ccb-web.cs.uni-saarland.de/tissueatlas>) es un repositorio en línea que proporciona información sobre la presencia de miRNAs en tejidos específicos. Compila los datos de abundancia de 1997 miRNAs determinados en 61 biopsias de tejidos de diferentes órganos de dos individuos (Ludwig *et al.*, 2016). En este atlas también se encuentran miRNAs y familias de miRNAs que se expresan predominantemente en ciertos tejidos. En este sentido, se confirmó que miR-122-5p se expresa exclusivamente en hígado, o la presencia específica de grupos de miRNAs en determinados tejidos: miR-133b, miR-133a-3p y miR-1-3p en músculo, que se conoce regulan genes clave en el desarrollo muscular (Callis *et al.*, 2007; Townley-Tilson *et al.*, 2010); miR-338-3p, miR-219a-5p, miR-124-3p y miR-9-5p en cerebro; o miR-507, miR-514a-3p y miR-509-5p en testículo. La mayor especificidad tisular se observó para la familia miR-378 en el miocardio y músculo (Ludwig *et al.*, 2016).

En relación al estado de salud y enfermedad, se sabe que los miRNAs se encuentran implicados en multitud de procesos biológicos y en la patogénesis de enfermedades humanas, desde infecciones a trastornos cardiovasculares (Wojciechowska *et al.*, 2017), inmunológicos (Sonkoly *et al.*, 2008), neurológicos (Nelson *et al.*, 2008) y oncológicos (Peng and Croce, 2016). El miR-144, por ejemplo, se encuentra altamente expresado en la tiroides, mientras que su expresión disminuye en el carcinoma papilar de tiroides; el miR-205-5p está altamente expresado en melanocito y disminuye su expresión en melanoma correlacionándose inversamente con su progresión (Liu *et al.*, 2012); los niveles de miR-146a aumentan en células T CD4+ de pacientes con artritis reumatoide, mientras que disminuyen en PBMC de lupus eritematoso sistémico (Li *et al.*, 2010).

De este modo, el conocimiento del patrón de expresión de los microRNAs en diferentes tejidos es esencial para comprender el desarrollo de una enfermedad asociada a un determinado tejido, ofreciendo también la posibilidad de desarrollar un miRNA o conjunto de miRNAs que actúen como biomarcadores específicos en el diagnóstico (Reid *et al.*, 2011; Akamatsu *et al.*, 2015; Correia *et al.*, 2017), progresión (Gasparini *et al.*, 2015; Negoj *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2019; W. Zhang *et al.*, 2019; Zhu and Ji, 2019) y/o respuesta al tratamiento (Wu *et al.*, 2019) de enfermedades.

2.4. Localización Intracelular y extracelular de los microRNAs

Se ha hallado que los miRNAs pueden localizarse intracelularmente en diversos compartimentos subcelulares, incluidos núcleo y mitocondrias, endosomas y cuerpos multivesiculares (Makarova *et al.*, 2016), de manera que la actividad del miRNA va a depender de la localización del complejo miRISC y el mRNA diana.

El complejo miRISC se ha detectado en distintas ubicaciones. En el núcleo, donde puede promover los estados de cromatina activos o inactivos (Xiao *et al.*, 2017), interaccionar con el mRNA naciente y alternar perfiles de *splicing* (Allo *et al.*, 2014). En el citoplasma, el sitio de nucleación central del silenciamiento mediado por siRNAs es la membrana del retículo endoplasmático rugoso (Stalder *et al.*, 2013) donde se produce el ensamblaje de la maquinaria del miRNA y su interacción con el RNA mensajero diana (Barman and Bhattacharyya, 2015). En 1999 Olsen y Ambross mostraron que el miRISC citoplasmático podía encontrarse asociado a polisomas inhibiendo el inicio de la traducción (Olsen and Ambros, 1999). En este sentido, también Barman y Bhattacharyya mostraron que los mRNAs diana se unían primero a polisomas, seguido de su asociación con Ago2/miRNP en la membrana del RE para la represión. El complejo miRISC también puede encontrarse en cuerpos citoplasmáticos de procesamiento conocidos como cuerpos P, que sirven como lugares de degradación del mRNA (Liu *et al.*, 2005; Sen and Blau, 2005; Parker and Sheth, 2007); o en gránulos de estrés, donde ciertos mRNAs se acumulan en condiciones de estrés celular o cuando la iniciación de la traducción se inhibe específicamente (Anderson and Kedersha, 2006; Leung *et al.*, 2006). miRISC también puede localizarse en mitocondrias para promover la activación de la traducción, o inhibición y degradación del mRNA (Das *et al.*, 2012; X. Zhang *et al.*, 2014), o dentro de vesículas del endosoma temprano, pudiendo reciclarse al citosol o exocitarse en el endosoma tardío hasta el medio extracelular para mediar la comunicación célula-célula.

Extracelularmente, se sabe que los microRNAs se pueden encontrar de manera estable en fluidos como saliva (Patel *et al.*, 2011), lágrimas, plasma y suero (Chen *et al.*, 2008), orina, líquido amniótico, leche materna (Zhou *et al.*, 2011; Liao *et al.*, 2017), líquido cefalorraquídeo (Danglavalles *et al.*, 2017) y líquido seminal (Weber *et al.*, 2010).

Los microRNAs circulantes de biofluidos (**Figura 3**) se pueden encontrar en cuerpos apoptóticos (Zernecke *et al.*, 2009), estabilizados mediante su unión a complejos con proteínas como Ago2 (Arroyo *et al.*, 2011; Turchinovich *et al.*, 2011) que los protege de la degradación, o de manera enriquecida incorporados en vesículas extracelulares como exosomas (Gallo *et al.*, 2012; Cheng

et al., 2014) o microvesículas (Hunter *et al.*, 2008) permitiendo la comunicación entre células (Valadi *et al.*, 2007; Ekström *et al.*, 2012). También se han encontrado asociados a apolipoproteínas, particularmente las lipoproteínas de alta densidad (HDL), que transportan microRNAs funcionales como un mecanismo de comunicación intercelular (Vickers *et al.*, 2011; Michell and Vickers, 2016).

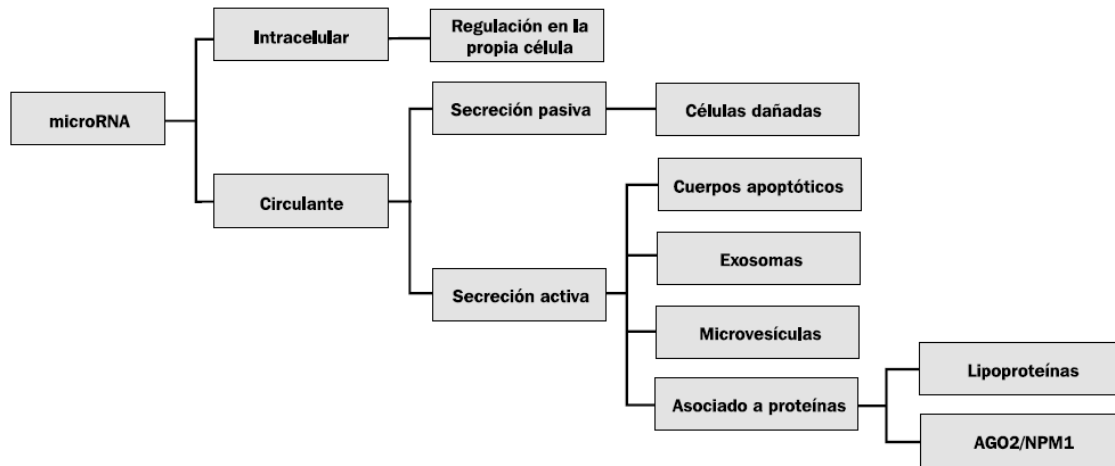


Figura 3. miRNAs en función de su localización y su forma de transporte.

Tomada de Fernández-Sanjurjo *et al.* 2016

Aunque, por su asociación a Ago2 y cuerpos apoptóticos, algunos miRNAs extracelulares se consideran subproductos secretados de manera pasiva como resultado de la actividad, lesión o muerte celular (Corsten *et al.*, 2010), existen evidencias que sugieren que los microRNAs se exportan activamente desde las células en un proceso regulado (Kosaka, Iguchi, *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010) y con funcionalidad. Por ejemplo, se ha descrito que las propiedades antiinflamatorias de las HDL se deben en parte por la transferencia que realizan del miR-233 a las células endoteliales, dando lugar a la represión traslacional de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) (Tabet *et al.*, 2014).

2.5. microRNAs en el metabolismo lipídico

El nivel de colesterol plasmático está controlado principalmente por el hígado, que es responsable de la producción de lipoproteínas, de la eliminación del exceso de colesterol a través del transporte reverso, y de la excreción biliar. Sin embargo, el intestino también juega un papel en este control, en parte a través de la absorción del colesterol de la dieta.

Las proteínas de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP) son los reguladores clave de la homeostasis lipídica. Activan directamente más de 30 genes involucrados en la síntesis y captación del colesterol, ácidos grasos, triglicéridos y fosfolípidos. Existen tres isoformas SREBP que difieren en su expresión específica de tejido, siendo SREBP-1a la que participa en la activación de los genes implicados en el metabolismo de los ácidos grasos y lipogénesis *de novo*. SREBP-1c regula la transcripción de genes implicados en el metabolismo de los ácidos grasos, como la sintasa de ácidos grasos (FASN). SREBP-2 es más específica de los genes involucrados directamente en la homeostasis del colesterol, regulando la 3-hidroxi-metilglutaril CoA reductasa (HMGCR), que cataliza un paso limitante en la biosíntesis del colesterol, y el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR), que capta colesterol de la sangre. Así, cuando los niveles de colesterol celular son bajos promueve la captación y biosíntesis de colesterol, en cambio, un alto nivel de colesterol activa genes involucrados en el flujo de salida de colesterol, mientras que SREBP-1c promueve la síntesis de triglicéridos y fosfolípidos. Ambas isoformas activan genes requeridos para generar NADPH (que se consume en varias de las etapas de la biosíntesis lipídica).

Además de SREBP, los receptores nucleares LXR también son importantes reguladores transcripcionales del metabolismo del colesterol, ácidos grasos y lipoproteínas. Los oxisteroides derivados del colesterol activan el heterodímero RXR/LXR para regular la expresión de diferentes genes diana. LXR α regula la lipogénesis al incrementar SREBP-1c, FAS, ACC y SCD1. Los LXR también activan la transcripción de genes involucrados en el transporte de colesterol, incluidos Abca1 y Abcg1, Abcg5, Abcg8, y regulan los niveles de la enzima CYP7A1 (involucrada en la síntesis de ácidos biliares), y los niveles de apolipoproteína E (involucrada en el transporte de lípidos).

En el metabolismo de las HDL se sabe que ABCA1 es clave en la formación de HDL, al promover la salida del colesterol celular a las apolipoproteínas para formar las partículas de HDL nacientes. ABCG1 también facilita la salida de colesterol a las lipoproteínas HDL, mientras que el receptor SRB1 contribuye a la maduración de las HDL y media la entrada de colesterol al hígado y otros

tejidos esteroideogénicos. Dentro del hígado, parte del colesterol se convierte en sales de ácidos biliares en un proceso iniciado por la enzima CYP7A1 para ser secretados a través de los transportadores ABCG5/ABCG8.

El nivel de colesterol intracelular ha de estar estrechamente regulado, y diversos estudios demuestran la participación de los miRNAs en esta regulación, observándose que participan en los mecanismos de retroalimentación que controlan la biosíntesis, transporte, entrada y salida del colesterol para mantener su homeostasis en la célula, a través de la regulación de sus genes diana (**Figura 4**). Algunos afectan al metabolismo de los lípidos en la célula, como es el caso de miR-122; otros regulan los lípidos circulantes actuando sobre las lipoproteínas de alta densidad (HDL) como es el caso de miR-33, las lipoproteínas de baja densidad (LDL), como miR-148a, miR-128-1, o miR-30c que es un importante regulador de la secreción de VLDL; y otros se conoce que afectan de manera coordinada tanto al metabolismo lipídico celular como la captación y salida del colesterol, es el caso de miRNAs como miR-33, miR-30c, miR-223 y miR-27b.

El **miR-122** es un miRNA específico de hígado que supone el 70% de todos los miRNAs hepáticos. Se asocia con la regulación del metabolismo lipídico hepático además de conocerse su papel terapéutico en la hepatitis vírica, fibrosis, esteatosis y carcinoma hepatocelular. Los estudios de inhibición de este miRNA realizados por Esau y colaboradores confirmaron la regulación de varios genes diana predichos involucrados en la regulación del metabolismo de lípidos y carbohidratos, y que su inhibición reduce el colesterol sérico, reflejado tanto en la fracción de HDL como de LDL, aumenta la oxidación de ácidos grasos hepáticos, y disminuye la síntesis de ácidos grasos y colesterol (Esau *et al.*, 2006). En el estudio de Chai y colaboradores de 2017 los resultados difirieron, indicando que Agpat1 y Dgat1 son genes diana de miR-122, lo que implica que miR-122 inhibe la vía de síntesis de triglicéridos (TG) (Chai *et al.*, 2017). Además, mostraron la correlación positiva entre los niveles de ácidos grasos (FFA) en plasma y los niveles del microRNA, que los FFA mejoran la expresión de miR-122 en hígado y su secreción a sangre, pudiendo actuar de forma remota en otros tejidos, y que miR-122 a su vez provoca un cambio metabólico incrementando la β -oxidación al inhibir la síntesis de TG. Estas diferentes observaciones pueden deberse a diferentes condiciones experimentales o cepa de ratón utilizada.

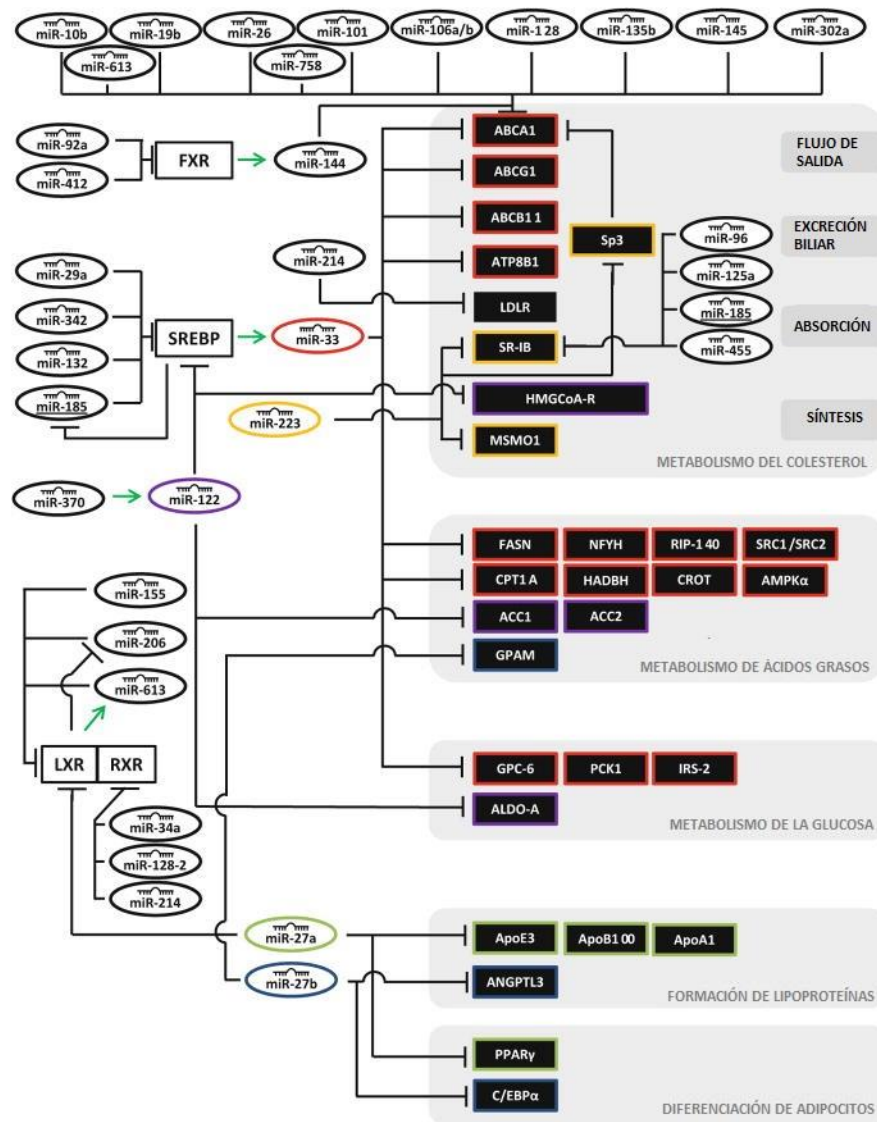


Figura 4. Resumen de los principales miRNAs involucrados en el metabolismo de lípidos.

Adaptada de Novák et al. 2015. (⊥) representa inhibición, (→) representa activación.

A diferencia del miR-122, el **miR-33** se expresa ampliamente en diferentes tipos de células y tejidos. Se trata de un miRNA intrónico que se coexpresa con SREBP-2 y SREBP-1, dando lugar a miR-33a y miR-33b respectivamente, de modo que los estímulos metabólicos que activan la expresión del gen *SREBF* también regulan la expresión de estos miRNAs. El miR-33 controla la exportación de colesterol a través de la regulación coordinada de ABCA1, NPC1 (transporta el colesterol de los compartimentos lisosomales a otras partes de la célula donde es necesario, y actúa junto a ABCA1 para expulsar el colesterol a ApoA1) y ABCG1 (moviliza el colesterol libre de células a partículas HDL más maduras para el flujo de salida), que regulan el flujo de salida del colesterol hacia la vía de transporte reverso de colesterol.

Además de regular la homeostasis del colesterol, los miR-33a/33b regulan genes involucrados en el metabolismo de los ácidos grasos y la señalización de la insulina. Inhiben la traducción de enzimas clave involucradas en la regulación de la oxidación de ácidos grasos, como CPT1A (necesario para el acoplamiento de acetil CoA a la carnitina, lo que permite el transporte de ácidos grasos de cadena media y cadena larga a las mitocondrias para la oxidación β), CROT (enzima peroxisomal que se requiere para el acoplamiento de los ácidos grasos de cadena corta a la carnitina, y también los transporta a las mitocondrias) y HADHB (se requiere para los últimos tres pasos en la vía de la oxidación β en mitocondrias), la AMPK α y Sirtuina 6 (SIRT6). Además, miR-33a y -b también actúan sobre el sustrato receptor de insulina 2, un componente esencial de la vía de señalización de la insulina en el hígado. La sobreexpresión de miR-33a y -b reduce la oxidación de ácidos grasos y la señalización de la insulina en líneas celulares hepáticas. En su conjunto, estos datos establecen que miR-33a y -b regulan las vías que controlan tres de los factores de riesgo del síndrome metabólico, es decir, los niveles de HDL, triglicéridos y señalización de insulina (Davalos *et al.*, 2011).

El **miR-223** coordina la homeostasis del colesterol a través de múltiples mecanismos que controlan la biosíntesis, captación y el flujo de salida del colesterol. El nivel de miR-223 se incrementa en presencia de una concentración alta de colesterol y actúa inhibiendo su síntesis (al reprimir la expresión génica de la enzima HMGCS1), reprimiendo su absorción (al disminuir la captación del colesterol-HDL a través de la disminución de la expresión del receptor SR-BI (SCARB1)), y paralelamente tiene un efecto sobre el flujo de salida del colesterol al aumentar la expresión del transportador ABCA1 (Vickers *et al.*, 2014). Además, se sabe que este miR se localiza también dentro de microvesículas y que es uno de los más abundantes en HDLs, pudiendo ser transportado a células endoteliales (algo que podría ayudar a explicar las propiedades antiinflamatorias de las HDL) (Vickers *et al.*, 2011).

Los estudios de Kurtz y colaboradores en 2015 mostraban que la inhibición de **miR-29** conducía a una reducción en el colesterol y triglicéridos circulantes mediante una represión generalizada de genes de las vías de síntesis de ácidos grasos y colesterol. Más concretamente se conoce que la inhibición de miR-29 suprime la síntesis de ácidos grasos *de novo* a través de la inhibición de los reguladores transcripcionales Srebf1 y ChREBP, y enzimas como Acly, Acaca, Fasn y Scd1; así como la vía de síntesis de colesterol disminuyendo Srebf2, Mvk, Cyp51, Sqle e Idil. Además, su inhibición promueve los factores anti-lipogénicos Ahr, Foxo3 y Sirt1 (Kurtz *et al.*, 2015).

En 2013 Vickers y colaboradores mostraron que los niveles de **miR-27b** son sensibles al contenido de lípidos hepáticos y plasmáticos, y que este miRNA reprime reguladores críticos en

la homeostasis lipídica como PPAR γ , GPAM y ANGPTL3 (Vickers *et al.*, 2013). En 2015, Goedeke y colaboradores volvieron a mostrar que miR-27b está regulado por los lípidos de la dieta y resaltaron el papel de miR-27b en la inhibición del receptor de LDL y ABCA1 pero sin observar cambios en los niveles de lípidos plasmáticos y hepáticos (Goedeke, Rotllan, Ramírez, *et al.*, 2015).

El **miR-34a** hepático disminuye tanto la expresión de SIRT1 (desacetilasa dependiente de NAD⁺) como los niveles de NAMPT/NAD⁺, incrementando la acetilación de los reguladores transcripcionales diana de SIRT1: PGC-1 α , SREBP-1c, FXR y NF- κ B. Como resultado disminuyen las actividades transcripcionales de PGC-1 α y FXR, y aumentan las actividades de SREBP-1c y NF- κ B disminuyendo los genes de la β -oxidación y aumentando la expresión de genes relacionados con lipogénesis e inflamación (Lee *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2013).

El **miR-195**, aunque se ha relacionado con inhibición en la proliferación, invasión y migración de células cancerosas, también se han identificado como dianas de este miRNA las enzimas clave de la síntesis de ácidos grasos ACC y FASN, y la enzima HMGCR de la biosíntesis de colesterol (Singh *et al.*, 2015).

El **miR-30c** disminuye de manera coordinada la biosíntesis de lípidos y la producción de lipoproteínas. Inhibe MTP hepática reduciendo la producción de colesterol-VLDL e inhibe la síntesis de lípidos a través de la inhibición de LPGAT1 involucrada en la síntesis de fosfolípidos. De este modo, inhibe la producción de VLDL sin causar esteatosis hepática porque también inhibe la síntesis de lípidos hepáticos (Soh *et al.*, 2013).

El **miR-148a** se expresa en hígado y regula el receptor de LDL junto con otros genes relacionados con metabolismo lipídico como ABCA1, PGC1 α , AMPK y ISIGN1, de modo que la sobreexpresión de miR-148a reduce la expresión del receptor de LDL hepático, lo que aumenta el colesterol-LDL circulante y reduce los niveles de colesterol-HDL en plasma. Su expresión está regulada por el contenido de lípidos hepáticos, de modo que la inducción mediada por LXR de SREBP-1c da como resultado un aumento de la expresión de miR-148a. Además de en hígado, se expresa en tejido adiposo, células hematopoyéticas y macrófagos. (Goedeke, Rotllan, Canfrán-Duque, *et al.*, 2015; Wagschal *et al.*, 2015).

El **miR-128-1** controla el metabolismo de lipoproteínas circulantes a través de LDLR y ABCA1 tanto en hígado como en macrófagos. Junto con miR-148a y otros miRNAs, regula la captación de colesterol-LDL y el flujo de salida de colesterol mediante control de LDLR y ABCA1. Además,

regula la señalización y sensibilidad a insulina, y la homeostasis de la glucosa, regulando la expresión del receptor de insulina y el sustrato del receptor de insulina (InsR y IRS1 respectivamente), así como la expresión de SIRT1 y lisina desacetilasa. Es por esto que su desregulación podría contribuir a otros aspectos del síndrome metabólico, como se ha observado en ratones *Apoe^{-/-}* tratados con antimiR-128-1, que mejoraban la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad a la insulina (Wagschal *et al.*, 2015).

El **miR-185** regula la expresión de SREBP-2, que a su vez regula la expresión del receptor de LDL y la captación de estas lipoproteínas. Además, SREBP-1c regula la expresión de miR-185 por lo que existe un circuito de retroalimentación articulado para mantener la homeostasis del colesterol (Yang *et al.*, 2014).

El **miR-370** posee efectos similares a miR-122; tiene como diana la palmitoil transferasa (Cpt1a, enzima mitocondrial que media el transporte de los ácidos grasos de cadena larga a través de la membrana uniéndolos a la carnitina) contribuyendo a una reducción de la oxidación de ácidos grasos. Además, controla la expresión de miR-122, aumentando su expresión y llevando a un incremento en la expresión de genes lipogénicos, incluidos SREBP1c y DGAT2.

La función del tejido adiposo también es esencial para la regulación del balance energético, funcionando como depósito de energía y como fuente de factores endocrinos. La diferenciación adipogénica se logra mediante una cascada de eventos transcripcionales en la que se inducen genes tempranos: *C / EBPβ* y *C / EBPδ*, genes de determinación: *PPARγ* y *C / EBPα*, y genes específicos de adipocitos, tales como la sintasa de ácidos grasos y proteínas de unión a ácidos grasos. Se han encontrado perfiles diferenciales de expresión de microRNAs entre preadipocitos y adipocitos maduros, encontrándose la expresión de genes de la familia **miR-27** disminuida por la diferenciación adipogénica. Destaca miR-27, que regula la diferenciación de adipocitos a través de *PPARγ* y *C/EBPα* (Lin *et al.*, 2009). También inhibe *PPARα*, un importante factor de transcripción, que regula genes como la lipoproteína lipasa (LPL) y los transportadores ABCA1 y ABCG1. Además, este miRNA también juega un papel importante en el desarrollo vascular.

2.6. microRNAs en el intestino

Aparte del hígado, el intestino es un órgano fundamental en el control del metabolismo lipídico. Este órgano supone la primera barrera para la absorción de nutrientes y grasas procedentes de la dieta, y está íntimamente relacionado con el hígado a través de la circulación enterohepática (que incluiría no solo nutrientes y ácidos biliares si no también la regulación hormonal a través de las hormonas duodeno-pancreático-biliares), influyendo en el contenido de grasa hepática. En referencia a la importancia del intestino en la homeostasis del colesterol, se conoce por ejemplo que la resección parcial del intestino disminuye el colesterol sérico así como la grasa total en el tejido hepático (Antúnez *et al.*, 2010). Se sabe también que el fármaco Ezetimibe (bloqueante de NPC1L1, principal transportador de colesterol intestinal (Altmann *et al.*, 2004; Garcia-Calvo *et al.*, 2005)), inhibe la absorción intestinal de colesterol y se usa en la práctica clínica para reducir el colesterol asociado a LDL y para el tratamiento de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD, *non-alcoholic fatty liver disease*) (Zheng *et al.*, 2008; Ahmed and Byrne, 2010; Chan *et al.*, 2010; Mangat *et al.*, 2010).

Dada su importancia, se hace necesario el establecimiento de una homeostasis intestinal, para lo cual se requiere un equilibrio entre la proliferación y la diferenciación de las células del epitelio intestinal, así como una adecuada interacción con la microbiota y el sistema inmunitario (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004; Goto, 2019).

El epitelio del intestino delgado está compuesto por cuatro tipos de células diferentes. Las células absorbentes (enterocitos) que son las más abundantes; las células enteroendocrinas secretan hormonas como la serotonina, sustancia P y secretina; las células de Goblet secretoras de mucus; y las células de Paneth que se encuentran en la base de la cripta, secretan péptidos antimicrobianos y lisozima y son un componente importante del nicho de las células madre de la cripta intestinal (Radtke *et al.*, 2006). La regulación de la expresión génica dentro del epitelio intestinal es compleja, y está controlada por múltiples vías de señalización (Wnt / β -catenina, Notch, Hippo, BMP) y factores reguladores adicionales provenientes de miofibroblastos y neuronas entéricas (Richmond and Breault, 2010). De modo que se conoce el papel de muchas proteínas reguladoras, pero los miRNAs y el papel que realizan en las redes de señalización necesarias para mantener este equilibrio aún están dilucidándose.

Ya en 2010, McKenna y colaboradores sugirieron la importancia de los miRNAs en el mantenimiento de la arquitectura intestinal y su función, al determinar que la ablación génica de la enzima Dicer1 en el intestino de ratones provoca una desorganización del intestino delgado y grueso, con un incremento en la apoptosis celular en las criptas del intestino y una alteración

de la función de la barrera intestinal que se refleja en inflamación intestinal con infiltración de linfocitos y neutrófilos (McKenna *et al.*, 2010).

Además, existen varios estudios que relacionan miRNAs con funciones en la enfermedad intestinal, como la participación de la familia let-7 en el crecimiento de las células de cáncer de colon (Akao *et al.*, 2006). La desregulación de miR-194 también se asocia a carcinogénesis colorrectal y su expresión está modulada por el factor de transcripción HNF-alfa en células epiteliales intestinales (Akao *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2014); los miR-24 y miR-21 como reguladores de la barrera intestinal siendo importantes en la patogénesis de la colitis ulcerosa (Yang *et al.*, 2013; Soroosh *et al.*, 2019); el miR-122 media la regulación de la permeabilidad intestinal por TNF- α , induciendo la degradación del mRNA de la ocludina, que se produce en afecciones inflamatorias como la enfermedad de Crohn (Ye *et al.*, 2011); el miR-29a, que aumenta la permeabilidad de la membrana intestinal, se ha descrito que regula el gen de la glutamina sintetasa (GLUL) en pacientes con síndrome de intestino irritable y que su silenciamiento puede revertir la hiperpermeabilidad intestinal a través de la regulación positiva del gen de la Claudina-1 y el factor nuclear NF- κ B (Zhou *et al.*, 2010, 2015), lo que lo convierte en un objetivo para estrategias terapéuticas; o el miR-214 cuya inhibición promueve un beneficio terapéutico en pacientes con colitis ulcerosa, siendo un objetivo terapéutico en la progresión de la enfermedad inflamatoria intestinal (Polytarchou *et al.*, 2015).

En 2016, Peck y colaboradores identificaron la familia miR-30 como un importante regulador de la proliferación y diferenciación intestinal a través de la regulación de SOX9, de tal modo que la inhibición de la familia miR-30 reduce la proliferación de las células epiteliales intestinales (IEC) aumentando los marcadores de diferenciación de enterocitos (Peck *et al.*, 2016). También miR-29b desempeña un papel en la regulación de la proliferación de las células epiteliales intestinales y la homeostasis del epitelio intestinal a través de la vía de señalización Wnt y la desestabilización del mRNA de la proteína LPR6 (Y. Li *et al.*, 2016). En el estudio publicado por Zhang y colaboradores en 2016 sobre la importancia de PepT1 en el intestino delgado y cómo regula la expresión de miRNAs, destacan entre sus hallazgos la expresión diferencial de miRNAs a lo largo del eje cripta-vellosidad y cómo una alteración de esta expresión altera la expresión de proteínas y el equilibrio entre apoptosis y proliferación celular (Zhang *et al.*, 2016). En 2017 Peck y colaboradores mostraron que existe una expresión de miRNAs específica del tipo celular que componen el epitelio intestinal (**Figura 5**) (Peck *et al.*, 2017), viendo que para cada miRNA es importante conocer el patrón de expresión celular a fin de realizar los estudios sobre el tipo de célula apropiado.

Esta importancia ya se denotó en un estudio sobre los miR-143 y miR-145 cuya expresión se encuentra desregulada en cáncer de colon, entendiéndose en numerosos estudios previos que estos miRNAs se encontraban disminuidos en cáncer de colon, pero en realidad su expresión es específica de tejido mesenquimatoso y esta disminución se debía al cambio en la composición celular producida en el adenocarcinoma (Chivukula *et al.*, 2014).

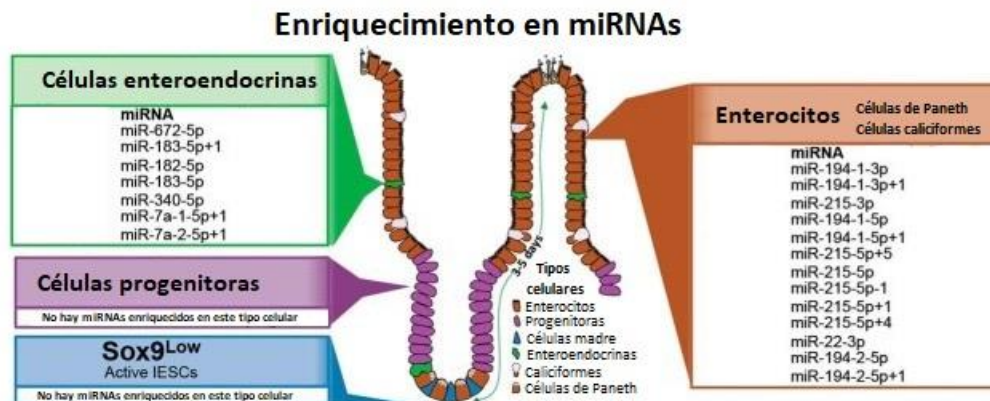


Figura 5. Expresión de miRNAs específica de tipo de célula intestinal.

Adaptada de Peck *et al.* 2017.

Se enumeran miRNAs con una expresión normalizada media que es al menos dos veces mayor en un subtipo de célula epitelial intestinal (IEC) en particular en relación con todos los demás.

Pero no solo son importantes en el mantenimiento de la arquitectura y funcionalidad del epitelio en sí, también lo son en la interacción/comunicación entre el sistema inmunitario y la microbiota comensal. En 2011 el trabajo de Dalmaso y colaboradores mostró como los miRNAs podrían estar involucrados en la regulación génica que se produce por la microbiota en el huésped (Dalmaso *et al.*, 2011), Goodrich en 2014 demostró cómo la genética del huésped y el microbioma intestinal pueden influir en los fenotipos metabólicos (Goodrich *et al.*, 2014), y en 2016 Liu y colaboradores señalaron las células epiteliales intestinales, células de Paneth y células caliciformes como las fuentes principales de miRNAs fecales, capaces de afectar al crecimiento bacteriano contribuyendo a dar forma a la composición de la microbiota intestinal (Liu *et al.*, 2016) (**Figura 6**).

Además, el trabajo de Peck en 2017 mostró que la expresión de miRNAs en respuesta a la microbiota es específica del tipo celular para controlar la función y mantener la homeostasis del epitelio intestinal. Esta relevancia quedó manifiesta en el trabajo de Liu con la restauración del fenotipo normal en ratones con colitis inducida a los que se realizó transferencia fecal, lo que

sugiere la importancia de los miRNAs intestinales para proteger la integridad de la barrera epitelial intestinal. Además, dado que la composición de la dieta ejerce un impacto sobre la permeabilidad intestinal y sobre la microbiota que se relaciona con enfermedades metabólicas (Bäckhed *et al.*, 2007; Lam *et al.*, 2012, 2015), es de esperar que los microRNAs también jueguen un papel en esta interacción dieta-microRNA-microbiota.

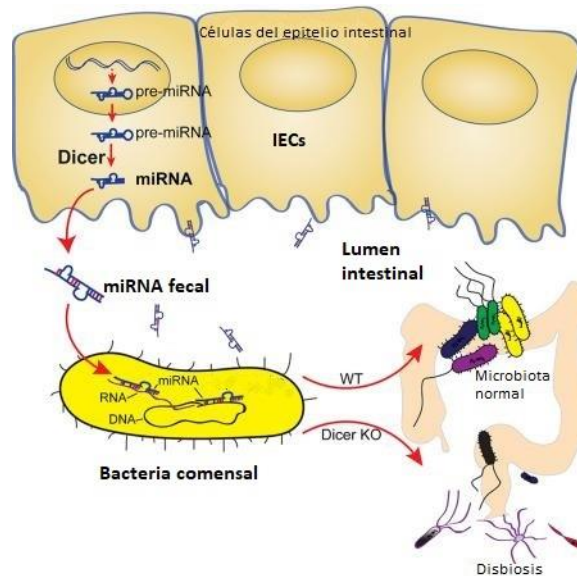


Figura 6. Interacción huésped-microbiota a través de miRNAs

Modificada de Liu *et al.* 2016.

La regulación de genes entre especies a través de microRNAs facilita el control de la microbiota intestinal, de tal modo que la pérdida específica de la enzima Dicer en las células epiteliales intestinales (fuentes predominantes de miRNAs fecales) regulan el crecimiento bacteriano, dando lugar a alteraciones de la microbiota (disbiosis).

En cuanto al sistema inmunitario a nivel intestinal, el miR-375, por ejemplo, es clave en la diferenciación de células caliciformes y regula la expresión de REM β (citocina antiparasitaria), haciendo que los ratones con deficiencia en miR-375 sean susceptibles a los parásitos (Biton *et al.*, 2011), y el miR-155 regula las células B intestinales siendo necesario para la protección durante la infección de la mucosa por el patógeno intestinal *Citrobacter rodentium* (Clare *et al.*, 2013). Además, no solo se encuentran implicados en la inmunidad frente a parásitos, sino que en relación a la inflamación intestinal se han realizado numerosos estudios que examinan los perfiles de expresión de miRNAs en tejidos derivados de pacientes, encontrándose ciertos miRNAs o patrones específicos de expresión que pueden asociarse a colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn (Schaefer *et al.*, 2015; Gwiggner *et al.*, 2018).

Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, se conoce la importancia e implicación de los miRNAs en la regulación de la homeostasis intestinal, y en la regulación de la inmunidad e interacción huésped-microbiota. No obstante, aún queda por esclarecer qué miRNAs actúan en el compartimento intestinal, cuáles son sus genes diana, y en qué redes de regulación se encuentran implicados.

2.7. microRNAs y terapia

En muchas enfermedades se conocen cambios de expresión de microRNAs específicos que se producen respecto la situación fisiológica normal. Por ello, además de servir como biomarcadores para el diagnóstico, pronóstico y terapia de predicción, los microRNAs se pueden emplear como herramientas terapéuticas, con la intención de revertir cambios de expresión desfavorables hacia el fenotipo saludable.

En principio, y dado que los microRNAs se conocen generalmente como inhibidores de la expresión génica, en función de la implicación del miRNA en el desarrollo de la enfermedad se pueden realizar dos tipos de aproximaciones terapéuticas (**Figura 7**). Si la alteración se relaciona con una disminución de la expresión de cierto miRNA se pueden utilizar microRNAs mímicos (1) (miRNA mimic: miRNA imitador). Los miRNAs mímicos son miRNAs exógenos con una secuencia de nucleótidos similar al miRNA objetivo que reemplazan la ausencia de copias de este último. Por otro lado, se pueden utilizar moléculas activadoras que incrementen la expresión del microRNA (2).

Si la enfermedad se asocia con un incremento del miRNA, la terapia estará dirigida hacia la inhibición de ese microRNA. Para ello pueden utilizarse inhibidores de la expresión génica del microRNA (3) u oligonucleótidos antisentido anti-microRNA (4) (AMOs, anti-miRNA oligonucleotides o anti-miRs, LNA locked-nucleic acids o antagomiRs), que son moléculas sintéticas complementarias a los miRNAs de modo que se unen formando un dúplex o produciendo la degradación del miRNA. También pueden utilizarse “esponjas miR” (5), que son transcritos de RNA que contienen múltiples sitios de unión en tándem de uno o varios miRNAs. Una alternativa más es el uso de oligonucleótidos antisentido de enmascaramiento (miR-mask) o “protectores de diana” (6), que actúan como moléculas complementarias a la 3'UTR del mRNA objetivo, bloqueando el acceso del miRNA a su sitio de unión (Dávalos and Suárez, 2013).

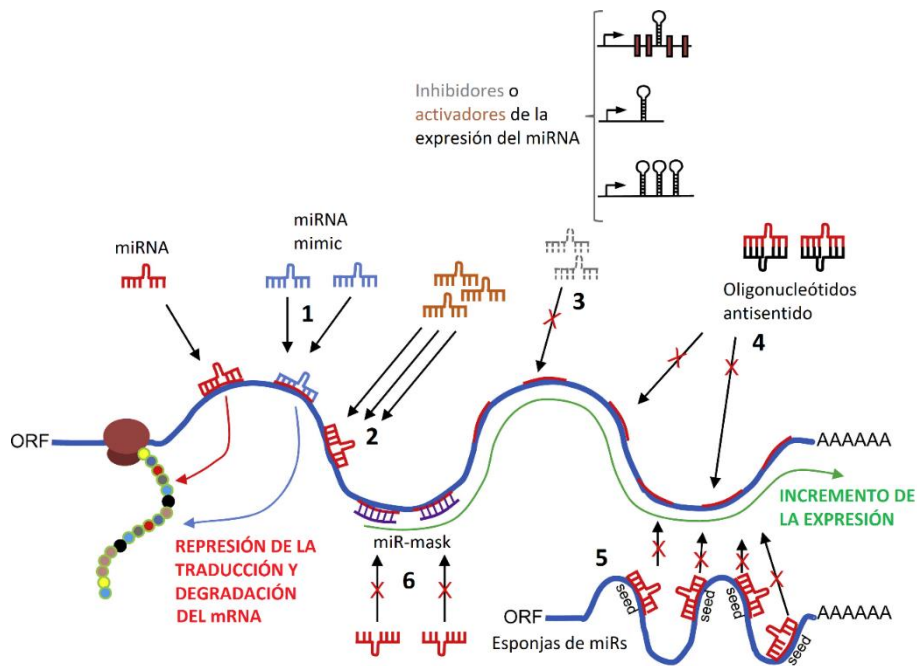


Figura 7. Aplicación terapéutica de los miRNAs.

Modificada de Dávalos and Suárez 2013

La participación de los miRNAs en rutas críticas y la implicación de su desregulación en el desarrollo y progresión del cáncer es bien conocida (Di Leva and Croce, 2013).

En este sentido, su modulación puede ser importante a modo de terapia dirigida, tanto para restaurar la pérdida de conocidos miRNAs supresores de tumores, como para el silenciamiento específico de oncomiRs sobreexpresados (terapia antimir = miRNAs antisentido), pudiendo utilizarse de forma combinada con quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia (Cortez *et al.*, 2014; X. Deng *et al.*, 2014; Mittal *et al.*, 2014) para mejorar la terapia antitumoral. Los miRNAs más comúnmente desregulados en cáncer son miR-21, miR-155 y el cluster miR-17-92 como oncogénicos, y let-7, miR-34 y el cluster miR-143-145 como supresores de tumores (Soriano *et al.*, 2013).

Se conoce, por ejemplo, que la disminución de la expresión de la familia de miRNAs let-7 se relaciona con el desarrollo de cáncer de ovarios. Además, el restablecimiento de su expresión reduce drásticamente el crecimiento del tumor ovárico, tanto *in vitro* como *in vivo*, lo que puede proporcionar una estrategia terapéutica para este tipo de cáncer (Wang *et al.*, 2012).

Un ejemplo de uso de antimirRs fue realizado por Fontana y colaboradores, bloqueando el miR-17-5p en un modelo de xenoinjerto de neuroblastoma, de modo que la inyección intratumoral

con el anti-miR hizo que los tumores crecieran mínimamente o desaparecieran (Fontana *et al.*, 2008).

Además de su uso potencial como diana terapéutica, también pueden usarse como biomarcadores predictivos de la terapia. Por ejemplo, Kim y colaboradores en 2011 identificaron una serie de miRNAs que se correlacionaban con la resistencia a la terapia con cisplatino y 5-fluorouracilo en pacientes con cáncer gástrico (Kim *et al.*, 2011).

Otro problema de salud creciente que ha alcanzado proporciones epidémicas a nivel mundial es la obesidad (James, 2004), la cual está relacionada con trastornos metabólicos como la diabetes, hipertensión y enfermedades cardiovasculares (ECV). También se conoce que la desregulación de microRNAs está implicada en la adipogénesis y obesidad (Xie *et al.*, 2009) y, por tanto, que pueden jugar un papel importante como biomarcadores y como posibles dianas de intervención terapéutica en la obesidad, patologías asociadas a la dislipidemia (Dávalos and Fernández-Hernando, 2013) y complicaciones relacionadas (Nazari-Jahantigh *et al.*, 2015). Por ejemplo, se ha estudiado que la inhibición de miR-21, utilizando LNA-21, conduce a una pérdida de peso significativa, reduce el tamaño de los adipocitos y mejora la homeostasis de los lípidos en ratones deficientes del receptor de leptina (db/db) (Seeger *et al.*, 2014), por lo que representa un potencial objetivo terapéutico para los trastornos metabólicos causados por la obesidad. También para miR-143, un miRNA adipogénico, se ha visto que el tratamiento con oligonucleótidos antisentido inhibe la diferenciación de adipocitos y conduce a una disminución de la acumulación de triglicéridos (Esau *et al.*, 2004). Otros ejemplos incluyen, miR-103 y miR-107, ambos relacionados con diabetes tipo 2 y obesidad, de manera que la inhibición farmacológica con un antagomiR mejora la homeostasis de la glucosa y reduce el tamaño de los adipocitos (Trajkovski *et al.*, 2011).

Es bien conocida la relación de los miRNAs con las ECVs (Concorelli *et al.*, 2014). Por ejemplo, se sabe que miR-155 además de ser importante para la diferenciación del linaje hematopoyético, inmunidad, inflamación e infecciones virales, se ha estudiado en la aterosclerosis y enfermedad arterial coronaria. Aunque tiene efectos contradictorios sobre la patogénesis de la enfermedad cardiovascular (Tian *et al.*, 2014; X. Li *et al.*, 2016), este miR se encuentra vinculado a varias cascadas de señales relacionadas con la aterosclerosis en diferentes tipos de células (endoteliales, macrófagos, células dendríticas y musculares) y modula la expresión de genes relacionados con la inflamación en células *in vitro* (Ma *et al.*, 2013). Xie y colaboradores presentaron, en 2014, un estudio prospectivo y aleatorizado con Rosuvastatina, la cual redujo la incidencia de eventos cardiovasculares mediante la supresión de la vía de señalización

molecular miRNA-155/SHIP-1 (Xie *et al.*, 2014), demostrando la viabilidad del miRNA-155 como objetivo para desarrollar estrategias terapéuticas efectivas para ECV.

Si bien la terapéutica basada en miRNAs es un enfoque novedoso hacia la medicina de precisión con el objetivo de controlar la expresión génica de manera específica, para su aplicación ha de garantizarse la entrega eficiente de esos miRNAs en las células objetivo tras su administración para que la terapia pueda ser eficaz. Dada su fácil degradación por las nucleasas, la vida media de los miRNAs en plasma es corta y se requieren modificaciones químicas que aumenten su estabilidad, o vehículos que eviten su degradación (nanovectores como los vectores virales, o liposomas). Así, como ejemplo de ensayo clínico dirigido en humanos que se basa en los miRNAs como terapia, se encuentra el estudio multicéntrico en fase I de MRX34. En este estudio, la inyección de una formulación liposomal, que engloba un miRNA mimico del supresor tumoral miR-34a, se utiliza para evaluar la seguridad, farmacocinética y farmacodinámica del MRX34 en pacientes con cáncer primario de hígado u otros tumores malignos hematológicos (el estudio realizado está registrado en ClinicalTrials.gov con el número de registro [NCT01829971](#)) (Beg *et al.*, 2017). Otro ensayo clínico dirigido (que se encuentra en fase 2), que muestra la utilidad de la aplicación clínica de inhibidores de miRNAs, es el realizado con Miravirsen (número de registro [NCT01200420](#)), un oligonucleótido antisentido que se dirige a miR-122 (específico de hígado) y muestra actividad antiviral frente al virus de la hepatitis C (Janssen *et al.*, 2013; Ottosen *et al.*, 2015).

2.8. microRNAs, y regulación por dieta y componentes de la dieta

Los nutrientes adquiridos a través de la dieta son importantes para el crecimiento normal, mantenimiento de las funciones biológicas y reproducción. Además de los hábitos alimentarios saludables, hay ciertos componentes naturales de los alimentos que pueden prevenir, retrasar e incluso revertir algunos procesos patológicos, como las enfermedades cardiovasculares y cáncer (Shah *et al.*, 2012).

Existen componentes dietéticos bioactivos como la quercetina, curcumina, los ácidos grasos omega-3, la vitamina D, el resveratrol o la fibra dietética, capaces de modificar la expresión génica a través de cambios en la expresión de microRNAs. Un ejemplo de esta modificación en los perfiles de expresión de miRNAs que afectan a la expresión génica asociada a vías antiinflamatorias y antiproliferativas es el estudio de Tsoukas y colaboradores en 2015. En este estudio mostraron que el consumo de nueces en ratones con cáncer colorectal disminuía el tamaño de los tumores, asociándose con un aumento de ácidos α -linoleico, eicopentaenoico,

docosahexanoico y omega-3 total, además de una disminución significativa de los miRNAs 1903, 467c y 3068, y un aumento en la expresión de miR-297a* (Tsoukas *et al.*, 2015).

Siguiendo esta línea, la curcumina es el ingrediente principal del curry y se considera un compuesto dietético bioactivo con propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas y anticancerígenas. Sun y colaboradores demostraron *in vitro* que los efectos biológicos de la curcumina pueden atribuirse en parte a su potencial para modular miRNAs. El tratamiento de una línea celular de cáncer pancreático con curcumina dio como resultado la sobreexpresión de 11 miRNAs e inhibición de 18 miRNAs. Además, el incremento de miR-22 condujo a la supresión específica del factor de transcripción Sp1 (SP1) y del receptor de estrógeno 1 (ESR1) (Sun *et al.*, 2008).

Otros ejemplos de componentes bioactivos son: el licopeno, que se ha visto disminuye la expresión de miR-21 mejorando la esteatosis hepática en ratones alimentados con dieta rica en grasa (Ahn *et al.*, 2012), y las proantocianidinas de semilla de uva o el ácido docosahexaenoico, que revierten el aumento de miR33a y miR-122 en ratas obesas dislipémicas (Baselga-Escudero *et al.*, 2013).

Así mismo, otros miRNAs específicos sensibles a la manipulación dietética son los miRNAs 103, 107 y miR-143, citados anteriormente como dianas terapéuticas relacionadas con la obesidad. El efecto de una dieta con ácido linoleico conjugado (CLA, del inglés *conjugated linoleic acid*) sobre la expresión de estos miRNAs correlaciona con cambios en genes implicados en el metabolismo de los ácidos grasos (Parra *et al.*, 2010) y diferenciación de adipocitos (Qi *et al.*, 2015).

En ratones, los polifenoles derivados de plantas atenúan el aumento de peso, esteatosis hepática y resistencia a insulina en la enfermedad del hígado graso inducida por la dieta, regulando la expresión de miR-103, miR-107 y miR-122 (Joven *et al.*, 2012). De hecho, estudios epidemiológicos sugieren que la ingesta elevada de polifenoles en la dieta se asocia con un menor riesgo de ECV, enfermedades neurodegenerativas y algunos cánceres.

El resveratrol ejerce efectos antiinflamatorios, produciendo una disminución de citoquinas proinflamatorias y de ciertos microRNAs relacionados con la respuesta inflamatoria, como es el caso de miR-155 (Tomé-Carneiro *et al.*, 2013), citado anteriormente como un biomarcador de enfermedades cardiovasculares. Otros estudios relacionan este compuesto con la

cardioprotección a través de la regulación de ciertos microRNAs, como miR-21 (Mukhopadhyay *et al.*, 2010), que regula la ruta de señalización de la quinasa ERK-MAP en fibroblastos cardíacos. Por otro lado, se debe tener en cuenta que no sólo se produce la modulación de microRNAs en función del tipo de dieta o del contenido en determinados nutrientes, sino también que los miRNAs presentes en los alimentos podrían desempeñar un papel activo en la salud humana. Sin ir más lejos, podemos encontrarlos en la leche materna (Zhou *et al.*, 2011), de manera que ésta no solo es una fuente de nutrientes necesarios sino que también proporciona miRNAs importantes para el desarrollo del sistema inmunitario del bebé (Kosaka, Izumi, *et al.*, 2010), y cuya falta perjudica el crecimiento y salud intestinal (Zhou and Zemleni, 2019).

Otro ejemplo lo presenta un estudio de Zhang y colaboradores en 2012, que mostró la existencia de miRNAs exógenos derivados de plantas en suero y tejidos de varios animales. Este descubrimiento va en contra de la creencia tradicional sobre que los RNAs exógenos son degradados en el tránsito intestinal y, por tanto, no tendrían efectos sobre el consumidor. Específicamente, el MIR168a, abundante en arroz, es el miRNA exógeno de plantas más altamente enriquecido en el suero de sujetos chinos (Zhang *et al.*, 2012), comprobándose, además, que podía unirse al mRNA de la proteína LDLRAP1 inhibiendo su expresión en hígado y, en consecuencia, disminuir la eliminación de LDL del plasma de ratón. Aunque estos resultados apuntan a que estos microRNAs exógenos podrían tener la capacidad de regular la expresión de genes diana en mamíferos, hay muchos aspectos básicos de biología fundamental que necesitan esclarecerse antes de poder aceptar estos hallazgos como un proceso generalizado (Dávalos *et al.*, 2019), y además existen estudios posteriores que lo contradicen.

Finalmente, un foco de investigación actual es la interacción de la dieta con la microbiota intestinal, como intersección entre la dieta y salud (Sonnenburg and Bäckhed, 2016). Se han identificado miRNAs producidos por células epiteliales intestinales y se ha estudiado su papel en la modulación de la microbiota intestinal (Liu *et al.*, 2016), siendo capaces de producir cambios en la integridad de la barrera intestinal. Así, si la dieta produce cambios en miRNAs intestinales y éstos a su vez afectan al crecimiento bacteriano de manera que pueda producirse un desequilibrio en las poblaciones como se ha visto por ejemplo en ratones genéticamente obesos (Ley *et al.*, 2005), la manipulación intencional de la constitución de la flora intestinal a través de la dieta podría regular los cambios en la fisiología y patología del huésped (Mohan *et al.*, 2016; Hoban *et al.*, 2017).

3. CACO-2 Y ORGANOIDES INTESTINALES COMO MODELO CELULAR 3D

Las líneas celulares de carcinoma de colon humano HT-29 y Caco-2 son modelos ampliamente utilizados para el estudio de la diferenciación y funcionalidad intestinal al ser capaces de adquirir, bajo ciertas modificaciones de las condiciones de cultivo, características propias de células intestinales (Rousset, 1986; Chantret *et al.*, 1988; Darmoul *et al.*, 1992; Hilgendorf *et al.*, 2000). Las **células Caco-2**, obtenidas de adenocarcinoma de colon humano, sufren en cultivo una diferenciación enterocítica espontánea caracterizada por la formación de uniones estrechas, una polarización de la membrana con la presencia de un borde en cepillo que expresa enzimas intestinales como sacarasa-isomaltasa, dipeptidildipeptidasa 4, lactasa, aminopeptidasa, fosfatasa alcalina, y transportadores de nutrientes propios de los enterocitos (Pinto *et al.*, 1983). Esto las ha convertido en un modelo muy caracterizado (Hidalgo *et al.*, 1989; Peterson and Mooseker, 1992; Sambuy *et al.*, 2005; Halbleib *et al.*, 2007; Nauli *et al.*, 2014) y utilizado para los estudios de transporte, absorción de nutrientes, metabolismo lipídico (Levy *et al.*, 1995; Van Greevenbroek *et al.*, 1996) y funcionalidad de la barrera, ya sea en estudios ADME-Tox (Administración, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicología) (Meunier *et al.*, 1995; Hubatsch *et al.*, 2007) o estudios acerca de la adherencia, invasión, penetración y el papel de los factores de virulencia para varias especies bacterianas, así como el efecto de las micotoxinas derivadas de especies fúngicas (Finlay and Falkow, 1990; Akbari *et al.*, 2017; Hayashi *et al.*, 2017). Para ello, estas células se cultivan en placas con filtros permeables (placas *Transwell*®), lo que permite el acceso a iones y nutrientes por ambos lados de la monocapa de células polarizadas que se forma tras alcanzar la confluencia (Hidalgo *et al.*, 1989). También se han desarrollado microdispositivos para el cultivo de las células Caco-2 que simulan las condiciones fisiológicas intestinales (Tan *et al.*, 2018).

No obstante, existe mucha variabilidad en las propiedades estructurales y funcionales del modelo de células Caco-2 diferenciadas, que hacen que este modelo tenga problemas de reproducibilidad que dificultan la comparación de resultados. Como fuentes de variabilidad se encuentran aquellas relacionadas con el cultivo como la densidad de crecimiento (Natoli *et al.*, 2011), el número de pase (Briske-Anderson *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 1997) o las condiciones del medio (Sambuy *et al.*, 2005), así como las diferentes subpoblaciones utilizadas por cada laboratorio (Vachon and Beaulieu, 1992; Hayeshi *et al.*, 2008) o las mutaciones producidas en los subcultivos. Además, este modelo unicelular tiene una serie de limitaciones y queda obsoleto al no recapitular la composición propia del epitelio intestinal, donde existe un microambiente complejo con un conjunto heterogéneo de células especializadas con diferentes funciones

importantes en el mantenimiento de la funcionalidad de la barrera intestinal (**Figura 8**). Esto ha fomentado el desarrollo y empleo de co-cultivos (Kämpfer *et al.*, 2017; Pereira *et al.*, 2018; Dosh *et al.*, 2019) y microdispositivos biomiméticos para imitar la complejidad y fisiología intestinal *in vivo* (Kim *et al.*, 2012, 2016), así como la búsqueda de otros modelos más análogos como es el caso de los organoides intestinales; y también, la persistencia de modelos *ex vivo* como el saco intestinal evertido (Alam *et al.*, 2012) o la cámara Ussing (Rozeznal *et al.*, 2012).

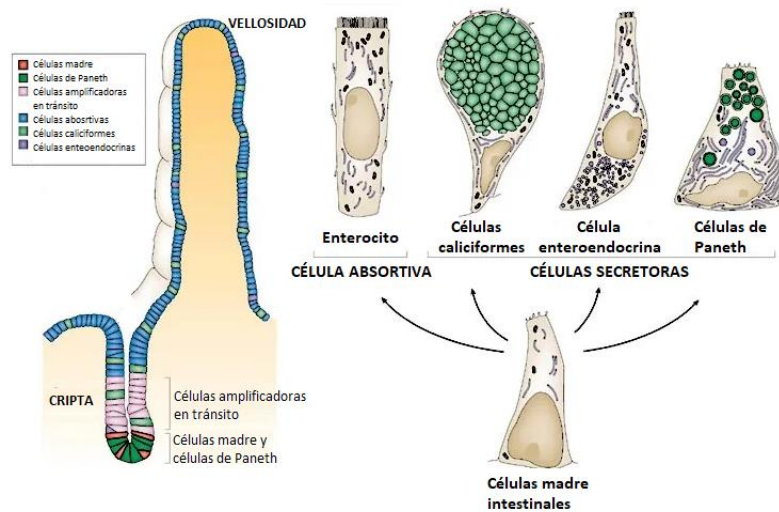


Figura 8. Estructura y tipos celulares principales en el epitelio intestinal de mamíferos.

Modificada de Crosnier, Stamataki, and Lewis 2006

Los **organoides intestinales** como cultivo primario a largo plazo fueron descritos inicialmente por Sato y colaboradores en 2009. Estas estructuras 3D se generan a partir del cultivo de criptas de intestino delgado de ratón o células madre Lgr5⁺, y poseen la capacidad de autorrenovación y diferenciación del epitelio (Sato *et al.*, 2009, 2011; Sato and Clevers, 2013).

El modelo de organoides intestinales recrea el microambiente que compone el epitelio intestinal, con un nicho de células madre en la base de la cripta y la formación de una capa de células epiteliales intestinales. Esta capa incluye los diferentes tipos de células especializadas y sus funciones: los enterocitos (células especializadas en la absorción de nutrientes), las células proliferativas, las células de Paneth (que secretan péptidos antimicrobianos), las células caliciformes (productoras de mucus), células Tuft, células enteroendocrinas y células Microfold. Además, mantienen la expresión génica específica de la región (Middendorp *et al.*, 2014), encontrándose patrones de metilación específicos que definen estas diferencias en la función

epitelial intestinal y la inducción de genes en función del segmento del cual deriven (Kraiczky *et al.*, 2019).

Aunque originalmente estas estructuras epiteliales tridimensionales se denominaron “organoides”, para diferenciarlos de aquellos obtenidos de otros tejidos, como los derivados de colon (colonoides), o de estómago (gastroides), los derivados del intestino delgado se denominan “enteroides” (Stelzner *et al.*, 2012). Además, de este modo se diferencian estos “mini-intestinos” derivados de ISC (células madre intestinales adultas) a los que se denomina “enteroides”, de los derivados de iPSCs (células madre pluripotentes inducidas) que se denominan “organoides” (Spence *et al.*, 2011).

La importancia clínica de este modelo reside en que la biopsia de un paciente se puede emplear para el cultivo de organoides, que pueden congelarse y descongelarse manteniendo las características genéticas y morfológicas del individuo del que deriva (Van De Wetering *et al.*, 2015). Así, las criptas intestinales pueden aislarse de resecciones quirúrgicas o biopsias para realizar estudios sobre las patologías del tracto gastrointestinal, estudios farmacológicos y farmagenómicos, toxicológicos, y microbiológicos (Y. G. Zhang *et al.*, 2014; William Murray *et al.*, 2016; Hill and Spence, 2017; O'Rourke *et al.*, 2017; Cruz-Gil *et al.*, 2019). Además, se pueden emplear como herramienta terapéutica utilizando su trasplante para reparar epitelios dañados en ciertos tipos de enfermedades (Yui *et al.*, 2012; Fordham *et al.*, 2013).

Pero el modelo de enteroide / organoide intestinal, aunque recapitula la diversidad, el desarrollo y diferenciación del epitelio intestinal, también supone un modelo estático con una luz cerrada. Esto difiere de las condiciones fisiológicas al quedarse acumulado el material secretado de las células enteroendocrinas, células de Paneth, células caliciformes y las células apoptóticas desprendidas. De igual forma, para los estudios de transporte y exposición a microbiomas se hace necesario la búsqueda de modificaciones del sistema que superen la inaccesibilidad de la superficie apical (Co *et al.*, 2019). Además, este sistema sigue careciendo de la relación con otros tejidos, células inmunes, vasculatura y fuerzas mecánicas (movimientos de peristaltismo y flujo de fluidos) que recrean y definen la fisiología intestinal normal. Por todo esto, se buscan variaciones del sistema que complementen estas carencias, como la creación de chips con células epiteliales intestinales derivadas de organoides obtenidos de biopsias humanas que se complementan con células endoteliales (Kasendra *et al.*, 2018).

4. EL MODELO ANIMAL DE RATÓN DICER-KNOCKOUT ESPECIFICO DE INTESTINO

Existen homólogos de Dicer ampliamente distribuidos en eucariotas, incluidos hongos, plantas y animales, lo que da idea de su importancia en el procesamiento de los miRNAs (Murphy *et al.*, 2008). La mayoría de especies tienen un solo gen *Dicer*, aunque algunas poseen múltiples homólogos de *Dicer* con diferentes roles, como por ejemplo en *Drosophila melanogaster*, donde Dicer-1 se requiere para el procesamiento de precursores de miRNA, mientras que Dicer-2 se requiere para el procesamiento de precursores de siRNA (Y. S. Lee *et al.*, 2004).

En el desarrollo de ratones “knockout” (KO) para Dicer, se ha visto que la pérdida completa de Dicer en la línea germinal de ratón produce la letalidad en las primeras etapas del desarrollo. Esto da a entender la importancia de Dicer1 y por ende de la maquinaria de RNAi en el mantenimiento y el control de la diferenciación de las células madre durante el desarrollo temprano en ratón (Bernstein *et al.*, 2003), así como en el silenciamiento epigenético en mamíferos, siendo esencial en el mantenimiento de la estructura de la cromatina centromérica y silenciamiento centromérico (Kanellopoulou *et al.*, 2005).

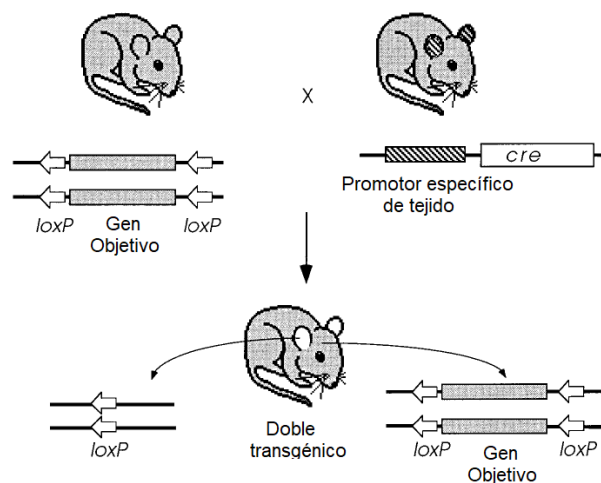


Figura 9. Sistema de cruzamiento para la obtención del ratón KO condicional mediante el sistema Cre/loxP.

Adaptada de Sauer 1998.

Ablación condicional de genes por la recombinasa Cre. El gen se modifica quedando flanqueado por dos sitios loxP repetidos y situados en el mismo sentido, y que son reconocidos por la recombinasa Cre. El apareamiento del ratón con las modificaciones loxP con el transgénico para la recombinasa Cre bajo el promotor específico de tejido generará un ratón doblemente transgénico en el que se elimina el gen modificado con loxP en aquellos tejidos en los que se ha expresado el gen de la recombinasa. En el ejemplo, la expresión de Cre en las orejas (a rayas) produce la delección del gen objetivo (modificado con loxP) únicamente en las orejas del doble transgénico.

Dado que esta inactivación impide el desarrollo del ratón, se generan los ratones KO condicionales en los cuales se induce la anulación de la expresión del gen en el animal adulto o se restringe a determinados tejidos o células. Para ello se utilizan la recombinasa de DNA específica de sitio Cre del bacteriófago P1 y los sistemas inducibles (**Figura 9**), a fin de controlar la expresión y función de Cre (sistema de recombinación Cre/loxP) (Sauer, 1998).

La generación de KO condicionales a fin de evaluar efectos fenotípicos de la eliminación de la regulación mediada por miRNAs ha revelado que, su ausencia en diferentes tejidos, da lugar a numerosos defectos. Se ha observado, por ejemplo, desde su requerimiento para la formación de las extremidades (Harfe *et al.*, 2005); hasta el mantenimiento de la integridad de los vasos sanguíneos durante la embriogénesis tardía (Yang *et al.*, 2005; Albinsson *et al.*, 2011); su impacto sobre la microglía del cerebro en desarrollo y adulto (Varol *et al.*, 2017); su función crítica en la supervivencia de los hepatocitos, metabolismo y hepatocarcinogénesis (Sekine *et al.*, 2009); y el impacto de su deficiencia sobre la homeostasis y función de las células de Langerhans epidérmicas (Kuipers *et al.*, 2010). También que su eliminación en las células progenitoras cardíacas da lugar a anomalías en el desarrollo del corazón (Zhao *et al.*, 2007) sugiriendo la importancia de los miRNAs en la regulación de la morfogénesis cardíaca (Saxena and Tabin, 2009; Luo *et al.*, 2018); o, dada la insuficiencia renal generada en animales carentes de Dicer, se demuestra su papel esencial para la regulación de los genes dependientes de microRNAs en el desarrollo renal (Bartram *et al.*, 2013).

En 2010, McKenna y colaboradores realizaron el perfil de expresión de los miRNAs presentes en el epitelio intestinal de ratones. Determinaron la importancia de los miRNAs en la diferenciación y viabilidad del epitelio intestinal, cruzando ratones *Dicer1*^{loxP/loxP} (Harfe *et al.*, 2005) y ratones transgénicos Villin-cre (Madison *et al.*, 2002) a fin de obtener ratones carentes de miRNAs funcionales en el epitelio intestinal (ratones con la delección específica de *Dicer1* en el epitelio intestinal). Los autores encontraron diferencias funcionales entre los ratones deficientes para la enzima *Dicer1* y ratones normales en cuanto al procesamiento de triglicéridos de la dieta y la absorción de agua en el colon, pero también diferencias morfológicas en el intestino, con las zonas de la cripta expandidas en el intestino delgado y desorganizadas en el colon con una disminución del número de células caliciformes (**Figura 10**).

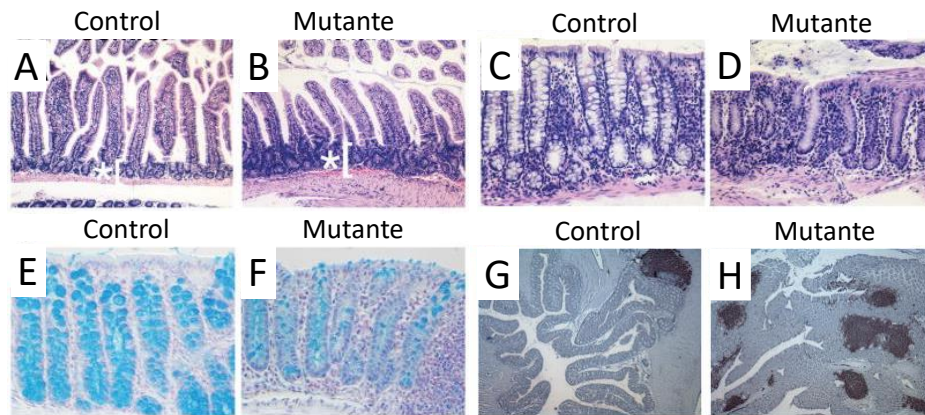


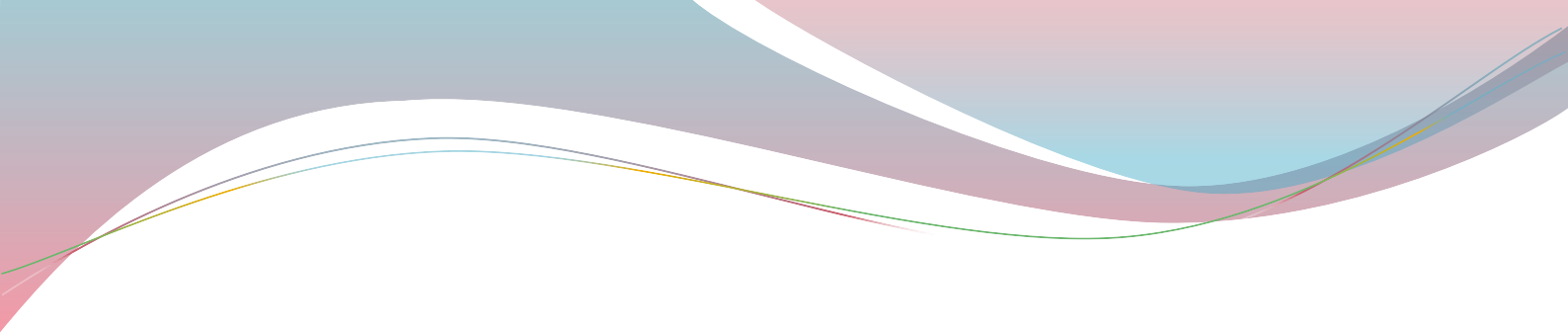
Figura 10. Alteraciones intestinales encontradas en ratones KO para Dicer1 respecto al animal *wild type*.

Modificada de Lindsay B McKenna et al. 2010

Se muestran las diferencias morfológicas en los mutantes adultos con la delección para Dicer1: zona de la cripta expandida en el intestino delgado (marcada con *[, B en comparación con A), desorganización de las criptas en el colon (D en comparación con C) y disminución de células caliciformes en el colon (tinción con azul Alcian, F en comparación con E), con un aumento de células B en los nódulos linfoides (H en comparación con G).

En cuanto a los genes que podrían estar implicados en este fenotipo, encontraron expresión diferencial de genes relacionados con las vías de señalización implicadas en inmunidad, existiendo un aumento de la inflamación que se relaciona con una disminución y desorganización de las uniones estrechas, que aumenta la permeabilidad intestinal provocando la pérdida de la integridad de la barrera intestinal, con un aumento en el número de neutrófilos y disminución de células caliciformes (McKenna *et al.*, 2010).

Aunque existen estudios que han generado otros modelos de ratones KO condicionales para el estudio de la importancia de Dicer en el intestino y metabolismo lipídico, como el sistema Cre-ERT2 regulado por tamoxifeno (T. C. Huang *et al.*, 2012), el modelo murino Dicer KO, generado por el cruce de ratones con el alelo “floxeado” para Dicer1 con ratones transgénicos que expresan la recombinasa Cre bajo la dirección del promotor villin1, se ha utilizado en numerosos estudios para valorar la importancia de los miRNAs en la homeostasis intestinal (Biton *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2016; Nakato *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2017), así como su implicación en estudios sobre el metabolismo lipídico (Briand *et al.*, 2016; Mantilla-Escalante *et al.*, 2019).



OBJETIVOS

Los excesos de la dieta continúan siendo el principal origen de las alteraciones metabólicas y enfermedades cardiovasculares. El intestino es un órgano fundamental en el control de la absorción de xenobióticos y juega un papel importante en el metabolismo lipídico sistémico. Los microRNAs se han caracterizado como elementos importantes en la regulación de la homeostasis y el mantenimiento de numerosas funciones y órganos, siendo clave su alteración en numerosos procesos patológicos. Por ello, resulta esencial entender cómo funcionan estas moléculas en la modulación de la expresión génica en las cascadas de respuestas regulatorias, y la envergadura de las alteraciones que se producen ante la falta de su regulación. Los microRNAs se pueden modular a través de la dieta o de componentes de la misma, pudiendo desregularse cuando se producen desequilibrios alimenticios. Aunque el control del metabolismo lipídico mediado por miRNAs en los diferentes tejidos se ha descrito parcialmente con anterioridad, a nivel intestinal está muy poco caracterizado. *La hipótesis de esta Tesis Doctoral es que los excesos alimenticios desregulan la expresión de miRNAs intestinales implicados en la regulación del metabolismo lipídico.* Por ello, su estudio es importante para desarrollar nuevas herramientas terapéuticas basadas en su modulación.

OBJETIVOS

1. Evaluar el papel de los microRNAs en el enterocito y su implicación en el metabolismo lipídico a nivel intestinal

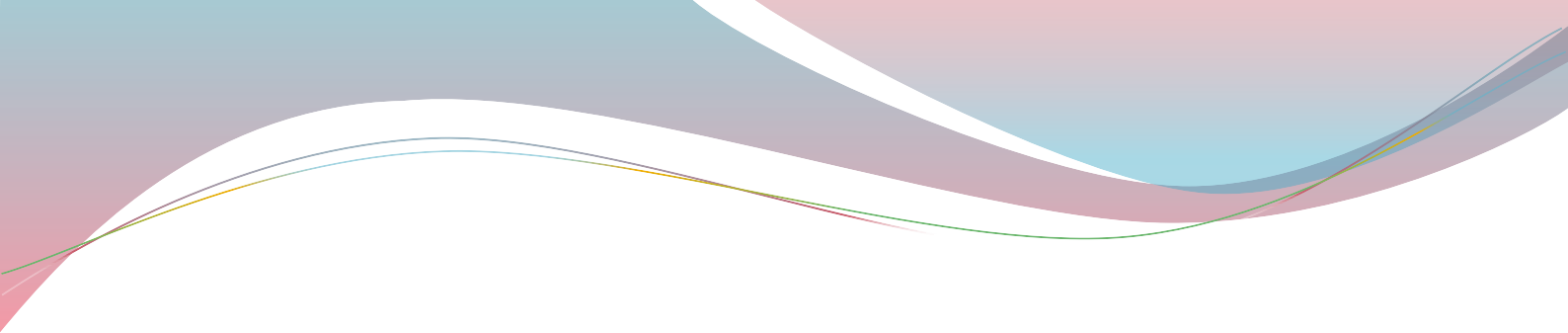
Generar un animal *knockout* para la enzima Dicer1, y caracterizar los lípidos intestinales y plasmáticos, lipidograma, genes relacionados con el metabolismo lipídico tras una carga oral de colesterol y triglicéridos, así como identificar, por métodos bioinformáticos, posibles microRNAs involucrados en el proceso.

2. Identificar miRNAs intestinales regulados por una dieta hipercalórica y en lipemia postprandial

Identificar y validar los posibles microRNAs involucrados en el metabolismo lipídico a nivel intestinal. Realizar screening de miRNAs intestinales en ratones tras una carga oral de colesterol y triglicéridos, o bajo una dieta hipercalórica a diferentes tiempos. Validar los miRNAs candidatos obtenidos en experimentos de cinética para seleccionar el tiempo de exposición adecuado y posteriormente dilucidar los cambios, y en una cohorte de animales expuesta a ese tiempo de experimentación que además permita diferenciar las modificaciones en la expresión en función del sexo y sección del intestino.

3. Evaluación inicial para analizar los mecanismos de acción de los miRNAs candidatos

Analizar, en diferentes modelos celulares, los mecanismos de acción de los miRNAs que presenten los cambios de expresión más significativos identificados en el objetivo 2. Realizar cinéticas de expresión de los miRNAs sobre los diferentes modelos celulares. El fin es seleccionar un firme candidato con el cual realizar estudios de sobreexpresión e inhibición sobre modelos celulares que permitan dilucidar el mecanismo de acción del miRNA candidato sobre la expresión génica a nivel celular y el microambiente intestinal.



MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL Y MÉTODOS UTILIZADOS CON LOS MODELOS *IN VIVO*

1.1. MODELOS MURINOS Y PROTOCOLO DE DESARROLLO

Todos los procedimientos realizados con animales incluidos en esta tesis doctoral se hicieron siguiendo las directrices europeas (86/609/EEC) que regulan el cuidado, utilización y la investigación con animales de experimentación y de acuerdo con el proyecto en el cual están incluidos (nº PROEX 281/15), previamente aprobado por el Comité de Experimentación Animal (CEEAA) del Hospital Universitario Ramón y Cajal (Madrid, España).

Los ratones C57BL/6 obtenidos de Charles River (Écully, Francia) fueron utilizados para los experimentos previos de screening, denominados “Long”, “Short” y “Pulse”, y el experimento de cinética que se detallan en la sección de resultados. El modelo murino *knockout* para la enzima *Dicer1*, específico de intestino, se utilizó para los experimentos de validación de los microRNAs candidatos y el análisis de la expresión génica.

La generación del modelo murino condicional específico de intestino *knockout* para *Dicer1* (o ratón deficiente de la enzima *Dicer1*, denominado KO en las secciones de Resultados correspondientes) requiere el cruce de dos líneas de ratones transgénicos (**Figura 11**).

Por un lado, se usan ratones con el alelo floxeado para *Dicer* (ratones *Dicer1*^{loxP/loxP}, B6.Cg-Dicer1tm1Bdh/J; JAX stock #006366) generados por Harfe y col. que presentan el exón 23 del alelo que codifica el gen *Dicer1* flanqueado por secuencias *loxP*, (Harfe *et al.*, 2005). Por otro lado, se usan ratones que expresan la recombinasa Cre específica de intestino (ratones *Villin-cre*, B6.Cg-Tg(*Vil1-cre*)997Gum/J; JAX stock #004586), generados por Madison y col. (Madison *et al.*, 2002). Con el cruce de ambas líneas se crea el KO condicional-espacial basado en la expresión controlada del gen de la recombinasa Cre bajo un promotor específico de tejido (*Villin*).

Tras realizar los cruces necesarios, tal y como se detalla en la Figura 11, y siguiendo el protocolo normal de cuidado y mantenimiento de camadas, los ratones jóvenes fueron destetados y separados por sexo veintiún días después del nacimiento. En ese momento se procedió a la identificación de los ratones mediante la colocación de aretes metálicos, numerados del 001 al 999, y se realizó el genotipado a partir de una pequeña porción de la cola.

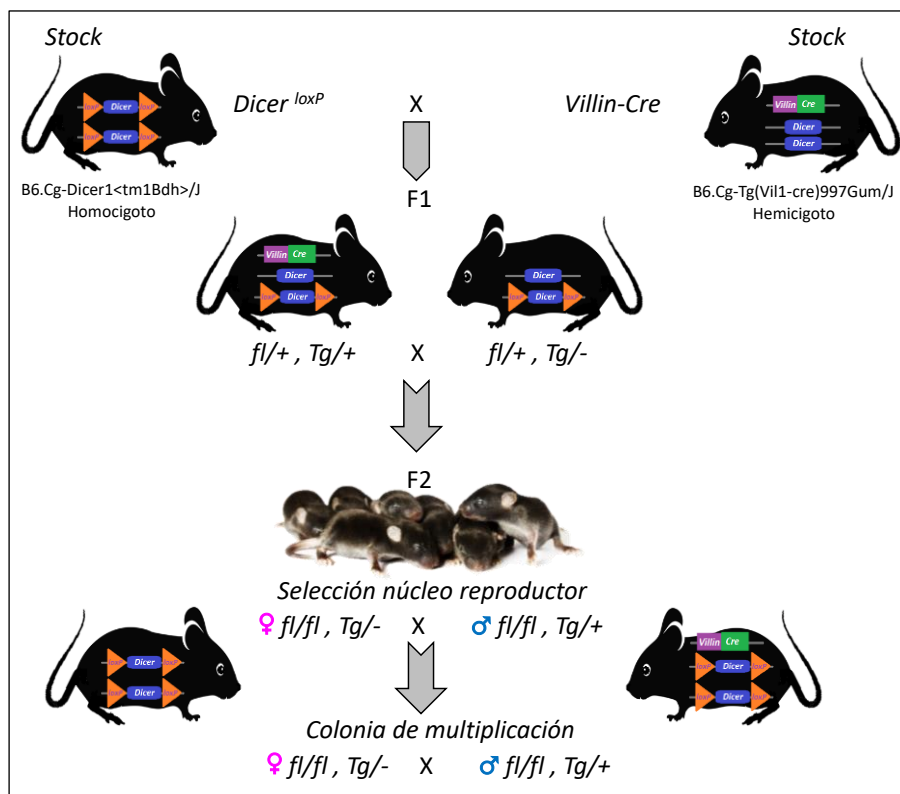


Figura 11. Representación esquemática del sistema de cría para la obtención de los animales de experimentación

De los cruces entre las dos líneas de ratones transgénicos (*Dicer*^{loxP} y Villin-Cre) se obtieron individuos heterocigotos (F1, denominados *fl/+*). Del cruce de estos individuos heterocigotos se seleccionaron aquellos que poseen el alelo floxeado para *Dicer1* en homocigosis (F2), estableciéndose un núcleo reproductor (cruces hermano x hermana) del cual se obtuvieron los individuos que constituyeron la colonia de multiplicación o expansión (cruces hermano x hermana). Ésta estaba formada por hembras con el alelo floxeado para *Dicer* (denominados *fl/fl*) pero que no poseen el transgén para la recombinasa Cre (denominadas Tg/-) que se cruzaron con machos que poseen el alelo floxeado para *Dicer* (*fl/fl*) y el transgén para la recombinasa Cre (denominados Tg/+). A partir de los cruces de esta colonia de multiplicación se obtuvieron los animales para los diferentes experimentos.

Todos los ratones fueron alojados en una instalación para animales estándar (en el animalario del Hospital Ramón y Cajal, en Madrid), con alimento y agua disponibles *ad libitum*, y mantenidos en salas de temperatura (25±2°C) e iluminación controladas (12h ciclos luz-oscuridad).

1.2. GENOTIPADO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS RATONES

El genotipado de los ratones se realizó siguiendo el protocolo descrito por Li y col. en 2007. El DNA se aisló de la porción final de la cola de cada ratón. El tejido se digirió mediante incubación a 100°C, durante 10 minutos, en 100 µL de tampón de lisis *Gittshier tail lysis buffer* (67 mM Tris pH 8.8, 16.6 mM (NH₄)₂SO₄, 6.5mM MgCl₂, 1% *basal modified Eagle* y 0.5% TritónX-100) . Después se añadió una mezcla de tampón de lisis *Gittshier tail lysis buffer* con 5% de proteinasa K y se incubó a 55°C durante 2 horas. Finalmente, el lisado fue hervido a 100°C durante 5 minutos, para inactivar la proteinasa K (Li et al., 2007).

A continuación, el DNA aislado fue utilizado para amplificar, mediante PCR, las distintas secuencias génicas. Las diferentes secuencias de *primers* utilizadas para realizar la amplificación de la región génica de interés se detallan en la **Tabla 1**, y los tamaños de los productos amplificados se presentan en la tabla adjunta a la Figura 13. Los parámetros de ciclado y condiciones de la reacción varían en función de los productos de amplificación buscados, y de las “*Tm*” de cada pareja de *primers*, como puede observarse en la **Tabla 2** y **Figura 12**. Se utilizó el termociclador *Applied Biosystems Thermal Cycler System* (Versión 2.09).

Tabla 1. Lista y secuencias de los *primers* usados en el genotipado de ratones.

<i>Primers</i> (oligos o cebadores) para el genotipado			
	<i>Primer</i>	Secuencia 5' → 3'	Tipo de primer
Vil-cre	<i>oIMR1878</i>	GTG TGG GAC AGA GAA CAA ACC	Transgén
	<i>oIMR1879</i>	ACA TCT TCA GGT TCT GCG GG	Transgén
	<i>oIMR8744</i>	CAA ATG TTG CTT GTC TGG TG	Control positivo interno sentido directo (Forward)
	<i>oIMR8745</i>	GTC AGT CGA GTG CAC AGT TT	Control positivo interno sentido inverso (Reverse)
Dicer	<i>oIMR6305</i>	CCT GAC AGT GAC GGT CCA AAG	Sentido directo (Forward)
	<i>oIMR6569</i>	CAT GAC TCT TCA ACT CAA ACT	Sentido inverso (Reverse)

Se muestra el tipo y la secuencia nucleotídica de los *primers* usados (Isogen), obtenidos a partir de los protocolos de genotipado de Laboratorios Jackson:

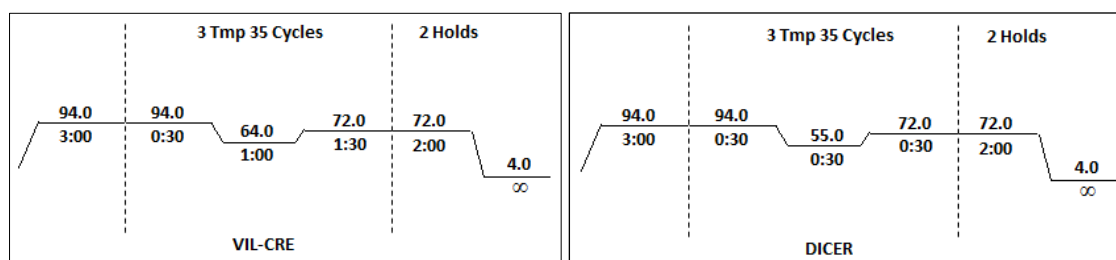
https://www2.jax.org/protocolsdb/f?p=116:2:0::NO:2:P2_MASTER_PROTOCOL_ID,P2_JRS_CODE:15105,018963

https://www2.jax.org/protocolsdb/f?p=116:2:0::NO:2:P2_MASTER_PROTOCOL_ID,P2_JRS_CODE:9139,006001

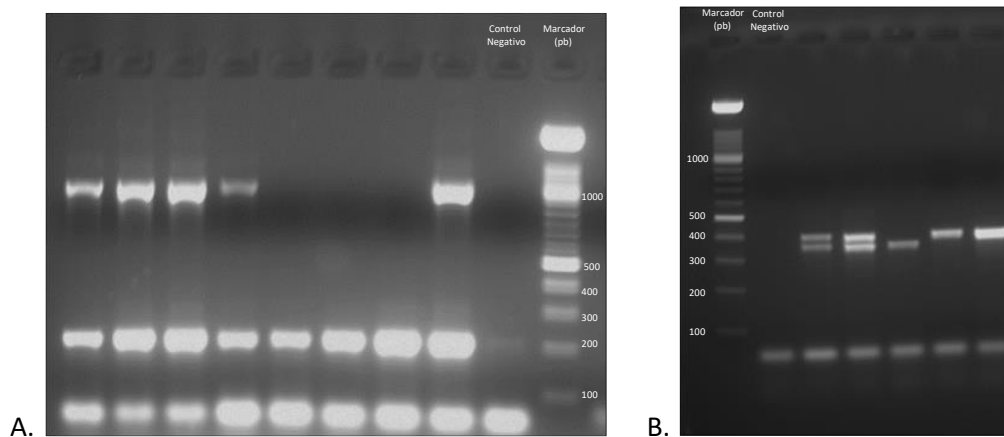
Tabla 2. Listado de reactivos usados en el genotipado de los ratones.

VIL-CRE					
COMPONENTE	Concentración de la solución madre	U	Concentración final	U	Volumen por reacción
H ₂ O					12.40
dNTP MIX (10mM each)	10	mM	0.2	mM	0.40
Primer A (<i>oIMR 1878</i>)	10	μM	0.2	μM	0.40
Primer B (<i>oIMR 1879</i>)	10	μM	0.2	μM	0.40
Primer C (<i>oIMR 8744</i>)	10	μM	0.6	μM	1.20
Primer D (<i>oIMR 8745</i>)	10	μM	0.6	μM	1.20
MgCl ₂	50	mM	3	mM	1.20
Buffer 10X libre de MgCl ₂	10	X	1	X	2.00
DNA Polimerasa	1	U/μl	0.05	U/μl	1.00
DNA genómico					1.00
VOLUMEN TOTAL					20
DICER					
COMPONENTE	Concentración de la solución madre	U	Concentración final	U	Volumen por reacción
H ₂ O					11.20
dNTP MIX (10mM each)	10	mM	0.2	mM	0.40
Primer A (<i>oIMR 6305</i>)	10	μM	0.5	μM	1.00
Primer B (<i>oIMR 6569</i>)	10	μM	0.5	μM	1.00
MgCl ₂	50	mM	3	mM	1.20
Buffer 10X libre de MgCl ₂	10	X	1	X	2.00
DNA Polimerasa	1	U/μl	0.05	U/μl	1.00
DNA genómico					1.00
VOLUMEN TOTAL					20

Se muestran las concentraciones de los componentes (Biotools) y *primers* (Isogen) optimizados para cada reacción

**Figura 12. Parámetros de ciclado para cada genotipado.**

Finalmente, para identificar los ratones *wild type* (WT, Dicer fl/fl y Tg/-) y KO (Dicer fl/fl y Tg/+), los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa en función de su tamaño (**Figura 13**), preparando un gel de agarosa (Fisher BioReagents, BP1356-500) al 1.5% para *Vil-cre* y al 2% para *Dicer*.



Resultados esperados	
Vil-cre	Transgén = 1100 pb
	Control interno positivo = 200 pb
Dicer	Mutante $\approx \sim 420$ pb
	Heterocigoto = 351 bp and ~ 420 pb
	Wild type (silvestre) = 351 pb

Figura 13. Diferentes productos de PCR en función del genotipo.

Ejemplos de geles de Agarosa que representan los fragmentos amplificados tras la PCR. Cada una de las calles de los geles corresponde al genotipado de un ratón, considerándose KO para *Dicer* cuando expresa *Cre*-recombinasa y posee los sitios *loxP* en homocigosis. A: Gel que representa la diferenciación entre *Cre* positivos (amplificación de la banda de 1100pb, Tg/+) y negativos (Sin banda, Tg/-) con su control interno (banda de 200pb). B: Gel que representa la diferenciación entre *Dicer* mutante (homocigoto para el alelo floxeado, fl/fl), heterocigoto (fl/+) y silvestre (que no posee el alelo floxeado para *Dicer*, +/+)

1.3. GRUPOS EXPERIMENTALES Y TRATAMIENTOS

1.3.1. Screening de microRNAs

Para la búsqueda de microRNAs intestinales regulados por una dieta rica en grasas (*High fat diet*, *HFD*), los microRNAs candidatos se obtuvieron de nuestros experimentos previos con machos C57BL/6 repartidos en tres grupos experimentales distintos, detallados más abajo, según la duración del tratamiento (20 semanas, 4 días o 2 horas). Cada uno de los grupos experimentales contiene animales “tratados” y animales “sin tratar o Control”.

El tratamiento para los grupos experimentales de 20 semanas y 4 días consistió en una dieta aterogénica comercial con colesterol añadido y fuente de colato (TD 02028 Laboratorios Harlan, **Tabla Suplementaria 1**) para el grupo de “animales tratados” y, pienso estándar (A04, Safe-lab) para el “grupo control”. El tratamiento del grupo experimental de 2 horas de duración consistió

en la administración oral de una solución de aceite de oliva (250 µL) enriquecida con 40 mg de colesterol, mientras que a los animales control se les administró agua.

En nuestros experimentos previos para la búsqueda de microRNAs candidatos se realizó:

- Experimento “Long”: Tratamiento largo de veinte semanas. N=4 para cada uno de los grupos: Tratado y Control.
- Experimento “Short”: Tratamiento corto de cuatro días. N=5 para cada uno de los grupos: Tratado y Control.
- Experimento “Pulse”: Tratamiento de 2 horas. Carga oral y obtención de las muestras a las dos horas tras la administración. N=5 para cada uno de los grupos: Tratado y Control.

Los animales se sacrificaron con una sobredosis de anestésicos (mezcla de ketamina/xilacina). Tras extraer los intestinos, éstos se lavaron con ayuda de una jeringa y 20 ml de solución salina (PBS, Lonza) estéril a fin de eliminar el exceso de contenido gástrico, e inmediatamente se congelaron las muestras en nitrógeno líquido conservándose a -80°C para su posterior análisis.

1.3.2. Cinética

Para el experimento de cinética, se analizaron a distintos tiempos, los niveles de expresión de los miRNAs (previamente seleccionados tras el *screening*) en el grupo de animales tratados (administración oral de 250 µL de aceite de oliva enriquecido con 40 mg de colesterol) y en el grupo control (administración oral de 250 µL de agua).

Se utilizaron 38 machos C57BL/6 divididos en 5 grupos experimentales correspondientes a 4 tiempos de exposición distintos y al control:

- Grupo 1: Control (C). Administración oral de agua. N = 8.
- Grupo 2: 30 minutos (30 min). Administración oral de aceite+colesterol. N = 7.
- Grupo 3: 1 hora (1 h). Administración oral de aceite+colesterol. N = 8.
- Grupo 4: 2 horas (2 h). Administración oral de aceite+colesterol. N = 8.
- Grupo 5: 4 horas (4 h). Administración oral de aceite+colesterol. N = 7.

De acuerdo a los grupos experimentales, los ratones fueron sacrificados a los 30 minutos, 1 hora, 2 horas o 4 horas tras la administración oral para la recogida de sangre y diferentes tejidos. Para ello, los animales fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal (IP) con una mezcla de Ketamina/Xilacina (80 mg/kg ket. + 20mg/kg xil.) y sacrificados por exanguinación, transfiriendo la sangre a un tubo con EDTA para la obtención de plasma. A continuación, los ratones fueron perfundidos con PBS 1X para eliminar todos los restos de sangre y recoger

diferentes tejidos (corazón, pulmón, hígado, bazo, riñón, estómago, intestino delgado, tejido adiposo, músculo esquelético, cerebro y cerebelo) aunque el objetivo de esta tesis solo compete el intestino delgado. Las muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta su posterior análisis.

1.3.3. Primera cohorte de animales *knockout* y *wild type*

Con la primera cohorte de animales generados se realizó la validación de los cambios en los niveles de expresión observados en los diferentes miRNAs candidatos en función del sexo, así como el estudio del papel de los miRNAs en el metabolismo lipídico en función del genotipo.

Se utilizaron animales KO (*Dicer^{fl/fl}*, Tg+) y animales WT (hermanos de camada, *Dicer^{fl/fl}*, Tg-). 91 ratones hembras y machos fueron divididos en cuatro grupos experimentales según su tratamiento y sexo:

- Grupo 1: WT Control (Para machos N = 12 y para hembras N = 10).
- Grupo 2: WT Tratados (Para machos N = 11 y para hembras N = 10).
- Grupo 3: KO Control (Para machos N = 12 y para hembras N = 11).
- Grupo 4: KO Tratados (Para machos N = 14 y para hembras N = 11).

De manera similar al experimento de cinética, los animales “Control” (1 y 3) recibieron una dosis oral de agua (250 µL), y los animales “Tratados” (2 y 4) recibieron una carga oral de una solución de aceite de oliva (250 µL) enriquecida con 40 mg de colesterol.

Todos los animales fueron sacrificados a las 2 h tras la administración oral, procediéndose a la recogida de sangre y diferentes tejidos. El procedimiento de anestesia, recogida de sangre, perfusión y obtención de tejidos es el mismo que se ha descrito para el experimento de cinética, siendo, el intestino delgado el único tejido analizado en esta tesis.

1.3.4. Segunda cohorte de animales *knockout* y *wild type*

La segunda cohorte de animales generados se utilizó para validar la expresión de los miRNAs candidatos finales en las diferentes porciones del intestino delgado, colon e hígado, para lo cual se utilizaron sólo los animales WT. Estas muestras también se utilizaron para el análisis de los lípidos intestinales que se realizó tanto en animales WT como KO.

Dentro de la segunda cohorte de animales generados KO y WT, 97 ratones hembras y machos fueron divididos en ocho grupos experimentales según su tratamiento y sexo. Se repitieron las

condiciones de tratamiento (carga oral suministrada a los grupos control y tratados) anteriormente citadas, a excepción de los tiempos de recogida, realizándose tanto a dos horas como cuatro horas tras la administración oral del tratamiento.

- Grupo 1: Hembras Control 2 horas (Para KO N = 6 y para WT N = 5).
- Group 2: Hembras Control 4 horas (Para KO N = 4 y para WT N = 5).
- Group 3: Hembras Tratadas 2 horas (Para KO N = 5 y para WT N = 9).
- Group 4: Hembras Tratadas 4 horas (Para KO N = 4 y para WT N = 9).
- Grupo 5: Machos Control 2 horas (Para KO N = 7 y para WT N = 4).
- Group 6: Machos Control 4 horas (Para KO N = 5 y para WT N = 4).
- Group 7: Machos Tratados 2 horas (Para KO N = 9 y para WT N = 8).
- Group 8: Machos Tratados 4 horas (Para KO N = 5 y para WT N = 8).

Como en experimentos anteriores, para la recolección de muestras, los animales fueron previamente anestesiados mediante inyección intraperitoneal de una mezcla de Ketamina/Xilacina y sacrificados por exanguinación. Tras extraer la sangre, los animales se perfundieron con PBS 1X, y únicamente se recogieron intestino delgado, colon e hígado, puntualizando que el intestino delgado se dividió en las diferentes porciones: duodeno, yeyuno e íleon.

1.4. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

La **sangre** de los ratones fue extraída por punción cardiaca y recolectada en tubos con EDTA-Na₂. La obtención del plasma se realizó tras la centrifugación de las muestras a 1500 g durante 15 minutos. El plasma se almacenó a -80°C hasta su posterior utilización para la determinación del perfil de lipoproteínas, y los niveles de triglicéridos y colesterol plasmáticos.

Los diferentes **tejidos** recolectados fueron inmediatamente congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C hasta su procesamiento, para extraer el RNA en el caso de los intestinos, y analizar los lípidos en intestino e hígado.

Para el análisis de la expresión proteica, se realizó un raspado de la mucosa intestinal utilizando una porción del intestino proximal y *buffer* de lisis RIPA (Sigma) con inhibidor de proteasas y fosfatasas, para posteriormente extraer y cuantificar las proteínas.

1.5. ANÁLISIS DE LÍPIDOS PLASMÁTICOS

La determinación cuantitativa de las concentraciones de colesterol total y triglicéridos en plasma se realizó con los kit comerciales “Colesterol-LQ CHOD-POD líquido” y “Triglicéridos-LQ GPO-POD” respectivamente (Spinreact, España). Estos ensayos colorimétricos se realizaron en placas de microtitulación siguiendo los protocolos especificados por la casa comercial.

1.6. PERFIL DE LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS

El perfil de lipoproteínas plasmáticas se analizó mediante el método de cromatografía líquida de alta eficacia (fast phase liquid chromatography, FPLC). Para realizar este análisis con más confianza, las muestras de plasma de varios animales se agruparon por genotipo y grupo de tratamiento. Esta determinación se realizó en colaboración con el Dr. Diego Gomez-Coronado, del servicio de Bioquímica-Investigación del Hospital Universitario Ramón y Cajal (Madrid).

1.7. ANÁLISIS DE LÍPIDOS EN TEJIDOS

El análisis de lípidos (colesterol, triglicéridos y fosfolípidos) de las muestras de tejido de la segunda cohorte de animales se realizó en el departamento de Bioquímica y Metabolismo perinatal de la Universidad San Pablo CEU. Como se detalla a continuación, la extracción de lípidos se realizó siguiendo el método de Folch (Folch *et al.*, 1957), seguido de su solubilización en agua mediante la adición de Tritón X-100 (Carr *et al.*, 1993) para la determinación enzimático-colorimétrica.

El tejido fue pulverizado utilizando un mortero y nitrógeno líquido. Para obtener el extracto de lípidos, 200mg de este tejido pulverizado se incubaron con 3mL de una mezcla de cloroformo-metanol (2:1) + BHT (50 mg/L) durante 4h en agitación por inversión. El sobrenadante se llevó a un tubo nuevo y este proceso se repitió dos veces más. El extracto obtenido para cada muestra se llevó a un volumen final de 10 mL con cloroformo-metanol (2:1). Después se añadieron 2,5 mL de agua destilada incubando la mezcla 20 minutos en agitación. Posteriormente, se centrifugó la mezcla a 1000 rpm durante 10 minutos a Tª ambiente, se eliminó la fase superior con un matraz Kitasato y se enrasó hasta 10 mL con metanol + BHT (10 mg/L). A continuación se añadieron 2,5 mL de cloruro sódico al 2% y se incubó 20 minutos en agitación. Se volvió a centrifugar a 1000 rpm durante 10 minutos a Tª ambiente y se eliminó la fase superior de nuevo. Finalmente, la fase restante se enrasó hasta 10 mL de nuevo con metanol + BHT (10 mg/L) obteniéndose así el llamado “Extracto de Folch”.

A continuación, se prepararon los patrones para: triglicéridos (Trioleína, Sigma) y colesterol (Colesterol, Sigma) en cloroformo, así como para fosfolípidos (Fosfatidilcolina, Sigma-Aldrich) en metanol. Las concentraciones que se utilizaron como “recta patrón” para determinar los niveles de lípidos son: 0 (sólo solvente), 12.5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL y 200 µg/mL.

Para realizar la valoración de los triglicéridos, colesterol y fosfolípidos en el extracto de Folch obtenido, se evaporaron las muestras y patrones en 1 mL de Tritón X-100 al 1,25% en un concentrador con bomba de calor. Una vez evaporado el solvente, se solubilizaron los extractos de las muestras en 0,5 mL de agua desionizada, agitando en vórtex e incubando las muestras en un baño con agitación (84 ciclos) durante 15 minutos a 37°C. Tras éste último paso, las muestras ya estaban listas para la determinación de lípidos.

La determinación de los lípidos se realizó siguiendo el protocolo especificado en los Kits comerciales enzimáticos colorimétricos de Spinreact (*Cholesterol CHOD-POD*, *Triglycerides GPO-POD* y *Phospholipids CHO-POD*), ya descritos en el apartado anterior. Para la lectura de las absorbancias a 500 nm, se utilizó un lector de microplacas (Bio-Tek Instruments, USA) y el software KC4.

2. MATERIAL Y MÉTODOS UTILIZADOS CON LOS MODELOS DE APROXIMACIÓN *IN VITRO*

2.1. CÉLULAS CACO-2 DIFERENCIADAS

El cultivo de las células epiteliales de adenocarcinoma colorrectal, Caco-2, (obtenidas de *American Type Culture Collection*, ATCC, Ref HTB37) se realizó sobre placas de cultivo celular estándar (100 x 20 mm, Falcon) en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con 10% de suero bovino fetal (*Fetal bovine serum*, FBS, Sigma-Aldrich), 1% de L-Glutamina (*L-Glutamine*, Lonza) y antibióticos (*Pen/Strep*, *Amphotericin B* (100X), Lonza). Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂. Para los sucesivos pases de las Caco-2, las células se lavaron con PBS estéril y despegaron de la placa tras incubación con 3 mL de Tripsina (Lonza) durante 3-5 minutos a 37°C. A continuación, se añadió medio DMEM para inactivar la tripsina y se recogieron las células, las cuales se homogeneizaron bien y se realizó el recuento con la cámara de Neubauer. La mezcla se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos y, en función del recuento, se añadió el medio de cultivo, y sembraron a una densidad de 300.000 células por placa (100x 20 mm, Falcon).

La diferenciación de las células Caco-2 se realizó entre los pases 28-55 (Briske-Anderson *et al.*, 1997). Las células Caco-2 fueron sembradas a una densidad de 120.000 células/pocillo sobre insertos Transwell® de policarbonato de 12 mm de diámetro con un tamaño de poro de 0,4 µm (Corning, NY). Los insertos se colocaron sobre placas de 12 pocillos y las monocapas de células se cultivaron durante tres semanas para alcanzar la confluencia necesaria para que las Caco-2 se diferenciases adquiriendo las características morfofuncionales presentes en un enterocito maduro (Pinto *et al.*, 1983; Hidalgo *et al.*, 1989).

A los 21 días, se prepararon las células para su tratamiento, para lo cual se realizaron dos lavados con PBS de los compartimentos superior e inferior de las placas Transwell y las células fueron incubadas o/n (*overnight*) en ausencia de FBS, utilizando medio DMEM suplementado con suero deficiente en lipoproteínas al 10% (*Lipoprotein Deficient Serum*, LPDS, Sigma-Aldrich).

2.2. ORGANOIDES INTESTINALES

Para la obtención de organoides intestinales (enteroides) de ratón (Sato *et al.*, 2009) se extrajo el yeyuno de un ratón sacrificado por dislocación cervical. Se lavó con PBS frío y se procedió al aislamiento de las criptas intestinales siguiendo el protocolo proporcionado por Stemcell (<https://www.stemcell.com/technical-resources/area-of-interest/organoid-research/intestinal-research/tech-tips-protocols/intestinal-epithelial-organoid-culture-with-intesticult-organoid-growth-medium-mouse-lp.html>).

Brevemente, sobre una placa Petri con PBS 1X el intestino se cortó longitudinalmente y se lavó de nuevo con PBS 1X, a continuación se cortó en secciones de unos 2 mm pasándolas a un tubo cónico de 50 mL donde se realizaron una serie de lavados con 10 mL de PBS 1X frío mediante pipeteo con una pipeta serológica hasta que el medio quedó claro, tras lo cual se incubó 15 minutos con 25 mL de reactivo de disociación celular "*Gentle cell dissociation buffer*" (Stemcell). Tras dejar que los segmentos se asentasen por gravedad, se eliminó el reactivo de disociación y se añadieron 10 mL de PBS 1X con BSA al 0,1% mezclando bien. De nuevo se dejaron asentar por gravedad los segmentos de intestino y el sobrenadante se pasó por un filtro de 70 µm obteniéndose la primera fracción de criptas. Esta acción se repitió hasta obtener 4 fracciones de criptas, que se visualizaron al microscopio para seleccionar aquella con mayor contenido en criptas intestinales, y más limpia de restos y células individuales. La fracción seleccionada se centrifugó a 200 g durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en DMEM/F12. Se utilizaron 10 µL de la mezcla para hacer un recuento de las criptas intestinales

contenidas en la fracción en un hemocitómetro. Con este dato, y según la concentración de criptas requeridas por pocillo y el número de pocillos, se centrifugó el volumen necesario. Tras eliminar el sobrenadante, se añadieron a partes iguales medio IntestiCult (*IntestiCult Organoid Growth Mouse Medium*, StemCell) y Matrigel (*Matrigel Growth Factor Reduced (GFR) Basement Membrane Matrix*, Corning), según el cálculo estimado en relación con el número de criptas y pocillos requeridos. Las criptas se sembraron pipeteando una gota (semiesfera denominada *dome*) en cada pocillo, de las placas de cultivo previamente atemperadas a 37°C.

Finalmente, tras incubar 10 minutos a 37°C para la gelificación de la suspensión de criptas contenidas en la matriz extracelular (Matrigel), se añadió el medio IntestiCult, que contiene los factores específicos que imitan la señalización presente en la base de la cripta intestinal *in vivo*. A los 5-7 días, se verificó el desarrollo completo de los enteroides y se procedió a su pase. Así, mediante la disociación de los enteroides desarrollados, rompiéndolos en fragmentos y volviéndolos a sembrar, se consiguió la expansión de los mismos para su tratamiento con micelas postprandiales.

2.3. TRATAMIENTO CON MICELAS POSTPRANDIALES

Las micelas postprandiales (*Post-prandial micelles*, PPM) se prepararon siguiendo el protocolo descrito por Chateau y col. (Chateau *et al.*, 2005), obteniéndose una composición final de las micelas de 0.6 mmol/L de ácido oleico (*Oleic acid*, OA, Sigma O1383), 0.2 mmol/L de L- α -*lysophosphatidylcholine* (LPC, Sigma L4129), 0.05 mmol/L de colesterol (CHOL, Sigma C3045), 0.2 mmol/L de 2-*monooleylglycerol* (2-MO, Sigma M7765), y 2 mM de Taurocolato (*Sodium taurocholate*, TC, Sigma T9034). A la vez se prepararon también “micelas vacías” (*Empty micelles*, EM), que se desarrollaron igual que las PPM pero excluyendo en su composición el ácido oleico y el colesterol, y se incluyeron en el experimento como control.

En el caso de las células Caco-2 diferenciadas, el tratamiento se preparó en medio DMEM con LPDS al 10%. Se generaron tres condiciones: una únicamente con medio (DMEM con LPDS al 10%), otra de medio con “micelas vacías” y la que incluía las PPM en el medio. Tras la incubación o/n en medio DMEM con LPDS al 10% mencionada anteriormente, se eliminó el medio y se añadió el tratamiento. Cada uno de los tratamientos correspondientes se administró sobre la parte apical (compartimento superior del inserto), manteniendo el compartimento inferior (en contacto con la parte basal de las células) con medio DMEM + LPDS al 10%. Tras 20-24 h de incubación con el tratamiento, se recogieron 200 μ L del medio basal (compartimento inferior) y guardaron a -80°C para el posterior análisis de la secreción de lipoproteínas. Finalmente, se

eliminó el medio del compartimento superior (parte apical) del inserto, que contiene las células, y se recogió con 600 μ L de *QIAzol Lysis Reagent* (Qiagen), almacenándose el lisado celular a -80°C para la posterior extracción del RNA.

En el caso de los enteroides, se procedió de manera similar para la preparación de los tratamientos, sustituyendo el DMEM con LPDS al 10% por DMEM/F12. Se generaron las mismas tres condiciones (medio solo, EM y PPM) y para la administración del correspondiente tratamiento se eliminó el medio *IntestiCult* del pocillo y se añadió el tratamiento. A las 24 horas se eliminó el volumen de tratamiento, se añadieron 0.5 mL de *QIAzol Lysis Reagent* a cada pocillo para recoger los enteroides disgregando el matrigel. Se almacenaron a -80°C hasta que se procedió al aislamiento de RNA.

2.4. ANÁLISIS DE LA SECRECIÓN DE APOLIPOPROTEÍNAS

La determinación de los niveles de lipoproteínas secretadas por las células Caco-2 diferenciadas tras el tratamiento con las micelas, se realizó con dos kits de ensayos ELISA, específicos para determinar los niveles de Apolipoproteína A1 (ApoA1) y Apolipoproteína B (ApoB) (ELISA^{PRO} kit, Mabtech), siguiendo el protocolo descrito en cada caso por el fabricante.

Para ambos, tras medir la absorbancia en un lector de microplacas a 450 nm, se estableció una “recta patrón” con la absorbancia de cada estándar proporcionado por el kit y se calculó la ecuación lineal de la recta patrón para determinar la concentración de ApoA1 y ApoB en las muestras interpolando los valores de absorbancia.

3. EXTRACCIÓN Y PROCESAMIENTO DEL RNA

3.1. EXTRACCIÓN DE RNA Y ANÁLISIS DE INTEGRIDAD

El RNA total incluyendo pequeños RNAs de las diferentes muestras, se aisló y purificó utilizando el kit *miRNeasy Mini Kit* (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante para células animales o tejidos según correspondía.

En el caso de la extracción del RNA de las células Caco-2 y enteroides, se partió de todo el volumen obtenido y ya congelado a -80°C en el reactivo de lisis *QIAzol* (*QIAzol lysis Reagent*, Qiagen).

Para la extracción de RNA de tejidos, se partió de material previamente pulverizado y homogeneizado con 600 μ L de reactivo de lisis QIAzol, que facilita su lisis y previene la degradación del RNA inhibiendo las RNasas, utilizando un homogeneizador *TIO basic ULTRA-TURRAX* (IKA®). Según resultados de extracciones previas y dado que el material de partida excedía las recomendaciones especificadas en el protocolo del kit (máximo de 50mg de tejido), se tomaron 250 μ L del homogeneizado y se añadieron otros 750 μ L del reactivo de lisis QIAzol.

Brevemente, el procedimiento de extracción para ambos se compone de los siguientes pasos: tras la adición de cloroformo, el homogeneizado fue separado en una fase acuosa y otra orgánica mediante centrifugación a 4°C. Trás el asilamiento de la fase acuosa que contiene el RNA, se le añadió etanol para proporcionar las condiciones de unión necesarias para que todas las moléculas de RNA de más de 18 nucleótidos se puedan unir a la membrana de sílice que tiene la columna del kit. El fenol y otros contaminantes fueron eliminados mediante sucesivos lavados de la columna de afinidad. Durante esta purificación, para la eliminación de posible DNA genómico contaminante, se realizó un paso de degradación del DNA utilizando la DNasa del kit *RNase-free DNase Set* (Qiagen). Finalmente, el RNA fue eluído en agua libre de RNasas (un volumen de 30-50 μ L para el RNA obtenido de células y enteroides, y 100 μ L para el RNA obtenido de los diferentes tejidos).

La cantidad de RNA aislado se cuantificó usando el espectrofotómetro Nanodrop-2000 (ThermoScientific), con el que además se pudo analizar la pureza de los extractos con los ratios 260/280 y 260/230.

Para definir la buena calidad del RNA aislado, además de la pureza, se evaluó la integridad del RNA con el análisis *Eukaryote Total RNA Nano assay* en el sistema bioanalizador *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Servicio de Genómica del Parque Científico de Madrid) (**Figura Suplementaria 1**).

3.2. RNA-SEQ

La lista de microRNAs obtenida de los resultados de los arrays para los experimentos “Long”, “Short” y “Pulse” se complementó con los datos obtenidos de la secuenciación masiva del transcriptoma, RNA-Seq, realizada en las muestras de “Short” y “Pulse”.

Las muestras de RNA de ambos experimentos se envió para su procesamiento a través del servicio externo *BGI Genomics* (www.bgi.com), obteniéndose el dato de la expresión diferencial de los RNAs pequeños.

Para el análisis de expresión diferencial de microRNAs en células Caco-2 diferenciadas frente a Caco-2 no diferenciadas y en enteroides en respuesta al tratamiento con micelas, se utilizó el servicio externo *Sistemas Genómicos* (Paterna, Valencia). Para obtener el resultado de la secuenciación del micro-transcriptoma de las muestras, los datos se analizaron a distintos niveles:

- Control de calidad primario de las secuencias generadas (mediante fastqc, <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>)
- Alineamiento de las lecturas, identificación y cuantificación. Según el protocolo indicado por miARmaSeq, las lecturas fueron mapeadas frente a la versión del genoma (GRcm38) y frente a las secuencias de microRNAs maduros y precursores obtenidos de la versión 22 de miRBase.
- Estudio de expresión diferencial, mediante la comparación entre muestras control y tratados empleando el algoritmo EdgeR.

3.3. SÍNTESIS DEL DNA COMPLEMENTARIO Y PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

Para la cuantificación de miRNAs y mRNAs, un μg de RNA total en el caso de tejidos y 0.5 μg de RNA total para células y enteroides, obtenido de cada muestra, se retrotranscribió a DNA complementario (cDNA) utilizando el Kit comercial *miScript II RT Kit* (Qiagen), en un volumen final de 20 μL y siguiendo las instrucciones del fabricante (**Tabla 3**). Esta reacción de retrotranscripción (RT-PCR) se llevó a cabo en un termociclador (*GeneAmp Thermal Cycler 2720*, Applied Biosystems), y consistió en un periodo de 60 minutos a 37°C seguido de una incubación a 95°C durante 5 minutos para inactivar la transcriptasa. El cDNA obtenido fue diluido en función de la aplicación posterior.

Tabla 3. Componentes de la reacción de retrotranscripción.

COMPONENTE	Volumen/reacción
5x miScript HiFlex buffer*	4 μL
10x Nucleics Mix	2 μL
RNase-free water	Variable
miScript Reverse Transcriptase Mix	2 μL
Template RNA	Variable
Volumen total	20

*De acuerdo con las especificaciones del kit, se utilizó *miScript HiFlex buffer* para la síntesis de cDNA, ya que permite la cuantificación de miRNA maduro, miRNA precursor, otros ncRNAs y/o mRNA del mismo cDNA.

Para el estudio por PCR a tiempo real de genes relacionados con componentes celulares, identidad y maduración del intestino, en animales WT y KO que conforman las cohortes de experimentación, se utilizaron parejas de oligos (**Tabla 4**) obtenidas a través de la herramienta pública online PrimerBank (Wang, 2003; Spandidos *et al.*, 2008, 2010) (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>) o diseñados con la plataforma online Primer-BLAST a partir de las secuencias para cada gen (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) y utilizando el software Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) (Koressaar and Remm, 2007; Untergasser *et al.*, 2012; Kõressaar *et al.*, 2018).

En el screening inicial de miRNAs, el cDNA de los experimentos Long, Short y Pulse se utilizó para el análisis de expresión diferencial de los miRNAs en función del tratamiento, utilizando paneles de microRNAs maduros *-miRNome panels-* (641 miRNAs maduros) Version 3 (Exiqon, Dinamarca).

Tabla 4. Secuencias de oligos (*primer sets*) para el estudio de genes relacionados con la composición e identidad del intestino.

<i>Primer</i>	<i>Forward (Fw)</i>	<i>Reverse (Rev)</i>
<i>Lgr5</i>	CGTCCCACTTCCTTCCTGTC	TATGCTGGCGTGGGTAAAGG
<i>Mki67</i>	ACCATCATTGACCGCTCCTT	TATCTGCAGAAAGGCCCTTGG
<i>Dicer-1</i>	TCACTAGGGCACTTGCAATGGAAC	ACTGCATCTCAGGCTCATTTGTC
<i>Vil-1</i>	GGAGGATCGAGGCTATGCAG	GAGAGTGCTGCTGGTCTTGT
<i>Lyz-1</i>	GAGACCGAAGCACCGACTATG	CGGTTTTGACATTGTGTTTCGC
<i>Muc2</i>	CCTGAAGACTGTCGTGCTGT	GGGTAGGGTCACCTCCATC
<i>Chgb</i>	CAGACGAAGGTAGGCAATGAG	GGTTGGAGGGACGGAGACT
<i>Gata4</i>	TCAACCGGCCCTCATTAAG	GTGGTGGTAGTCTGGCAGT
<i>Dpp4</i>	CAGCTCATCCTCTAGTGCGG	GTAGCCACACCATCACA
<i>Slc2a2</i>	ATCACCGGAACCTTGCTTT	CAGCTTCCGGTCATCCAGT
<i>Alpi</i>	ATGATGCCAACCAGAAACCCC	GCGTGTCTTCTCATTGGTAA
<i>lqgap2</i>	ACGCCCTTCAAGACACAGAG	GGCAATGTTGTTCCGGTTCC

Secuencias de las parejas de oligos para cada uno de los genes utilizados en el estudio de las características celulares, identidad y maduración del intestino para los animales WT y KO que conforman la cohorte 1.

En cuanto al análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa, se utilizaron paneles prediseñados para realizar la selección de los genes del metabolismo lipídico diferencialmente expresados en función de la ausencia/presencia de miRNAs, frente al tratamiento. *RT2 Profiler PCR Array Mouse Lipoprotein & Cholesterol 384 Well (4x96)* (Cat nº 330231 PAMM-080ZA, Qiagen) permite el análisis de la expresión de 84 genes clave en el transporte de lipoproteínas y

metabolismo de colesterol en el ratón (**Tablas Suplementarias 2 y 3**). La matriz incluye receptores de LDL y HDL así como sus proteínas asociadas. La matriz también incluye genes clave implicados en el metabolismo del colesterol. Para este screening se seleccionaron al azar muestras de cDNA de cada grupo de animales de la cohorte 1, y los genes seleccionados fueron validados en el resto de muestras de la cohorte.

El estudio de la expresión y validación de los candidatos en las muestras de cinética, y cohortes 1 y 2 se realizó por PCR a tiempo real utilizando la mezcla ya preparada miScript SYBR Green qPCR Master Mix (Qiagen), el cDNA y las parejas de *primers* (en el caso de análisis de expresión de genes, **Tabla 5**) o el *primer* para cada microRNA y el *primer* universal proporcionado por el kit (en el caso del análisis de expresión de miRNAs, **Tabla 6**) según las especificaciones del fabricante (**Tabla 7**). Los sistemas de PCR a tiempo real utilizados fueron el Applied Biosystems 7900HT Real Time PCR (**Figura 14**) y el QuantStudio 12K Flex (**Figura 15**).

Tabla 5. Secuencias de los oligos usados para la determinación de la expresión de genes del metabolismo lipídico y de lipoproteínas.

<i>Primer</i>	<i>Forward (Fw)</i>	<i>Reverse (Rev)</i>
<i>Hmgcs2</i>	GAAGAGAGCGATGCAGGAAAC	GTCCACATATTGGGCTGGAAA
<i>Nr0b2</i>	GGGAGCAGGAAGCTGTACTTTCAA	ATGAGTCCCCTCCAGCAAGACTAA
<i>Olr1</i>	CCAGCCTCAGCATCTCAAGTTACA	GTTAAGAGCACTGCTTGCCTTTCC
<i>Prkaa2</i>	CAGGCCATAAAGTGGCAGTTA	AAAAGTCTGTCGGAGTGCTGA
<i>Soat1</i>	TACCGAGACAACTACCCAAGGACT	GCACTGAAGGGCTCCTGTTTGATA
<i>Dicer1</i>	TCTACTAGGGCACTTGCAATGGAAC	ACTGCATCTCAGGCTCATTTGTC
<i>Abca1</i>	GGATACAATCGATGCGTCTGACCT	ACGGATGACATTGAGCACTGGT
<i>Abca2</i>	CGCAGTTTGATGCCCTGTTTGA	AGAAAGATGAAGGCAGGGTACCCA
<i>Apoa4</i>	TGGGGATGCTAGTACGTATGCTGA	TGCTCCTGCAACTTCTGCATGT
<i>Apob</i>	TCTTTCAGGATCCCTCACTTCCCA	TAAATGCTCCCCAGTGACACCTCT
<i>Apoc3</i>	TAAGTAGCGTGCAGGAGTCCGATA	ATAGCTGGAGTTGGTTGGTCTCTCA
<i>Cnbp</i>	GGGTTCCAGTTTGTTCCTCGTCT	TCCTTGCACTCCTTGGAATGT
<i>Crp</i>	CGGAGATGTGAACATGTGGGACTT	GTGCCCAGTTCAAAACATT
<i>Cyb5r3</i>	GACGGTGAAGTCTGTAGGCATGAT	CGAGCAGAATGTTTCGTTCTCAGT
<i>Lep</i>	AAGCAGTGCCTATCCAGAAAGTCC	ATAGACTGCCAGAGTCTGGTCCAT
<i>Lipe</i>	TGTGTTAGAGGGAGGGTGAAGGAT	GGTGCCTGGTACACTCCAAATGTT
<i>Osbp1a</i>	AGACCCTGCCACTTTTGATGCT	TCGGAATCTGGCACTGGCATTT
<i>Stard3</i>	AGGAAGTAATCCTGCAGCCTGAGA	CCGCTCAATACGTCGGACATTCA

Secuencias de los oligos para cada uno de los genes seleccionados para validar. Para su diseño se utilizó el programa informático Ape.exe y el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Para la comprobación de las secuencias se utilizó el programa Amplic. Condiciones de diseño de secuencias: Fragmento entre 100-300 nt y Tm entre 58°C-63°C.

Tabla 6. Secuencias de los oligos usados para la determinación de la expresión de los miRNAs candidatos

Nombre del oligo	Secuencia (5' a 3')
mmu-miR-218-2-3p	CATGGTTCTGTCAAGCACCGCG
mmu-miR-138-1-3p	CGGCTACTTCACAACACCAGGG
mmu-miR-147-3p	GTGTGCGGAAATGCTTCTGCTA
mmu-miR-217-5p	TACTGCATCAGGAACTGACTGGA
mmu-miR-449c-5p	AGGCAGTGCATTGCTAGCTGG
mmu-miR-146b-3p	GCCCTAGGGACTCAGTTCTGGT
mmu-miR-212-3p	TAACAGTCTCCAGTCACGGCCA
mmu-miR-216a-5p	TAATCTCAGCTGGCAACTGTGA
mmu-miR-216b-5p	AAATCTCTGCAGGCAAATGTGA
mmu-miR-711	GGGACCCGGGGAGAGATGTAAG
mmu-miR-10b-3p	CAGATTGATTCTAGGGGAATA
mmu-miR-346-5p	TGTCTGCCCGAGTGCCTGCCTCT
mmu-miR-370-3p	GCCTGCTGGGGTGGAACCTGGT
mmu-miR-544-3p	ATTCTGCATTTTTAGCAAGCTC
mmu-miR-452-5p	TGTTTGAGAGGAACTGAGAC
mmu-miR-202-5p	TTCCTATGCATATACTTCTTT
mmu-miR-193b-5p	CGGGGTTTTGAGGGCGAGATGA
mmu-miR-431-3p	CAGGTCGTCTTGACAGGGCTTCT
mmu-miR-129-2-3p	AAGCCCTTACCCCAAAAAGCAT
mmu-miR-21a-3p	TGAGGTAGTAGTTTGTGCTGTT
let-7i-5p	TGAGGTAGTAGTTTGTGCTGTT
mmu-miR-542-5p	CTCGGGGATCATCATGTCACGA
mmu-miR-21a-5p	TAGCTTATCAGACTGATGTTGA
mmu-miR-154-5p	TAGGTTATCCGTGTTGCCTTCG
mmu-miR-23a-3p	ATCACATTGCCAGGGATTTC
mmu-miR-133a-3p	TTTGGTCCCCTTCAACCAGCTG
mmu-miR-598-3p	TACGTCATCGTCGTCATCGTTA
mmu-miR-133b-3p	TTTGGTCCCCTTCAACCAGCTA
mmu-miR-9-5p	TCTTTGGTTATCTAGCTGTATGA
mmu-miR-199a-3p	ACAGTAGTCTGCACATTGGTTA
mmu-miR-143-3p	TGAGATGAAGCACTGTAGCTC
mmu-miR-208b-3p	ATAAGACGAACAAAAGTTTGT
mmu-miR-491-3p	CTTATGCAAGATTCCCTTCTAC
mmu-miR-764-5p	GGTGCTCACATGTCCTCCT
mmu-miR-337-5p	GAACGGCGTCATGCAGGAGTT
mmu-miR-770-5p	AGCACCACGTGTCTGGGCCACG
mmu-miR-122-5p	TGGAGTGTGACAATGGTGTGTTG
mmu-miR-145a-5p	GTCCAGTTTTCCAGGAATCCCT
mmu-miR-451a	AAACCGTTACCATTACTGAGTT
mmu-miR-132-3p	TAACAGTCTACAGCCATGGTCG
mmu-miR-150-5p	TCTCCCAACCCTTGTACCAAGT
mmu-miR-31-3p	TGCTATGCCAACATATTGCCATC
mmu-miR-217-3p	CATCAGTTCCTAATGCATTGCCT
mmu-miR-532-3p	CCTCCACACCCAAGGCTTGCA
mmu-miR-186-3p	GCCCTAAGGTGAATTTTTTGGG

Secuencias de los oligos obtenidas a partir de las secuencias de miRBase para cada miRNA maduro

Tabla 7. Composición de la reacción de PCR a tiempo real.

COMPONENTE	Volumen/reacción
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	5 μ L
10x miScript Universal Primer (reverse primer)	1 μ L
miRNA specific primer (forward primer)	1 μ L
Template cDNA (diluted)	3 μ L
Volumen total	10 μ L

Composición de la reacción para la cuantificación por PCR a tiempo real de miRNAs maduros. Para la detección de mRNA se usó el mismo cDNA y se utilizaron los mismos volúmenes de cada componente de la reacción exceptuando que el *Universal primer* y el *miRNA specific primer* se sustituyeron por la pareja de oligos correspondiente, *Reverse* y *Forward* respectivamente, para cada gen.

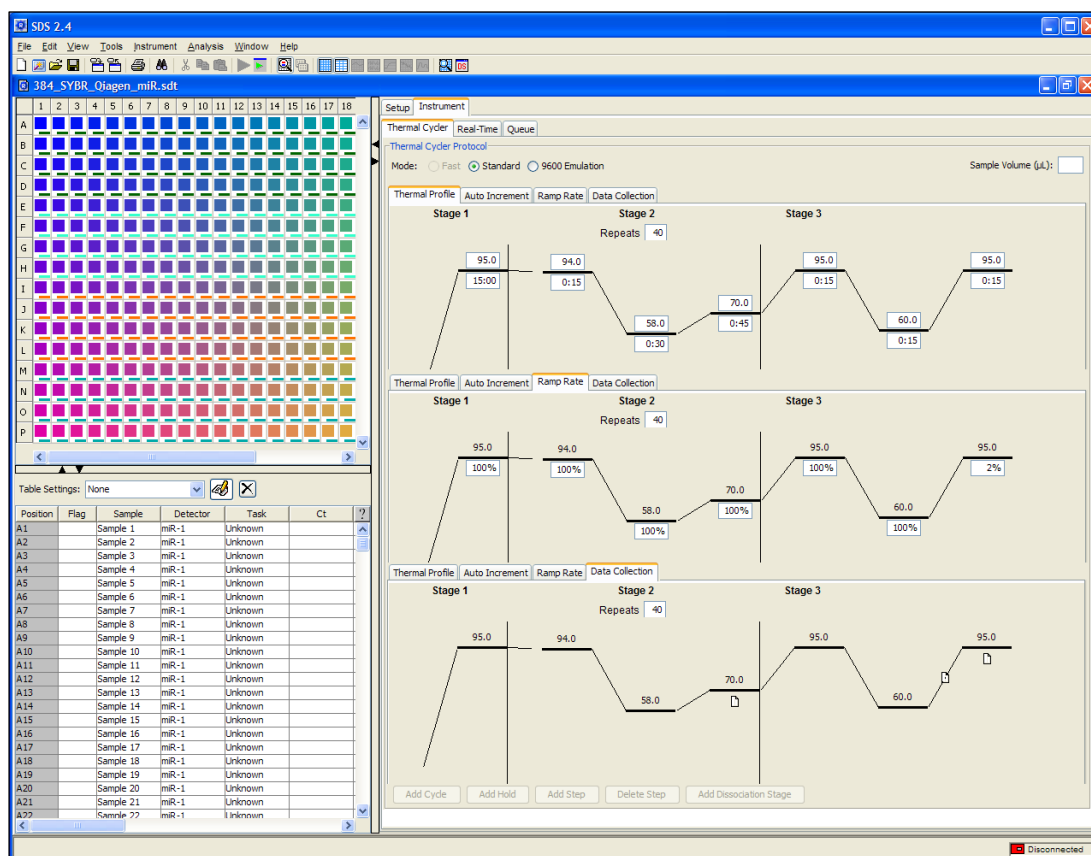


Figura 14. Condiciones de ciclado PCR cuantitativa a tiempo real en el programa SDS 2.4 del equipo 7900 HT.

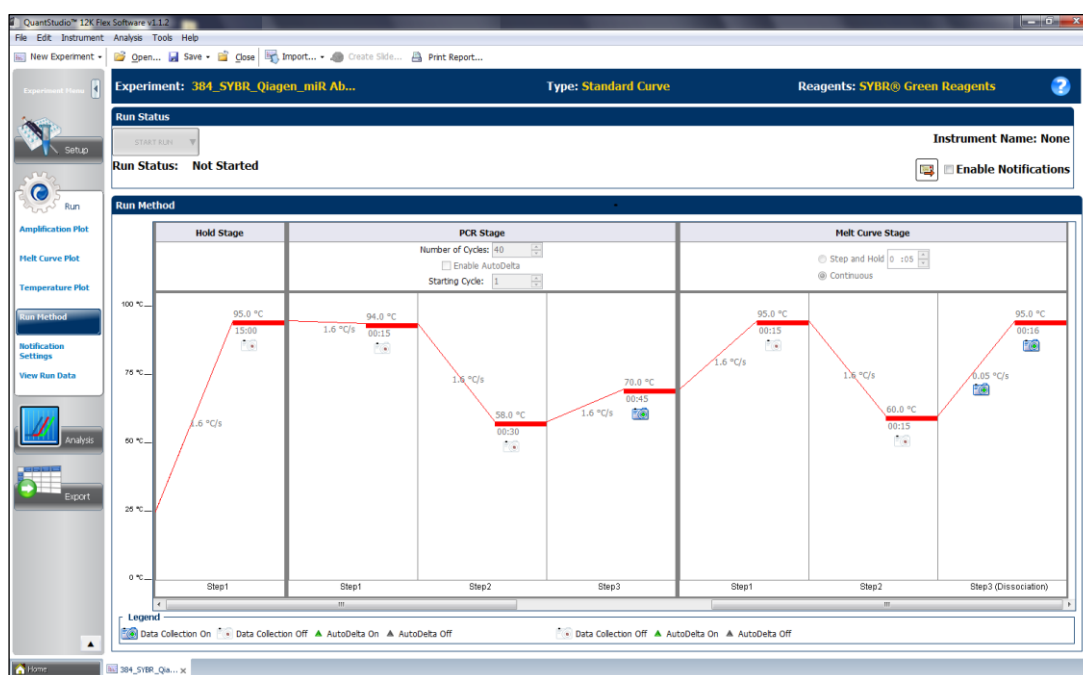


Figura 15. Condiciones ciclado PCR cuantitativa a tiempo real en el programa *QuantStudio 12K Flex v1.1.2*.

Ya que no se utilizaron sondas fluorogénicas específicas sino que la detección de nuestros productos de amplificación se basó en el colorante fluorescente *SYBR Green I*, que se une de manera inespecífica al DNA bicatenario presente en la muestra, introdujimos un control negativo (para determinar si hay contaminación presente) y añadimos un paso con un gradiente de temperatura creciente o curva de disociación (curva de *melting*) para monitorizar la cinética de disociación de los productos amplificados. Tras la realización de la qPCR, verificamos las curvas de amplificación, duplicados, curvas de disociación (y temperatura de *melting* para identificar los fragmentos amplificados y diferenciarlos de los dímeros de primers u otros artefactos de la amplificación) y estabilidad de los respectivos normalizadores. Para la cuantificación relativa de la expresión de cada microRNA o gen (mRNA) utilizamos el método de la doble delta Ct, a partir de los datos de Ct (Ciclo umbral, *cycle threshold*, Ct) y normalizando los valores con respecto a RNU1A1, RNU43 y RNU6 para miRNAs; y GAPDH y ACTINAB como genes normalizadores para la estimación de la expresión relativa de los genes.

4. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

El análisis de proteínas mediante *Western blot* se realizó en muestras de mucosa intestinal de animales WT y KO para determinar la presencia o ausencia de la proteína DICER en el intestino de los ratones generados. Además, se utilizó para la validación de la expresión de los genes seleccionados del *screening* previo en muestras de mucosa intestinal obtenida de animales de la cohorte 2.

Para la **extracción y cuantificación** de las proteínas, se raspó la mucosa intestinal, colocándola en tampón RIPA (Sigma) junto con inhibidores de proteasas (*Protease inhibitor cocktail Complete*, Roche) y fosfatasa (*PhosSTOP*, Roche). A continuación, se sonicaron las muestras 5 minutos a máxima potencia en hielo y se centrifugó el lisado a 13,000 rpm durante 20 minutos a 4°C, tras lo cual se recogió el sobrenadante para cuantificar la proteína total. La concentración de proteína se determinó utilizando el método de Bradford (*Kit Protein Assay*, Bio-Rad).

Las proteínas se separaron mediante **electroforesis** en gel de poliacrilamida con SDS al 10% (SDS-PAGE) para los extractos de proteínas (40 µg de proteína por muestra) y posteriormente se realizó la **electrotransferencia** de las proteínas a membranas de nitrocelulosa (0.45µM), en la que se realizará la inmunodetección de las proteínas de interés.

Para la **inmunodetección** de las proteínas primeramente se incubaron las membranas con solución de bloqueo (leche en polvo al 5% en TTBS, conteniendo Tampón Tris-HCl y Tween al 0,5%) durante una hora a temperatura ambiente; posteriormente se incubaron durante toda la noche (o/n) a 4°C en agitación suave con el anticuerpo primario correspondiente: policlonal de conejo contra DICER (*Rabbit polyclonal antibody* A301-936A, Bethyl Laboratories, en dilución 1:2000), monoclonal de ratón contra HSP90 (610418, BD Biosciences, en dilución 1:2000), monoclonal de conejo contra HMGCS2 (*Rabbit monoclonal antibody* D3U1A, CellSignaling Technologies, en dilución 1:500), policlonal de conejo contra ACAT1 (*Rabbit polyclonal antibody*, CSB-PA001134LA01HU, Cusabio, en dilución 1:1000) y policlonal de conejo frente a OLR1 (*Rabbit polyclonal antibody*, CSB-PA016331LA01HU, dilución 1:1000). Tras la incubación o/n se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TTBS a temperatura ambiente, se incubaron las membranas durante 1 hora con el anticuerpo secundario fluorescente (Invitrogen) específico contra la especie originaria del primario tras lo cual se retiró y se lavaron las membranas con TTBS (10 minutos, 3 veces). Las bandas de proteína se visualizaron con el sistema *Odyssey Infrared Imaging System* (Li-COR) y se densitometrizaron con el programa informático *ImageJ* para cuantificar su intensidad.

5. PROCESAMIENTO, REPRESENTACIÓN Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los resultados obtenidos en el *screening* con el *array* de genes del metabolismo de lipoproteínas y colesterol se procesaron con el método de la doble delta Ct ($2(-\Delta\Delta C(T))$ method) (Livak and Schmittgen, 2001) y se representaron mediante *volcano plot* y *heat map* utilizando el programa *GraphPad Prism*, versión 7.00 para Windows (*GraphPad Software*, La Jolla, California, USA). Para el análisis estadístico de las diferencias de expresión de los genes entre los grupos se utilizó T-test múltiple, considerando la significancia estadística para un valor de $p < 0,05$. Se utilizó la misma metodología para la validación de cada gen candidato, representándose su expresión relativa en función del genotipo y tratamiento, y analizando su significación mediante *Two-way ANOVA*, aplicando la corrección por el test de Sidak para las comparaciones múltiples.

Los resultados del *screening* de miRNAs con los experimentos “Long”, “Short” y “Pulse” fueron analizados utilizando el software de análisis GenEx (*MuldiD Analyses*). Para ajustar los valores-p obtenidos por comparaciones múltiples se llevó a cabo el método de Benjamini-Hochberg para la estimación del *false discovery rate* (FDR, tasa de falsos descubrimientos). Los microRNAs comunes entre los experimentos del *screening* fueron representados en un diagrama de Venn utilizando la herramienta online VENNY (Oliveros, 2007).

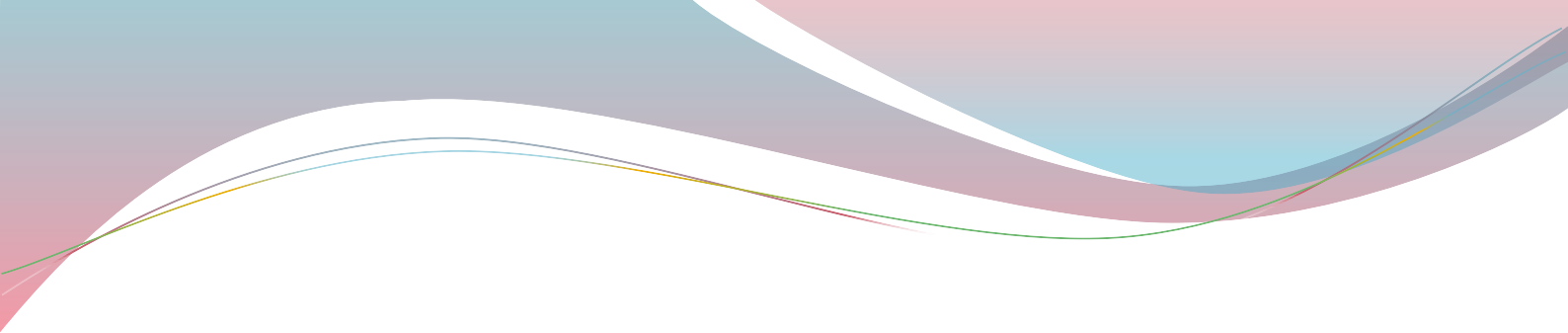
En el caso de los experimentos de cinética, 1ª y 2ª cohortes, las cantidades relativas de los microRNAs sometidos a estudio en los diferentes experimentos fueron calculadas con el método de la doble delta Ct y representados utilizando el programa *GraphPad Prism*. La significancia estadística de las diferencias entre microRNAs fueron calculadas mediante análisis de la varianza. Para la comparación de la media de cada tiempo de tratamiento con la media del control para la cinética se utilizó *One-way ANOVA*, y la corrección por la prueba Dunnett de múltiples comparaciones (*Dunnett's multiple comparisons test*). Para las cohortes 1 y 2 que incluían dos factores (tratamiento y sexo) se utilizó *Two-way ANOVA*, aplicando la corrección por el método de Bonferroni para las comparaciones múltiples.

Los resultados de la determinación de los lípidos plasmáticos, intestinales y hepáticos (cohorte 2) en función del tratamiento y genotipo se expresaron como media $\pm$ desviación estándar (media $\pm$ SD) y el análisis estadístico se realizó mediante *ANOVA* de dos vías (*Two-way ANOVA*) y comparaciones múltiples *post hoc* utilizando la corrección por el método de Bonferroni.

Para la detección y eliminación de valores atípicos (*outliers*) se utilizó el método *ROUT* ($Q = 10\%$), que posee el programa *GraphPad* para el análisis de columnas y eliminación de datos atípicos.

Finalmente, en relación a la validación sobre modelos *in vitro*, se utilizó, en el caso del experimento sobre Caco-2 diferenciadas, el análisis de la varianza *One-way ANOVA* para el estudio estadístico de los datos comparando para cada tiempo la expresión de cada miRNA en función del tratamiento (DMEM, EM y PPM), y aplicando la corrección de Tukey para las comparaciones múltiples. En el caso del estudio de los miRNAs en enteroides, se tuvieron en consideración los factores tratamiento (DMEM, EM y PPM) y sexo (sexo del animal del cual proceden los enteroides aislados), realizando *Two-way ANOVA* y aplicando la corrección por el método de Bonferroni para las comparaciones múltiples.

En cuanto a las aproximaciones computacionales para la predicción de las interacciones miRNA-mRNA, se utilizaron diferentes herramientas bioinformáticas de las disponibles en la actualidad. En la búsqueda de miRNAs candidatos para los genes diana se utilizaron la base de datos online de uso público *Target Scan* (http://www.targetscan.org/mmu_72/), cuyo algoritmo de predicción se basa en la complementariedad de la región semilla y el mRNA objetivo (Agarwal *et al.*, 2015); *miRWalk* (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/>), que integra resultados de otras bases de datos con interacciones miRNA-objetivo predichas y validadas (Sticht *et al.*, 2018); y *DIANA TarBase v.8* (http://carolina.imis.athena-innovation.gr/diana_tools/web/index.php?r=tarbasev8%2Findex) cuyas interacciones están respaldadas experimentalmente e incluye información de las condiciones, metodología experimental y el tipo celular/tejido (Karagkouni *et al.*, 2018). Para la búsqueda de mRNAs diana de los microRNAs candidatos finalmente seleccionados se utilizó la base de datos *miRNA Pathway Dictionary* (miRPathDB, <https://mpd.bioinf.uni-sb.de/>) que contiene genes diana validados experimentalmente y genes diana predichos (Backes *et al.*, 2017) con los cuales se realizó un análisis de enriquecimiento funcional para mostrar las principales vías en las que se encuentran implicados los genes predichos a través de PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>) (Mi *et al.*, 2019).



RESULTADOS

1. PAPEL DE LOS microRNAs EN EL ENTEROCITO Y METABOLISMO LIPÍDICO

Con objeto de determinar el papel de los microRNAs en relación al metabolismo lipídico a nivel intestinal, generamos el modelo animal carente de microRNAs intestinales, en el cual realizamos la determinación de diferentes parámetros a nivel basal y tras una carga oral de lípidos para estudiar los cambios en el metabolismo lipídico asociados a esta pérdida de microRNAs.

1.1. GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL MODELO ANIMAL

Los animales obtenidos en el sistema de cruzamientos para generar el animal carente de microRNAs intestinales (animal *knockout* para *Dicer1* específico de intestino) y sus compañeros de camada (*litter mates*) con enzima Dicer funcional, fueron genotipados para caracterizarlos y generar los diferentes grupos experimentales.

Como resultado tipo de la electroforesis para el genotipado de los parentales *Dicer1^{loxP/loxP}* y *Villin-cre* se observó, en el caso de la PCR para Vil-cre (**Figura 16A**), la aparición de la banda del control interno positivo (200 pb) y el transgén (1100 pb) en el caso de los ratones *Villin-cre* (muestras 124-129) mientras los ratones *Dicer1^{loxP/loxP}* presentaron el control interno positivo pero no la banda del transgén (muestras 120-122). En el resultado de la PCR para Dicer (**Figura 16B**) se obtuvo la banda correspondiente al alelo modificado (420 pb) en el caso de los ratones *Dicer1^{loxP/loxP}* (muestras 120-122) y la banda correspondiente al alelo silvestre en el caso de los parentales *Villin-cre* (351 pb) (muestras 124-129).

En el genotipado para las crías obtenidas en la F1 (**Figuras 16C y 16D**) se observaron las dos bandas de los heterocigotos en la PCR para Dicer, denominados +/- (muestras 213-228), y en el resultado de la PCR para Vil-cre el control interno positivo en todos los animales genotipados con la aparición o no del transgén. Se denominan Tg/- a los animales carentes del transgén y Tg/+ a los animales que poseen el transgén en hemigiosis.

Los cruzamientos entre animales heterocigotos con el alelo floxeado para Dicer dieron lugar a los diferentes animales que conformaron la colonia de multiplicación (**Figuras 16E y 16F**) como los animales identificados con los números 473, 475, 476, 477, 478, 479 y 480, cuyos cruces generaron los animales que se utilizaron en los experimentos.

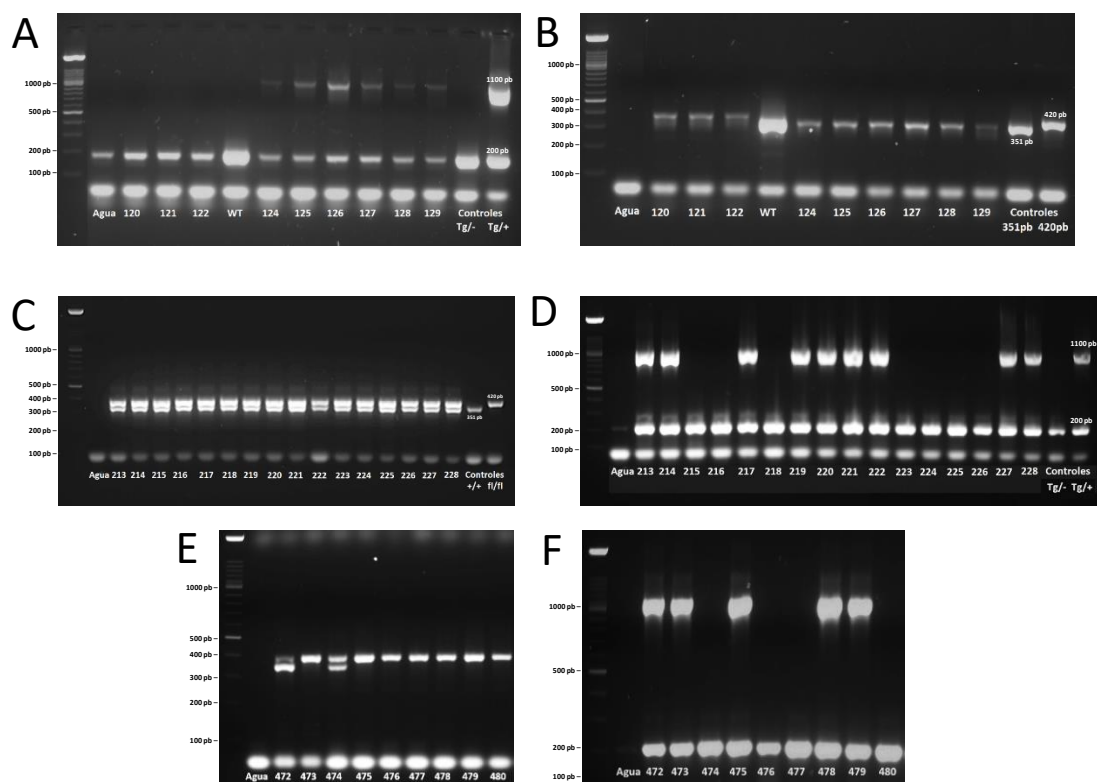


Figura 16. Fotografías representativas del genotipado de los animales, tomadas con el sistema de fotodocumentación de geles Avegene (BioNova científica).

Fotografías de los geles de electroforesis con ejemplos de los resultados posibles obtenidos de los genotipados de los animales durante la generación de los animales que conforman las cohortes 1 y 2. De izquierda a derecha se muestra el marcador de pesos moleculares, el control negativo de PCR (Agua), las muestras y los respectivos controles según corresponda. A y B: genotipado Vil-cre y Dicer para parentales Dicer1^{loxP/loxP} y Villin-cre, C y D: crías F1, E y F: crías F2. Los amplicones obtenidos a partir de reacciones de PCR con los primers correspondientes (ver M&M, pp 48) se resolvieron en geles de agarosa al 1,5% para Vil-cre y al 2% para Dicer.

Para verificar la disminución de la expresión de la enzima DICER en estos animales que conformaron las cohortes de experimentación, se realizó un análisis de la expresión de la proteína por *Western blot*. Como puede observarse en la **Figura 17**, el animal que expresa la recombinasa Cre tiene disminuida la expresión de la proteína DICER en las muestras de intestino de los ratones derivados de los cruces anteriormente citados.

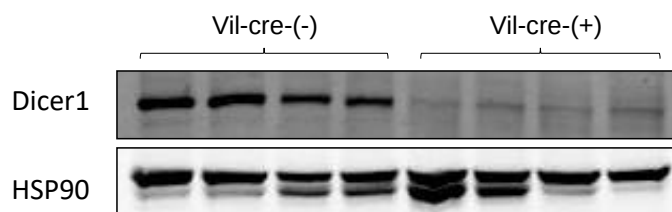


Figura 17: Western Blot para el análisis de la proteína DICER en muestras de intestinos de los ratones que conforman las cohortes de experimentación.

Cuantificación de la proteína DICER mediante Western Blot en muestras de intestino delgado de ratones que poseen el alelo floxeado para *Dicer* (*Dicer1^{loxP/loxP}*) y que poseen el trasgén para la recombinasa Cre (*Vil-cre-(+)*) o carecen de ella (*Vil-cre-(-)*).

Además de la caracterización genética y el estudio de la expresión de DICER en el animal carente de microRNAs intestinales, se estudiaron algunos de los cambios apreciados en el modelo animal.

Como se puede observar en la **Figura 18**, existe una clara diferencia de peso entre machos “wild type” (WT) y machos “knockout” (KO), aunque se sigue observando el dimorfismo sexual entre hembras y machos independientemente del genotipo. Así, los animales machos KO son más pequeños que los WT.

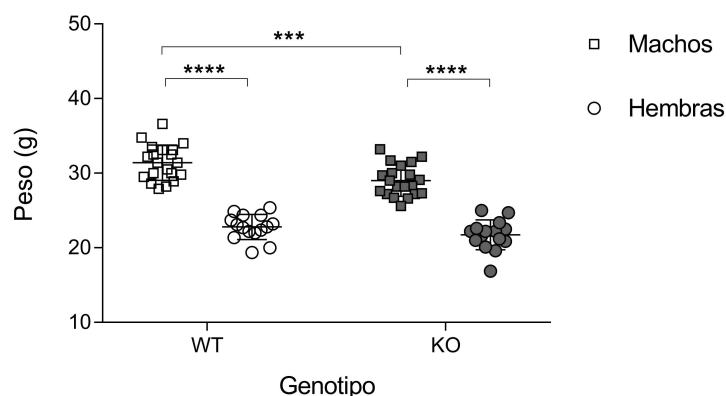


Figura 18. Datos de peso en función del sexo y genotipo.

Peso en gramos determinado en animales de la colonia. Se muestran los pesos de machos (cuadrado) y hembras (círculo) de animales “wild type” (WT) que no poseen el trasgén para la recombinasa Cre y animales knockout que poseen el trasgén para la recombinasa Cre. ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$. N = 20 para los grupos de machos y N = 15 para los grupos de hembras.

También, los animales KO usualmente desarrollaron prolapso rectal (**Figura 19C**) y durante la toma de muestras se observaron variaciones en el tamaño del intestino con respecto al animal WT, por lo que estudiamos por PCR a tiempo real la expresión de una serie de genes marcadores de células propias del epitelio intestinal y genes relacionados con la diferenciación.

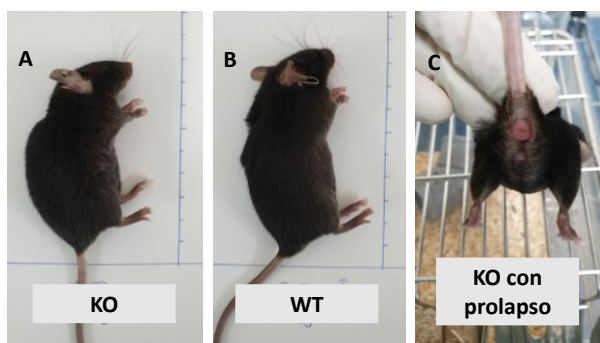


Figura 19. Fotografías del fenotipo de los ratones.

Fotografías representativas del tamaño de un ratón macho adulto *knockout* para DICER1 (A) y *wild type* (B) así como un macho adulto KO con prolapso rectal (C).

Como puede observarse en la **Figura 20**, verificamos de nuevo que disminuye la expresión del mRNA de la ribonucleasa DICER-1 en los animales KO. Encontramos que tanto la expresión del mRNA para el receptor Lgr5 (marcador de células madre), como el marcador de proliferación Ki67 se encuentran disminuidos en el animal KO. Además, la expresión del mRNA de proteínas como villin-1 (Vil1), lisozima C-1 (Lyz1), la glicoproteína mucina-2 (Muc2), la fosfatasa alcalina intestinal (Alpi) y la proteína transportadora de glucosa (Glut2 o Slc2a2), que son marcadores de enterocitos, células de Paneth, células caliciformes (o células Globet) y células enteroendocrinas se encuentran disminuidos en el animal KO. Otros marcadores asociados al mantenimiento de la identidad y estado de maduración del intestino, como el factor de transcripción GATA-4 (Gata4) y la dipeptidil peptidasa 4 (Dpp4), también se encuentran disminuidos.

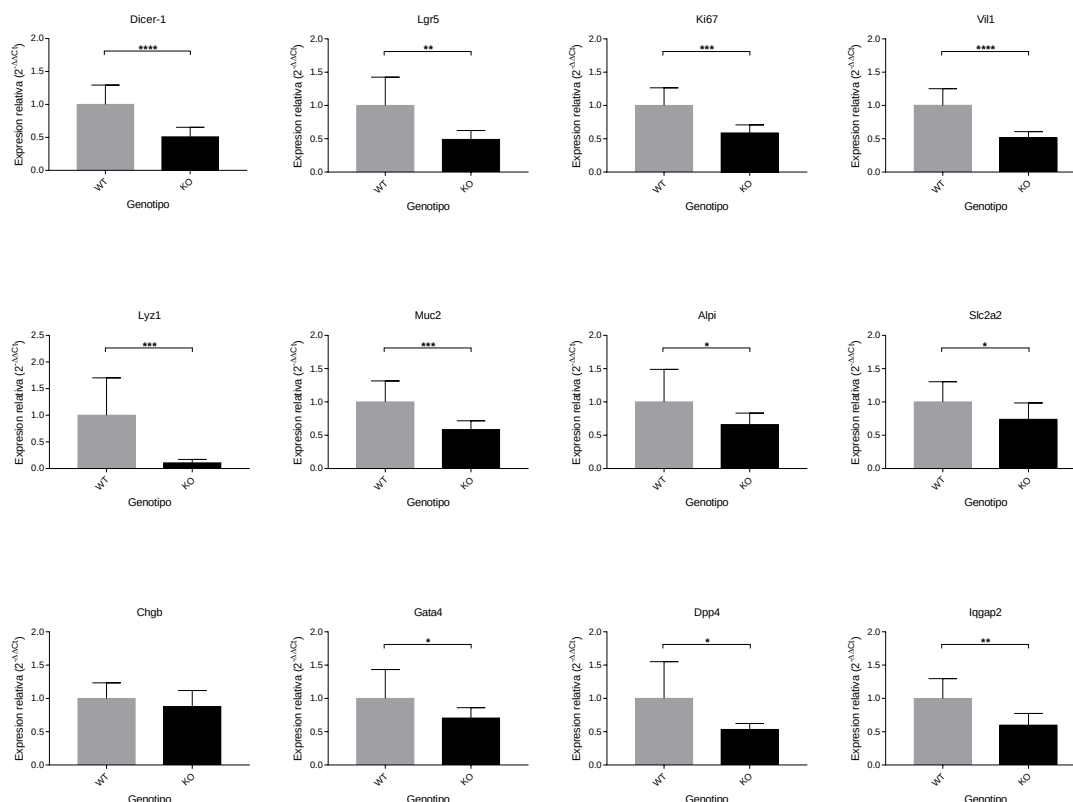


Figura 20. Análisis de la expresión del mRNA de genes relacionados con el linaje de las células componentes del endotelio intestinal en animales WT vs. KO.

Gráficos de barras que muestran los resultados de expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) del mRNA de los genes determinados en el intestino delgado en función del genotipo WT (■) y KO (■) y cuantificados mediante PCR cuantitativa en tiempo real. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. N = 12 para animales WT y 11 para animales KO.

1.2. ANÁLISIS DE LÍPIDOS PLASMÁTICOS

Con objeto de determinar si la disrupción de la síntesis de microRNAs tiene algún efecto en cuanto a la concentración de lípidos presentes en plasma, se procedió a su cuantificación. La determinación de los lípidos plasmáticos se realizó sobre las muestras de plasma obtenidas de la primera cohorte de animales generados, comparándose con los animales WT y diferenciando la respuesta en función del sexo a las dos horas tras una carga oral de lípidos (**Figura 21**).

Observamos unos niveles reducidos de lípidos plasmáticos, tanto a nivel basal como tras la carga oral de lípidos, para las hembras frente a los machos y en ambos sexos se produce un incremento significativamente menor del nivel de triglicéridos tras la carga oral en animales KO, mientras

que los niveles de colesterol se mantienen constantes independientemente del genotipo y tratamiento.

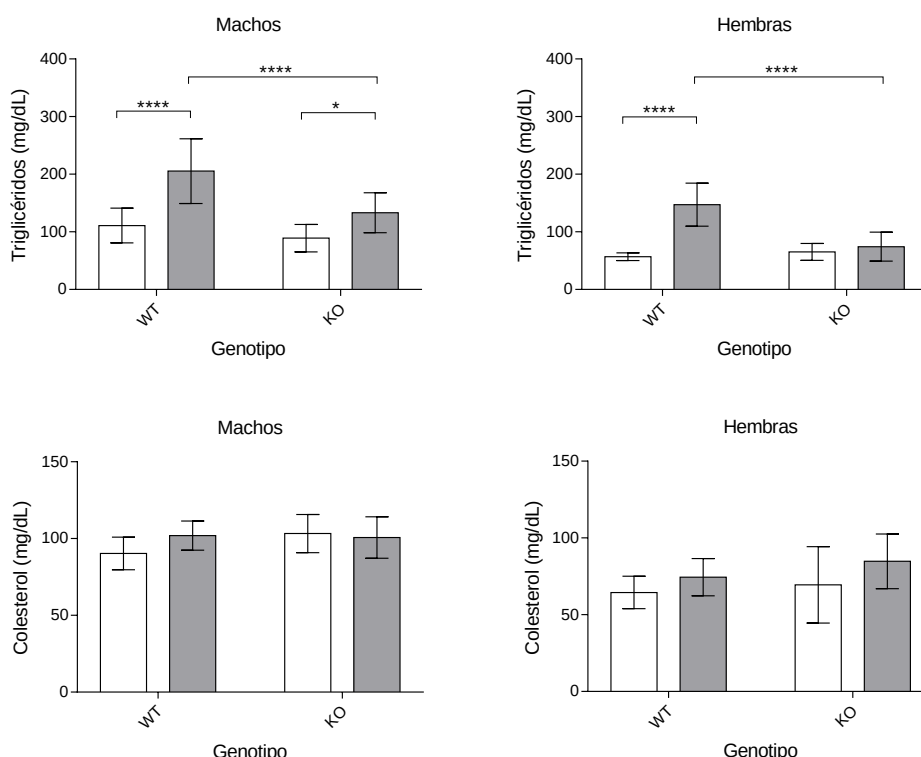


Figura 21. Medida de lípidos plasmáticos.

Valores de lípidos plasmáticos (triglicéridos y colesterol) en animales WT (fl/fl, Tg/-) y KO (fl/fl, Tg/+) machos y hembras a las dos horas tras la administración de una carga oral de agua (□) o de aceite de oliva enriquecido con colesterol (■). Los resultados (media $\pm$ error estándar) se expresan en mg/dL. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$. $N \geq 10$ por grupo.

1.3. PERFIL DE LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS

A fin de determinar qué tipo de lipoproteínas podrían estar influenciando los cambios anteriormente observados, se analizaron los perfiles de lipoproteínas mediante FPLC. Dado el volumen necesario para el estudio del perfil de lipoproteínas plasmáticas y realizar la determinación con mayor confianza, se generaron *pools* de plasma en función del genotipo del animal y el tratamiento (sin diferenciar por sexos), obteniéndose los perfiles que se muestran en la **Figura 22**.

En condiciones control, el animal *knockout* para *Dicer-1* apenas presenta niveles detectables de VLDL, mientras que tras el tratamiento, los resultados sugieren que el animal KO presenta VLDL

con menor contenido en triglicéridos (TG), así como de HDL con menor contenido en colesterol comparado con el animal WT.

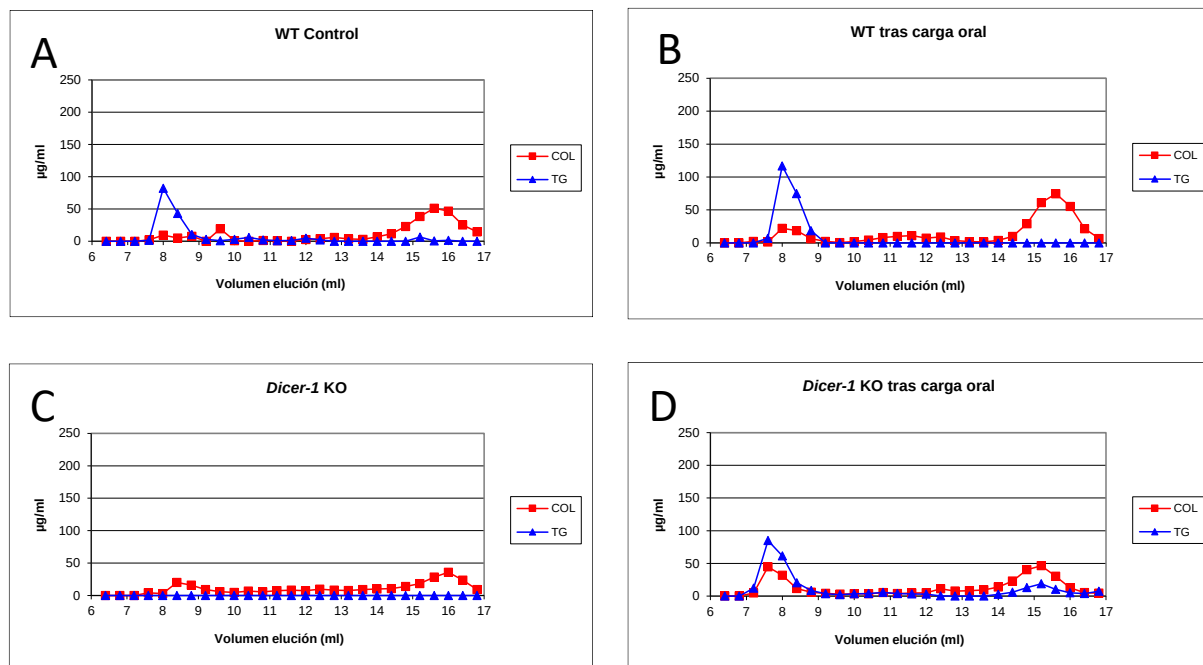


Figura 22. Perfil de lipoproteínas plasmáticas.

Perfil de lipoproteínas plasmáticas en función del genotipo (A y B, animales WT y C y D animales *Dicer-1* KO) y tratamiento (A y C, Control, y B y D, tras carga oral de aceite de oliva con colesterol). —■— Colesterol (COL) —▲— Triglicéridos (TG). N = 4 *Pools* de plasma.

1.4. ANÁLISIS DE LÍPIDOS INTESTINALES Y HEPÁTICOS

Para estudiar si, por la pérdida de microRNAs intestinales, la absorción de lípidos se encuentra alterada en el modelo animal generado, tal y como esperamos, analizamos los niveles de lípidos en las diferentes regiones del intestino, colon e hígado.

Así, los niveles de triglicéridos (**Figura 23**) se encuentran aumentados tras la carga oral con la solución de aceite de oliva (250 µL) enriquecida con de colesterol (40 mg). Observamos este incremento estadísticamente significativo tanto en animales WT como KO a nivel de duodeno, yeyuno e íleon (en este último exceptuando el animal KO las 4 horas, donde el cambio no es significativo). No encontramos cambios significativos tras la carga oral en colon ni hígado. La diferencia en función del genotipo la encontramos entre los animales sometidos a la carga oral de aceite de oliva y colesterol a las 2 horas para duodeno, yeyuno e íleon, y a las 4 horas sólo para duodeno.

En cuanto a la respuesta al tratamiento en función del sexo, únicamente observamos diferencias significativas a nivel hepático (**Figura suplementaria 2**).

En relación a la determinación de los niveles de colesterol (**Figura 24**), observamos que los niveles de colesterol aumentan de manera significativa en el grupo “tratados” de animales WT en duodeno, yeyuno, íleon e hígado (éste último sólo a las 2 horas); mientras que este aumento sólo es significativo a nivel de yeyuno y a las 4 horas en íleon para animales KO. Los niveles de colesterol entre animales tratados, según el genotipo, difieren de manera significativa a nivel de yeyuno e íleon a las 2 horas tras la carga oral de aceite de oliva enriquecido con colesterol.

Los valores de fosfolípidos no se vieron modificados en función del genotipo ni en respuesta al tratamiento administrado a los animales para ninguno de los tiempos estudiados (**Figura 25**).

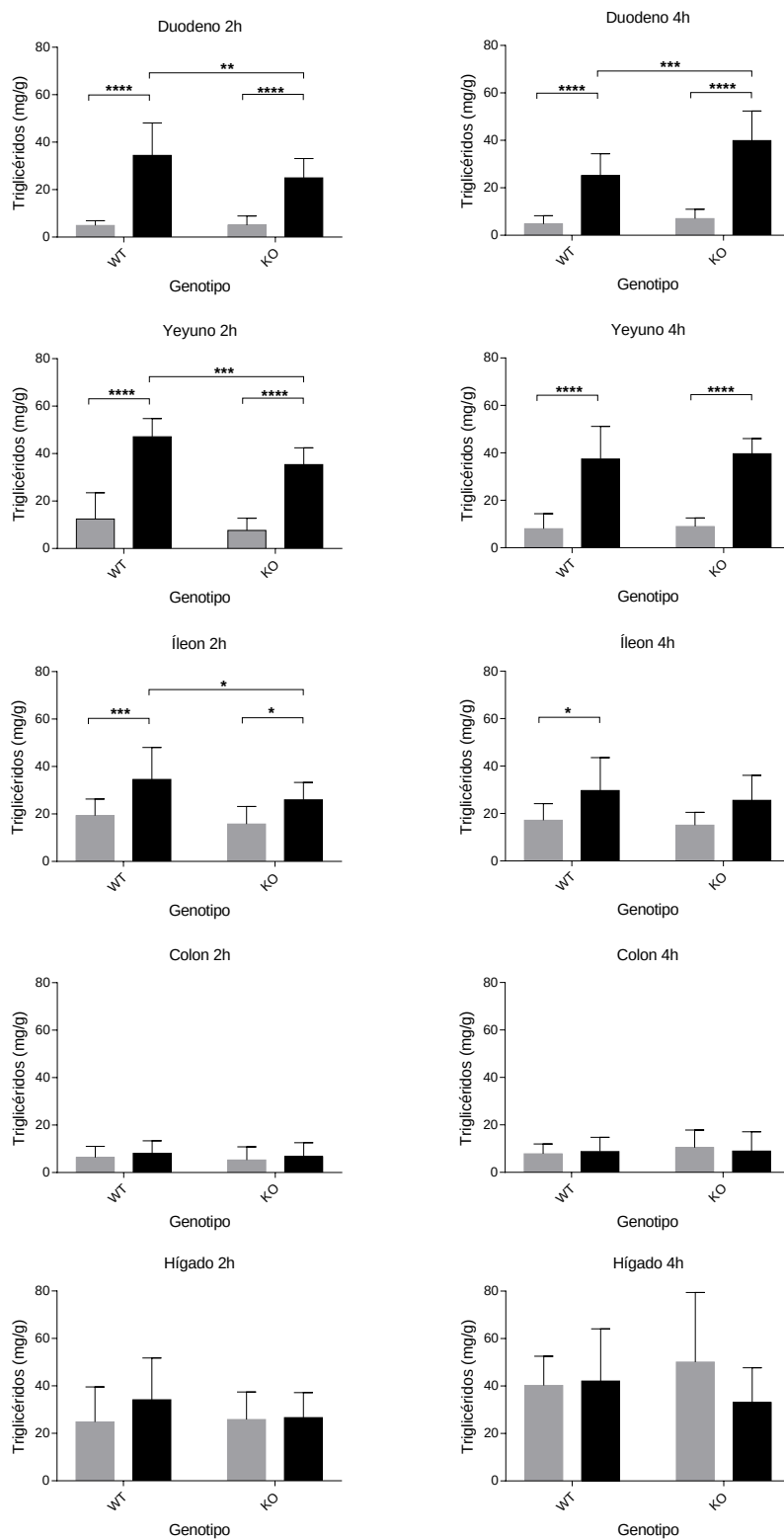


Figura 23. Cuantificación de triglicéridos intestinales y hepáticos.

Valores de triglicéridos intestinales y hepáticos en animales WT (fl/fl, Tg/-) y KO (fl/fl, Tg/+) a dos horas (2h) y cuatro horas (4h) tras la administración de una carga oral de agua (Control,) o una solución de aceite de oliva enriquecida con colesterol (Tratados,). Los resultados (media $\pm$ error estándar) se expresan en mg/g. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. $N \geq 9$ por grupo.

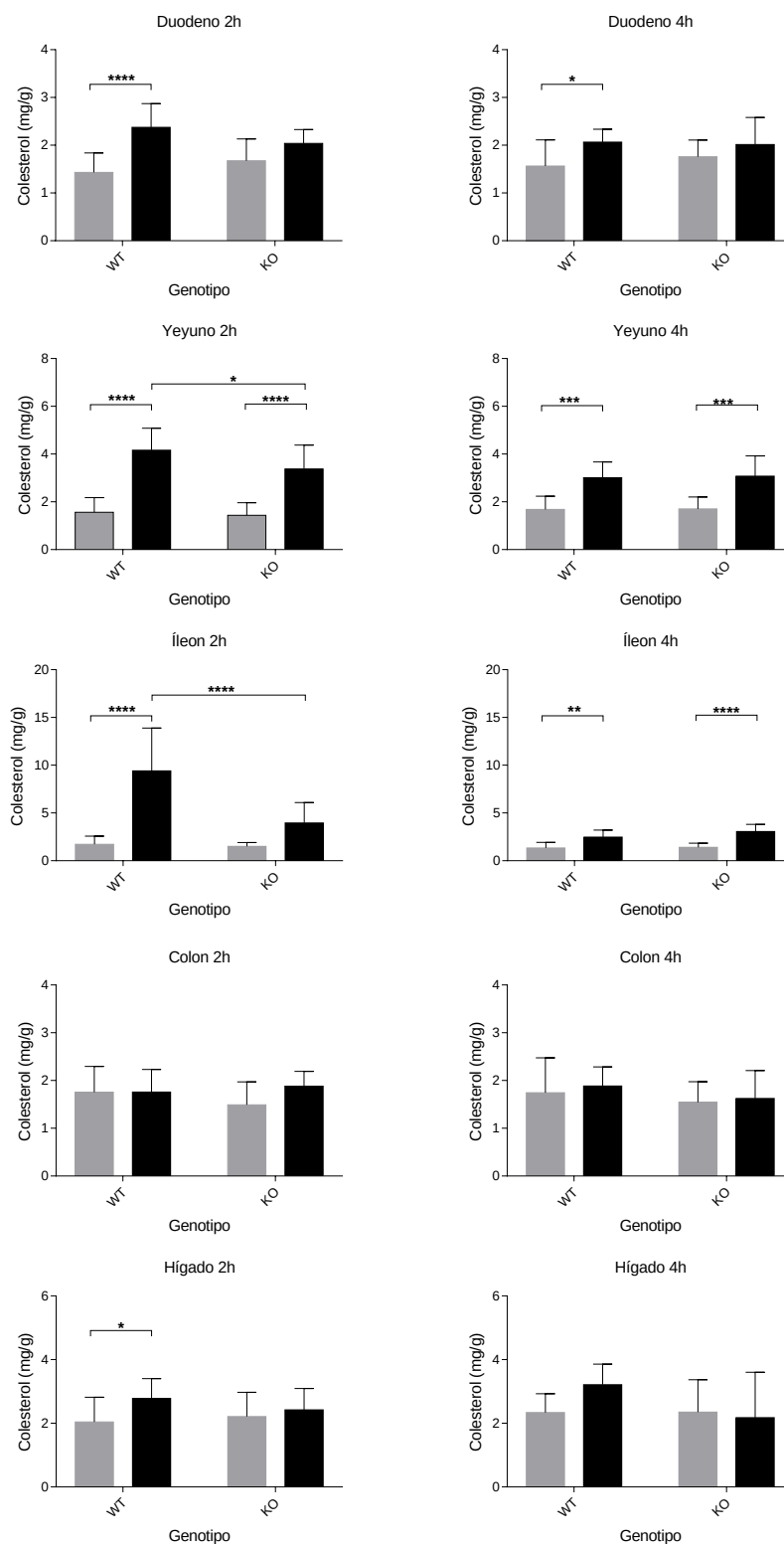


Figura 24. Cuantificación del colesterol intestinal y hepático.

Niveles de colesterol intestinal y hepático en animales WT (fl/fl, Tg/-) y KO (fl/fl, Tg/+) a dos horas (2h) y cuatro horas (4h) tras la administración de una carga oral de agua (Control,) o una solución de aceite de oliva enriquecida con colesterol (Tratados,). Los resultados (media $\pm$ error estándar) se expresan en mg/g. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. N $\geq$ 9 por grupo.

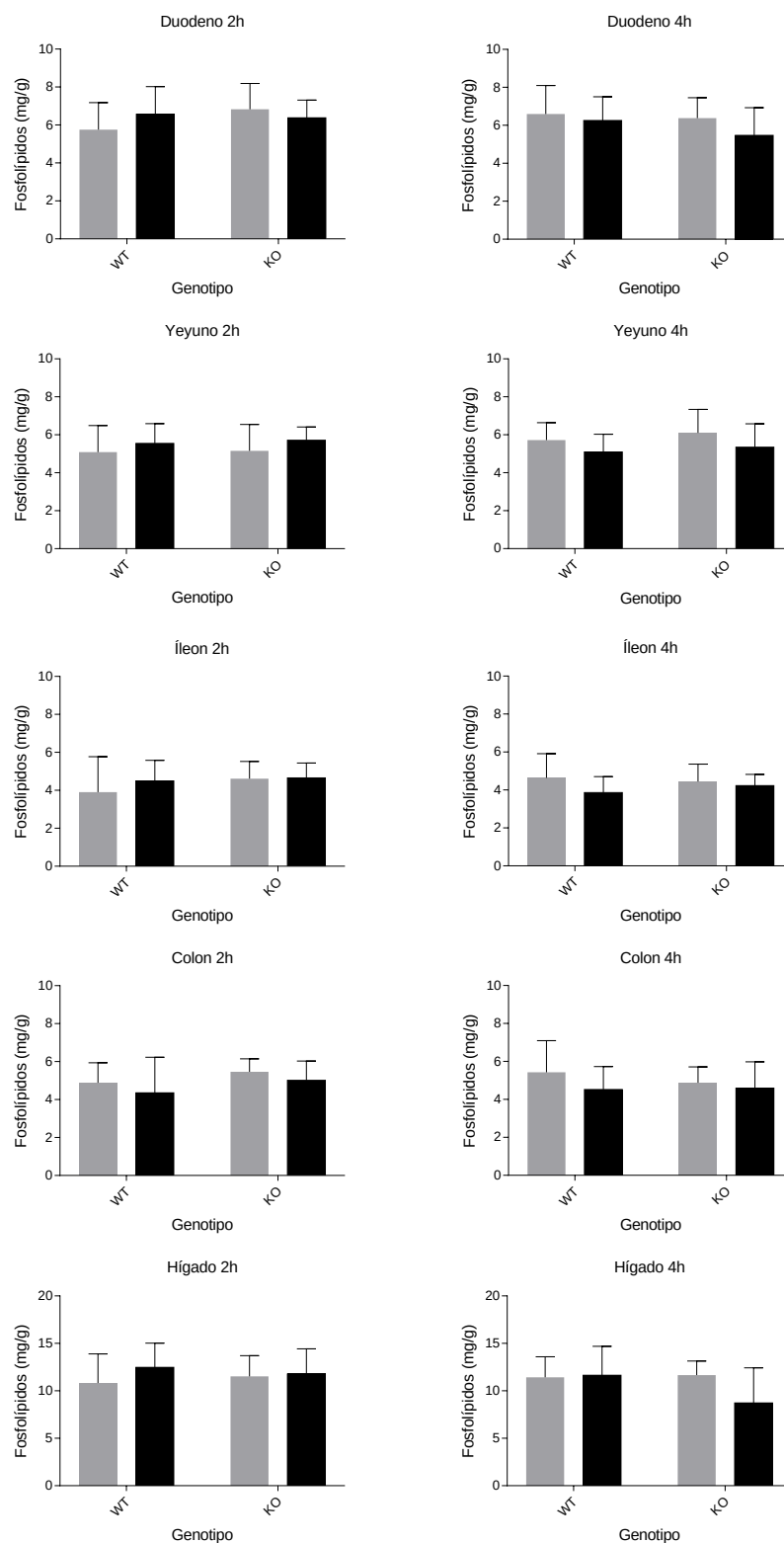


Figura 25. Cuantificación de fosfolípidos intestinales y hepáticos.

Valores de fosfolípidos intestinales y hepáticos en animales WT (fl/fl, Tg/-) y KO (fl/fl, Tg/+) a dos horas (2h) y cuatro horas (4h) tras la administración de una carga oral de agua (Control, ■) o una solución de aceite de oliva enriquecida con colesterol (Tratados, ■). Los resultados (media ± error estándar) se expresan en mg/g. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. N ≥ 9 por grupo.

1.5. ANÁLISIS DE LOS GENES RELACIONADOS CON EL METABOLISMO LIPÍDICO.

Con objeto de determinar qué genes del metabolismo lipídico se encuentran implicados en los cambios observados por la falta de miRNAs intestinales y en respuesta a una dieta hipercalórica, se analizaron los principales genes involucrados en el metabolismo de lipoproteínas y colesterol, seleccionándose aquellos que presentaban diferencias significativas en cuanto a su expresión en función del genotipo, y tras la carga oral de lípidos y colesterol.

1.5.1. Arrays de expresión génica

A partir de muestras procedentes de la primera cohorte de animales KO y WT se aisló RNA con el objeto de proceder al análisis de su expresión mediante el uso de arrays de expresión génica. Los resultados del *array* de genes realizado muestran una serie de genes que responden a la lipemia postprandial (**Figura 26A** y **Figura 26C**). Así, en los animales WT en condiciones de lipemia postprandial encontramos genes que aumentan su expresión de manera significativa como *Insig1*, *Srebf1*, *Nr0b2*, *Cyp51*, *Apoa4* y *Nr1h4*, o disminuyen su expresión significativamente como *Lrp12*, *Ppard*, *Mbtps1*, *Cel*, *Cela3b* y *Dhcr7*. En el caso de animales KO encontramos que aumentan su expresión de manera significativa en condiciones de lipemia postprandial los genes *Lep*, *Pcsk9*, *Idi1*, *Ldlr*, *Cyp51*, *Srebf2* y *Hmgcr*, mientras que disminuyen su expresión significativamente *Mbtps1* y *Nr0b2* (**Figura suplementaria 3**).

También observamos, en cuanto a la pérdida de *Dicer* (animales KO), una disminución general de los genes relacionados con el metabolismo de lipoproteínas y colesterol (**Figura 26B**). Pero basándonos en la posible pérdida de la regulación por microRNAs, nos fijamos en aquellos genes cuya expresión se vea aumentada de manera significativa, como es el caso de *Hmgcs2*, *Soat1*, *Prkaa2*, *Nr0b2* y *Olr1* (**Figura suplementaria 3**).

A partir de estos resultados seleccionamos 17 genes para validar con el resto de animales de la cohorte 1: *Hmgcs2*, *Soat1*, *Prkaa2*, *NrOb2*, *Olr1*, *Crp*, *Lep*, *Apoc3*, *Abca1*, *Osbpl1a*, *Apoa4*, *Apob*, *Cyb5r3*, *Lipe*, *Cnbp*, *Abca2* y *Stard3*; que se corresponden con aquellos en que su expresión aumenta significativamente con la pérdida de miRNAs intestinales, y dentro de los que disminuye significativamente, aquellos con mayor disminución de la expresión

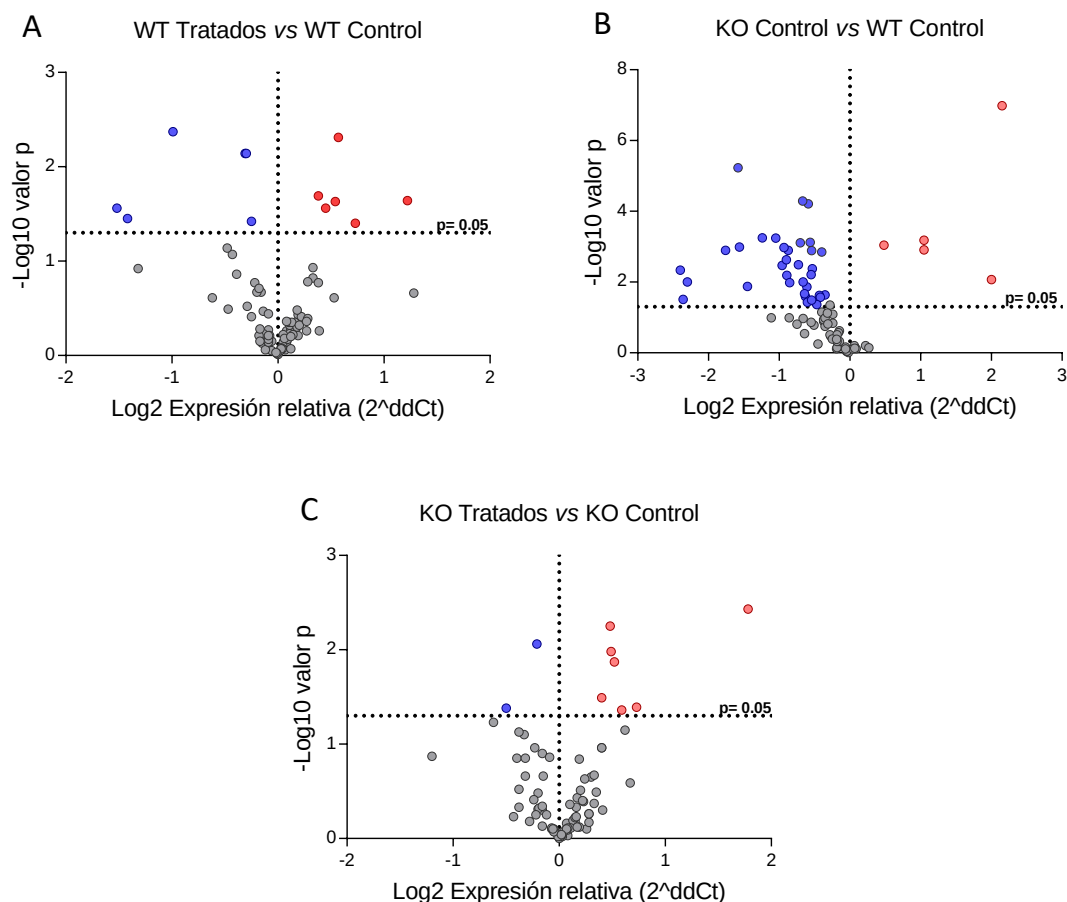


Figura 26. Volcano plots para los genes estudiados.

Diagrama que muestra los genes (puntos) diferencialmente expresados en las distintas condiciones enfrentadas. La línea punteada horizontal que cruza en $Y = 1.30$ marca las diferencias estadísticamente significativas, mostrándose en rojo los genes regulados al alza y en azul aquellos genes regulados a la baja. **A**, compara los cambios de expresión de los genes entre animales WT (fl/fl, Tg/-) tratados (dos horas tras la carga oral de oleico y colesterol) frente al WT control (carga oral de agua). **B**, muestra los resultados de la comparativa bajo condiciones control, entre animales KO (fl/fl, Tg/+) y WT. **C**, muestra los genes diferencialmente expresados en la comparativa de animales KO tratados y control. $N = 5$ y cada uno es mezcla de dos animales.

1.5.2. Validación de genes

Para validar los resultados obtenidos en el *screening* de los genes seleccionados anteriormente, realizamos PCRs cuantitativas a tiempo real con las secuencias de oligos diseñadas para cada gen y las muestras de cDNA obtenidas del experimento con la cohorte 1 de animales generados.

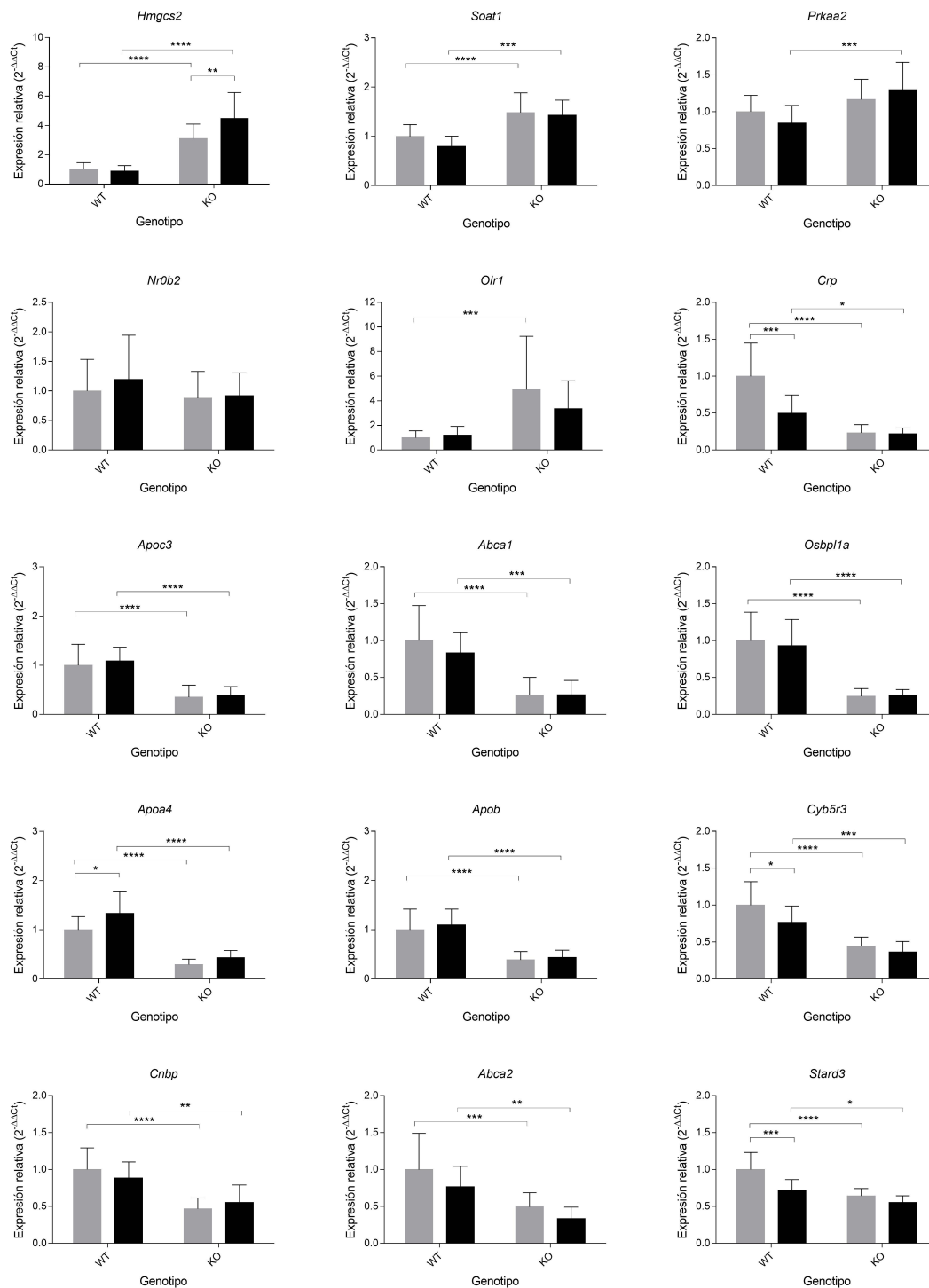


Figura 27. Validación de los genes candidatos.

Gráficos de barras que muestran los resultados de expresión relativa (2^{-ΔΔCt}) de los genes seleccionados y su respuesta en la validación realizada sobre todas las muestras que conforman la cohorte 1 (N ≥ 10 por grupo). Se diferencian en función del genotipo, la respuesta a dos horas (2h) tras la administración de una carga oral de agua (Control,) o una solución de aceite de oliva enriquecida con colesterol (Tratados,). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001

Como puede observarse en la **Figura 27**, confirmamos el resultado obtenido para el gen *Hmgcs2*, que aumenta su expresión ante la falta de regulación por miRNAs intestinales y se incrementa aún más en condiciones de lipemia postprandial para los animales KO. Igualmente para *Soat1* validamos el incremento de su expresión en animales KO, y como observamos en el *array*, no hay respuesta significativa ante la carga oral de aceite de oliva con colesterol. De manera similar, para *Olr1* y *Prkaa2* confirmamos el aumento de expresión del gen ante la falta de regulación de miRNAs intestinales, siendo estadísticamente significativo en condiciones basales o tras la carga oral, respectivamente. Contrariamente a estos genes, pero en consonancia con los resultados previos, observamos una disminución significativa de la expresión de *Crp*, *Apoc3*, *Abca1*, *Osbpl1a*, *Apoa4*, *Apob*, *Cyb5r3*, *Cnbp*, *Abca2* y *Stard3* en ausencia de miRNAs.

En el caso de *Prkaa2* no se observa ningún cambio significativo ni tendencia, en función del genotipo o tratamiento, que valide los resultados previos del *array*.

Para *Nr0b2*, la respuesta obtenida en la validación ante la lipemia postprandial difiere del *array* en los animales WT, y tampoco observamos ni el incremento significativo ante la falta de regulación por miRNAs en condiciones control ni el cambio de expresión tras la carga oral en los animales KO.

En cuanto a los genes *Lipe* y *Lep* no detectamos expresión en las muestras de la validación, resultando en Cts muy elevadas o valores indeterminados en la cuantificación por PCR a tiempo real.

1.5.3. Análisis de la expresión proteica

A partir de los anteriores resultados, seleccionamos aquellos genes cuya aparente respuesta frente a la ausencia de miRNAs, y por tanto de su regulación, se tradujese en un incremento en su expresión en el animal KO con respecto al WT. De este modo, para estudiar el efecto regulador no solo a nivel transcripcional, que podría desviarse de los resultados a nivel proteico, analizamos la expresión de HMGCS2, SOAT1 y OLR1 en muestras de mucosa intestinal.

Como puede observarse en la **Figura 28**, se confirma que los niveles de expresión del gen y la proteína en el animal KO frente al WT se encuentran aumentados en el caso de HMGCS2 y OLR1. En cambio, el aumento observado previamente en el mRNA para SOAT-1 no se traduce en un aumento del nivel de proteína mediante *western blot*.

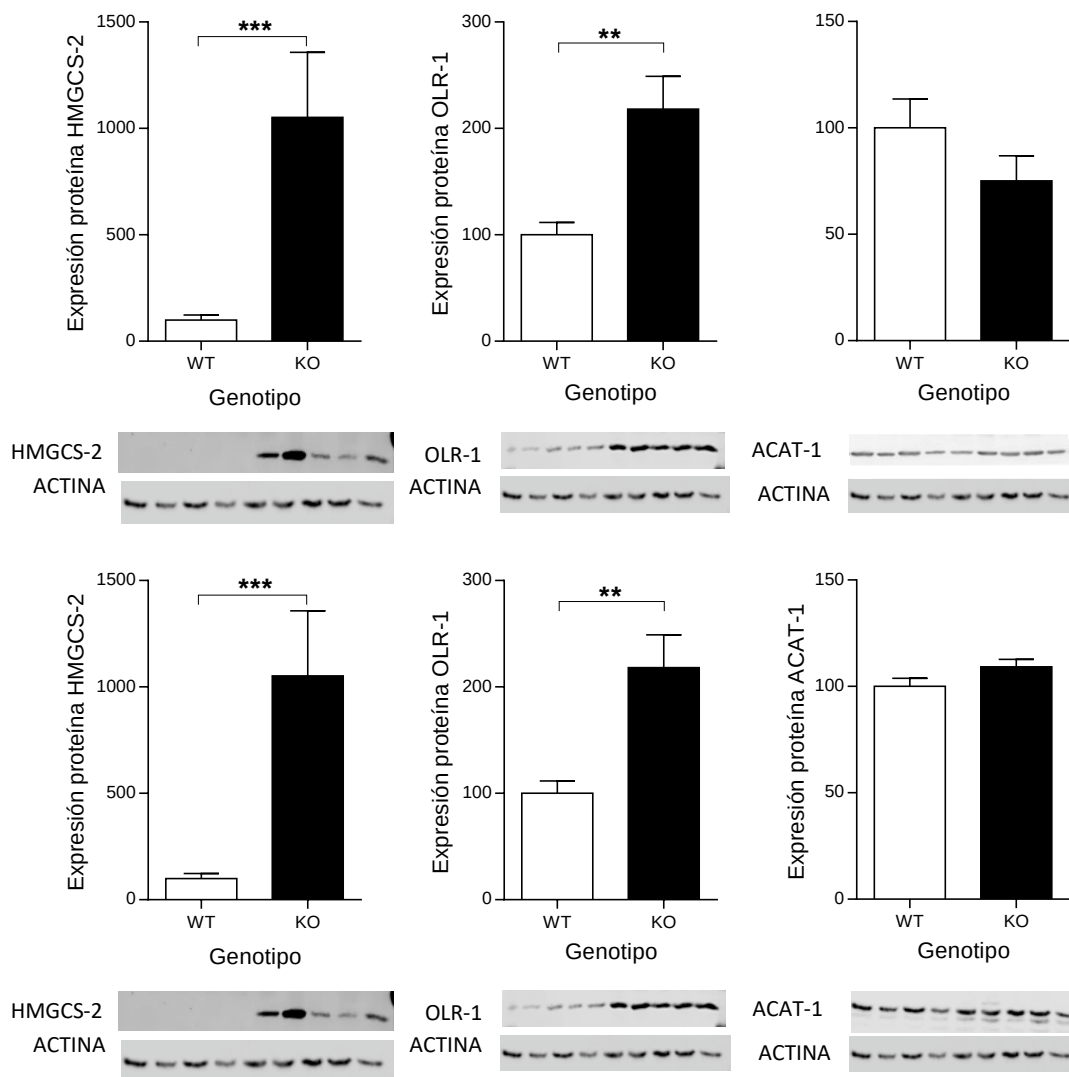


Figura 28. Niveles de proteína de los genes seleccionados

Imagen representativa que muestra los resultados de Western Blot (parte inferior) de las proteínas seleccionadas HMGCS-2, OLR-1 y ACAT-1 (SOAT-1), y los gráficos con los niveles y significancia (parte superior) de la variación en la expresión proteica entre animales WT y KO. N = 5 **p < 0.001, ***p < 0.0001

1.5.4. Búsqueda de miRNAs candidatos de unión a los genes cuya expresión se ve modificada

Para el estudio in silico se emplearon diferentes herramientas informáticas de predicción disponibles para buscar los miRNAs que tienen como diana estos genes candidatos en los que se han observado cambios.

La intersección de los resultados obtenidos con TargetScan, miRWalk y DIANA-TarBase para cada gen resultó en una serie de microRNAs comunes (**Figura 29 y Tabla suplementaria 4**): mmu-miR-

497a-5p, mmu-miR-193b-3p, mmu-miR-193a-3p y mmu-miR-194-2-3p para *Hmgcs2*; mmu-miR-365-3p para *Olr1*; mmu-miR-186-5p, mmu-miR-381-3p, mmu-miR-23a-3p, mmu-miR-378a-3p, mmu-miR-15a-5p y mmu-miR-15b-5p para *Soat1*.

Al cruzar los miRNAs comunes obtenidos con los algoritmos con el listado de microRNAs expresados en intestino delgado publicado por McKenna y colaboradores (McKenna *et al.*, 2010), obtuvimos que de los miRNAs predichos que hacen diana en *Hmgcs2*, se expresan en intestino mmu-miR-193b-3p y mmu-miR-194-2-3p; el único común para *Olr1* no se encuentra en el listado de miRNAs que se expresan en intestino delgado; y de los miRNAs con diana predicha para *Soat1*, se expresan en intestino mmu-miR-186-5p, mmu-miR-381-3p, mmu-miR-23a-3p, mmu-miR-15a-5p y mmu-miR-15b-5p. Estos miRNAs pasaron a ser candidatos para evaluar *in vitro* si de facto hacían diana sobre los genes seleccionados.

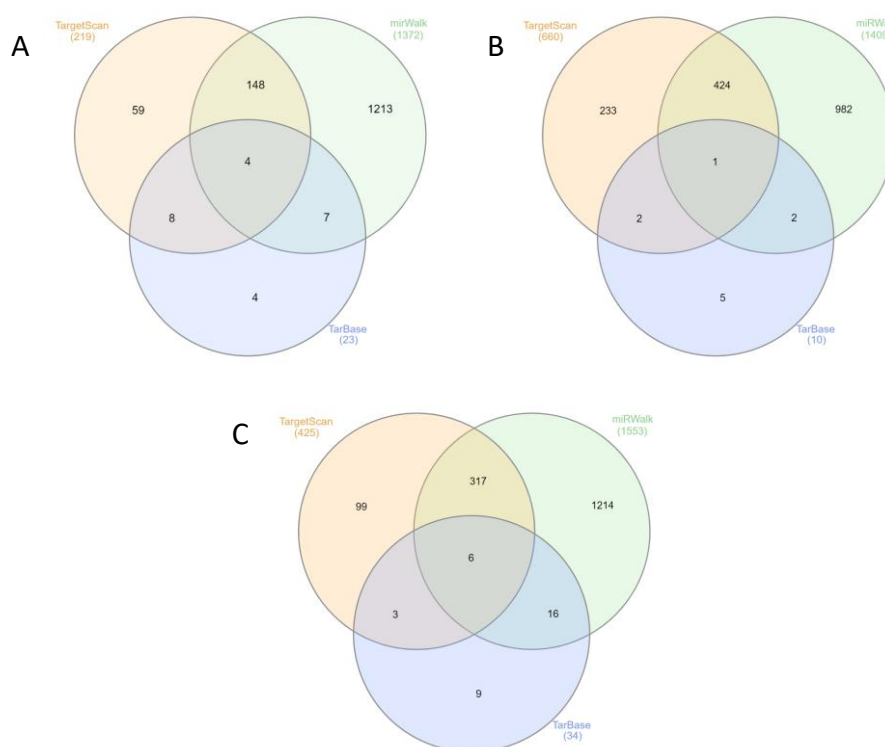


Figura 29. Análisis de los miRNAs comunes entre las herramientas de predicción utilizadas para cada gen.

Imagen que muestra los diagramas de Venn representando los microRNAs comunes, entre los resultados obtenidos mediante TargetScan, miRWalk y DIANA-Tarbase, que tienen como diana predicha los genes *Hmgcs2* (A), *Olr1* (B) y *Soat1* (C).

2. CARACTERIZACIÓN DE miRNAs INTESTINALES REGULADOS POR UNA DIETA HIPERCALÓRICA Y EN LIPEMIA POSTPRANDIAL.

2.1. EXPERIMENTOS “LONG”, “SHORT” Y “PULSE”.

Con objeto de caracterizar los microRNAs intestinales regulados por la dieta hipercalórica (HFD) y en lipemia postprandial, analizamos los niveles de expresión de microRNAs de ratones expuestos a diferentes tiempos de tratamiento mediante arrays.

Como resultado del análisis, encontramos cambios significativos (valor-p < 0.05) en ciertos microRNAs (**Tablas 8 a 10**). Los datos de *Fold change* (veces de cambio) y valor-p para cada miRNA, obtenidos del análisis con el programa GenEx, se representan gráficamente en los siguientes *volcano plots* (**Figura 30**) y se pueden encontrar completos en las **Tablas suplementarias 5 a 7**.

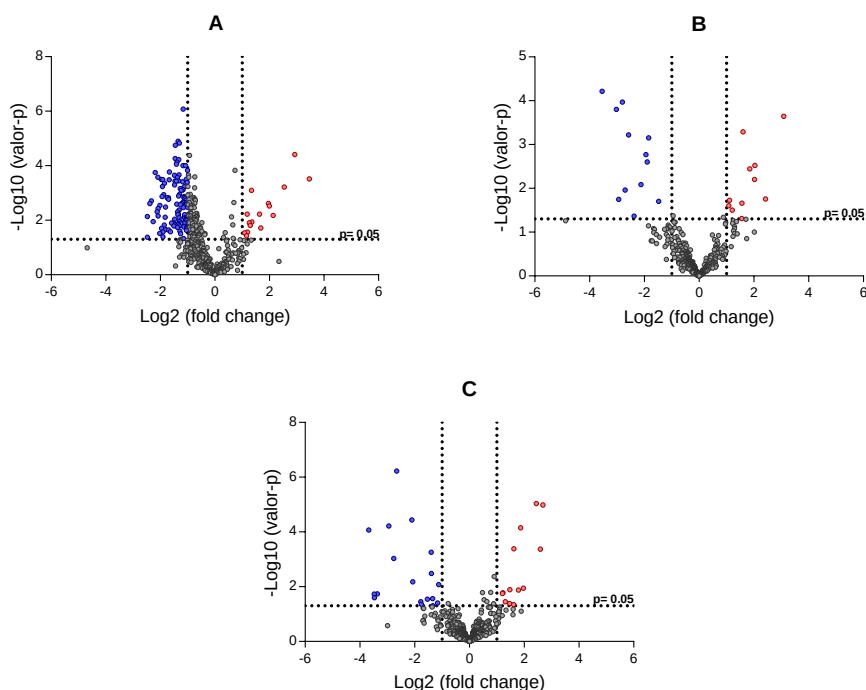


Figura 30. Análisis de los miRNAs modificados en los diferentes estudios temporales.

Representación como *volcano plots* de los miRNAs (puntos) diferencialmente expresados en los ratones, según los diferentes tiempos de tratamiento. La línea punteada horizontal que cruza en $Y = 1.30$ marca las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), diferenciándose en rojo los miRNAs que aumentan su expresión y en azul aquellos miRNAs que disminuyen su expresión como consecuencia del tratamiento. Se muestran los miRNAs modificados en: **A**, el tratamiento de 20 semanas (Long); **B**, el tratamiento de 4 días (Short); y **C**, a las 2 horas tras la carga oral de aceite y colesterol (Pulse). $N \geq 4$ por grupo.

Tabla 8. miRNAs intestinales significativamente alterados tras tratamiento largo (“Long”, 20 semanas) con dieta hipercalórica.

<i>miRNA</i>	<i>Fold Change</i>	<i>P-value</i>	<i>P (Benjamini-Hochberg)</i>
mmu-let-7i	-2.24359	0.00000084	0.01182
mmu-miR-542-5p	-2.5516	0.000012698	0.01235
mmu-miR-21	-2.46434	0.000014868	0.01235
mmu-miR-154	-2.72854	0.000017718	0.01235
mmu-miR-1897-5p	7.62534	0.000038729	0.01247
mmu-miR-23a	-1.90358	0.000042246	0.01265
mmu-miR-133a	-2.7478	0.000054926	0.01265
mmu-miR-598	-2.49986	0.000060055	0.01302
mmu-miR-133b	-2.62356	0.000074025	0.01302
mmu-miR-9	-2.65221	0.000087273	0.01348
mmu-miR-199a-3p	-2.24771	0.000098851	0.01447
mmu-miR-143	-2.11177	0.000099189	0.01447
mmu-miR-103	1.66844	0.000147381	0.01447
mmu-miR-425	-2.00327	0.000148197	0.01447
mmu-miR-130b	-3.18414	0.000169523	0.01527
mmu-miR-486	-4.56556	0.000177788	0.01527
mmu-miR-23a*	-2.48837	0.00021784	0.01527
mmu-miR-27b	-1.96312	0.00022073	0.01527
mmu-miR-136	-2.79737	0.00022247	0.01539
mmu-miR-140*	-1.66693	0.000257442	0.01539
mmu-miR-148b	-1.9382	0.000263349	0.01588
mmu-miR-384-5p	-4.25525	0.000264289	0.01588
mmu-miR-146a	-2.59633	0.000267395	0.01652
mmu-miR-449c	11.04929	0.00030518	0.0168
mmu-miR-342-5p	-2.06715	0.000314507	0.0168
mmu-miR-1894-5p	-3.89922	0.000317862	0.01695
mmu-miR-217	-3.76382	0.000324124	0.01821
mmu-miR-26b	-3.19225	0.000330073	0.01821
mmu-miR-185	-2.51246	0.000361769	0.01821
mmu-miR-26a	-2.75199	0.000364737	0.01839
mmu-miR-1	-2.67189	0.000366954	0.01853
mmu-miR-29b	-2.27513	0.00038818	0.01869
mmu-miR-151-3p	-2.02665	0.00040989	0.01925
mmu-miR-147	-3.60113	0.000439477	0.0215
mmu-miR-16	-2.78506	0.000508564	0.0224
mmu-miR-15a	-1.99077	0.000577746	0.02464
mmu-miR-127	-3.79075	0.000578576	0.02464
mmu-miR-125b-5p	-2.16786	0.000591755	0.02492
mmu-miR-669e	5.83967	0.000606217	0.02505

mmu-miR-191	-1.67697	0.000647077	0.0262
mmu-miR-7b	-2.40735	0.000686352	0.02692
mmu-miR-181a	-2.2644	0.000763298	0.02692
mmu-miR-145	-2.26494	0.00076408	0.0272
mmu-miR-138	-2.35467	0.00079839	0.02749
mmu-miR-1894-3p	2.54075	0.000798777	0.02749
mmu-miR-467e	-2.45374	0.00111787	0.02749
mmu-miR-22	-1.86976	0.001124001	0.0275
mmu-miR-33	-3.66561	0.001161717	0.0275
mmu-miR-27a	-1.98539	0.001200493	0.02773
mmu-miR-411	-2.50998	0.00128834	0.02801
mmu-miR-337-3p	-3.83633	0.001342284	0.02801
mmu-miR-363-3p	-2.18056	0.001353807	0.02886
mmu-miR-10a	-2.16769	0.001467067	0.02886
mmu-miR-29c	-1.70675	0.001482644	0.0295
mmu-miR-666-3p	-3.2576	0.001502432	0.02965
mmu-miR-183	-2.19979	0.001504216	0.02977
mmu-miR-503	-3.35691	0.001507665	0.02984
mmu-miR-96	-2.13617	0.001621491	0.02984
mmu-miR-29a*	-1.67125	0.001645639	0.02984
mmu-miR-142-5p	-3.2384	0.001691357	0.02984
mmu-miR-125a-5p	-1.93471	0.001755755	0.03047
mmu-miR-369-5p	-1.66959	0.001767445	0.03075
mmu-let-7c	-1.64655	0.001855479	0.03145
mmu-miR-148a	-2.09207	0.001871871	0.03148
mmu-miR-20b	-5.03726	0.001964787	0.03148
mmu-miR-322	-2.24504	0.002198681	0.03148
mmu-miR-301b	-2.0379	0.002211547	0.03177
mmu-miR-106a	-1.91673	0.002224275	0.03192
mmu-miR-31*	1.62357	0.002226811	0.03198
mmu-miR-30c	-1.67015	0.00238562	0.03287
mmu-miR-1966	3.89355	0.002422717	0.03398
mmu-miR-467a	-2.32143	0.002452761	0.03398
mmu-miR-144	-5.22547	0.002473022	0.03407
mmu-let-7e	-2.04429	0.002533444	0.03465
mmu-miR-142-3p	-2.63101	0.00255488	0.03465
mmu-miR-704	-2.40575	0.002670998	0.03465
mmu-miR-101b	-1.96825	0.002699853	0.03465
mmu-miR-1947	-4.04527	0.002842245	0.03465
mmu-miR-362-3p	-1.75472	0.002940421	0.03465
mmu-miR-130a	-1.82935	0.002958527	0.03465
mmu-miR-1968	3.98777	0.003019458	0.03471
mmu-miR-92b	-3.51429	0.003285992	0.03591
mmu-miR-190	-2.0083	0.003322798	0.03632
mmu-miR-326	-1.81854	0.003354871	0.03642
mmu-miR-350	-2.22812	0.003424157	0.03665

mmu-miR-101a	-1.68801	0.003488828	0.03742
mmu-miR-24	-1.83351	0.003556837	0.03742
mmu-miR-339-3p	-4.23952	0.003701669	0.03815
mmu-miR-449a	-2.47393	0.004177994	0.03937
mmu-miR-377	-4.33403	0.004930207	0.0397
mmu-miR-139-3p	-2.5898	0.00493847	0.03994
mmu-miR-99b	-1.85451	0.005045335	0.03994
mmu-miR-374	-1.8688	0.005120648	0.03994
mmu-miR-182	-1.84024	0.005638018	0.03994
mmu-miR-107	-1.58056	0.005666451	0.03994
mmu-miR-497	-1.62546	0.005780754	0.04022
mmu-miR-345-3p	3.11111	0.005948428	0.04025
mmu-miR-466j	2.26953	0.005959782	0.04025
mmu-miR-467b	-2.52486	0.006099402	0.04231
mmu-miR-99a	-2.56624	0.006123556	0.04234
mmu-miR-93*	-2.16135	0.006231731	0.04456
mmu-miR-501-3p	-1.93573	0.006357016	0.04504
mmu-miR-19b	-1.68691	0.006406079	0.0452
mmu-miR-1898	4.39913	0.006705897	0.04522
mmu-miR-15b	-1.94166	0.006718678	0.04522
mmu-miR-488	-4.23284	0.006926063	0.04522
mmu-miR-17	-1.84617	0.007022619	0.04533
mmu-miR-200a	-1.56917	0.00711044	0.04681
mmu-miR-543	-5.57407	0.007301091	0.04682
mmu-miR-221	-1.58797	0.007328207	0.04692
mmu-miR-199a-5p	-1.61953	0.007369302	0.04785
mmu-miR-674	1.52678	0.007585748	0.04955
mmu-miR-376b	-3.53091	0.007718658	0.05017
mmu-miR-339-5p	-1.67969	0.007957241	0.05079
mmu-miR-140	-2.13093	0.008093318	0.05097
mmu-miR-369-3p	-2.48458	0.008155604	0.05103
mmu-miR-145*	-1.79847	0.008295832	0.05218
mmu-miR-195	-1.7072	0.008398785	0.05219
mmu-miR-1306	-2.20621	0.008480201	0.05278
mmu-miR-124	-2.19975	0.00878229	0.05348
mmu-miR-450b-5p	-2.78693	0.00918968	0.05365
mmu-miR-219-5p	-2.07315	0.009218338	0.05365
mmu-miR-30d	-1.72856	0.009309503	0.05402
mmu-miR-192	-1.59411	0.009595943	0.05479
mmu-miR-214	-1.87927	0.009703543	0.05713
mmu-miR-330	-2.34059	0.009797368	0.05742
mmu-miR-200b	-1.69398	0.009799637	0.05742
mmu-miR-181c	-2.09911	0.00995773	0.05905
mmu-miR-299	-2.03735	0.010046277	0.05905
mmu-miR-139-5p	-1.6264	0.010468603	0.05968
mmu-miR-186	-1.81872	0.01065935	0.05983

mmu-miR-324-5p	-1.86995	0.010764667	0.05983
mmu-miR-325	-1.84344	0.010906073	0.06324
mmu-miR-153	-4.80066	0.011240525	0.06357
mmu-miR-193	-2.45574	0.011285711	0.06379
mmu-miR-1895	2.55859	0.011584677	0.06572
mmu-miR-328	-2.0042	0.012033495	0.06572
mmu-miR-126-3p	-1.39469	0.012215028	0.06692
mmu-miR-223	-1.91164	0.012451448	0.06699
mmu-miR-138-1*	-1.68479	0.012463017	0.06699
mmu-miR-1946a	2.39723	0.012551704	0.06919
mmu-miR-338-5p	-2.86751	0.012637601	0.07014
mmu-miR-708	-3.01702	0.012693773	0.07389
mmu-miR-434-3p	-2.19223	0.012865381	0.07397
mmu-miR-351	-2.37834	0.012988642	0.07443
mmu-miR-137	-1.7708	0.013036343	0.07494
mmu-miR-335-5p	-2.53315	0.013788198	0.07511
mmu-miR-380-3p	-2.58017	0.013884538	0.0753
mmu-miR-674*	1.57611	0.014703295	0.07601
mmu-miR-100	-2.74532	0.014953475	0.07739
mmu-miR-669a-5p	-3.61488	0.015096397	0.07847
mmu-miR-23b	-1.53161	0.015244722	0.07847
mmu-miR-1907	2.45555	0.01537705	0.08042
mmu-miR-423-3p	-1.70252	0.015507588	0.08433
mmu-miR-299*	-2.47761	0.01610813	0.08508
mmu-miR-592	-2.8398	0.016205999	0.08679
mmu-miR-93	-1.60699	0.016335471	0.0886
mmu-miR-149	-2.22239	0.016756993	0.0886
mmu-let-7f	-2.19463	0.017453191	0.09154
mmu-miR-345-5p	-1.90109	0.018095628	0.0927
mmu-miR-193b	-2.58153	0.018260774	0.09271
mmu-miR-188-5p	-2.04392	0.018386111	0.09369
mmu-miR-19a	-1.7853	0.018908459	0.09369
mmu-miR-218	-1.43624	0.019014888	0.10063
mmu-miR-1196	3.207	0.019336767	0.10199
mmu-miR-301a	-3.8857	0.01970248	0.10334
mmu-miR-181b	-2.00147	0.019950138	0.10535
mmu-let-7b	-1.45045	0.019984549	0.1056
mmu-miR-874	-2.03634	0.020229113	0.10875
mmu-miR-27a*	-1.84957	0.021624689	0.11039
mmu-miR-324-3p	-1.75212	0.021867961	0.11039
mmu-miR-296-5p	-3.50793	0.021969837	0.11039
mmu-miR-467c	-3.23989	0.022811256	0.11225
mmu-miR-106b	-1.51305	0.023193604	0.11225
mmu-miR-9*	-2.06495	0.023497199	0.11227
mmu-miR-18a	-1.5934	0.024963326	0.11231
mmu-miR-200c	-1.39225	0.025223206	0.11372

mmu-miR-127*	-2.43532	0.025439871	0.11419
mmu-miR-760-3p	-3.09944	0.02636046	0.11479
mmu-miR-30b	-1.55875	0.026473096	0.11774
mmu-miR-450a	-3.73377	0.027091402	0.11899
mmu-miR-330*	2.29573	0.027391481	0.11923
mmu-miR-106b*	1.29589	0.028430831	0.12083
mmu-miR-468	2.13165	0.028964462	0.12206
mmu-miR-466a-3p	-4.06429	0.030661856	0.12569
mmu-miR-101a*	-1.28885	0.030845438	0.12569
mmu-miR-365	-1.82351	0.031189832	0.12569
mmu-miR-150	-2.3929	0.031554269	0.12784
mmu-miR-141	-1.50899	0.031776227	0.12808
mmu-miR-434-5p	-1.84056	0.032010767	0.12865
mmu-miR-152	-1.49214	0.03321339	0.13274
mmu-miR-652	-1.68283	0.033835056	0.1337
mmu-miR-132	-1.29497	0.033991268	0.13388
mmu-miR-877	-1.73121	0.035001372	0.13388
mmu-miR-342-3p	-1.48993	0.03687409	0.13437
mmu-miR-715	2.23634	0.037371201	0.13791
mmu-miR-18a*	-1.84533	0.038301586	0.13823
mmu-miR-204	-1.88814	0.03944791	0.13823
mmu-miR-362-5p	-1.76914	0.039458857	0.13889
mmu-miR-451	-3.74524	0.040950813	0.13889
mmu-miR-29a	-1.69818	0.041657025	0.13946
mmu-miR-455*	-5.56832	0.041850267	0.14436
mmu-miR-1949	1.24785	0.042603075	0.14457
mmu-miR-184	-1.50332	0.042672375	0.14559
mmu-miR-99b*	1.59427	0.046035675	0.14821
mmu-miR-20a*	-2.21561	0.046864358	0.14879
mmu-miR-484	-1.42163	0.047696773	0.15025

Listado de miRNAs analizados, con valor- $p < 0.05$. Incluye los resultados de *Fold change*, valor- p y el valor- p ajustado por múltiples comparaciones (método Benjamini-Hochberg) entre los animales Tratados y Control para el experimento de 20 semanas (Long). N = 4.

Tabla 9. miRNAs intestinales significativamente alterados tras tratamiento corto ("Short", 4 días) con dieta hipercalórica.

<i>miRNA</i>	<i>Fold Change</i>	<i>P-value</i>	<i>P (Benjamini-Hochberg)</i>
mmu-miR-218-2-3p	-11.64725	0.000060837	0.03048
mmu-miR-346-5p	-6.98594	0.000107912	0.03048
mmu-miR-879-3p	-8.11892	0.000158204	0.03048
mmu-miR-10b-3p	8.51092	0.000227522	0.03288
mmu-miR-138-1-3p	3.0443	0.000511794	0.0493
mmu-miR-466b-5p	-5.95447	0.000606616	0.05009
mmu-miR-147-3p	-3.58123	0.000701969	0.05072
mmu-miR-1894-3p	-3.8418	0.001703526	0.1094
mmu-miR-544-3p	-3.72996	0.002511558	0.13197
mmu-miR-711	4.09938	0.002999617	0.14448
mmu-miR-344-3p	3.60712	0.003590845	0.15965
mmu-miR-146b-3p	4.07155	0.006277028	0.25915
mmu-miR-666-3p	-4.36703	0.008251496	0.31796
mmu-miR-673-5p	-6.52681	0.010999306	0.37398
mmu-miR-466k	5.35207	0.017460241	0.51657
mmu-miR-216b-5p	-7.66976	0.017930361	0.51657
mmu-miR-212-3p	2.15494	0.018768258	0.51657
mmu-miR-208b-3p	-2.78608	0.019776257	0.51958
mmu-miR-370-3p	2.95073	0.021766603	0.547
mmu-miR-452-5p	2.11554	0.024926584	0.60032
mmu-miR-764-5p	2.31675	0.031533839	0.67506
mmu-miR-491-3p	-1.92819	0.042453533	0.80674
mmu-miR-216a-5p	-5.19735	0.043268094	0.80674
mmu-miR-298-5p	1.84308	0.045590019	0.82347
mmu-miR-291a-5p	2.93613	0.048801452	0.85476

Listado de miRNAs analizados con valor- $p < 0.05$. Incluye los resultados de *Fold change*, valor- p y el valor- p ajustado por múltiples comparaciones (método Benjamini-Hochberg) entre los animales Tratados y Control para el experimento de 4 días (Short). N = 5.

Tabla 10. miRNAs intestinales significativamente alterados a las dos horas tras tratamiento con carga oral de aceite de oliva suplementado con colesterol ("Pulse", 2 horas).

<i>miRNA</i>	<i>Fold Change</i>	<i>P-value</i>	<i>P (Benjamini-Hochberg)</i>
mmu-miR-1198-3p	-6.31318	0.000000601	0.00038
mmu-miR-146b-3p	5.43465	0.000009171	0.00217
mmu-miR-344d-3p	6.43262	0.000010398	0.00217
mmu-miR-295-3p	-4.29874	0.000036507	0.00572
mmu-miR-1953	-7.70450	0.000060548	0.00744
mmu-miR-202-5p	3.65784	0.000071176	0.00744
mmu-miR-218-2-3p	-12.77451	0.000085398	0.00765
mmu-miR-669k-3p	3.08565	0.000415439	0.02965
mmu-miR-193b-5p	6.00800	0.000425593	0.02965
mmu-miR-344c-3p	-2.62812	0.000556269	0.03488
mmu-miR-742-5p	-6.80429	0.000934505	0.05327
mmu-miR-669i	-2.61952	0.003287716	0.15185
mmu-miR-21a-3p	1.87419	0.004237462	0.16606
mmu-miR-431-3p	-4.19093	0.006663082	0.24575
mmu-miR-669h-3p	-2.17928	0.008379005	0.27651
mmu-miR-1938	3.92242	0.011373244	0.33957
mmu-miR-337-5p	2.78200	0.012927918	0.36473
mmu-miR-711	3.46159	0.013379281	0.36473
mmu-miR-208a-5p	1.71258	0.016217771	0.40082
mmu-miR-495-3p	1.39168	0.016368189	0.40082
mmu-miR-300-5p	2.33113	0.016620968	0.40082
mmu-miR-291a-5p	2.30465	0.017658152	0.40534
mmu-miR-216a-5p	-10.26927	0.01825907	0.40534
mmu-miR-217-5p	-11.15673	0.01874785	0.40534
mmu-miR-216b-5p	-11.09591	0.025384101	0.51752
mmu-miR-133a-5p	-2.54275	0.02714961	0.53196
mmu-miR-1929-5p	-2.89497	0.028630244	0.54397
mmu-miR-212-3p	1.45241	0.030170276	0.55638
mmu-miR-449c-5p	1.55212	0.035099061	0.60451
mmu-miR-879-3p	-3.41937	0.035334039	0.60451
mmu-miR-343	2.47500	0.035672674	0.60451
mmu-miR-1894-5p	-2.23618	0.039274597	0.61492
mmu-miR-433-5p	-1.71165	0.041335566	0.61492
mmu-miR-671-3p	2.76779	0.041461315	0.61492
mmu-miR-412-3p	1.84826	0.041932827	0.61492
mmu-miR-129-2-3p	-3.38114	0.043805288	0.62423
mmu-miR-770-5p	3.06709	0.045293095	0.63108
mmu-miR-466h-5p	-2.52719	0.049487627	0.67454

Listado de miRNAs analizados con valor- $p < 0.05$. Incluye los resultados de *Fold change*, valor- p y el valor- p ajustado por múltiples comparaciones (método Benjamini-Hochberg) entre los animales Tratados y Control para el experimento de 2 horas (Pulse). N = 5.

2.2. SELECCIÓN DE LOS miRNAS CANDIDATOS.

Con objeto de determinar los miRNAs intestinales candidatos a participar en la regulación de los genes modificados por la dieta hipercalórica y en lipemia postprandial, se seleccionaron una serie de miRNAs. De los miRNAs para *Mus musculus* significativamente modificados para el experimento Long (Tabla 8), Short (Tabla 9) y Pulse (Tabla 10) seleccionamos aquellos comunes a los tres experimentos (**Figura 31**): mmu-miR-218-2-3p es común a los tres experimentos; mmu-miR-147-3p, mmu-miR-138-1-3p, mmu-miR-1894-3p y mmu-miR-666-3p son comunes entre los experimentos Long y Short; mmu-miR-449c-5p, mmu-miR-1894-5p y mmu-miR-217-5p son comunes entre los experimentos Long y Pulse; mmu-miR-879-3p, mmu-miR-711, mmu-miR-146b-3p, mmu-miR-216b-5p, mmu-miR-212-3p, mmu-miR-216a-5p, mmu-miR-291a-5p son comunes a los experimentos Short y Pulse.

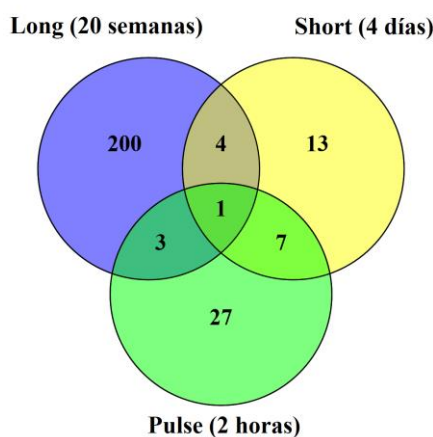


Figura 31. Representación de los miRNAs comunes a los diferentes experimentos

Diagrama de Venn que representa los miRNAs comunes a los distintos experimentos.

Del listado de miRNAs comunes (15) se seleccionaron sólo los que se encuentran en humanos (10). Con objeto de validar el mayor número de miRNAs posible, seleccionamos además algunos exclusivos (significativamente modificados) para cada uno de los experimentos. En el caso del experimento Long, ya que obtuvimos una gran cantidad de miRNAs con valor- $p < 0.05$, restringimos a aquellos con valor- $p < 0,0001$ (Tabla 8) y que tuviesen su homólogo en humanos. De los resultados para los experimentos Short y Pulse, se seleccionaron los de valor- $p < 0.05$, y en función del valor absoluto mayor del *Fold change* y que presentase su homólogo en humanos. Finalmente, se seleccionan 35 miRNAs para verificar en la cinética y validar en las diferentes cohortes (**Tabla 11**).

Tabla 11. Lista de miRNAs candidatos.

mmu-miR-218-2-3p	mmu-miR-711	mmu-miR-129-2-3p	mmu-miR-133b-3p
mmu-miR-138-1-3p	mmu-miR-10b-3p	mmu-miR-21a-3p	mmu-miR-9-5p
mmu-miR-147-3p	mmu-miR-346-5p	mmu-let-7i-5p	mmu-miR-199a-3p
mmu-miR-217-5p	mmu-miR-370-3p	mmu-miR-542-5p	mmu-miR-143-3p
mmu-miR-449c-5p	mmu-miR-544-3p	mmu-miR-21a-5p	mmu-miR-208b-3p
mmu-miR-146b-3p	mmu-miR-452-5p	mmu-miR-154-5p	mmu-miR-491-3p
mmu-miR-212-3p	mmu-miR-202-5p	mmu-miR-23a-3p	mmu-miR-764-5p
mmu-miR-216a-5p	mmu-miR-193b-5p	mmu-miR-133a-3p	mmu-miR-337-5p
mmu-miR-216b-5p	mmu-miR-431-3p	mmu-miR-598-3p	

3. RNA-Seq DE LOS EXPERIMENTOS “SHORT” y “PULSE”

Con objeto de profundizar en nuestros estudios, procedimos al análisis por secuenciación masiva del miRNoma para las muestras de RNA de los experimentos Short y Pulse, reportándonos una serie de miRNAs conocidos cuya expresión se encuentra significativamente modificada entre los grupos Control y Tratados (Tabla 12).

Tabla 12. Informe BGI de miRNAs intestinales diferencialmente expresados en los experimentos “Short” y “Pulse”.

SHORT (4 días)					
<i>miRNA</i>	<i>Control Reads Mean</i>	<i>Treated Reads Mean</i>	<i>log2Ratio</i>	<i>P-value</i>	<i>FDR</i>
mmu-miR-217-5p	628.67	340.00	-1.11	1.97E-06	3.97E-04
mmu-miR-216b-5p	348.67	151.00	-1.43	3.87E-08	9.74E-06
mmu-miR-122-5p	93.33	421.33	1.94	3.29E-11	3.31E-08
mmu-miR-6538	55.00	15.00	-2.11	2.34E-08	7.84E-06
mmu-miR-147-3p	48.00	20.33	-1.54	4.80E-05	6.04E-03
mmu-miR-690	2.33	29.00	3.34	6.53E-09	3.29E-06
PULSE (2 horas)					
<i>miRNA</i>	<i>Control Reads Mean</i>	<i>Treated Reads Mean</i>	<i>log2Ratio</i>	<i>P-value</i>	<i>FDR</i>
mmu-miR-145a-5p	42225,33	17168,00	-1,21	8,01E-15	2,65E-12
mmu-miR-451a	1034,00	396,33	-1,30	5,20E-07	7,36E-05
mmu-miR-132-3p	959,67	439,33	-1,03	5,51E-05	4,56E-03
mmu-miR-217-5p	1085,33	238,33	-2,20	4,76E-15	2,36E-12
mmu-miR-150-5p	433,33	157,00	-1,38	3,57E-06	3,93E-04
mmu-miR-216b-5p	456,67	100,67	-2,19	1,01E-11	2,50E-09
mmu-miR-31-3p	378,33	85,33	-2,07	6,99E-11	1,39E-08
mmu-miR-532-3p	237,67	91,67	-1,27	7,66E-05	5,85E-03
mmu-miR-186-3p	340,67	85,00	-1,92	1,74E-09	2,88E-07
mmu-miR-1839-3p	90,00	24,33	-1,77	4,99E-06	4,95E-04
mmu-miR-6538	2,67	50,33	4,39	3,41E-15	2,36E-12

mmu-miR-33-3p	24,33	3,33	-2,77	1,32E-06	1,63E-04
mmu-miR-217-3p	7,33	0,00	-12,78	1,28E-05	1,16E-03
mmu-miR-5126	7,33	25,67	1,96	1,17E-04	7,72E-03

Listado de miRNAs significativamente modificados tras el tratamiento corto (Short, 4 días) con dieta hipercalórica y carga oral (Pulse, 2 horas) con aceite de oliva y colesterol, obtenidos por secuenciación del transcriptoma (RNA-Seq). N = 3 por grupo.

De éstos, mmu-miR-217-5p, mmu-miR-216b-5p y mmu-miR-147-3p ya se encontraban en el listado de miRNAs candidatos; mmu-miR-6538, mmu-miR-690, mmu-miR-1839-3p y mmu-miR-5126 se descartaron por no poseer homólogo en humanos.

Del miR-33-3p ya se conoce su importancia en la homeostasis del colesterol y los lípidos, por ello no se continuó con su estudio. El resto de miRNAs se incluyeron en el listado de candidatos para verificar en las muestras procedentes de los experimentos de cinética.

4. VERIFICACIÓN DE LAS VARIACIONES DE EXPRESIÓN DE miRNAs INTESTINALES EN MUESTRAS DE CINÉTICA

Para verificar y estudiar la cinética de expresión de los miRNAs candidatos (obtenidos de los *screenings* Long, Short, Pulse y complementados con los datos de RNA-Seq para los experimentos Short y Pulse) en respuesta a la lipemia postprandial, estudiamos la expresión de cada uno de ellos por PCR a tiempo real utilizando las muestras obtenidas del experimento “Cinética”.

Los miRNAs analizados respondieron de diferente manera, algunos de los cuales solo cambiaban de manera significativa a distintos tiempos analizados, mientras que pocos cambiaban de manera consistente en todos los puntos. De acuerdo a los resultados previos y los obtenidos en la cinética (**Figura 32**), miR-218-2-3p, miR-138-1-3p, miR-147-3p, miR-217-5p, miR-216b-5p, miR-544 -3p, miR-202-5p, miR-129-2-3p, miR-208b-3p y miR-150-5p se seleccionaron para validar en la siguiente cohorte; mientras miR-449c-5p, miR-146b-3p, miR-212-3p, miR-711, miR-10b-3p, miR-346-5p, miR-370-3p, miR-452-5p, miR-193b-5p, miR-431-3p, let-7i-5p, miR-542-5p, miR-21a-5p, miR-154-5p, miR-23a-3p, miR-133a-3p, miR-598-3p, miR-133b-3p, miR-9-5p, miR-199a-3p, miR-143-3p, miR-491-3p, miR-764-5p, miR-337-5p, miR-122-5p, miR-145a-5p, miR-451a, miR-132-3p, miR-31-3p, miR-532-3p, miR-21a-3p, miR-186-3p, miR-217-3p y 216a-5p (**Figura 33**) se excluyeron al no observarse cambios significativos para ninguno de los tiempos analizados.

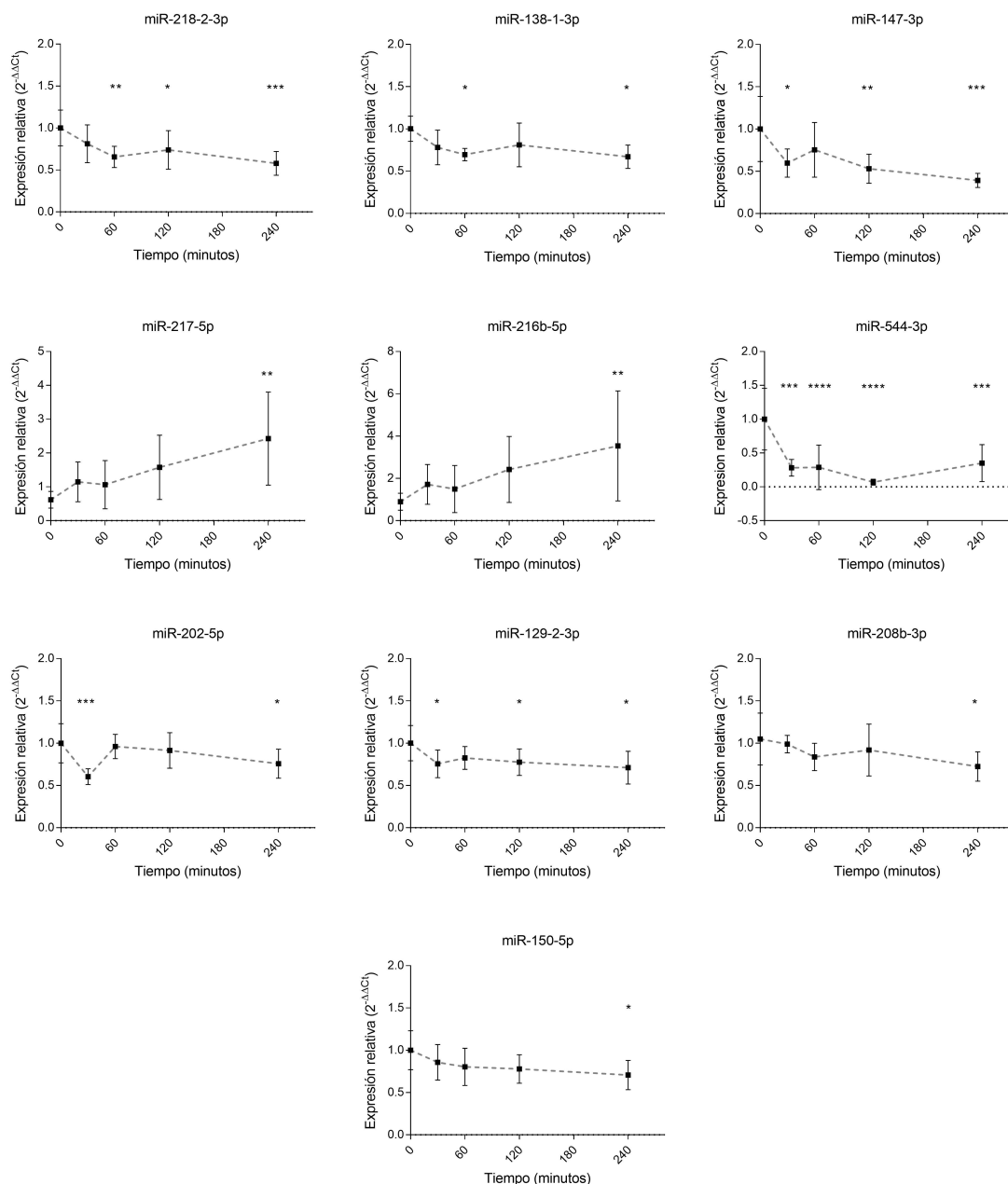
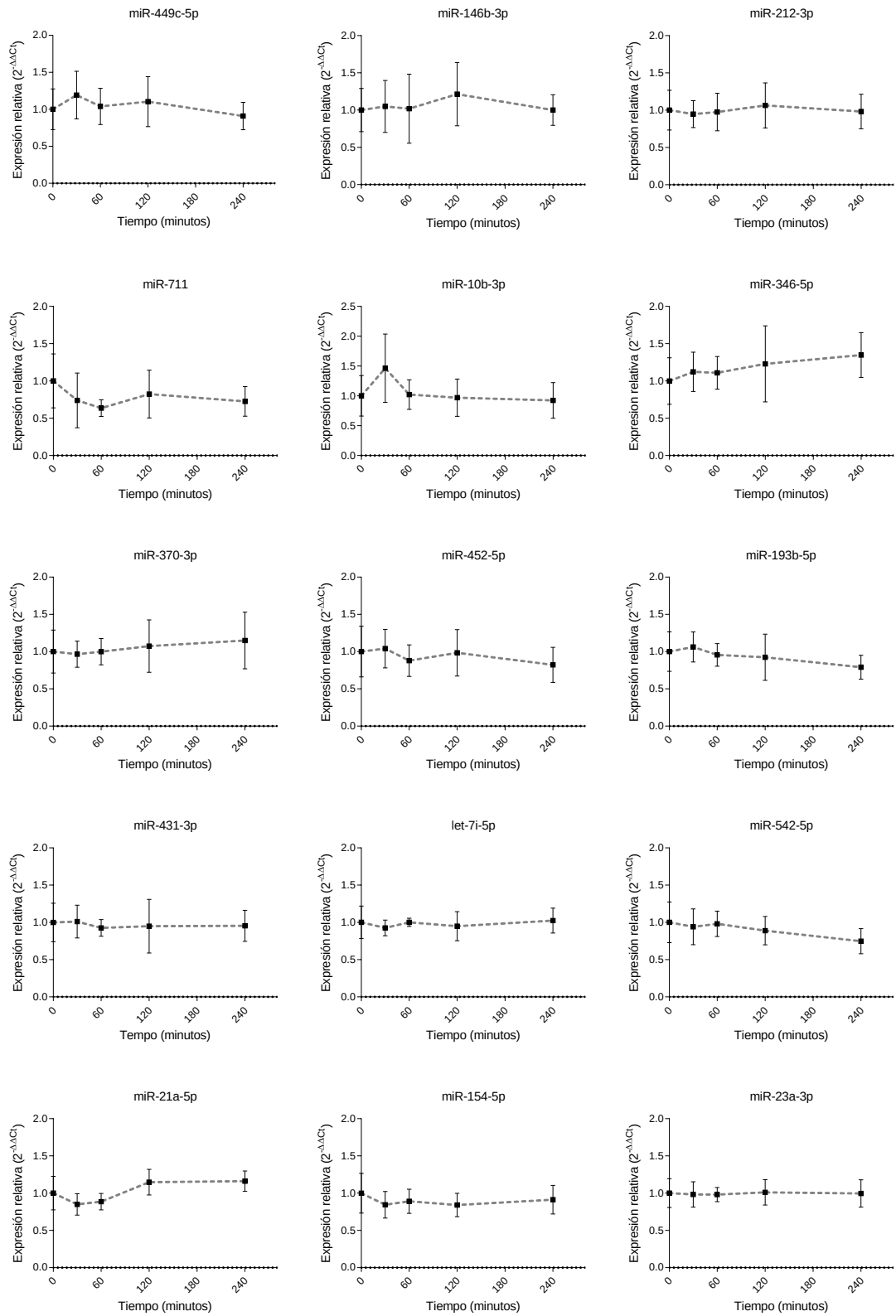


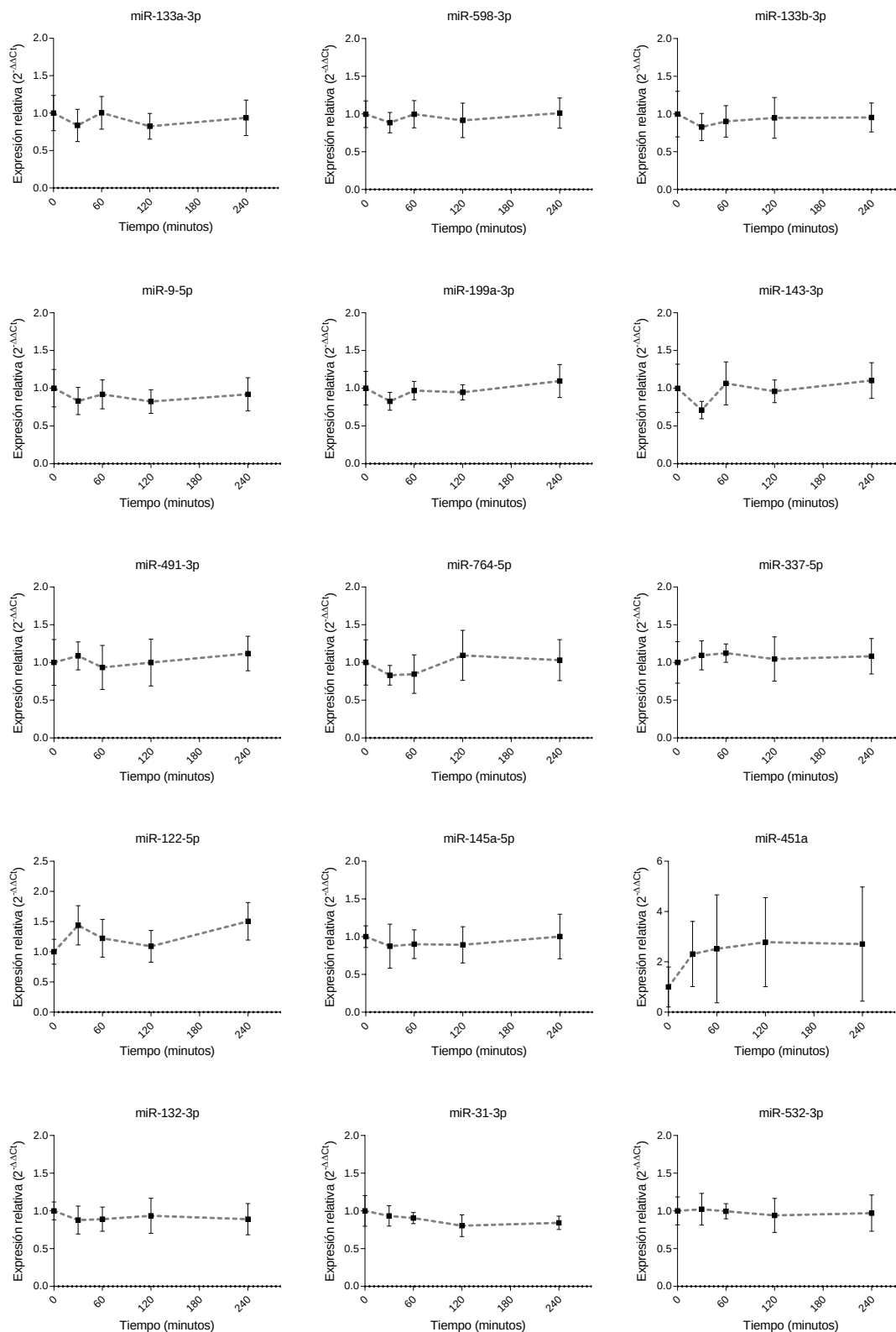
Figura 32. Cinética de expresión para cada miRNA seleccionado.

Gráficas que representan la expresión de cada miRNA en el tiempo, tomándose las medidas de expresión relativa a los 30 minutos, 1 hora (60), 2 horas (120) y 4 horas (240). La significancia estadística del cambio de expresión respecto al control (tiempo 0 minutos) determina su selección para la validación en la siguiente cohorte. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. N ≥ 7.

RESULTADOS



...continúa.



...continúa.

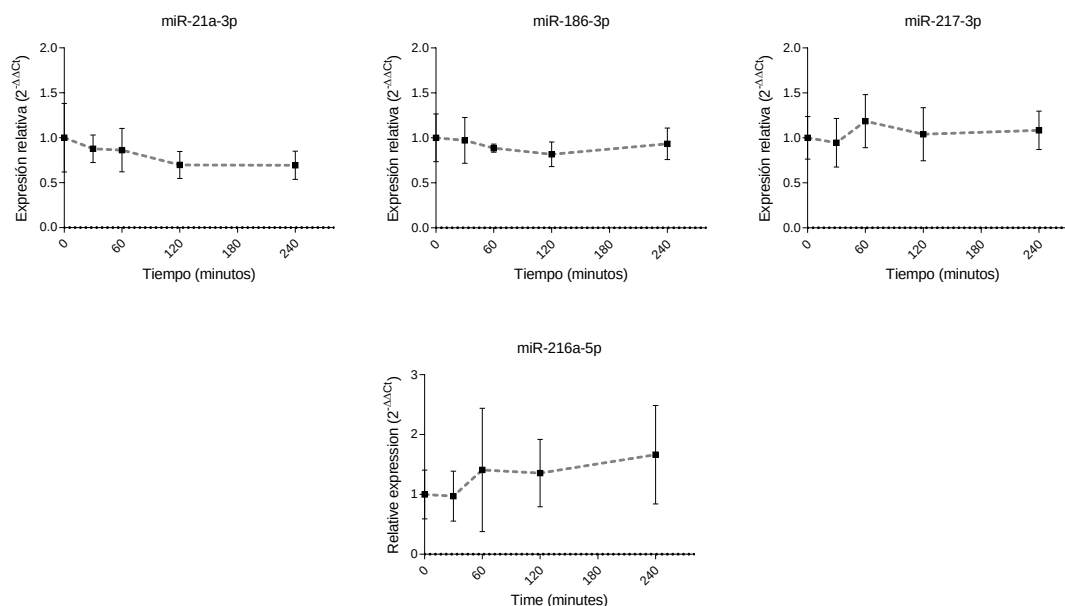


Figura 33. Cinética de expresión para cada miRNA excluido.

Gráficas que representan la expresión de cada miRNA en el tiempo, tomándose las medidas de expresión relativa a los 30 minutos, 1 hora (60), 2 horas (120) y 4 horas (240). La ausencia de significancia estadística en el cambio de expresión respecto al control (tiempo 0 minutos) determina su exclusión para la validación en las siguientes cohortes. $N \geq 7$.

5. RNA-Seq DE miRNAs PROCEDENTES DE ENTEROIDES

Debido a la posibilidad de que los cambios de expresión observados para los miRNAs candidatos seleccionados pudiesen estar bajo la influencia de tipos celulares distintos a los propiamente específicos del intestino (tales como enterocitos, células de Goblet, células de Paneth y células enteroendocrinas entre otras), se usaron, específicamente, enteroides duodenales para analizar la expresión de miRNAs. Como se indica en la sección de introducción (pagina 34), los organoides representan un modelo mas análogo, “celularmente” hablando, al intestino, sin embargo también tienen sus limitaciones (página 35). Como resultado del análisis por secuenciación masiva de las muestras de RNA de enteroides de ratón sometidos a un tratamiento de 24 horas con micelas postprandiales (PPM) frente a muestras control con “micelas vacías” (Empty micelles, EM), se obtuvieron una serie de miRNAs diferencialmente expresados (**Tablas suplementarias 8 y 9**). Mediante el análisis estadístico del recuento para cada miRNA en función del tratamiento obtuvimos tres miRNAs cuyas diferencias de expresión son estadísticamente significativas ($p\text{-value} < 0.05$): mmu-miR-30d-5p, mmu-miR-15a-5p y mmu-miR-218-5p (**Tabla 13**).

Tabla 13. miRNAs diferencialmente expresados en enteroides tratados.

<i>miRNA</i>	<i>LogFC</i>	<i>logCPM</i>	<i>P-value</i>	<i>FDR</i>
mmu-miR-30d-5p	17.93063	12.40625	2.18E-150	4.30E-148
mmu-miR-15a-5p	7.51717	2.22554	3.74E-12	3.69E-10
mmu-miR-218-5p	0.65935	10.13204	3.57E-02	1

Se muestran los miRNAs cuyas diferencias de expresión son significativas ($P\text{-value} < 0.05$). Los resultados obtenidos de la secuenciación muestran el logaritmo del *Fold change* (*logFC*), el logaritmo de las unidades por millón (*log CPM*), el valor-p (*P-value*) y el FDR.

6. VALIDACIÓN DE miRNAs INTESTINALES EN COHORTE 1

Una vez analizados los datos de cinética de expresión de los miRNAs intestinales, seleccionamos aquellos candidatos con diferencias de expresión significativas y acotamos los tiempos de experimentación a las observaciones obtenidas a 2 y 4 horas tras la administración de la carga oral. Los miRNAs seleccionados anteriormente pasaron a ser validados en una cohorte mayor de animales que incluía animales de ambos sexos.

Dado que el objetivo es la búsqueda de miRNAs específicos de intestino, presupusimos que los miRNAs candidatos se encontraban expresados mínimamente en los animales KO, por lo que validamos únicamente en las muestras de la cohorte que conforman los animales de genotipo WT. Al realizar los primeros análisis encontramos que la expresión de algunos microRNAs era diferente en función del sexo, por lo que decidimos separar el análisis en función del sexo (**Figura 34**). En esta aproximación inicial solo se analizó el tiempo de 2h.

Encontramos que, en cuanto a las diferencias de expresión en función del sexo, hay diferente magnitud de la respuesta al tratamiento, como por ejemplo el miR-150-5p; casos en los que en machos no se regula y en hembras sí, como es el caso de los miR-138-1-3p o miR-208b-3p; o en que el sentido de la regulación difiere como es el caso de miR-218-2-3p o miR-129-2-3p. Así, con los resultados obtenidos observamos que existen diferencias en la respuesta postprandial dependiendo del sexo y en el caso de los machos no observamos los cambios esperados de acuerdo con los resultados previos. Por ello, los miRNAs candidatos se validaron en una nueva cohorte de animales en la que se incluyó el tiempo de 4 horas y diseccionamos las diferentes secciones del intestino.

RESULTADOS

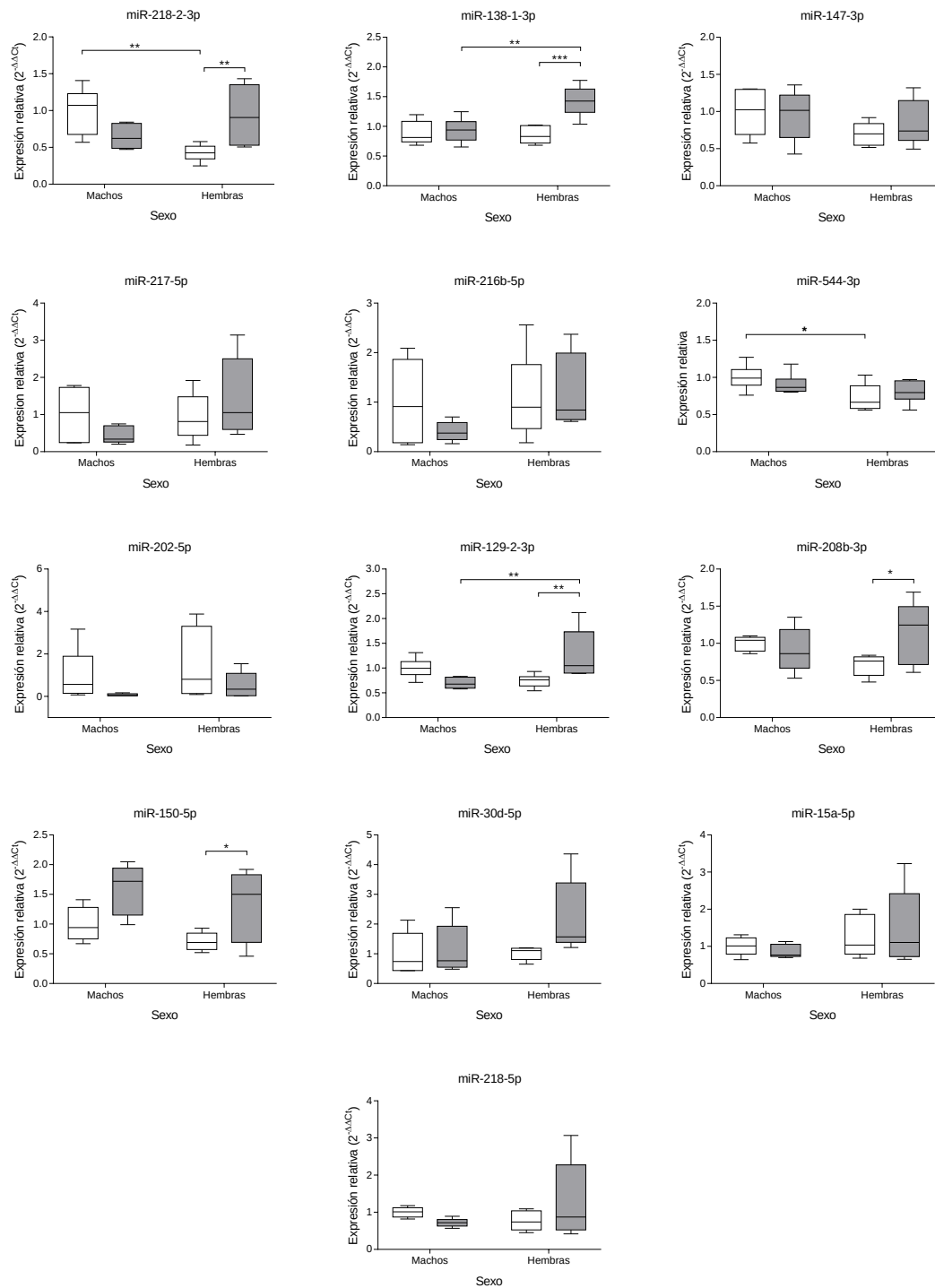


Figura 34. Validación de los cambios de expresión de cada miRNA seleccionado en función del sexo.

Gráficas que representan la expresión relativa de cada miRNA a las 2 horas tras la carga oral de oleico enriquecido con colesterol. Se diferencia la expresión en función del sexo, indicándose la significancia estadística en cada caso * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. $N \geq 10$.

7. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE microRNAS A LO LARGO DEL INTESTINO Y EN FUNCIÓN DEL SEXO.

Habiendo encontrado diferencias en función del sexo y dado que para algunos de los miRNAs no se encontraron diferencias a las 2 horas, validamos los candidatos seleccionados y los obtenidos por RNA-Seq de enteroides, en los animales WT de una nueva cohorte generada que incluía animales de ambos sexos, el tiempo 4h de recogida tras la carga oral, y donde además se diseccionó el intestino en las diferentes porciones. Así, validamos los cambios de expresión de estos candidatos por qPCR en duodeno, yeyuno, íleon, colon e hígado tanto a 2 horas como a 4 horas tras la administración de la carga oral (**Figura 35**).



Figura 35. Análisis de la expresión para cada miRNA a lo largo del intestino, colon e hígado.

Representación mediante *heatmap* de los resultados para el análisis de expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) de los miRNAs candidatos en las diferentes secciones de intestino delgado, colon e hígado. Se observan los cambios, a las 2 horas (2h) y 4 horas (4h) tras la carga oral de oleico enriquecido con colesterol, respecto al control (C) con una carga oral de agua, diferenciándose la expresión en función del sexo. N ≥ 8 por grupo.

Con los resultados del análisis estadístico, que pueden observarse más detalladamente en las **Figuras 36-40**, para los cambios de expresión relativa de cada miRNA a lo largo del intestino y en hígado, a las 2 horas y 4 horas tras la carga oral de oleico enriquecido con colesterol, observamos que:

- En machos, el miRNA-218-2-3p aumenta su expresión en duodeno (Fig. 36) a las 2 horas tras el tratamiento y disminuye a las 4 horas de manera significativa, en yeyuno (Fig. 37) se incrementa su expresión a las 2 horas tras el tratamiento y a las 4 horas la expresión se normaliza. En íleon (Fig. 38) se observa una disminución de la expresión a las 4 horas, que en colon (Fig. 39) es significativa con respecto a la expresión del control. Para hígado (Fig. 40), aunque se observa un incremento a las 2 horas, éste no es significativo. Para las hembras no se producen cambios significativos en la expresión del miRNA excepto la disminución de la expresión a las 4 horas en íleon (Fig. 38).
- El miR-138-1-3p en machos, tan solo en duodeno (Fig. 36) y yeyuno (Fig. 37), tiende a aumentar su expresión a las 2 horas pero es a las 4 h tras el tratamiento cuando se produce una disminución significativa en su expresión. En el caso de las hembras no observamos cambios significativos salvo en íleon (Fig. 38) a las 4 horas tras el tratamiento.
- El miR-147-3p en duodeno (Fig. 36) tiene una tendencia similar en machos y hembras aunque el cambio es sólo significativo en machos, incrementándose su expresión a las 2 horas tras el tratamiento. En yeyuno (Fig. 37) sólo machos mantienen la misma tendencia y en íleon (Fig. 38) ambos mantienen una tendencia similar, aunque sólo es significativa la disminución a las 4 horas para las hembras. En colon (Fig. 39) e hígado (Fig. 40) no se observa ninguna respuesta ante el tratamiento, aunque los niveles de expresión difieren entre hembras y machos.
- El miR-217-5p no presenta cambios significativos respecto al control para ninguna de las secciones estudiadas ni en hígado, aunque si presenta cambios significativos entre las 2 y 4 horas tras el tratamiento en yeyuno para machos (Fig.37), e íleon y colon para hembras (Fig.38).
- El miR-216b-5p en machos se ve alterada su expresión en yeyuno (Fig. 37), en que aumenta su expresión a las 2 horas y disminuye significativamente a las 4 horas. En el caso de hembras hay una tendencia a la disminución de su expresión, de manera significativa en duodeno (Fig. 36) a las 2 horas y en colon (Fig. 39) a las 4 horas. De nuevo observamos una diferencia en los niveles de expresión en función del sexo para colon (Fig. 39) y algo menor en hígado (Fig. 40).

- En los machos, el miR-544-3p aumenta su expresión de manera significativa a las 2 horas tanto en duodeno (Fig. 36) como yeyuno (Fig. 37), seguido de una disminución significativa a las 4 horas tras el tratamiento, mientras en hembras solo se observa una disminución significativa a las 4 horas en íleon (Fig. 38).
- El miR-202-5p disminuye su expresión de manera significativa a las 4 horas tras la carga oral en yeyuno (Fig. 37) para ambos sexos, en íleon (Fig. 38), colon (Fig. 39) e hígado (Fig. 40) sólo para hembras.
- El miR-129-2-3p aumenta su expresión en duodeno (Fig. 36) a las 2 horas tras el tratamiento, siendo significativo el cambio sólo en hembras. En yeyuno (Fig. 37) sin embargo se produce una disminución que es significativa a las 4 horas tras el tratamiento para ambos sexos, y se repite esta disminución de su expresión con respecto al control en íleon (Fig. 38) sólo para hembras, en colon (Fig. 39) para ambos sexos y en hígado (Fig. 40) sólo en machos.
- El miR-208b-3p aumenta su expresión a las 2 horas produciéndose una disminución a significativa a las 4 horas en duodeno (Fig. 36) y yeyuno (Fig. 37) para machos, y en íleon (Fig. 38) para hembras. En colon (Fig. 39) e hígado (Fig. 40) no observamos cambios significativos.
- El miR-30d-5p sólo presenta cambios significativos en intestino en hembras a nivel de duodeno (Fig.36) y colon (Fig. 39). En hígado observamos cambios significativos con el tratamiento sólo en machos (Fig.40).
- Para el miR-15a-5p no observamos cambios significativos a nivel intestinal ni hepático, y una alta variabilidad de la expresión del miRNA entre las muestras de cada grupo.
- El miR-218-5p presenta sólo diferencias significativas con el tratamiento a nivel del duodeno (Fig.36), lo cual concuerda con que este miRNA se seleccionó previamente a partir de los resultados de RNA-Seq de enteroides duodenales (Tabla 13).
- El miR-150-5p disminuye su expresión de manera significativa únicamente en hembras en duodeno e íleon, a las 4 horas tras el tratamiento (Fig. 36 y 38).

Destacar que volvemos a observar las diferencias de expresión entre sexos que ya se habían observado en la cohorte 1 y por la cual se decidió dividir el análisis en función del sexo. Estas diferencias se observan tanto a nivel de control, como es el caso de miR-202-5p en yeyuno, como en la respuesta al tratamiento, como por ejemplo miR-218-2-3p y miR-208b-3p en duodeno (**Tablas suplementarias 10 a 14**, donde se puede observar los resultados completos del análisis estadístico realizado).

RESULTADOS

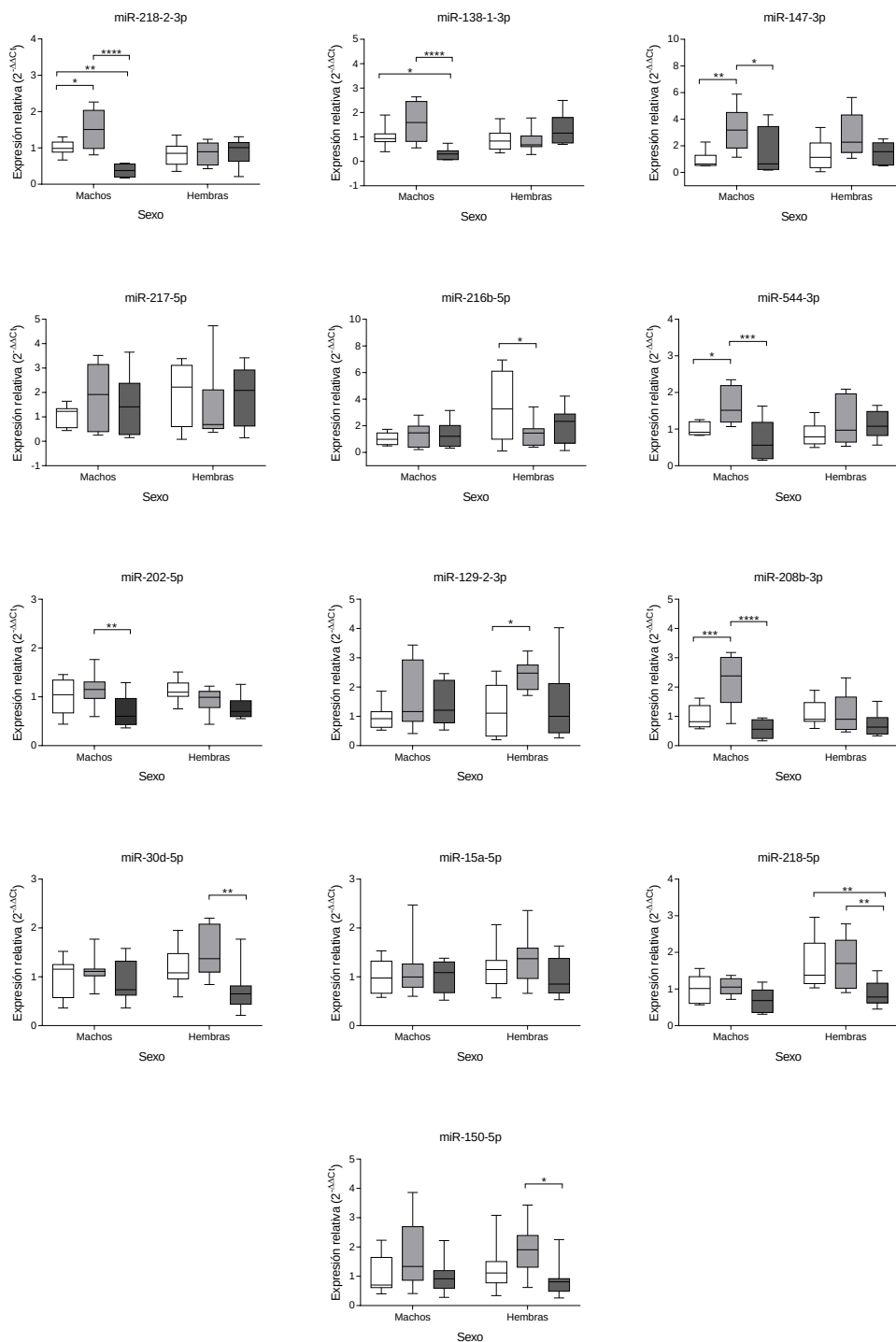


Figura 36. Validación de los cambios de expresión de cada miRNA seleccionado en el duodeno

Gráficas que representan la expresión relativa de cada miRNA, a las 2 horas y 4 horas tras la carga oral de oleico enriquecido con colesterol, en el duodeno. Se diferencia la expresión en función del sexo y condiciones de lipemia postprandial, indicándose en el caso que corresponda, la significancia estadística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. □ Control carga oral agua, ■ 2 horas tras la carga oral y ■ 4 horas tras la carga oral de aceite de oliva enriquecido con colesterol. $N \geq 8$ por grupo.

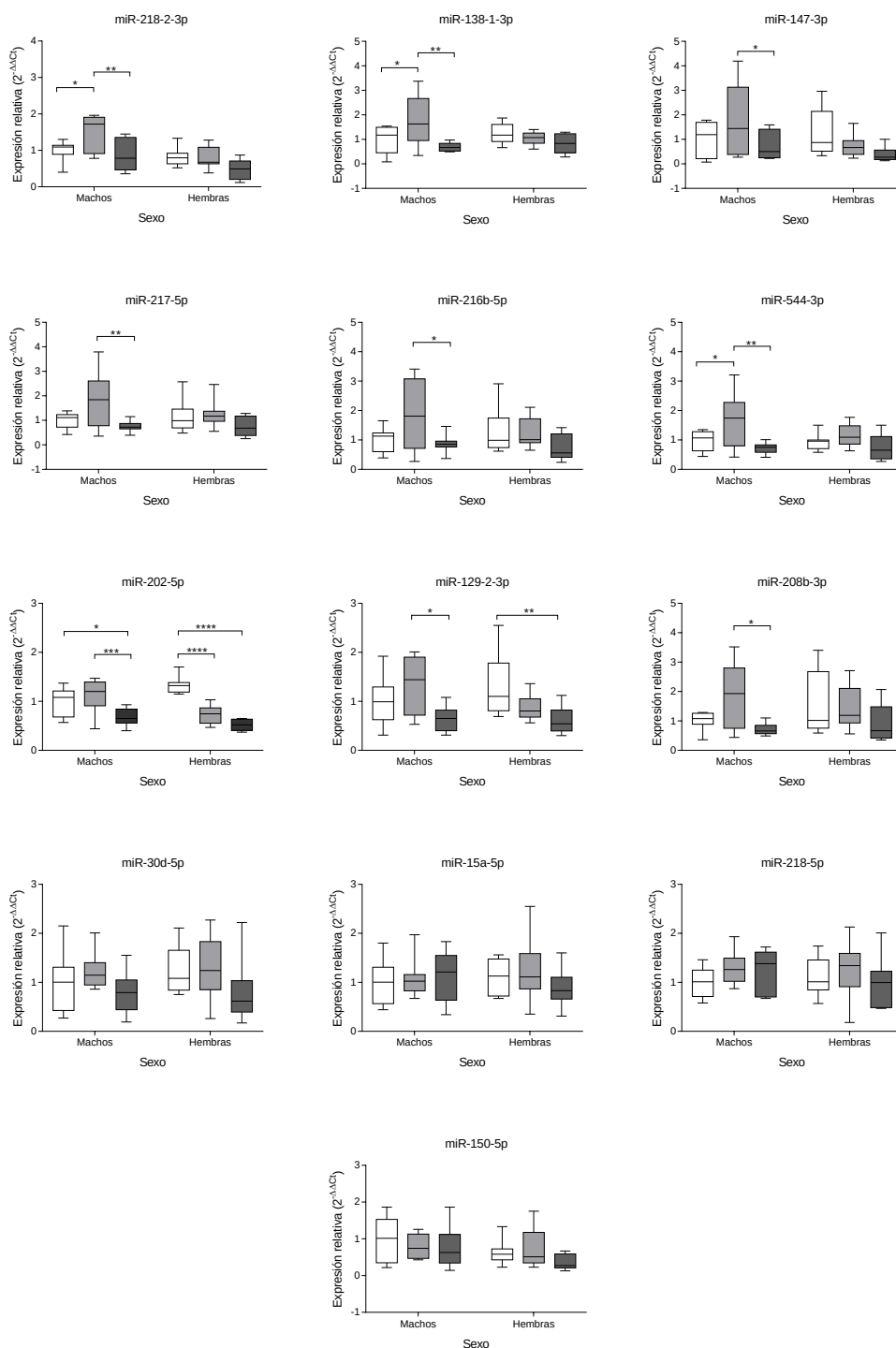


Figura 37. Validación de los cambios de expresión de cada miRNA seleccionado en el yeyuno.

Gráficas que representan la expresión relativa de cada miRNA, a las 2 horas y 4 horas tras la carga oral de oleico enriquecido con colesterol, en el duodeno. Se diferencia la expresión en función del sexo y condiciones de lipemia postprandial, indicándose en el caso que corresponda, la significancia estadística *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. □ Control carga oral agua, ▒ 2 horas tras la carga oral y ■ 4 horas tras la carga oral de aceite de oliva enriquecido con colesterol. N ≥ 8 por grupo.

RESULTADOS

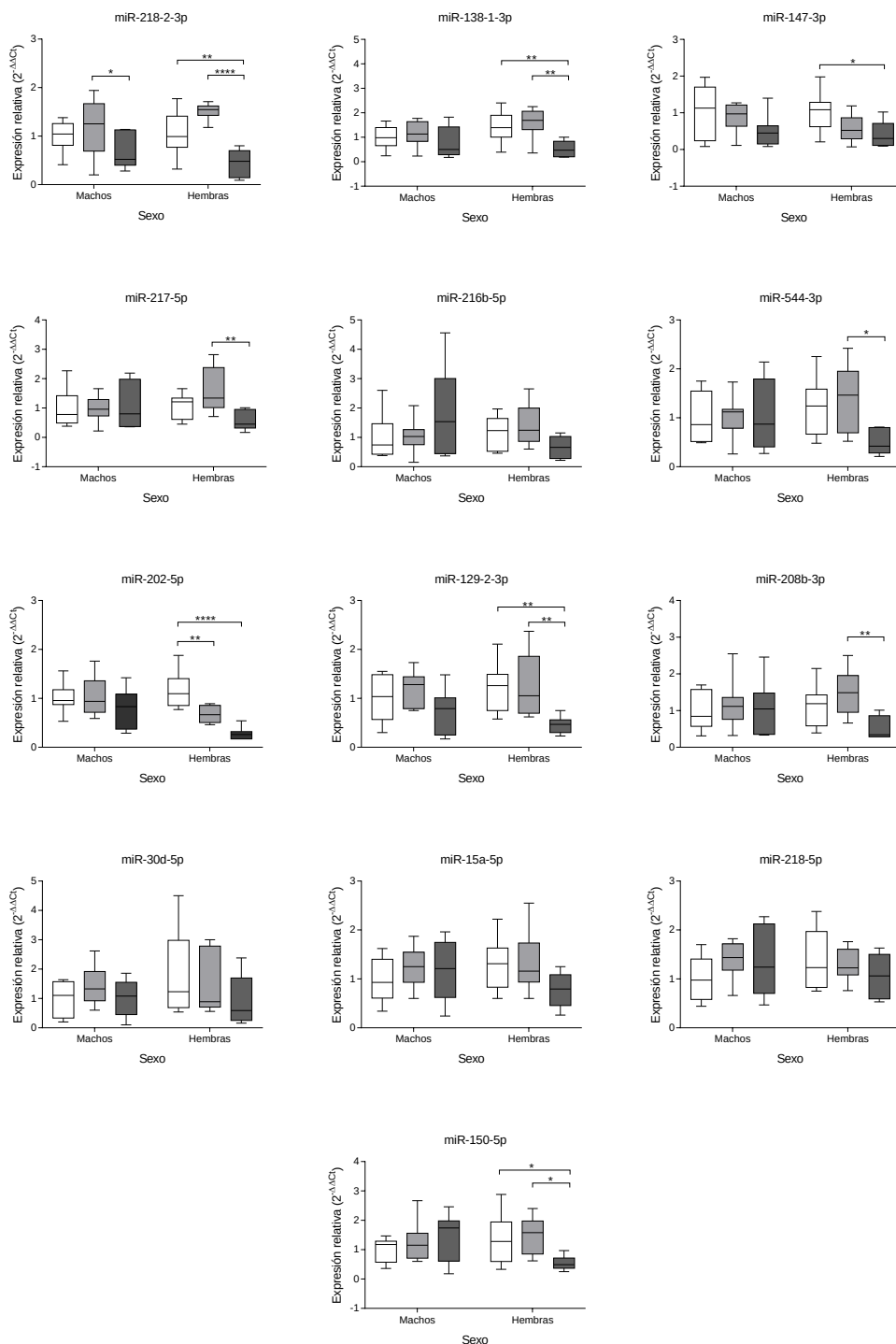


Figura 38. Validación de los cambios de expresión de cada miRNA seleccionado en el íleon.

Gráficas que representan la expresión relativa de cada miRNA, a las 2 horas y 4 horas tras la carga oral de oleico enriquecido con colesterol, en el duodeno. Se diferencia la expresión en función del sexo y condiciones de lipemia postprandial, indicándose en el caso que corresponda, la significancia estadística *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. □ Control carga oral agua, ■ 2 horas tras la carga oral y ■ 4 horas tras la carga oral de aceite de oliva enriquecido con colesterol. N ≥ 8 por grupo.

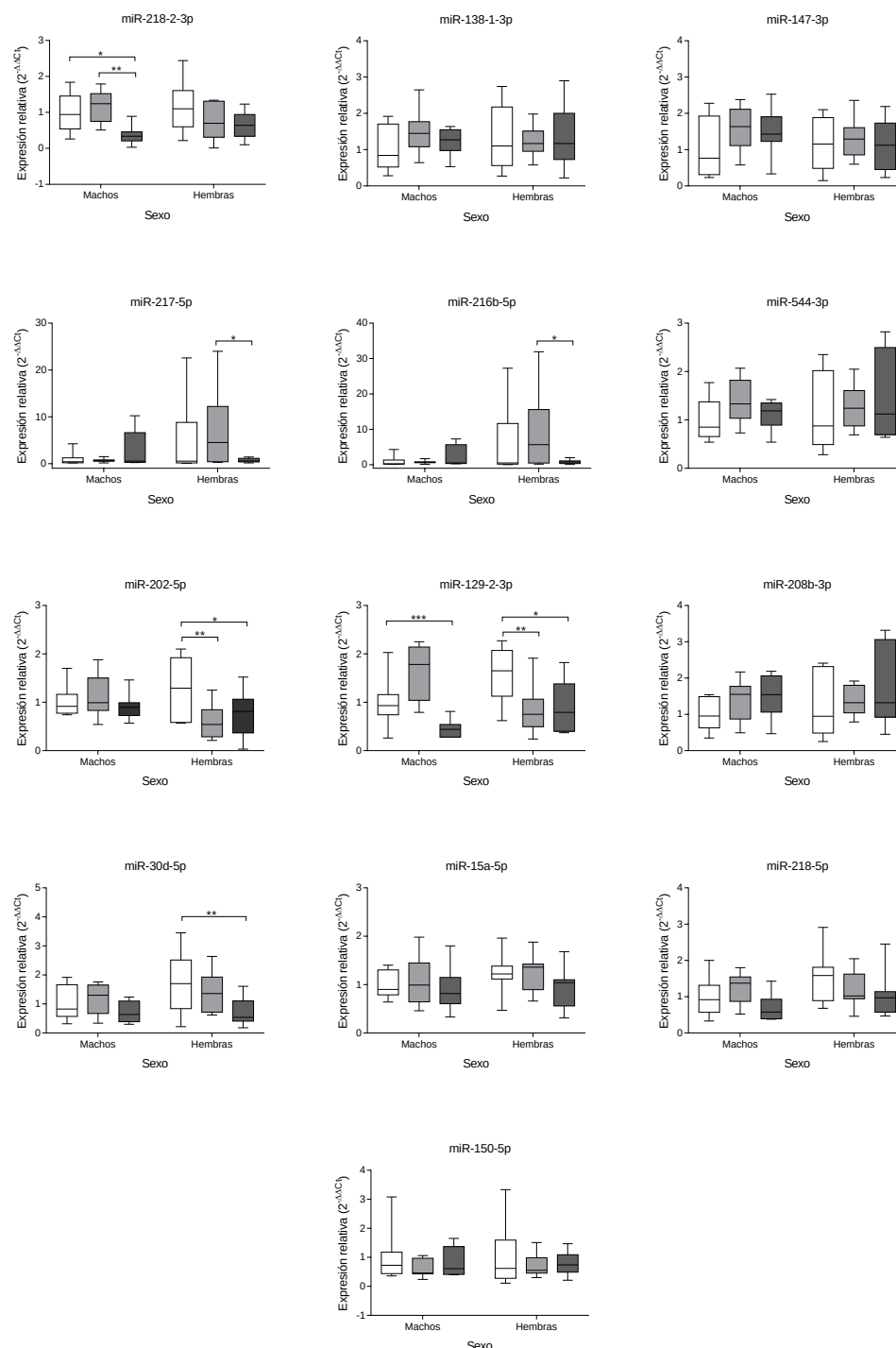


Figura 39. Validación de los cambios de expresión de cada miRNA seleccionado en el colon.

Gráficas que representan la expresión relativa de cada miRNA, a las 2 horas y 4 horas tras la carga oral de oleico enriquecido con colesterol, en el duodeno. Se diferencia la expresión en función del sexo y condiciones de lipemia postprandial, indicándose en el caso que corresponda, la significancia estadística *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. □ Control carga oral agua, ▒ 2 horas tras la carga oral y ■ 4 horas tras la carga oral de aceite de oliva enriquecido con colesterol. N ≥ 8 por grupo.

RESULTADOS

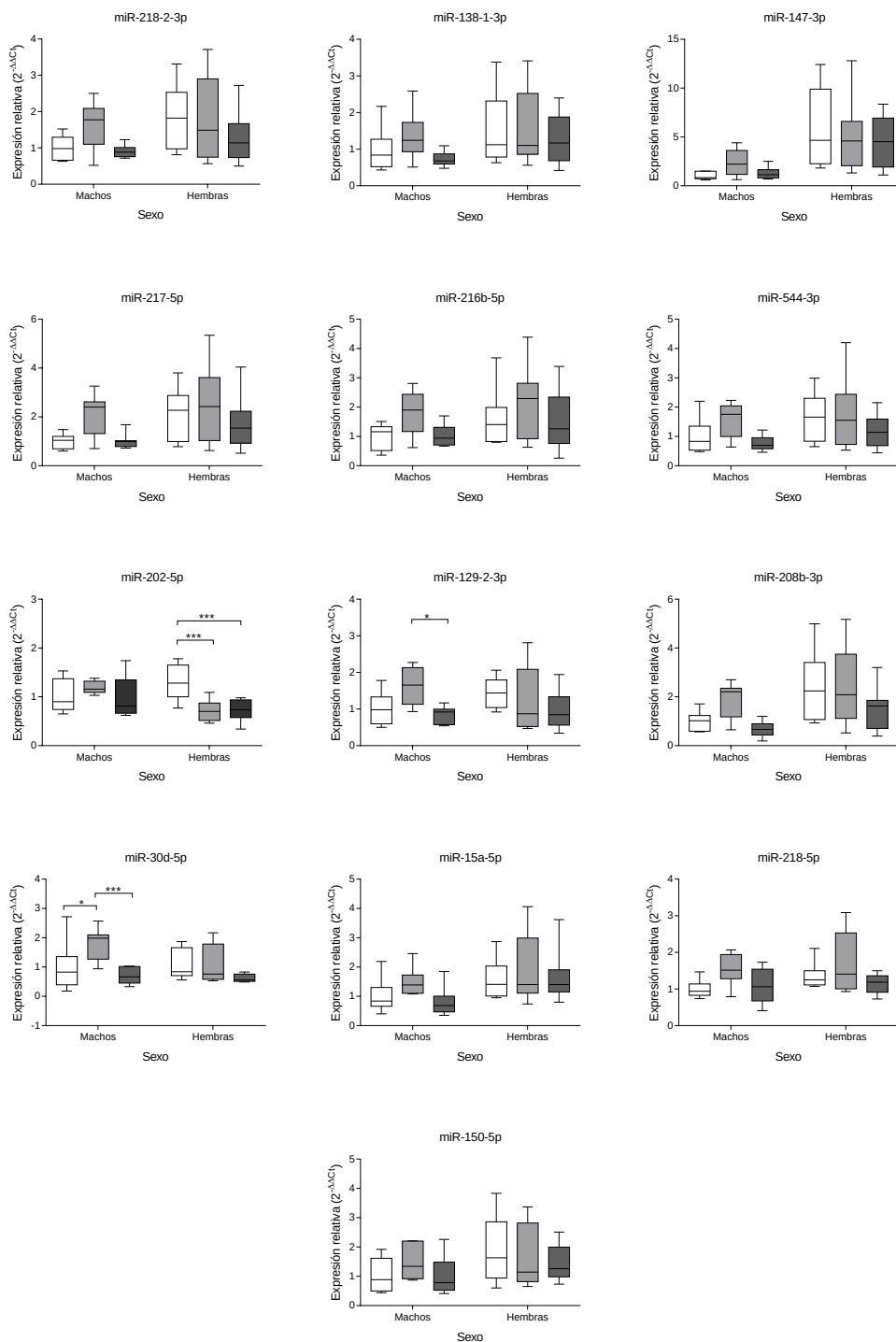


Figura 40. Validación de los cambios de expresión de cada miRNA seleccionado en el hígado.

Gráficas que representan la expresión relativa de cada miRNA, a las 2 horas y 4 horas tras la carga oral de oleico enriquecido con colesterol, en el duodeno. Se diferencia la expresión en función del sexo y condiciones de lipemia postprandial, indicándose en el caso que corresponda, la significancia estadística *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. □ Control carga oral agua, ■ 2 horas tras la carga oral y ■ 4 horas tras la carga oral de aceite de oliva enriquecido con colesterol. N ≥ 8 por grupo.

8. ANÁLISIS DE LOS miRNAs CANDIDATOS *IN VITRO*.

Con base en los resultados obtenidos, se utilizaron los modelos celulares de aproximación para analizar con mayor profundidad los cambios de los microRNAs candidatos en respuesta al tratamiento con micelas postprandiales, y utilizar estos modelos para el estudio de los mecanismos de acción de los miRNAs correspondientes.

Para ello utilizamos células Caco-2 diferenciadas. Las células se diferenciaron tras 21 días de crecimiento en placas transwell. Como se trata de un modelo muy caracterizado y estudiado, dado que nuestro estudio se centra en los miRNAs, realizamos una comparación de los resultados de secuenciación masiva de miRNAs obtenidos a partir de células Caco-2 diferenciadas y células Caco-2 sin diferenciar. Nuestra primera observación es que se incrementa el recuento de ciertos miRNAs abundantes en intestino, como el miR-192, miR-215 y miR-194 (Figura 41).

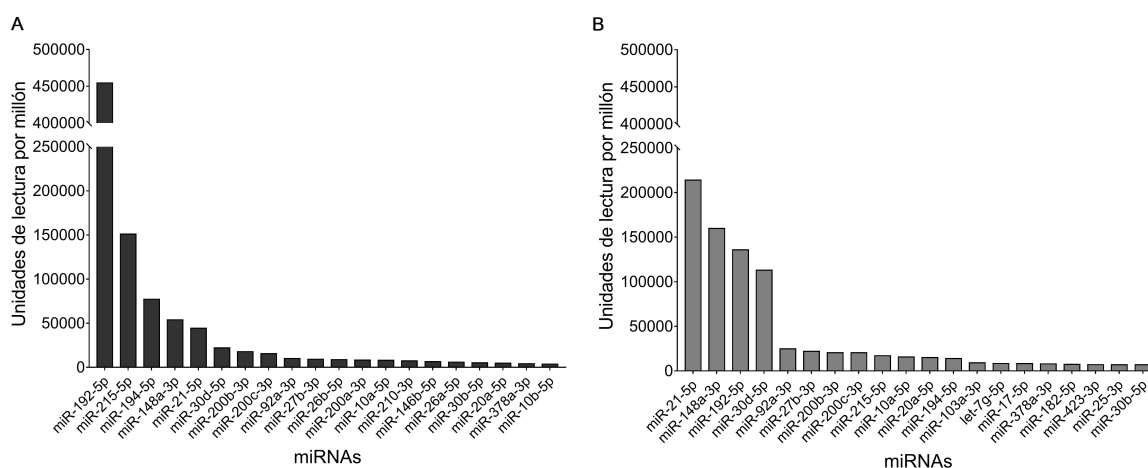


Figura 41. Secuenciación masiva de microRNAs en células Caco-2.

Gráficas de barras que representan los miRNAs más abundantes en muestras RNA obtenido de células Caco-2 cultivadas en placas sin diferenciar y diferenciadas tras cultivar 21 días sobre soportes Transwell®. Se muestran los 20 miRNAs más abundantes encontrados en células Caco-2 diferenciadas (A) y células Caco-2 no diferenciadas (B). N = 4 por grupo.

Primeramente realizamos una cinética en células Caco-2 diferenciadas para observar la secreción de apolipoproteínas en respuesta al tratamiento así como la evolución de la expresión de los microRNAs y seleccionar los tiempos de exposición más adecuados. Así, con este experimento observamos que las células diferenciadas son enterocitos funcionales puesto que secretan apolipoproteínas a la zona basolateral cuando se incubaron añadiendo las micelas postprandiales a diferentes tiempos en la zona apical (Figura suplementaria 4). Esto indica que

puede ser un buen modelo para validar los hallazgos hasta aquí encontrados *in vivo*. También observamos que las micelas vacías tienen un efecto por sí solo, por lo que para estudiar los cambios sobre la expresión de los microRNAs en relación al tratamiento utilizamos las micelas vacías (EM, *empty micelles*) como referencia. Aunque encontramos una baja expresión de los microRNAs testados en general (Cts muy elevadas) y una alta variabilidad, seleccionamos los tiempos de tratamiento a 4 y 24 horas, en los que observamos que hay un cambio en la expresión en la mayoría de miRNAs en el tratamiento con PPM (**Figura 42**). En el caso de miR-202-5p no detectamos su expresión en estas muestras.

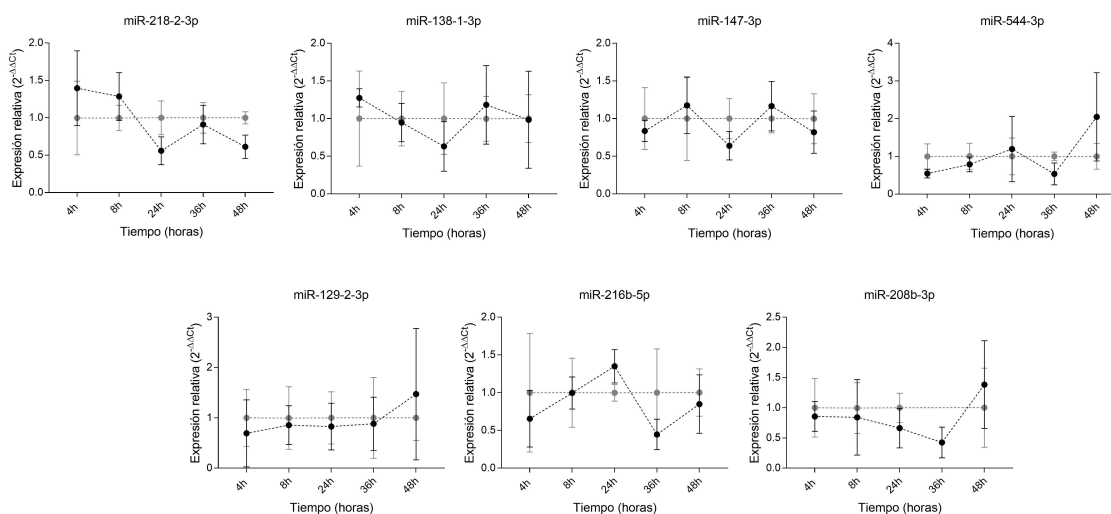


Figura 42. Cinéticas de expresión de los miRNAs candidatos en Caco-2 diferenciadas.

Gráficas que representan la expresión relativa de algunos de los miRNAs candidatos, a las 4, 8, 24, 36 y 48 horas tras la incubación con micelas postprandiales. Se muestran los cambios de expresión de los miRNAs al tratamiento con micelas postprandiales (●) en referencia al tratamiento con micelas vacías (▲). N = 4 para cada grupo de tratamiento.

Posteriormente realizamos varias réplicas del experimento en las que incubamos las células Caco-2 diferenciadas en las mismas condiciones a 4 y 24 horas. Tras verificar que, como esperamos, el tratamiento produce cambios de expresión en genes clave del metabolismo lipídico (**Figura suplementaria 5**), analizamos los cambios de expresión en los miRNAs candidatos. Como muestra la **Figura 43**, los cambios de expresión se producen principalmente a las 24 horas y son significativas las diferencias de expresión con respecto a las células tratadas con micelas vacías. Encontramos que la mayoría de miRNAs estudiados disminuyen su expresión con el tratamiento a excepción del incremento de expresión del miRNA-147-3p a las 4 horas tras el tratamiento. De nuevo no detectamos expresión del miR-202-5p en células Caco-2 diferenciadas.

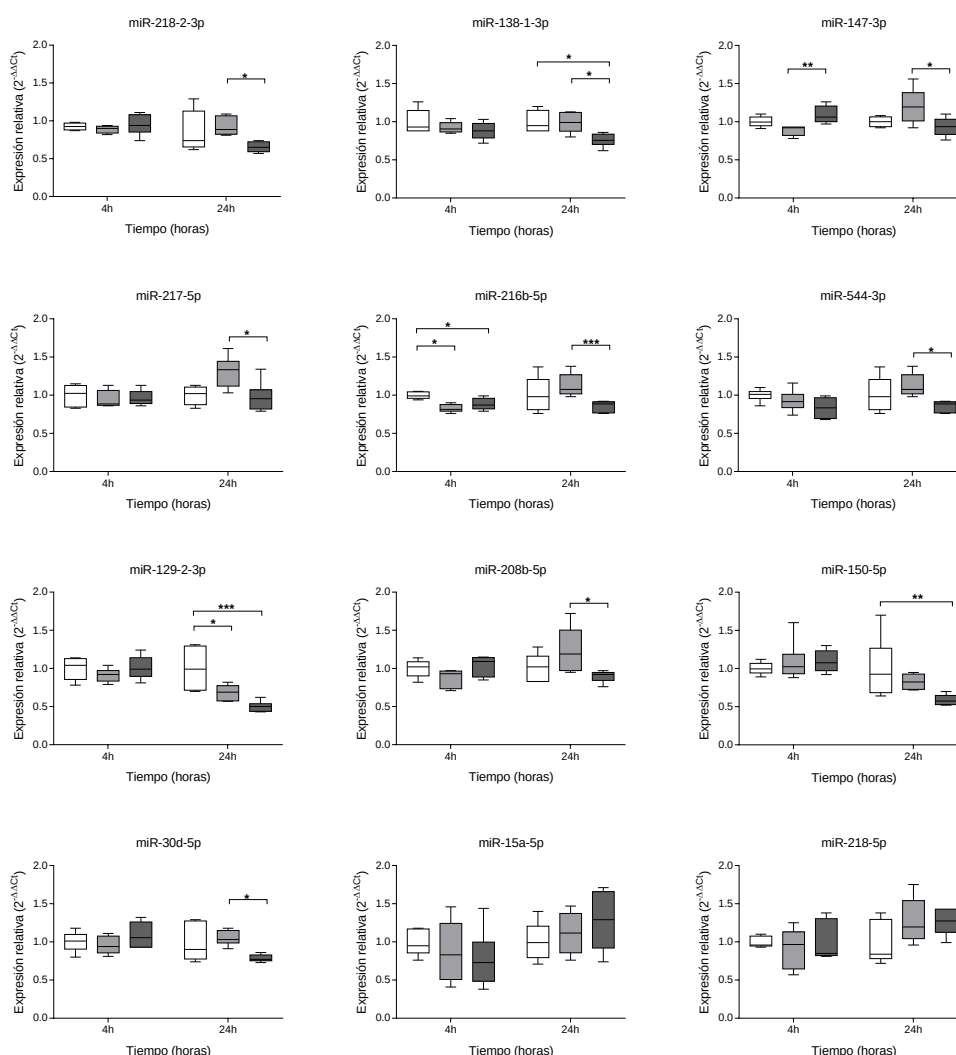


Figura 43. Validación de los cambios de expresión de cada miRNA seleccionado en células Caco-2 diferenciadas.

Gráficas que representan la expresión relativa de cada miRNA, a las 4 horas y 24 horas tras el tratamiento: Control con medio DMEM, micelas vacías (EM) en medio DMEM y micelas postprandiales (PPM) en medio DMEM. Se indica la significancia estadística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. $N = 6$ para cada grupo de tratamiento, en experimentos independientes.

Para verificar estos cambios en un modelo *in vitro* más aproximado a la composición celular fisiológica de las criptas intestinales utilizamos los enteroides derivados de ratón. Éstos se obtuvieron a partir de hembras y machos WT (con el alelo floxeado para Dicer pero sin el transgén para la recombinasa Cre) y se sometieron al mismo tratamiento, pero como ya observamos que los cambios se producían principalmente a 24 horas, y dada la dificultad que entraña el establecimiento de estos cultivos, se incubaron sólo a ese tiempo (**Figura Suplementaria 6**). Como puede observarse en la **Figura 44** de nuevo encontramos diferencias

en función del sexo para algunos microRNAs, por lo que indicamos los cambios de expresión para cada sexo.

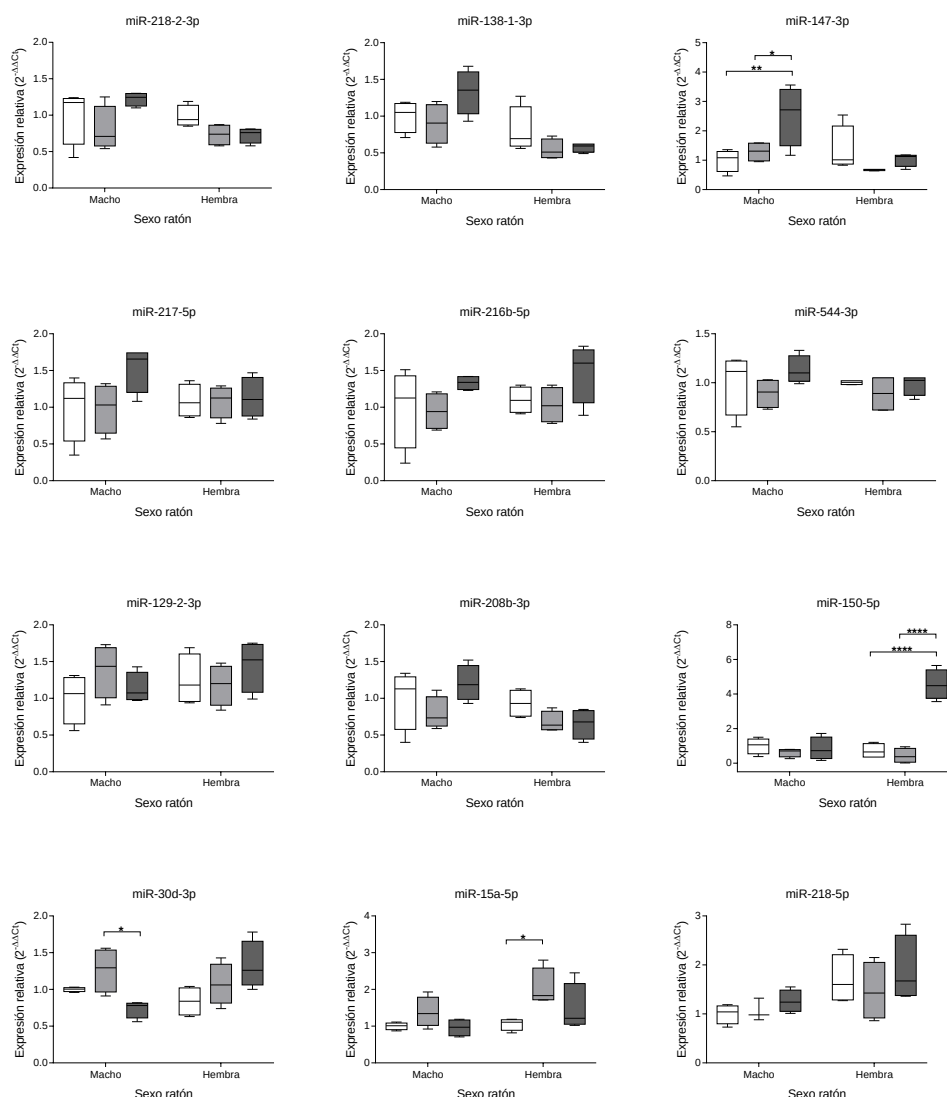


Figura 44. Validación de los cambios de expresión de cada miRNA seleccionado en enteroides derivados de ratones hembras y machos.

Gráficas que representan la expresión relativa de cada miRNA, en enteroides derivados de ratón tras 24 horas de incubación con: Medio DMEM como control, micelas vacías (EM) en medio DMEM y micelas postprandiales (PPM) en medio DMEM. Se indica la significancia estadística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. $N = 4$ para cada grupo de tratamiento.

Al igual que los experimentos para células Caco-2 diferenciadas, no detectamos expresión del miR-202-5p. Hay significancia en los cambios de expresión para el miR-147-3p (en machos) y miR-150-5p (en hembras), aunque en el sentido opuesto a lo observado en la validación en

células Caco-2 y en tejido; y el miR-30d-3p disminuye su expresión significativamente en machos al igual que observamos en células Caco-2 pero no se corresponde con lo que observamos en el tejido intestinal (disminución en el duodeno y colon de hembras pero sin cambios significativos en machos).

9. ANÁLISIS DE LAS POSIBLES VÍAS IMPLICADAS.

Por último, con objeto de establecer las posibles vías implicadas en la regulación mediada por lípidos/*high fat diet*, decidimos realizar un análisis *in silico*. Con el listado de genes diana posibles (dianas predichas y/o con evidencia experimental) obtenido para cada miRNA candidato utilizando la plataforma miRPathDB, se realizó un análisis de las posibles vías implicadas a través de la herramienta online PANTHER (**Figura 45**).

Las principales vías en las cuales se encuentran implicados los genes predichos como diana para los microRNAs candidatos evaluados son: la vía de señalización WNT (*Wnt signaling pathway* (P00057)), la vía de inflamación mediada por quimiocinas y citoquinas (*Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway* (P00031)) y la vía del receptor de la hormona liberadora de gonadotropina (*Gonadotropin-releasing hormone receptor pathway* (P06664)).

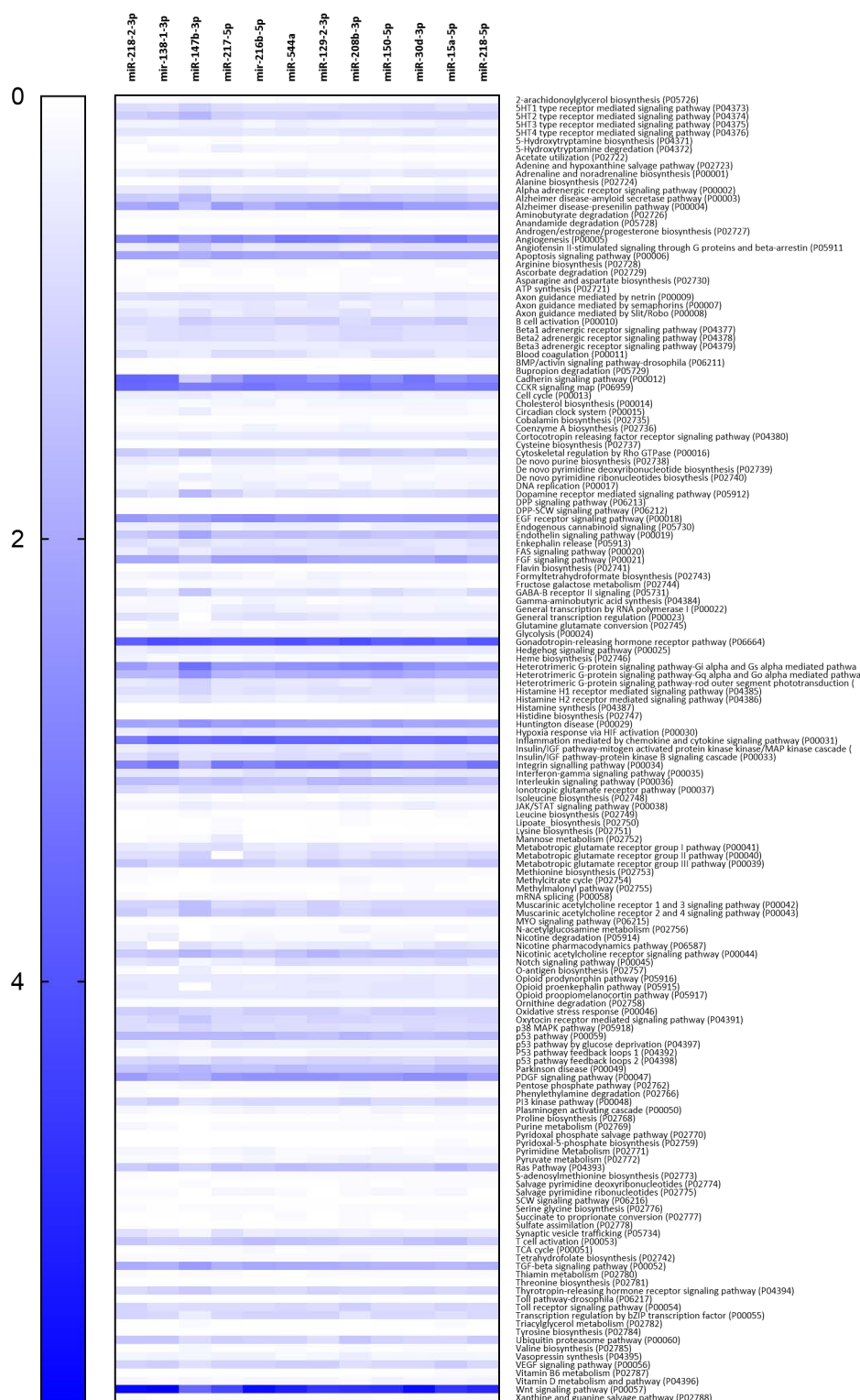
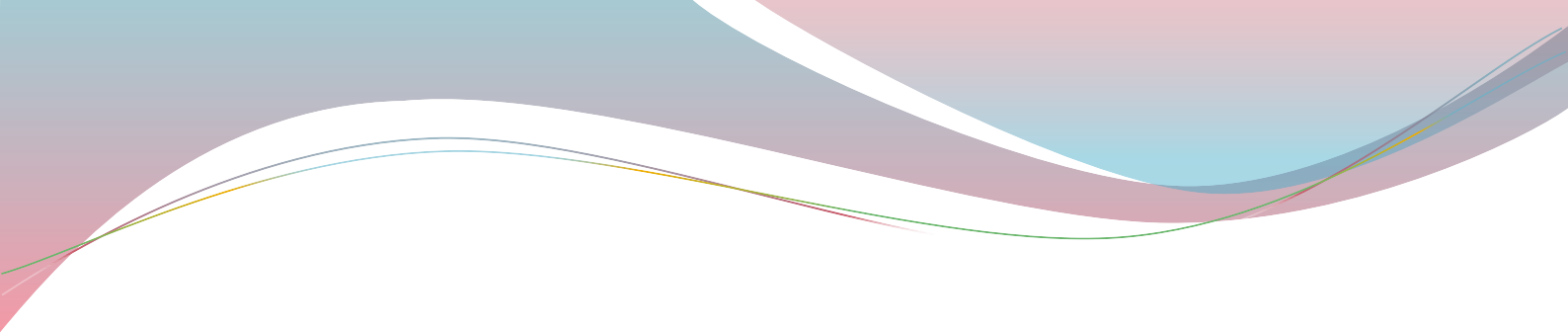


Figura 45. Heatmap de las vías implicadas en función de los genes diana.

Vías implicadas en función de los genes diana para cada miRNA candidato mostrando el porcentaje respecto al total de genes diana predichos para ese miRNA.



DISCUSIÓN

Los avances recientes en terapias basadas en oligonucleótidos, de los que se hace eco con la aprobación en los últimos 2 años de numerosos fármacos (Yin and Rogge, 2019) (oligonucleótidos antisentido contra moléculas de RNAs o DNA) por la FDA y la EMEA, probablemente impulsará el desarrollo de terapias basadas en miRNAs. De hecho, aunque sólo hay dos estudios clínicos publicados en humanos relacionados con terapias frente a miRNAs, uno inhibiendo (Janssen *et al.*, 2013; Ottosen *et al.*, 2015) y otro mimico (Beg *et al.*, 2017), hay varios en fase de estudio en humanos (Bajan and Hutvagner, 2020). **El objetivo** de esta tesis, dada la problemática actual generada en relación al uso de terapias génicas y por la envergadura de su capacidad como herramientas terapéuticas, es el estudio a nivel intestinal de la importancia de los microRNAs en el metabolismo lipídico, haciendo un especial hincapié en su estudio bajo condiciones de lipemia postprandial y dieta hipercalórica. La finalidad es encontrar candidatos cuyos mecanismos de acción impliquen y sean capaces de regular aspectos clave del metabolismo lipídico, para su posterior desarrollo como punto clave en el tratamiento de alteraciones como la obesidad y trastornos metabólicos asociados como diabetes, hipertensión y enfermedades cardiovasculares, todas ellas patologías en claro aumento en las sociedades occidentalizadas.

Numerosos estudios han demostrado ya la importancia de los microRNAs en el mantenimiento de la homeostasis intestinal. También, como estos RNAs no codificantes funcionan ajustando la magnitud de la expresión génica, actuando en bucles de retroalimentación, amortiguando la inflamación y coordinando el ajuste de los procesos inmunes en el tracto gastrointestinal, así como su relación con la microbiota (Runtsch *et al.*, 2014). Por esto, centramos nuestra investigación en el intestino en relación con los microRNAs, pero como órgano fundamental en el metabolismo de lípidos, planteamiento respecto al cual pocos estudios se han centrado.

CARACTERIZACIÓN DEL MODELO ANIMAL DE TRABAJO

Como herramienta de trabajo más apropiada, primeramente se ha generado un **modelo animal** que presenta reducida la actividad de un enzima clave en el procesamiento de los pre-miRNAs para la obtención del miRNA maduro a nivel intestinal. De este modo, podemos estudiar su importancia en el metabolismo lipídico a nivel intestinal y caracterizar los genes que se encuentren claramente modulados por la maquinaria de RNAi, así como posibles miRNAs candidatos partícipes en esta regulación. Aunque el ratón en este modelo animal posee la ablación génica de la enzima DICER, existe una expresión residual (tal y como se observa en la Figura 20, el mRNA disminuye pero no desaparece, lo cual se confirma en el nivel de proteína mostrado en la Figura 17), probablemente debido a poblaciones celulares localizadas en el

intestino donde no se expresa el transgén como las células inmunes o mesenquimales (McKenna *et al.*, 2010), puesto que escapan al control del promotor de VILLIN de expresión exclusiva en los enterocitos. De modo similar a los hallazgos de McKenna en el modelo de ratón generado, observamos una proporción mendeliana en los genotipos de la descendencia de los cruzamientos, y en general las crías son normales salvo excepciones, como crías que han de destetarse mucho más tarde y parecen tener problemas en el desarrollo postnatal o que mueren antes del destete (datos no mostrados).

En cuanto a la **fisiología del modelo animal**, otro rasgo mostrado en el estudio de McKenna y colaboradores es el **tamaño** menor de los animales KO respecto a sus controles de camada; aunque hacen hincapié en el menor peso de las crías previo al destete y que se hace indistinguible a las 7 semanas de edad, nosotros encontramos que, si bien visualmente no parece significativa la diferencia en el tamaño, la diferencia de **peso** sigue siendo significativa en los animales adultos, tal y como se muestra en la Figura 18.

Como hemos indicado en el apartado anterior, estos animales carentes de la enzima DICER intestinal, poseen una disminución de la expresión de **marcadores** del mantenimiento de la identidad y estado de maduración del intestino. De manera similar a los hallazgos de McKenna sobre el epitelio desorganizado del intestino en este modelo de ratón, con criptas más extendidas y una disminución de células caliciformes; nosotros encontramos una disminución significativa del mRNA del receptor Lgr5 y el marcador de proliferación Ki67, que junto con la disminución del mRNA de la lisozima C1, podrían explicar esta desorganización de la estructura que conforma la cripta, entendiendo por nuestros resultados que disminuye el número de células madre y células de Paneth que mantienen el nicho de la cripta intestinal. La disminución del mRNA de la mucina 2 concuerda con la disminución de las células caliciformes que, junto con la disminución de la secreción de lisozima, resultaría en una disminución de la barrera mucosa y de la protección de las células epiteliales intestinales. Esto daría lugar a la alteración de la barrera intestinal que induce un aumento de la permeabilidad seguido de inflamación, lo cual explicaría los cambios en el tamaño del intestino que hemos observado, así como los datos del peso disminuido en los ratones KO por la disfunción intestinal. Pero la disminución de peso entre los hermanos de camada alimentados con la misma dieta estándar no sólo la explica la pérdida de la integridad de la barrera y el estado inflamatorio, también hay que considerar que el epitelio intestinal es una estructura dinámica con procesos muy regulados de proliferación, migración y diferenciación celular. Ya hemos indicado las deficiencias en la proliferación de las células de la base de la cripta de estos animales, y también encontramos la disminución del gen de la fosfatasa alcalina intestinal (ALPI) observada. Este gen codifica una enzima digestiva del

borde en cepillo que está altamente regulada durante la diferenciación de las células epiteliales del intestino delgado, lo que, junto a la disminución del mRNA de la dipeptidil peptidasa 4, el transportador de glucosa tipo 2, y de villin resaltaría un problema de estructura y/o maduración funcional de las vellosidades intestinales. Esto también explicaría la disminución de la expresión del mRNA de IQGAP2, que se localiza en las vellosidades del intestino delgado, específicamente en células no proliferativas diferenciadas (Nojima *et al.*, 2008).

Cuando cuantificamos los **lípidos plasmáticos totales**, por un lado observamos que a nivel basal no existen diferencias significativas entre animales WT y KO, pero que tras la carga oral los niveles plasmáticos de triglicéridos son menores en el animal KO respecto al WT, independientemente del sexo. Esta observación concuerda con las conclusiones de McKenna respecto al problema en el procesamiento de los triglicéridos de la dieta por parte de los mutantes *Dicer*^{loxP/loxP};Villin-cre, así como la presencia de grasa en heces tras la administración de una dieta rica en grasas. Sin embargo, los resultados de FPLC indican una ligera diferencia en el perfil (distribución) lipídico en las lipoproteínas, con una disminución de colesterol en las HDL y una disminución de TG en las VLDL, tanto a nivel basal como postprandial. Esta contradicción entre los niveles totales y el perfil de lipoproteínas individuales indicarían una posible influencia de los miRNAs intestinales en la distribución de los lípidos entre las distintas lipoproteínas.

Nuestros datos de **lípidos en el intestino** también parecen estar en consonancia con la afirmación de McKenna acerca del problema en el procesamiento de TG en los mutantes. Así, el menor incremento en los niveles de triglicéridos a las dos horas tras la carga oral de aceite de oliva enriquecido con colesterol se debería al problema de absorción. Como observamos que a las 4 horas se normalizan con respecto a los animales WT, podríamos especular que hay un “retraso” en la absorción de los lípidos de la dieta. Este posible “retraso” también se observa para el colesterol, aunque sólo se aprecia a nivel del yeyuno e íleon. Se sabe que los procesos de absorción de colesterol y triglicéridos siguen mecanismos moleculares diferentes. Así, mientras que la absorción de colesterol está regulada en parte por la expresión de NPC1L1 y ABCG5/G8, la de los triglicéridos está regulada por la expresión de CD36 y Scarb1, entre otros (Hussain, 2014), muchos de los cuales pueden estar regulados por diferentes miRNAs en el intestino (Figuras 23 y 24). Estos cambios en la absorción de lípidos posiblemente mediado por miRNAs podría abrir nuevas alternativas terapéuticas a los tratamientos actuales (fibratos, estatinas, ezetimiba, resinas, orlistat), una vez se caracterice el/los miRNA/s implicado/s y sus mecanismos de acción.

Por otro lado, los niveles de lípidos plasmáticos son inferiores tanto a nivel basal como tras la carga oral para las hembras respecto a los machos, y esta diferencia por sexo también la observamos a nivel hepático (Figura Suplementaria 2). La literatura científica describe el dimorfismo sexual en diferentes aspectos fisiológicos (véase más abajo), conociéndose que estas diferencias se basan en una expresión y regulación génica específica de tejido. Así por ejemplo, el estudio de Yang y colaboradores (Yang *et al.*, 2006) indica que el grado de dimorfismo sexual varía desde un 14% en cerebro al 70% en hígado. De modo que también se han descrito variaciones en el metabolismo lipídico en función del sexo (Link and Reue, 2017; Palmisano *et al.*, 2018), aunque la mayoría de genes con dimorfismo sexual se han estudiado con detalle en el hígado (Gustafsson *et al.*, 1983; Udy *et al.*, 1997; Tullis *et al.*, 2003; Waxman and Holloway, 2009; Saito *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2018) y muy pocos directamente relacionados con el intestino.

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES RELACIONADOS CON EL METABOLISMO LIPÍDICO

En relación a las **alteraciones de la expresión génica**, se conoce que la eliminación de *Dicer1* produce una desregulación en las enzimas involucradas en el metabolismo lipídico tanto en hepatocitos como intestino delgado. La pérdida de este enzima en sí en el hígado da lugar a esteatosis, pérdida del almacenamiento de glucógeno, aumento de la proliferación y apoptosis de los hepatocitos (Sekine *et al.*, 2009), así como la sobreexpresión de proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos y que son dianas de PPAR α (Sahasrabuddhe *et al.*, 2014). También se ha evaluado que la eliminación global de *Dicer1* en ratones adultos induce múltiples cambios que incluyen anomalías en el intestino delgado causando una desregulación del metabolismo de lípidos (T. C. Huang *et al.*, 2012), siendo visible la alteración de los enterocitos que presentan una acumulación de lípidos en vacuolas.

Nuestro análisis del **array de expresión génica** muestra que la mayoría de los genes implicados en el metabolismo de lipoproteínas y colesterol se encuentran regulados a la baja (Figura 26 Volcano plot B) en el intestino de animales KO frente a WT. El estudio de Huang en 2012 también muestra cambios proteómicos en el intestino delgado inducidos por la ablación del gen *Dicer*, con una regulación negativa significativa en proteínas que participan en el metabolismo de lípidos. De este modo, la alteración de ciertas enzimas como MTTP, cuya función principal es el empaquetamiento de los triglicéridos en pre-quilomicrones para su exportación desde los enterocitos al sistema linfático para ser transportados a los tejidos periféricos; la aldehído deshidrogenasa (ALDH2) y alcohol deshidrogenasa 6A (ADH6A) implicadas en el catabolismo de triglicéridos; FABP1 implicada en el transporte de ácidos grasos o ACADVL, implicada en la β -

oxidación de los ácidos grasos, explicaría el posible mecanismo por el cual se produce la acumulación de lípidos en el intestino de los animales *knockout* para *Dicer*.

Es de esperar que las proteínas cuya expresión génica no se encuentra modificada o se encuentra disminuida puedan estar reguladas por miRNAs independientes de DICER o por las dianas proteicas de miRNAs dependientes de DICER, respectivamente. Los genes cuya expresión hemos observado disminuye de manera significativa se relacionarían con los cambios en el metabolismo lipídico intestinal al encontrarse implicados en la absorción, transporte intracelular y formación de lipoproteínas:

APOC3 forma parte de las lipoproteínas ricas en triglicéridos (TG) como los quilomicrones (QM) y su disminución alteraría la producción de éstos. También forman parte de los quilomicrones **APOB** y **APOA4**, cuyos niveles de mRNA también encontramos disminuidos en animales KO, lo que explicaría los menores niveles de TG en el plasma de estos animales respecto a los WT (Wang *et al.*, 2014); los niveles de MTP intestinal junto con el transportador **ABCA1** son críticos para la absorción de lípidos y determinan sus niveles plasmáticos e intestinales, controlando la absorción de colesterol y biogénesis de HDL (Iqbal *et al.*, 2013). **ABCA2** también es un regulador clave que responde a cambios en el nivel de colesterol celular disponible, regula positivamente la expresión del mRNA del receptor de lipoproteínas de baja densidad e inhibe la esterificación del colesterol en células de ovario de hámster (Davis *et al.*, 2004), así como modula el metabolismo intracelular de los esfingolípidos en cerebro (Sakai *et al.*, 2007). **STARD3** media el transporte de colesterol del retículo endoplasmático a endosomas y mitocondrias (Wilhelm *et al.*, 2017; Höglinger *et al.*, 2019). **OSBPL** controla la movilidad, distribución subcelular y anclaje de los endosomas, y la pérdida de su función inhibe el flujo de salida del colesterol endocitado a la apolipoproteína A en macrófagos (Vihervaara *et al.*, 2011), por lo que la disminución que encontramos podría afectar a la biogénesis de HDL en intestino. La **citocromo B₅ reductasa 3** se necesita para la elongación y desaturación de ácidos grasos, y la síntesis de colesterol por lo que su disminución también se correlacionaría con las alteraciones en el metabolismo lipídico de estos ratones KO. La **proteína C reactiva** es una proteína de fase aguda, marcador de inflamación en enfermedades gastrointestinales, predice la incidencia de enfermedad coronaria y se relaciona con una alteración de la absorción de triglicéridos encontrándose aumentada en plasma de individuos obesos; además, su función asociada a las lipoproteínas de baja densidad se relaciona con las lesiones ateroscleróticas (Zwaka *et al.*, 2001; Aronson *et al.*, 2004; Sproston and Ashworth, 2018).

En cuanto a las proteínas que aumentan su expresión génica, efecto esperado (en la mayoría de los casos) por ausencia de la falta de su represión por miRNAs, validamos el aumento de expresión de proteína para HMGCS2 y OLR-1 en los ratones KO respecto a los WT. Para SOAT-1 (ACAT-1) no encontramos cambios en la expresión proteica, aunque habíamos observado un aumento significativo del mRNA para esta proteína que coincide con los resultados obtenidos por McKenna y colaboradores, por lo que presuponemos existe otro mecanismo postranscripcional que regularía negativamente la producción de SOAT-1. Aunque el aumento de **SOAT-1** podría relacionarse con la formación de las gotas lipídicas (Pol *et al.*, 2014) que se observan en los animales KO, este mecanismo se produce para controlar los niveles de colesterol libre en las células y reducir la citotoxicidad asociada a su acumulación (Warner *et al.*, 1995; Feng *et al.*, 2003). En base a nuestros resultados de colesterol en los tejidos, esto no sería necesario ya que no observamos un aumento de colesterol en los animales KO respecto a los WT y, de hecho, los h

El **receptor de LDL oxidada tipo lectina 1**, que se encuentra codificado por el gen *Olr1* se encuentra implicado en el transporte de ácidos grasos de manera que un aumento en su expresión aumenta el colesterol en adipocitos y la captación de ácidos grasos (Chui *et al.*, 2005). También se ha encontrado implicada en la transcitosis intestinal de la lipasa pancreática BSDL (*pancreatic bile salt-dependent lipase*) que cataliza la hidrólisis duodenal de los ésteres de colesterol en colesterol libre y ácidos grasos antes de su absorción por las células intestinales (Bruneau *et al.*, 2003), y además se ha asociado con el ensamblaje y secreción de quilomicrones (Jason Kirby *et al.*, 2002). Por otro lado, también se relaciona con el proceso inflamatorio y aterosclerosis, encontrándose aumentado en el proceso de deterioro de la microcirculación intestinal y sepsis, participando en el reclutamiento de leucocitos (Landsberger *et al.*, 2010). Por lo tanto, su aumento de expresión podría relacionarse con la alteración que observamos en el procesamiento de los lípidos en el intestino así como estar relacionado con el proceso inflamatorio y de disfunción intestinal propuesto previamente para estos animales KO.

En cuanto a la **HMG-CoA sintetasa** (codificada por el gen *Hmgcs2*) se localiza mayoritariamente en hígado y está involucrada en la síntesis mitocondrial de cuerpos cetónicos a partir del exceso de acetil-CoA generado de la oxidación de los ácidos grasos. Habitualmente se encuentra aumentada en dietas ricas en grasas, el ayuno y otras condiciones en las que la disponibilidad de carbohidratos es limitada, como vía metabólica alternativa para proporcionar energía derivada de lípidos. También se conoce que contribuye a la diferenciación de las células intestinales, encontrándose regulada por la vía Wnt/ β -catenina, que es crucial para el desarrollo y renovación del epitelio intestinal.

Por un lado, se ha observado que la inhibición de HMGCS2 atenúa la diferenciación espontánea de células Caco-2; y su sobreexpresión, que se localiza en las porciones más diferenciadas de la mucosa intestinal, aumenta la expresión de CDX2. Además, el β -hidroxibutirato (β HB) induce la diferenciación celular intestinal, y los ratones alimentados con dietas cetogénicas muestran una mayor diferenciación de las células intestinales (Wang *et al.*, 2017). Por otro, la inhibición de la vía Wnt/ β -catenina y la activación de PPAR γ , que se une al promotor de HMGCS2, aumentan la expresión del mRNA y producción de HMGCS2 en líneas celulares de cáncer de colon y Caco-2 (Kim *et al.*, 2019).

La vía Wnt/ β -catenina se asocia con la homeostasis del proceso de renovación del epitelio intestinal (proliferación, migración, diferenciación y apoptosis) a través del mantenimiento de las células madre, inhibición de la diferenciación y regulación de la migración de las células epiteliales en el eje cripta-vellosidad (Koch, 2017). Ratones homocigotos que expresan un inhibidor de Wnt poseen una mucosa desorganizada con vellosidades acortadas y, de manera similar a la desorganización que observamos en nuestros ratones KO para DICER1, alteraciones en la expresión de la fosfatasa alcalina y los linajes de células secretoras (células de Paneth, células caliciformes y enteroendocrinas) (Pinto *et al.*, 2003); además se ha visto como la inhibición de Wnt en el intestino da lugar a una enterocolitis por la pérdida de la integridad de la barrera intestinal (Kuhnert *et al.*, 2004). De modo que la desregulación de la señalización Wnt/ β -catenina daría como resultado una regulación aberrante de la cetogénesis (dando lugar a un aumento de la HMGCS2 y el β HB) con un desequilibrio en los patrones de proliferación y diferenciación dentro de las criptas intestinales (Kim *et al.*, 2019), lo cual se asociaría a las alteraciones del epitelio intestinal y funcionalidad observadas en el animal *Dicer1* KO.

Los resultados del estudio de McKenna muestran un epitelio intestinal desorganizado con una expansión de la cripta y mayores tasas de migración de las células epiteliales en los mutantes *Dicer1* KO. En nuestro estudio, aunque encontramos los marcadores de células proliferativas disminuidos podríamos aventurar que se produce un mecanismo “compensatorio” en el cual la tasa de migración celular aumenta y existe un mecanismo que induce a la diferenciación de estas células a través de la cetogénesis, pero el estado inflamatorio es tal que solo logra un “mantenimiento” y no la compensación funcional completa, de donde podrían derivar los cambios observados en la absorción de lípidos intestinales.

CARACTERIZACIÓN DE miRNAs INTESTINALES RELEVANTES EN EL METABOLISMO LIPÍDICO

Para extraer información de los datos obtenidos de los **arrays para la búsqueda de los miRNAs intestinales** regulados por dieta hipercalórica y en lipemia postprandial hay que tener en cuenta la adaptación metabólica del intestino. Esto es, la alimentación con dieta alta en grasas provoca una modificación de las propiedades funcionales del epitelio del intestino delgado.

A corto plazo, como ocurriría en nuestro experimento de 4 días (“Short”), hay que considerar que ya se observan cambios en el epitelio intestinal tras sólo tres días de dieta rica en grasas (Sukhotnik *et al.*, 2004), donde se sabe que las grasas saturadas aumentan la altura de las vellosidades intestinales en yeyuno e íleon tras tres días de tratamiento en animales sometidos a resección intestinal. La grasa también afecta a la secreción de mucina, el número de células caliciformes y la proliferación celular, alterando la homeostasis intestinal ya que estos cambios pueden influir en la absorción de nutrientes y la función protectora de la barrera mucosa. Otro estudio muestra como también en este corto plazo de tiempo se producen cambios adaptativos en el enterocito de ratón, modulándose la expresión de genes relacionados con el metabolismo de la glucosa y los lípidos en el duodeno y yeyuno, en particular aumentando su capacidad para oxidar la grasa y producir cuerpos cetónicos (Clara *et al.*, 2017). De hecho, dos estudios de de Wit y colaboradores muestran que tras 2, 4 y 8 semanas de intervención dietética, los intestinos de animales alimentados con HFD presentan una expresión diferencial de genes que interfieren con el metabolismo de lípidos, el ciclo celular y la inflamación. Además, encontraron una expresión elevada de *Ki67* indicando un aumento de la proliferación celular que observaron reflejado en el aumento de la longitud de las vellosidades intestinales y el número de células. También observaron una expresión génica diferencial dependiente del contenido en grasa de la dieta, de modo que los genes inducidos en alimentación con dietas con un 20-30% de grasas se relacionan con genes del metabolismo lipídico regulados por PPAR α , mientras que en dietas con un 45% de grasa los genes diferencialmente expresados se relacionan con alteraciones en el ciclo celular e inmunidad (de Wit *et al.*, 2008, 2011). Pero además, existen diversos estudios en los que se sugiere que la dieta rica en grasas produce una pérdida neuronal, aunque ésta puede variar según los diferentes niveles de lípidos en las dietas, distintos segmentos intestinales, cepas de ratones y periodos de alimentación (Stenkamp-Strahm *et al.*, 2013; Voss *et al.*, 2013; Nezami *et al.*, 2014). Por todo ello, dado que los miRNAs se encuentran implicados en multitud de procesos celulares, todos estos cambios pueden verse reflejados también en cambios en el perfil de expresión de los microRNAs. Por ejemplo, la dieta rica en grasas durante 11 semanas causa retraso en el tránsito gastrointestinal e induce apoptosis de las neuronas del plexo mientérico colónico, encontrándose un aumento de la expresión del miR-375. Estudios *in vitro*

e inyectando miR-375 en ratones confirman su implicación en la apoptosis de las neuronas entéricas lo que puede contribuir al retraso en el tránsito gastrointestinal (Nezami *et al.*, 2014). Así pues, en los resultados obtenidos en los *arrays* de expresión para miRNAs y RNA-Seq hemos de tener en cuenta que ciertos cambios en el perfil de microRNAs podrían no deberse a su directa implicación sobre el metabolismo de lípidos, sino que están relacionados con alguno de estos otros cambios y adaptaciones del intestino de los animales tratados.

Es por esto que, para profundizar en el estudio de los miRNAs que se encuentran diferencialmente expresados, seleccionamos, además de los comunes entre los tres experimentos, aquellos incluidos en el experimento “Long” con un p-valor < 0.0001 mientras que para “Short” y “Pulse” el nivel de significancia lo redujimos para seleccionar aquellos que poseen un p-valor < 0.05. Los resultados de RNA-Seq para los experimentos “Short” y “Pulse” ratificaron los cambios de expresión de algunos de estos miRNAs y añadieron otros más para su estudio.

En la **verificación** de los cambios de los miRNAs seleccionados **en las muestras de cinética** se excluyeron una serie de miRNAs, bien porque no observamos cambio o los cambios no fueron consistentes. Por ejemplo, del mmu-miR-146b-3p que aumenta su expresión en los experimentos “Short” y “Pulse”, en la verificación sobre las muestras de cinética no apreciamos diferencias significativas pero sí una alta variabilidad entre las muestras a los diferentes tiempos observados. Este miRNA se relaciona con la modulación de la respuesta inmune (Testa *et al.*, 2017) y activación de macrófagos. Otro ejemplo de miRNA que aumenta su expresión en los experimentos “Short” y “Pulse” pero que no encontramos cambios en las muestras de cinética es el miR-212-3p, del cual se conoce que a nivel intestinal (yeyuno) se relaciona con la proteína PepT1 (que afecta a la apoptosis y la proliferación de IEC) (Zhang *et al.*, 2016).

La **validación** de los cambios en la expresión de los miRNAs seleccionados con los datos de cinética se realizó en una cohorte de animales (**cohorte 1**), observándose durante el análisis una variabilidad que se reducía al clasificar las muestras en función del sexo, encontrando así que, en la respuesta postprandial, existen diferencias en la expresión de microRNAs dependiendo del sexo.

Se sabe que los machos y las hembras difieren en su fisiología. Los mecanismos genéticos, transcripcionales y las vías reguladoras que subyacen a la diferenciación sexual dan como resultado diferencias en el desarrollo y progresión de diversas patologías, así como en la respuesta al tratamiento. De igual modo que existe dimorfismo sexual en la expresión y regulación de genes específica de tejido (Yang *et al.*, 2006), y se conoce que hay diferencias de

género en el metabolismo y el control de la homeostasis energética que se pueden atribuir a factores genéticos y hormonales (Clegg *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2009; Link and Reue, 2017), existen diferencias en cuanto al sexo en la obesidad. Estas diferencias se producen tanto en el contenido y distribución de la grasa corporal, la hiperplasia e hipertrofia de los adipocitos, así como la función del tejido adiposo (Grove *et al.*, 2010; Medrikova *et al.*, 2012; Palmer and Clegg, 2015). La mayoría de los estudios moleculares que exponen este dimorfismo sexual se centran en genes con grandes diferencias de expresión entre sexos. Puede que estos genes sean fundamentales en las funciones fisiológicas características de cada sexo, pero existe una gran cantidad de genes que presentan pequeñas diferencias entre los sexos y que podrían contribuir a la heterogénea susceptibilidad de enfermedades como el cáncer, las enfermedades autoinmunes, la diabetes o la aterosclerosis, así como las diferencias en su progresión y respuesta a los tratamientos.

Otra parcela muy estudiada en los últimos años en relación al metabolismo y funcionalidad intestinal, así como estudios de salud y enfermedad, es el microbioma intestinal, en el cual también se han descrito enterotipos específicos según el sexo. En un estudio reciente, Son y colaboradores muestran que existen diferencias en la microbiota intestinal entre los ratones machos y hembras, tanto a nivel de *phylum* como de taxones familiares, siendo los filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes* igualmente dominantes en machos y el filo *Bacteroidetes* dominante en hembras (Son *et al.*, 2019). En un estudio anterior, Xie y colaboradores encontraron asociación entre los ácidos biliares, la microbiota intestinal y el sexo. Realizaron un análisis metagenómico que muestra diferencias en la microbiota intestinal entre ratones machos y hembras normales, lo cual conduce a diferencias en la síntesis de ácidos biliares, metabolismo y transporte en el hígado de machos y hembras, las cuales se vuelven significativas en condiciones patológicas. También describieron perfiles de expresión diferenciales de miRNAs en función del sexo para la carcinogénesis hepática, lo cual puede servir para prevenir y controlar cánceres gastrointestinales relacionados con la obesidad humana, y que a menudo exhiben diferencias en cuanto al sexo (Xie *et al.*, 2017). Aunque estos hallazgos se han descrito en ratones, este perfil diferencial de miRNAs en función del sexo también se ha estudiado en pacientes con carcinoma hepatocelular (Ji *et al.*, 2009), y lo asocian a diferencias en la respuesta al tratamiento y supervivencia. Y, también en humanos, se conoce que en el síndrome metabólico se pueden asociar niveles de miRNAs circulantes en función del sexo, como los miRNAs let-7 y miR-221, importantes en el metabolismo de la glucosa, que muestran una sobreexpresión significativa en las mujeres con síndrome metabólico (Wang *et al.*, 2013).

Otro estudio acerca de la microbiota es el de Lee y colaboradores realizado en ratas (Lee *et al.*, 2018). Señalan como la microbiota intestinal cambia, no sólo en respuesta a la composición

alterada de la dieta y la edad, sino en función del sexo. Así, ante una dieta rica en grasas, cambia la composición de la microbiota incrementándose el ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* sólo en ratas “viejas” y, además, se incrementaron las especies *Akkermansia* y *Desulfovibrio* en ratas hembras y no en machos. También relacionan la disbiosis intestinal inducida por HFD con cambios en la proliferación celular de la mucosa del colon, lo cual sería de esperar, ya que se conoce la asociación entre la obesidad y el riesgo de cáncer colorrectal, así como que existen diferencias en función del sexo tanto para su incidencia como para la supervivencia (Kim *et al.*, 2015; Kim and Giovannucci, 2017).

En relación a los microRNAs, los resultados de Castellano y colaboradores en 2009 muestran que el receptor de estrógenos (ER α) modula el procesamiento de ciertos miRNAs (Castellano *et al.*, 2009). Esto supone un mecanismo regulador, a nivel postranscripcional, de la biogénesis de ciertos miRNAs y, a su vez, puede establecer el papel de los miRNAs en la expresión de genes diana regulados por estrógenos (Macias *et al.*, 2009). En esta línea, otros estudios muestran que el perfil de expresión de miRNAs en el tejido adiposo está influenciado por las hormonas gonadales y que además cambian en respuesta a una dieta rica en grasas. Así, estos diferentes perfiles de expresión pueden contribuir a las diferencias de expresión génica en tejido adiposo debido al sexo, así como en el desarrollo del tejido adiposo y la obesidad inducida por la dieta (Link *et al.*, 2017).

Históricamente, la mayoría de experimentos *in vivo* se han realizado estudiando un sexo, enfocándose en los machos. De este modo se evitaban complicaciones por los ciclos hormonales o estadios del ciclo estral, pero ello ha acabado produciendo un desequilibrio en las investigaciones realizadas (Beery and Zucker, 2011). Más aun, este desequilibrio se hace evidente en los ensayos clínicos en humanos (Kim *et al.*, 2010) pero, como se ha visto, existen diferencias significativas en la incidencia, prevalencia, síntomas y el pronóstico frente al tratamiento para una enfermedad respecto al sexo que han de ser tenidas en cuenta.

Con todo esto, y dado que los miRNAs se encuentran involucrados en gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos, vale la pena examinar su papel en el contexto de nuestros estudios valorando la existencia de diferencias en función del sexo. De modo que los parámetros estudiados y la validación de los miRNAs seleccionados la realizamos considerando esta diferencia fundamental.

En cuanto a los **miRNAs seleccionados para validar en la cohorte 2 e *in vitro***, el principal candidato es el miR-218-2-3p, cuya expresión disminuye en los experimentos de *screening*. Esta disminución es de hasta más de 11 veces respecto al control para los experimentos “Short” y

“Pulse”, y muestra una disminución significativa respecto al control en todos los tiempos de la cinética. Como ya se comentó en los resultados, en la cohorte 1 no observamos los cambios esperados en machos y tenemos un incremento significativo en hembras a las dos horas tras la carga oral. Este cambio no se reproduce en la cohorte 2, donde no encontramos ese aumento significativo de la expresión del miRNA en hembras en ninguna de las secciones de intestino, y en machos la disminución la encontramos a las 4 horas y no a las 2 horas, donde incluso encontramos una elevación de los niveles del miRNA en casi todas las secciones del intestino. En su evaluación *in vitro* tras el tratamiento con micelas postprandiales sí vemos la disminución de su expresión a las 24 horas pero únicamente en el modelo de células Caco-2 diferenciadas. El miR-218 se considera un supresor tumoral en varios carcinomas, por ejemplo, se conoce la implicación del miR-218 en la tumorigénesis y metástasis de cáncer gástrico en relación a la vía Slit-Robo1, y que la disminución de su expresión se correlaciona con un estadio clínico avanzado, la metástasis de los ganglios linfáticos y el mal pronóstico de los pacientes (Tie *et al.*, 2010). En relación con el cáncer de colon, el miR-218 inhibe la proliferación de células cancerosas, suprime la progresión del ciclo y promueve la apoptosis al regular negativamente la expresión de BM-1 (He *et al.*, 2012), asociándose la disminución de la expresión de este miRNA con mal pronóstico en pacientes con cáncer colorrectal (Yu *et al.*, 2013). También en relación al cáncer colorrectal un estudio de 2017 investiga la contribución del LncRNA HOTAIR en la resistencia al tratamiento con 5-FU (5-fluorouracilo) a través de la supresión del miR-218-2 (Li *et al.*, 2017). Este miRNA también se relaciona con la diferenciación de osteoblastos mediante la activación de la vía Wnt (Hassan *et al.*, 2012). Otro estudio en 2017 relaciona el miR-218-2-3p con el crecimiento, invasión y la resistencia a los medicamentos de los glioblastomas (Feng *et al.*, 2017). En este estudio encuentran que el miR-218-2 se expresa altamente en las líneas celulares de glioma promoviendo el crecimiento, invasión y migración, a través de su relación con CDC27 (subunidad que forma parte del complejo promotor de la anafase que regula la segregación cromosómica al término de la mitosis por la proteólisis de reguladores del ciclo celular) y por ende con la vía de señalización TGF- β /Smad que regula el ciclo celular y transición epitelio-mesenquimal (EMT). Pese a no encontrar ninguna referencia en la literatura que relacione este microRNA con HFD e intestino, su implicación en procesos de proliferación y diferenciación podría ser un punto para estudiar su posible relación con los cambios citados anteriormente que se producen en el epitelio intestinal tras el consumo de una dieta rica en grasas .

Otro miRNA candidato es el miR-138-1-3p, el cual observamos disminuye su expresión en el tratamiento largo y aumenta en el de 4 días, mientras que en la cinética observamos una tendencia a disminuir su expresión sin resultar significativa. Volvemos a encontrar un aumento

en la expresión de este miRNA en las hembras de la cohorte 1 sin cambios en los machos, y en la cohorte 2 de nuevo no observamos el cambio significativo en hembras (incluso en íleon se produce la disminución significativa de su expresión) pero sí en machos a las 4 horas en duodeno y yeyuno. En los experimentos *in vitro* tras el tratamiento con micelas postprandiales sí vemos la disminución de su expresión a las 24 horas pero únicamente en el modelo de células Caco-2 diferenciadas. La literatura encontrada se refiere principalmente al miR-138-5p, donde en 2011 Eskildsen y colaboradores encontraron que el miR-138 modula la diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales (Eskildsen *et al.*, 2011). Y un estudio de 2012 encontró que la expresión ectópica de miR-138 aumenta la generación de células madre pluripotentes (iPS) a través de la disminución de p53 (Ye *et al.*, 2012). En relación al miR-138-1-3p, únicamente encontramos descrito que se encuentra desregulado, junto a otros miRNAs, disminuyendo su expresión en la mucosa duodenal de pacientes con celiaquía (Vaira *et al.*, 2014). Dado que en esta enfermedad se produce una alteración/inflamación intestinal, podríamos relacionarlo con los cambios adaptativos, alteraciones en el ciclo celular e inmunidad, mencionados anteriormente, que se producen en relación a la exposición a una dieta rica en grasas.

El miR-147-3p disminuye su expresión en el *screening* previo del tratamiento “Long” y “Short” y la cinética muestra una clara disminución de su expresión, no obstante no observamos cambios en su expresión a las 2 horas tras la carga oral en la cohorte 1 pero sí a las 4 horas en duodeno y yeyuno de los machos pertenecientes a la cohorte 2. En las células Caco-2 diferenciadas observamos la disminución a las 24 horas tras el tratamiento pero en los enteroides derivados de machos observamos un claro aumento de su expresión a las 24 horas tras su tratamiento. El miR-147 inhibe la respuesta inflamatoria, se ha relacionado con receptores tipo Toll (TLR) para prevenir la respuesta inflamatoria excesiva de los macrófagos murinos (Liu *et al.*, 2009), con SLC22A3 para modular la respuesta inflamatoria monocítica (Li *et al.*, 2015) y se ha descrito que juega un papel protector contra la aterosclerosis al regular la respuesta inflamatoria de los macrófagos reduciendo la acumulación de lípidos y apoptosis, limitando así la formación del núcleo necrótico (Spinosa *et al.*, 2018). En esta línea, otro estudio muestra que la IL-10, que actúa sobre macrófagos para suprimir las respuestas inducidas por TLRs que inducen la expresión de genes proinflamatorios, inhibe la expresión del miR-147 (Cardwell and Weaver, 2014). En relación al cáncer, un estudio de 2016 (Sui *et al.*, 2016) muestra que la sobreexpresión de miR-147 inhibe la proliferación y migración *in vitro* de líneas celulares de carcinoma hepatocelular (HCC) aumentando su sensibilidad al tratamiento con 5-FU, y en 2018 se publicó otro estudio que relaciona este micro-RNA con el cáncer gástrico (Shen *et al.*, 2018), regulando la vía de señalización Pi3K/AKT al actuar sobre PTEN, pero encontrando que sus niveles de

expresión son altos en los tejidos de cáncer gástrico y que su inhibición es la que suprime la proliferación de células *in vitro* y aumenta su sensibilidad al 5-FU. También se ha encontrado que la sobreexpresión de este miRNA en células de cáncer de colon reprime la transición epitelio-mesenquimal (Lee *et al.*, 2014) actuando sobre la vía Wnt/ β -catenina (Ning *et al.*, 2019).

El microRNA-217-5p, que disminuye su expresión en los experimentos “Long” y “Pulse”, aumenta su expresión en las muestras de cinética, siendo significativo pese a la variabilidad a las 4 horas tras la carga oral. En la cohorte 1 no observamos cambios significativos y en la cohorte 2 únicamente a nivel de yeyuno disminuye su expresión de manera significativa a las 4 horas. El análisis *in vitro* muestra una disminución significativa de su expresión únicamente para las células Caco-2 diferenciadas a las 24 horas tras su tratamiento. Al igual que otros miRNAs, encontramos estudios que relacionan el miR-217 con diversos tipos de cáncer como leucemia, cáncer de riñón, cáncer de esófago, de páncreas o carcinoma hepatocelular. En el caso del cáncer pancreático, además de servir como marcador diagnóstico y pronóstico junto a otros microRNAs (Vychytilova-Faltejskova *et al.*, 2015), se demuestra que inhibe la EMT mediante la regulación negativa de SIRT1 (S. Deng *et al.*, 2014). Y esta inhibición de SIRT1 por el miR-217 también fue observado por Yin y colaboradores en 2012 (Yin *et al.*, 2012), en relación con la enfermedad de hígado graso alcohólico. También se ha demostrado que miR-217-5p inhibe el crecimiento y proliferación de células de cáncer colorrectal al regular la expresión de genes codificantes de proteínas relevantes para la supervivencia y apoptosis como MAPK1, PRKC1, ITGAV y BAG3 (Flum *et al.*, 2018). Por otro lado se ha encontrado que inhibe la apoptosis de las células endoteliales a través de CLIC4 (canal intracelular de cloruro) (X. Zhang *et al.*, 2019).

Para miR-216b-5p encontramos también gran variabilidad de su expresión en las muestras de cinética y que aumenta, pese a encontrar una disminución de su expresión en los experimentos del *screening*. La validación en las cohortes 1 y 2 no dan resultados significativos salvo la disminución de su expresión a las 2 horas en el duodeno de hembras y en el yeyuno de machos. De nuevo, *in vitro*, solo se encuentra disminución significativa de su expresión en los experimentos en células Caco-2 diferenciadas. Los estudios sobre este miRNA lo relacionan con diferentes dianas moleculares y tipos de cáncer, de modo que inhibe la proliferación e invasión en cáncer de riñón, de páncreas, de mama y cáncer colorrectal (Wang *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2018; Y. F. Yao *et al.*, 2018; Menbari *et al.*, 2019).

El miR-544-3p disminuye su expresión en el experimento de cinética en el mismo sentido que lo hacía en el *screening* previo “short”. Aunque en la cohorte 1 no observamos efecto sobre su expresión, en la cohorte 2 volvemos a observar la disminución de su expresión, en duodeno y

yeyuno de machos principalmente, y de nuevo únicamente en las células Caco-2 diferenciadas a las 24 horas tras su tratamiento con micelas postprandiales. Varios estudios informan de la implicación de miR-544 en diferentes tipos de cánceres, como el cáncer de mama, de tiroides, de células escamosas esofágicas y osteosarcoma entre otros. Para el cáncer gástrico se sugiere que es un microRNA oncogénico, y su sobreexpresión inactiva y disminuye la expresión de IRX1 (gen supresor de tumores) (Zhi *et al.*, 2013). Igualmente, para el cáncer colorrectal, promueve la progresión del cáncer observándose un aumento de proliferación e invasión en células cancerosas *in vitro*, sugiriendo que FOXO1 media la progresión del cáncer colorrectal inducido por miR-544 (G. D. Yao *et al.*, 2018).

El miR-202-5p aumenta su expresión en el *screening* a las 2 horas tras la carga oral de los animales, pero en la cinética observamos una disminución en su expresión. Aunque en la cohorte 1 no encontramos cambios, la cohorte 2 vuelve a confirmar una disminución en la expresión tras la carga oral en el duodeno para machos, en el yeyuno para ambos sexos, y en íleon y colon para hembras. En este caso también observamos una disminución del microRNA en el hígado de las hembras. En los experimentos *in vitro* no detectamos la presencia del microRNA ni en el modelo de células Caco-2 diferenciadas ni en los enteroides, por lo que suponemos que la expresión de este microRNA en intestino se debe a otros tipos celulares. La búsqueda de este miRNA en la literatura científica nos reporta, por ejemplo, su implicación en relación al cáncer, encontrándose que la sobreexpresión de miR-202-5p inhibe la migración e invasión de las células de osteosarcoma al regular negativamente la expresión de ROCK1 (C. Li *et al.*, 2018); o mediando la resistencia a doxorrubicina (DOX) de las células de mama a través de la vía de señalización PI3K/Akt (Liu *et al.*, 2019). También se ha descrito que funciona como supresor de tumores en el cáncer colorrectal, inhibiendo el potencial tumorigénico de las células mediante la regulación negativa de SMARCC1 (oncogen) (Ke *et al.*, 2018), lo cual concuerda con que el lncRNA NORAL contribuya a la progresión y mal pronóstico de los pacientes con cáncer colorrectal mediante la inhibición de miR-202-5p (Zhang *et al.*, 2018).

Otro microRNA candidato analizado es miR-129-2-3p, que disminuye su expresión en el experimento "Short" y en la cinética. En la cohorte 1 encontramos que hay una tendencia a disminuir en machos y un incremento significativo en hembras. Se confirma el incremento de su expresión a las 2 horas sólo para duodeno, mientras que en yeyuno, íleon y colon encontramos que disminuye su expresión a las 4 horas tras la carga oral. La disminución de su expresión en machos la encontramos sólo en yeyuno y colon a las 4 horas. En cuanto a su validación *in vitro*, confirmamos la disminución de su expresión a las 24 horas tras el tratamiento de las células Caco-2, pero no observamos cambios significativos en enteroides. De nuevo se encuentra bibliografía

acerca de la relación de este miRNA con ciertos tipos de cánceres, como el cáncer de mama o el cáncer gástrico. En 2019 un estudio de Huang y colaboradores asocian los niveles sanguíneos de miR-192-3-p con el riesgo de padecer ictus, relacionándolo con el gen de la tirosina quinasa SYK y la función plaquetaria (Huang *et al.*, 2019). Otro estudio de 2019 (Unehara *et al.*, 2019) identifica miRNAs específicamente alterados en neutrófilos de ratones diabéticos, encontrando que los niveles de miR-129-2-3p aumentan en neutrófilos y macrófagos en comparación con los niveles en células B y células T en el bazo. Además, muestran que tiene como genes diana *Casp6*, *Ccr2* y *Dedd2*, sugiriendo que está relacionado con el proceso de inflamación. Encontraron que la sobreexpresión de miRNA-129-2-3p acelera la cicatrización de heridas al regular la expresión de *Casp6* y *Ccr2*, que están involucrados en respuesta inflamatoria y apoptosis, y que los niveles de expresión de este miRNA son deficientes en neutrófilos derivados de diabéticos.

El miR-208b-3p disminuye su expresión en el experimento “Short”, también en la cinética y en la cohorte 1 no se aprecia cambio significativo salvo en hembras, donde es contrario a lo observado anteriormente en machos, aumentando su expresión de manera significativa a las 2 horas tras la carga oral. En la cohorte 2 no se confirma este incremento en hembras pero sí lo vemos en machos, en donde aumenta su expresión de manera significativa a las 2 horas tras la carga oral en duodeno y yeyuno, disminuyendo significativamente con respecto a este aumento a las 4 horas. *In vitro* únicamente en las células Caco-2 diferenciadas encontramos también una disminución significativa a las 24 horas tras el tratamiento. Los estudios publicados hacen referencia a la hebra predominante, miR-208b-3p, y la relacionan con el corazón, enfermedad arterial coronaria, y el riesgo de isquemia o de infarto agudo de miocardio. También, junto con el miR-499, se relaciona con la regulación del tipo de fibra muscular en el músculo esquelético. Ambos miRNAs median los efectos opuestos de los receptores nucleares PPAR β/δ y PPAR α en el control del metabolismo energético muscular y la determinación del tipo de fibra muscular, activando el estrés oxidativo y reprimiendo la glicolisis (van Rooij *et al.*, 2009; Gan *et al.*, 2013).

En relación al miR-150-5p, encontramos que disminuye su expresión en el *screening* de 20 semanas de HFD y también en el resultado de RNA-Seq para las muestras del *screening* tras la carga oral de 2h. Verificamos su disminución en las muestras de cinética, aunque ésta es sólo significativa a las 4 horas tras la carga oral. En la cohorte 1 obtuvimos unos resultados contradictorios, con un aumento de su expresión tras el tratamiento. En la cohorte 2 encontramos alta variabilidad, pero de nuevo tenemos una disminución significativa de su expresión a las 4 horas en duodeno e íleon, pero únicamente en las hembras. Su comportamiento *in vitro* también muestra una disminución significativa de su expresión en las células Caco-2 diferenciadas a las 24 horas tras el tratamiento con micelas postprandiales. En el

caso de los enteroides, es de los pocos miRNAs seleccionados que muestran cambios significativos en su expresión tras el tratamiento, pero este cambio solo lo vemos en hembras y se trata de un aumento de la expresión. Además de su papel en la hematopoyesis normal y la transformación maligna (He *et al.*, 2014), los estudios acerca de este miRNA lo relacionan con la patogénesis de diversos tipos de cáncer, actuando como miRNA antitumoral (Srivastava *et al.*, 2011; Osako *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2019; Tian *et al.*, 2020), aunque lo relacionan también con funciones oncogénicas (Huang *et al.*, 2013; Liu and Di Wang, 2019; Zhu and Han, 2019). En algunos de estos tipos de cáncer, el mecanismo que subyace a la función del miR-150 está relativamente definida, pero en otros los mecanismos reguladores aún no están claros, ni el por qué en unos funciona como oncomiRNA y en otros como un microRNA supresor de tumores, pudiendo depender del origen histológico, el microambiente celular o la localización de la neoplasia.

Para el miR-30d-5p, los resultados obtenidos a partir del experimento de RNA-Seq para los enteroides tratados indican un aumento de su expresión, y esta modulación se verifica en las hembras de la cohorte 1 en donde vemos una tendencia a aumentar su expresión, aunque no de manera significativa. En la cohorte 2 encontramos mucha variabilidad en su expresión entre las muestras, encontrando además que su expresión disminuye en lugar de aumentar, siendo significativa la disminución de su expresión en duodeno e íleon. De nuevo, en los modelos *in vitro* su expresión disminuye a las 24 horas tras el tratamiento, tanto en células Caco-2 diferenciadas como en enteroides derivados de machos. Este miRNA se encuentra descrito en la literatura científica como oncomiR (Yao *et al.*, 2010; Kobayashi *et al.*, 2012) pero también como miRNA supresor de tumores (Wu *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2018), encontrándose que su expresión inhibe la proliferación de células de cáncer de colon, inhibiendo la autofagia (actuando sobre ATG5, Beclin 1 y PI3K) y promoviendo la apoptosis celular (Zhang *et al.*, 2017). En esta línea, por ejemplo, Su y colaboradores encontraron en 2013 que miR-30d, junto con los miR-181a y miR-199a-5p (Su *et al.*, 2013), ven disminuida su expresión en diversos tipos de cáncer y se relacionan inversamente con una chaperona del retículo endoplásmico (GRP78) que se detecta en la superficie de células cancerosas, donde media las señales oncogénicas. Y en este sentido también, los estudios de Muhammad y colaboradores en 2018 demostraron que los niveles del receptor de superficie celular GNA13 promueven la invasividad de las células de cáncer de colon, y que la sobreexpresión de miR-30d podría inhibir la proliferación, migración e invasión de las células cancerosas actuando directamente sobre GNA13 (Muhammad *et al.*, 2018). En relación al epitelio intestinal, los resultados de Peck y colaboradores muestran que la familia miR-30 promueve la proliferación e inhibe diferenciación de enterocitos a través de la

regulación de la proteína SOX9 (que es un factor clave en la homeostasis intestinal) (Peck *et al.*, 2016).

El miR-15a-5p aumenta su expresión en enteroides tratados, y su comprobación en la cohorte 1 no da cambios para ninguno de los sexos y en la cohorte 2 tampoco observamos cambios con el tratamiento. *In vitro* observamos una tendencia a aumentar su expresión con el tratamiento en células Caco-2 diferenciadas pero con mucha variabilidad entre las muestras, mientras que en los enteroides sí tenemos un aumento significativo de su expresión en el caso de aquellos derivados del intestino de hembras. Encontramos este miRNA implicado en distintos tipos de cáncer. Por ejemplo, en relación con el cáncer de colon, se ha descrito que su administración sistémica, junto al miR-16-1, disminuye el cáncer de colon *in vivo* (Dai *et al.*, 2012). Además, se correlaciona positivamente con el pronóstico del paciente e inhibe BCL2, BMI1, YAP1 y DCLK1, disminuyendo la proliferación celular e inhibiendo la progresión del tumor (Fesler *et al.*, 2018).

Por último, el miR-218-5p aumenta su expresión en enteroides tratados con micelas postprandiales, en la cohorte 1 no observamos cambios significativos, pero en la cohorte 2 encontramos que en el duodeno de hembras se produce una disminución de la expresión de este miRNA a las 4 horas tras la carga oral. *In vitro* no validamos esta modulación sobre las células Caco-2 diferenciadas y ni en enteroides, aunque se aprecia una tendencia a aumentar su expresión en el caso de los enteroides derivados de hembras con respecto a machos. Las investigaciones acerca de este microRNA lo relacionan con la inhibición de la proliferación de diferentes tipos de cáncer (Wu *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2016; X. Li *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019).

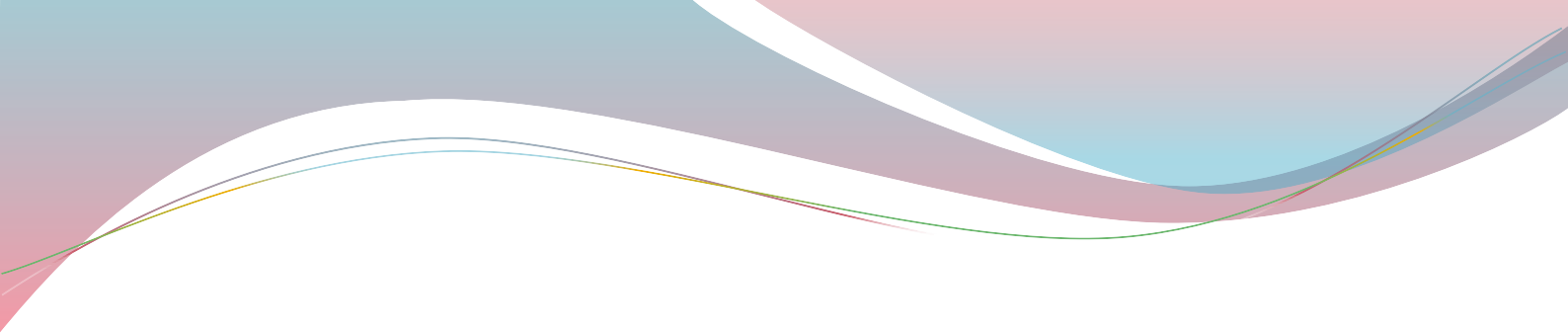
Finalmente, **el análisis integrativo *in silico*** de los 13 miRNAs arriba validados muestra que los genes posibles diana de estos miRNAs se encuentran relacionados con las vías de señalización WNT, la vía de inflamación mediada por citoquinas y quimiocinas, y la vía del receptor de la hormona liberadora de gonadotropinas. La señalización Wnt/ β -catenina es crítica para establecer y mantener la capacidad proliferativa que permite la autorrenovación de las células intestinales para mantener la homeostasis del epitelio intestinal (Clevers, 2006); la vía de inflamación mediada por citoquinas y quimiocinas incluye proteínas clave en la comunicación intercelular que ayudan al mantenimiento de la homeostasis intestinal pero que también pueden ser impulsoras de la inflamación intestinal en diversos procesos patológicos (Neurath, 2014; Peterson and Artis, 2014).

Pese a la discrepancia en los resultados de expresión para los miRNAs en las diferentes cohortes y modelos, los resultados muestran que algunos candidatos podrían ser nuevos miRNAs involucrados en el metabolismo lipídico que necesitarían ser validados funcionalmente.

La variabilidad observada de un modelo a otro se podría deber a varios factores:

- i) Que los microRNAs seleccionados no estén regulados específicamente por lípidos y, por lo tanto, las modulaciones observadas sean el reflejo de procesos biológicos asociados a la digestión de alimentos. Aunque los controles en cada caso llevaban una ingestión de agua, no conocemos el posible efecto sobre la expresión de miRNAs de la digestión de los carbohidratos o las proteínas de la dieta por el intestino.
- ii) La utilización de varias cohortes de animales. Aunque en la literatura en general se reportan los datos basados en los resultados experimentales sobre una única cohorte de animales, en este trabajo se han utilizado varias cohortes de animales para encontrar un/os candidato/s firme/s. De este modo se pretendía encontrar un/os candidato/s cuyos cambios de expresión por lípidos fueran reproducibles. En estas diferencias entre cohortes, también hay que considerar que se pasa de utilizar machos para los *screening* iniciales y con una N mucho menor, a aumentar la N, diferenciar por sexos y diferenciar por secciones intestinales. Aunque esto es una fortaleza de nuestro trabajo, reproduciendo así la respuesta interindividual que se podría ver en humanos, esto también ha podido atenuar los cambios observados y que previamente determinaron su selección.
- iii) Aunque el perfil de expresión de microRNAs en células Caco-2 diferenciadas, que se muestra en este trabajo por primera vez (Figura 41), indican su similitud al perfil de miRNAs intestinales (McKenna *et al.*, 2010) como era esperable, la respuesta a lípidos postprandiales no reporta la misma respuesta a la observada *in vivo*. Como ya se ha explicado anteriormente, esta diferencia puede explicarse por la ya conocida variabilidad en las propiedades estructurales y funcionales del modelo (Briske-Anderson *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 1997; Sambuy *et al.*, 2005; Hayeshi *et al.*, 2008) así como las limitaciones respecto a la heterogeneidad del microambiente celular del intestino que este modelo por sí solo no es capaz de recapitular.
- iv) En cuanto al modelo de enteroides, si bien es cierto que supera las limitaciones del estudio con células Caco-2 diferenciadas, incluyendo la diversidad celular propia del epitelio intestinal, además de permitir su propagación indefinida y ser capaz de mantener las características del individuo del que deriva, también posee una serie de limitaciones como se ha comentado anteriormente. Nosotros presentamos en este trabajo un análisis de microRNAs diferencialmente expresados en enteroides tratados. Cuando tomamos únicamente el recuento para las muestras control, obtenemos un perfil de microRNAs más similar al de intestino delgado (McKenna *et al.*, 2010), incluyendo por ejemplo la familia let-7 (que en células Caco-2 diferenciadas no aparecía entre los miRNAs más expresados). Pese

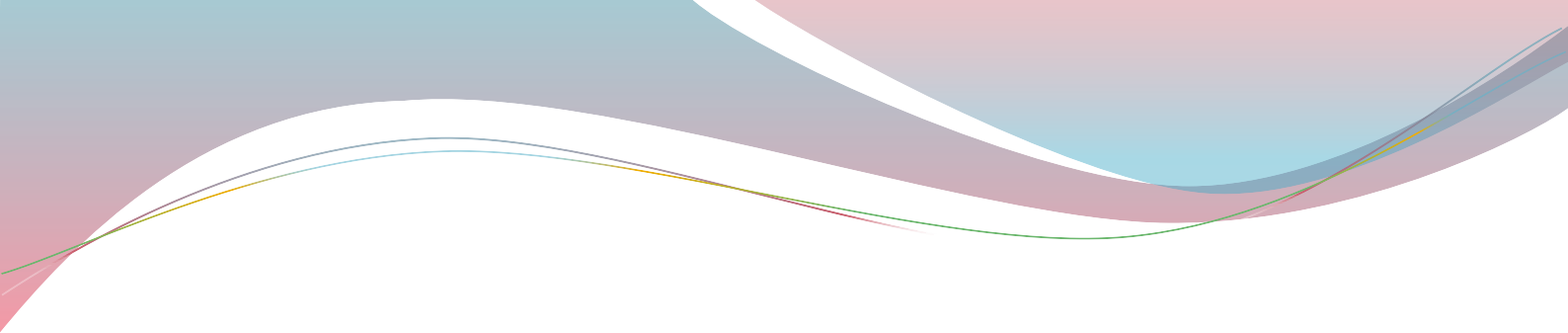
a esto, los resultados de expresión de los miRNAs candidatos no coinciden con los obtenidos *in vivo*. En esta diferencia hay que tener en cuenta que el modelo, pese a sus bondades, se trata de una estructura cerrada con la superficie luminal hacia adentro, lo que limita la exposición apical directa pese a que observamos cambios con el tratamiento. Por lo que se hace necesario modificar la técnica de cultivo para generar una superficie apical expuesta. Así, la formación de una monocapa de enteroides en un inserto permeable Transwell® permitiría el acceso a las superficies apicales y basolaterales de las células epiteliales intestinales (VanDussen *et al.*, 2015; Altay *et al.*, 2019). También se ha desarrollado recientemente (Co *et al.*, 2019) un método para revertir la polaridad epitelial de los enteroides y que mantengan la capacidad de diferenciarse en los diversos linajes de células intestinales, y así absorber los nutrientes de la manera esperada. Además, hay que indicar que un cultivo celular de una línea establecida es genéticamente homogéneo, mientras que los enteroides proceden de animales individuales, con sus características genéticas interindividuales a pesar de pertenecer a la misma camada. Pero a la vez, esta variabilidad es importante para permitir en un futuro el desarrollo de una nutrición de precisión, el poder cultivar enteroides de cada individuo, con sus características genéticas y genómicas propias, y así estudiar el efecto de los nutrientes de forma personalizada.



CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este trabajo confirman la validez de la hipótesis planteada ya que se ha demostrado que en condiciones de lipemia postprandial y dieta hipercalórica se produce una alteración en la expresión de miRNAs intestinales, posiblemente implicados en la regulación del metabolismo lipídico. Las conclusiones de este trabajo son:

1. El animal *knockout* intestinal para *Dicer1* (KO) presenta reducida la actividad de este enzima a nivel intestinal, lo cual se traduce en un menor peso de los animales así como la disminución de la expresión de marcadores del mantenimiento y estado de maduración del intestino.
2. Los animales KO presentan una alteración en el procesamiento de los triglicéridos de la dieta que se traduce en una disminución de los niveles plasmáticos e intestinales de TG respecto al animal *wild type* (WT), a las 2 horas tras realizar una carga oral de aceite de oliva enriquecido con colesterol.
3. La mayoría de los genes implicados en el metabolismo de lipoproteínas y colesterol disminuyen su expresión en el intestino de animales KO frente a animales WT.
4. El receptor de LDL oxidada tipo lectina 1 (OLR-1) y la HMG-CoA sintetasa (HMGCS2) aumentan su expresión génica y niveles de proteína en el intestino de los ratones KO para *Dicer1*.
5. En condiciones de lipemia postprandial y dieta hipercalórica se producen cambios en la expresión de ciertos microRNAs posiblemente implicados en el metabolismo lipídico.
6. Existen diferencias en la expresión de ciertos microRNAs, en lipemia postprandial determinados por el sexo de los individuos.
7. El modelo de células Caco-2 diferenciadas sobre placas Transwell® presenta un perfil de miRNAs que incluye, entre los 20 miRNAs más expresados, aquellos conocidos con mayor expresión en el intestino delgado de ratón, a excepción de la familia let-7.
8. El modelo de enteroides de ratón presenta un perfil de miRNAs que incluye, entre los 20 miRNAs más expresados, aquellos conocidos con mayor expresión en el intestino delgado de ratón, incluida la familia let-7.
9. Los modelos *in vitro* evaluados en este trabajo para reproducir las condiciones fisiológicas halladas en el intestino delgado no recrean en su totalidad los cambios en la expresión de miRNAs que se dan *in vivo* en respuesta a los lípidos.



BIBLIOGRAFÍA

- Abelson, J. F., Kwan, K. Y., O'Roak, B. J., Baek, D. Y., Stillman, A. A., Morgan, T. M., Mathews, C. A., Pauls, D. L., Rašin, M. R., Gunel, M., Davis, N. R., Ercan-Sencicek, A. G., Guez, D. H., Spertus, J. A., Leckman, J. F., Dure IV, L. S., Kurlan, R., Singer, H. S., Gilbert, D. L., Farhi, A., Louvi, A., Lifton, R. P., Šestan, N. and State, M. W. (2005) "Medicine: Sequence variants in SLITRK1 are associated with Tourette's syndrome", *Science*. American Association for the Advancement of Science, 310(5746), pp. 317–320. doi:10.1126/science.1116502.
- Agarwal, V., Bell, G. W., Nam, J. W. and Bartel, D. P. (2015) "Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs", *eLife*. eLife Sciences Publications Ltd, 4(AUGUST2015). doi:10.7554/eLife.05005.
- Ahmed, M. H. and Byrne, C. D. (2010) "Ezetimibe as a potential treatment for non-alcoholic fatty liver disease: Is the intestine a modulator of hepatic insulin sensitivity and hepatic fat accumulation?", *Drug Discovery Today*. Elsevier Current Trends, pp. 590–595. doi:10.1016/j.drudis.2010.06.007.
- Ahn, J., Lee, H., Jung, C. H. and Ha, T. (2012) "Lycopene inhibits hepatic steatosis via microRNA-21-induced downregulation of fatty acid-binding protein 7 in mice fed a high-fat diet", *Molecular Nutrition and Food Research*. John Wiley & Sons, Ltd, 56(11), pp. 1665–1674. doi:10.1002/mnfr.201200182.
- Akamatsu, S., Hayes, C. N., Tsuge, M., Miki, D., Akiyama, R., Abe, H., Ochi, H., Hiraga, N., Imamura, M., Takahashi, S., Aikata, H., Kawaoka, T., Kawakami, Y., Ohishi, W. and Chayama, K. (2015) "Differences in serum microRNA profiles in hepatitis B and C virus infection", *Journal of Infection*, 70(3), pp. 273–287. doi:10.1016/j.jinf.2014.10.017.
- Akao, Y., Nakagawa, Y. and Naoe, T. (2006) "let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. The Pharmaceutical Society of Japan, 29(5), pp. 903–906. doi:10.1248/bpb.29.903.
- Akbari, P., Braber, S., Varasteh, S., Alizadeh, A., Garssen, J. and Fink-Gremmels, J. (2017) "The intestinal barrier as an emerging target in the toxicological assessment of mycotoxins", *Archives of Toxicology*. Springer Verlag, pp. 1007–1029. doi:10.1007/s00204-016-1794-8.
- Alam, M. A., Al-Jenoobi, F. I. and Al-Mohizea, A. M. (2012) "Everted gut sac model as a tool in pharmaceutical research: Limitations and applications", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, pp. 326–336. doi:10.1111/j.2042-7158.2011.01391.x.
- Alarcón, C. R., Lee, H., Goodarzi, H., Halberg, N. and Tavazoie, S. F. (2015) "N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing", *Nature*. NIH Public Access, 519(7544), pp. 482–485. doi:10.1038/nature14281.
- Albinsson, S., Skoura, A., Yu, J., DiLorenzo, A., Fernández-Hernando, C., Offermanns, S., Miano, J. M. and Sessa, W. C. (2011) "Smooth muscle miRNAs are critical for post-natal regulation of blood pressure and vascular function", *PLoS ONE*, 6(4), p. 18869. doi:10.1371/journal.pone.0018869.
- Allo, M., Agirre, E., Bessonov, S., Bertucci, P., Gomez Acuna, L., Buggiano, V., Bellora, N., Singh, B., Petrillo, E., Blaustein, M., Minana, B., Dujardin, G., Pozzi, B., Pelisch, F., Bechara, E., Agafonov, D. E., Srebrow, A., Luhrmann, R., Valcarcel, J., Eyra, E. and Kornblihtt, A. R. (2014) "Argonaute-1 binds transcriptional enhancers and controls constitutive and alternative splicing in human cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 111(44), pp. 15622–15629. doi:10.1073/pnas.1416858111.
- Altay, G., Larrañaga, E., Tosi, S., Barriga, F. M., Batlle, E., Fernández-Majada, V. and Martínez, E. (2019) "Self-organized intestinal epithelial monolayers in crypt and villus-like domains show

effective barrier function", *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 9(1). doi:10.1038/s41598-019-46497-x.

Altmann, S. W., Davis, H. R., Zhu, L. J., Yao, X., Hoos, L. M., Tetzloff, G., Iyer, S. P. N., Maguire, M., Golovko, A., Zeng, M., Wang, L., Murgolo, N. and Graziano, M. P. (2004) "Niemann-Pick C1 Like 1 Protein Is Critical for Intestinal Cholesterol Absorption", *Science*, 303(5661), pp. 1201–1204. doi:10.1126/science.1093131.

Anderson, P. and Kedersha, N. (2006) "RNA granules", *The Journal of Cell Biology*. The Rockefeller University Press, 172(6), p. 803. doi:10.1083/JCB.200512082.

Antúnez, I. C., Lozano, J. L. A., MacHo, A. L., Botejara, E. M. I., Santamaría, J. S. and Penco, J. M. M. (2010) "Changes in the fat composition and histomorphology of the liver after partial intestinal resections", *Nutricion Hospitalaria*, 25(6), pp. 999–1005. doi:10.3305/nh.2010.25.6.4783.

Aronson, D., Bartha, P., Zinder, O., Kerner, A., Markiewicz, W., Avizohar, O., Brook, G. J. and Levy, Y. (2004) "Obesity is the major determinant of elevated C-reactive protein in subjects with the metabolic syndrome", *International Journal of Obesity*, 28(5), pp. 674–679. doi:10.1038/sj.ijo.0802609.

Arroyo, J. D., Chevillet, J. R., Kroh, E. M., Ruf, I. K., Pritchard, C. C., Gibson, D. F., Mitchell, P. S., Bennett, C. F., Pogosova-Agadjanyan, E. L., Stirewalt, D. L., Tait, J. F. and Tewari, M. (2011) "Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma", *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 108(12), pp. 5003–5008. doi:10.1073/pnas.1019055108.

Asadzadeh, Z., Mansoori, B., Mohammadi, A., Aghajani, M., Haji-Asgarzadeh, K., Safarzadeh, E., Mokhtarzadeh, A., Duijf, P. H. G. and Baradaran, B. (2019) "microRNAs in cancer stem cells: Biology, pathways, and therapeutic opportunities", *Journal of Cellular Physiology*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 10002–10017. doi:10.1002/jcp.27885.

Babiarz, J. E., Hsu, R., Melton, C., Thomas, M., Ullian, E. M. and Blelloch, R. (2011) "A role for noncanonical microRNAs in the mammalian brain revealed by phenotypic differences in Dgcr8 versus Dicer1 knockouts and small RNA sequencing", *RNA*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 17(8), pp. 1489–1501. doi:10.1261/rna.2442211.

Babiarz, J. E., Ruby, J. G., Wang, Y., Bartel, D. P. and Blelloch, R. (2008) "Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other microprocessor-independent, dicer-dependent small RNAs", *Genes and Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 22(20), pp. 2773–2785. doi:10.1101/gad.1705308.

Backes, C., Kehl, T., Stöckel, D., Fehlmann, T., Schneider, L., Meese, E., Lenhof, H. P. and Keller, A. (2017) "MiRPathDB: A new dictionary on microRNAs and target pathways", *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 45(D1), pp. D90–D96. doi:10.1093/nar/gkw926.

Bäckhed, F., Manchester, J. K., Semenkovich, C. F. and Gordon, J. I. (2007) "Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 104(3), pp. 979–984. doi:10.1073/pnas.0605374104.

Bajan, S. and Hutvagner, G. (2020) "RNA-Based Therapeutics: From Antisense Oligonucleotides to miRNAs", *Cells*. MDPI AG, 9(1), p. 137. doi:10.3390/cells9010137.

Barman, B. and Bhattacharyya, S. N. (2015) "mRNA targeting to endoplasmic reticulum precedes ago protein interaction and MicroRNA (miRNA)-mediated translation repression in mammalian

cells", *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 290(41), pp. 24650–24656. doi:10.1074/jbc.C115.661868.

Bartel, D. P. (2009) "MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions", *Cell*, pp. 215–233. doi:10.1016/j.cell.2009.01.002.

Bartel, D. P. (2018) "Metazoan MicroRNAs", *Cell*. Cell Press, pp. 20–51. doi:10.1016/j.cell.2018.03.006.

Bartram, M. P., Höhne, M., Dafinger, C., Völker, L. A., Albersmeyer, M., Heiss, J., Göbel, H., Brönneke, H., Burst, V., Liebau, M. C., Benzing, T., Schermer, B. and Müller, R. U. (2013) "Conditional loss of kidney microRNAs results in congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT)", *Journal of Molecular Medicine*, 91(6), pp. 739–748. doi:10.1007/s00109-013-1000-x.

Baselga-Escudero, L., Arola-Arnal, A., Pascual-Serrano, A., Ribas-Latre, A., Casanova, E., Salvadó, M. J., Arola, L. and Blade, C. (2013) "Chronic Administration of Proanthocyanidins or Docosahexaenoic Acid Reverse the Increase of miR-33a and miR-122 in Dyslipidemic Obese Rats", *PLoS ONE*. Public Library of Science, 8(7), p. e69817. doi:10.1371/journal.pone.0069817.

Bayraktar, R., Van Roosbroeck, K. and Calin, G. A. (2017) "Cell-to-cell communication: microRNAs as hormones", *Molecular Oncology*. Wiley-Blackwell, pp. 1673–1686. doi:10.1002/1878-0261.12144.

Beery, A. K. and Zucker, I. (2011) "Sex bias in neuroscience and biomedical research", *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. NIH Public Access, pp. 565–572. doi:10.1016/j.neubiorev.2010.07.002.

Beg, M. S., Brenner, A. J., Sachdev, J., Borad, M., Kang, Y. K., Stoudemire, J., Smith, S., Bader, A. G., Kim, S. and Hong, D. S. (2017) "Phase I study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, administered twice weekly in patients with advanced solid tumors", *Investigational New Drugs*. Springer New York LLC, 35(2), pp. 180–188. doi:10.1007/s10637-016-0407-y.

Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Stark, A., Bork, P. and Izaurralde, E. (2006) "mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes", *Genes and Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 20(14), pp. 1885–1898. doi:10.1101/gad.1424106.

Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. and Hannon, G. J. (2001) "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference", *Nature*. Nature Publishing Group, 409(6818), pp. 363–366. doi:10.1038/35053110.

Bernstein, E., Kim, S. Y., Carmell, M. A., Murchison, E. P., Alcorn, H., Li, M. Z., Mills, A. A., Elledge, S. J., Anderson, K. V and Hannon, G. J. (2003) "Dicer is essential for mouse development", *Nature Genetics*. Nature Publishing Group, 35(3), pp. 215–217. doi:10.1038/ng1253.

Betel, D., Wilson, M., Gabow, A., Marks, D. S. and Sander, C. (2008) "The microRNA.org resource: targets and expression.", *Nucleic acids research*. Oxford University Press, 36(Database issue), pp. D149-53. doi:10.1093/nar/gkm995.

Bhattacharyya, S. N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E. I. and Filipowicz, W. (2006) "Relief of microRNA-Mediated Translational Repression in Human Cells Subjected to Stress", *Cell*. Cell Press, 125(6), pp. 1111–1124. doi:10.1016/j.cell.2006.04.031.

Birney, E., Stamatoyannopoulos, J. A., Dutta, A., Guigó, R., Gingeras, T. R., Margulies, E. H., Weng, Z., Snyder, M., Dermitzakis, E. T., Thurman, R. E., Kuehn, M. S., Taylor, C. M., Neph, S., Koch, C. M., Asthana, S., Malhotra, A., Adzhubei, I., Greenbaum, J. A., Andrews, R. M., Flicek, P., Boyle, P.

J., Cao, H., Carter, N. P., Clelland, G. K., Davis, S., Day, N., Dhami, P., Dillon, S. C., Dorschner, M. O., Fiegler, H., Giresi, P. G., Goldy, J., Hawrylycz, M., Haydock, A., Humbert, R., James, K. D., Johnson, B. E., Johnson, E. M., Frum, T. T., Rosenzweig, E. R., Karnani, N., Lee, K., Lefebvre, G. C., Navas, P. A., Neri, F., Parker, S. C. J., Sabo, P. J., Sandstrom, R., Shafer, A., Vetric, D., Weaver, M., Wilcox, S., Yu, M., Collins, F. S., Dekker, J., Lieb, J. D., Tullius, T. D., Crawford, G. E., Sunyaev, S., Noble, W. S., Dunham, I., Denoeud, F., Reymond, A., Kapranov, P., Rozowsky, J., Zheng, D., Castelo, R., Frankish, A., Harrow, J., Ghosh, S., Sandelin, A., Hofacker, I. L., Baertsch, R., Keefe, D., Dike, S., Cheng, J., Hirsch, H. A., Sekinger, E. A., Lagarde, J., Abril, J. F., Shahab, A., Flamm, C., Fried, C., Hackermüller, J., Hertel, J., Lindemeyer, M., Missal, K., Tanzer, A., Washietl, S., Korbel, J., Emanuelsson, O., Pedersen, J. S., Holroyd, N., Taylor, R., Swarbreck, D., Matthews, N., Dickson, M. C., Thomas, D. J., Weirauch, M. T., Gilbert, J., Drenkow, J., Bell, I., Zhao, X., Srinivasan, K. G., Sung, W. K., Ooi, H. S., Chiu, K. P., Foissac, S., Alioto, T., Brent, M., Pachter, L., Tress, M. L., Valencia, A., Choo, S. W., Choo, C. Y., Ucla, C., Manzano, C., Wyss, C., Cheung, E., Clark, T. G., Brown, J. B., Ganesh, M., Patel, S., Tammana, H., Chrast, J., Henrichsen, C. N., Kai, C., Kawai, J., Nagalakshmi, U., Wu, J., Lian, Z., Lian, J., Newburger, P., Zhang, Xueqing, Bickel, P., Mattick, J. S., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Weissman, S., Hubbard, T., Myers, R. M., Rogers, J., Stadler, P. F., Lowe, T. M., Wei, C. L., Ruan, Y., Struhl, K., Gerstein, M., Antonarakis, S. E., Fu, Y., Green, E. D., Karaöz, U., Siepel, A., Taylor, J., Liefer, L. A., Wetterstrand, K. A., Good, P. J., Feingold, E. A., Guyer, M. S., Cooper, G. M., Asimenos, G., Dewey, C. N., Hou, M., Nikolaev, S., Montoya-Burgos, J. I., Löytynoja, A., Whelan, S., Pardi, F., Massingham, T., Huang, H., Zhang, N. R., Holmes, I., Mullikin, J. C., Ureta-Vidal, A., Paten, B., Seringhaus, M., Church, D., Rosenbloom, K., Kent, W. J., Stone, E. A., Batzoglu, S., Goldman, N., Hardison, R. C., Haussler, D., Miller, W., Sidow, A., Trinklein, N. D., Zhang, Z. D., Barrera, L., Stuart, R., King, D. C., Ameer, A., Enroth, S., Bieda, M. C., Kim, J., Bhinge, A. A., Jiang, N., Liu, J., Yao, F., Vega, V. B., Lee, C. W. H., Ng, P., Yang, A., Moqtaderi, Z., Zhu, Z., Xu, X., Squazzo, S., Oberley, M. J., Inman, D., Singer, M. A., Richmond, T. A., Munn, K. J., Rada-Iglesias, A., Wallerman, O., Komorowski, J., Fowler, J. C., Couttet, P., Bruce, A. W., Dovey, O. M., Ellis, P. D., Langford, C. F., Nix, D. A., Euskirchen, G., Hartman, S., Urban, A. E., Kraus, P., Van Calcar, S., Heintzman, N., Hoon Kim, T., Wang, K., Qu, C., Hon, G., Luna, R., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G., Aldred, S. F., Cooper, S. J., Halees, A., Lin, J. M., Shulha, H. P., Zhang, Xiaoling, Xu, M., Haidar, J. N. S., Yu, Y., Iyer, V. R., Green, R. D., Wadelius, C., Farnham, P. J., Ren, B., Harte, R. A., Hinrichs, A. S., Trumbower, H., Clawson, H., Hillman-Jackson, J., Zweig, A. S., Smith, K., Thakapallayil, A., Barber, G., Kuhn, R. M., Karolchik, D., Armengol, L., Bird, C. P., De Bakker, P. I. W., Kern, A. D., Lopez-Bigas, N., Martin, J. D., Stranger, B. E., Woodroffe, A., Davydov, E., Dimas, A., Eyas, E., Hallgrímsdóttir, I. B., Huppert, J., Zody, M. C., Abecasis, G. R., Estivill, X., Bouffard, G. G., Guan, X., Hansen, N. F., Idol, J. R., Maduro, V. V. B., Maskeri, B., McDowell, J. C., Park, M., Thomas, P. J., Young, A. C., Blakesley, R. W., Muzny, D. M., Sodergren, E., Wheeler, D. A., Worley, K. C., Jiang, H., Weinstock, G. M., Gibbs, R. A., Graves, T., Fulton, R., Mardis, E. R., Wilson, R. K., Clamp, M., Cuff, J., Gnerre, S., Jaffe, D. B., Chang, J. L., Lindblad-Toh, K., Lander, E. S., Koriabine, M., Nefedov, M., Osoegawa, K., Yoshinaga, Y., Zhu, B. and De Jong, P. J. (2007) "Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project", *Nature*, 447(7146), pp. 799–816. doi:10.1038/nature05874.

Biton, M., Levin, A., Slyper, M., Alkalay, I., Horwitz, E., Mor, H., Kredo-Russo, S., Avnit-Sagi, T., Cojocar, G., Zreik, F., Bentwich, Z., Poy, M. N., Artis, D., Walker, M. D., Hornstein, E., Pikarsky, E. and Ben-Neriah, Y. (2011) "Epithelial microRNAs regulate gut mucosal immunity via epithelium-T cell crosstalk", *Nature Immunology*. Nature Publishing Group, 12(3), pp. 239–246. doi:10.1038/ni.1994.

Borchert, G. M., Lanier, W. and Davidson, B. L. (2006) "RNA polymerase III transcribes human microRNAs", *Nature Structural and Molecular Biology*. Nature Publishing Group, 13(12), pp. 1097–1101. doi:10.1038/nsmb1167.

Briand, O., Touche, V., Colin, S., Brufau, G., Davalos, A., Schonewille, M., Bovenga, F., Carrière,

- V., De Boer, J. F., Dugardin, C., Riveau, B., Clavey, V., Tailleux, A., Moschetta, A., Lasunción, M. A., Groen, A. K., Staels, B. and Lestavel, S. (2016) "Liver X Receptor Regulates Triglyceride Absorption Through Intestinal Down-regulation of Scavenger Receptor Class B, Type 1", *Gastroenterology*. W.B. Saunders, 150(3), pp. 650–658. doi:10.1053/j.gastro.2015.11.015.
- Briske-Anderson, M. J., Finley, J. W. and Newman, S. M. (1997) "The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells", *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 214(3), pp. 248–257. doi:10.3181/00379727-214-44093.
- Broadbent, K. M., Park, D., Wolf, A. R., Van Tyne, D., Sims, J. S., Ribacke, U., Volkman, S., Duraisingh, M., Wirth, D., Sabeti, P. C. and Rinn, J. L. (2011) "A global transcriptional analysis of *Plasmodium falciparum* malaria reveals a novel family of telomere-associated lncRNAs", *Genome Biology*, 12(6). doi:10.1186/gb-2011-12-6-r56.
- Broughton, J. P., Lovci, M. T., Huang, J. L., Yeo, G. W. and Pasquinelli, A. E. (2016) "Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity.", *Molecular cell*. NIH Public Access, 64(2), pp. 320–333. doi:10.1016/j.molcel.2016.09.004.
- Bruneau, N., Richard, S., Silvy, F., Verine, A. and Lombardo, D. (2003) "Lectin-like Ox-LDL receptor is expressed in human INT-407 intestinal cells: Involvement in the transcytosis of pancreatic bile salt-dependent lipase", *Molecular Biology of the Cell*. American Society for Cell Biology, 14(7), pp. 2861–2875. doi:10.1091/mbc.E02-08-0544.
- Bukhari, S. I. A., Truesdell, S. S., Lee, S., Kollu, S., Classon, A., Boukhali, M., Jain, E., Mortensen, R. D., Yanagiya, A., Sadreyev, R. I., Haas, W. and Vasudevan, S. (2016) "A Specialized Mechanism of Translation Mediated by FXR1a-Associated MicroRNP in Cellular Quiescence", *Molecular Cell*. NIH Public Access, 61(5), pp. 760–773. doi:10.1016/j.molcel.2016.02.013.
- Burk, U., Schubert, J., Wellner, U., Schmalhofer, O., Vincan, E., Spaderna, S. and Brabletz, T. (2008) "A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells", *EMBO Reports*. European Molecular Biology Organization, 9(6), pp. 582–589. doi:10.1038/embor.2008.74.
- Callis, T. E., Chen, J.-F. and Wang, D.-Z. (2007) "MicroRNAs in Skeletal and Cardiac Muscle Development", *DNA and Cell Biology*, 26(4), pp. 219–225. doi:10.1089/dna.2006.0556.
- Cardwell, L. N. and Weaver, B. K. (2014) "IL-10 Inhibits LPS-Induced Expression of miR-147 in Murine Macrophages", *Advances in Biological Chemistry*. Scientific Research Publishing, Inc, 04(04), pp. 261–273. doi:10.4236/abc.2014.44032.
- Carr, T. P., Andresen, C. J. and Rudel, L. L. (1993) "Enzymatic determination of triglyceride, free cholesterol, and total cholesterol in tissue lipid extracts", *Clinical Biochemistry*, 26(1), pp. 39–42. doi:10.1016/0009-9120(93)90015-X.
- Castellano, L., Giamas, G., Jacob, J., Coombes, R. C., Lucchesi, W., Thiruchelvam, P., Barton, G., Jiao, L. R., Wait, R., Waxman, J., Hannon, G. J. and Stebbing, J. (2009) "The estrogen receptor- α -induced microRNA signature regulates itself and its transcriptional response", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(37), pp. 15732–15737. doi:10.1073/pnas.0906947106.
- Chai, C., Rivkin, M., Berkovits, L., Simerzin, A., Zorde-Khvaleyevsky, E., Rosenberg, N., Klein, S., Yaish, D., Durst, R., Shpitzen, S., Udi, S., Tam, J., Heeren, J., Worthmann, A., Schramm, C., Kluwe, J., Ravid, R., Hornstein, E., Giladi, H. and Galun, E. (2017) "Metabolic Circuit Involving Free Fatty Acids, microRNA 122, and Triglyceride Synthesis in Liver and Muscle Tissues", *Gastroenterology*. W.B. Saunders, 153(5), pp. 1404–1415. doi:10.1053/j.gastro.2017.08.013.

- Chan, D. C., Watts, G. F., Gan, S. K., Ooi, E. M. M. and Barrett, P. H. R. (2010) "Effect of ezetimibe on hepatic fat, inflammatory markers, and apolipoprotein B-100 kinetics in insulin-resistant obese subjects on a weight loss diet", *Diabetes Care*. American Diabetes Association, 33(5), pp. 1134–1139. doi:10.2337/dc09-1765.
- Chantret, I., Barbat, A., Dussaulx, E., Brattain, M. G. and Zweibaum, A. (1988) "Epithelial Polarity, Villin Expression, and Enterocytic Differentiation of Cultured Human Colon Carcinoma Cells: A Survey of Twenty Cell Lines", *Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 48(7), pp. 1936–1942. Available at: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/48/7/1936.long> (Accessed: October 16, 2019).
- Chateau, D., Pauquai, T., Delers, F., Rousset, M., Chambaz, J. and Demignot, S. (2005) "Lipid micelles stimulate the secretion of triglyceride-enriched apolipoprotein B48-containing lipoproteins by Caco-2 cells", *Journal of Cellular Physiology*, 202(3), pp. 767–776. doi:10.1002/jcp.20173.
- Cheloufi, S., Dos Santos, C. O., Chong, M. M. W. and Hannon, G. J. (2010) "A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis", *Nature*. NIH Public Access, 465(7298), pp. 584–589. doi:10.1038/nature09092.
- Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Yujing, Chen, J., Guo, X., Li, Q., Li, X., Wang, W., Zhang, Yan, Wang, Jin, Jiang, X., Xiang, Y., Xu, C., Zheng, P., Zhang, Juanbin, Li, R., Zhang, H., Shang, X., Gong, T., Ning, G., Wang, Jun, Zen, K., Zhang, Junfeng and Zhang, C.-Y. (2008) "Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases.", *Cell research*. Nature Publishing Group, 18(10), pp. 997–1006. doi:10.1038/cr.2008.282.
- Chen, X., Liang, H., Zhang, J., Zen, K. and Zhang, C. Y. (2012) "Secreted microRNAs: A new form of intercellular communication", *Trends in Cell Biology*. Elsevier Current Trends, 22(3), pp. 125–132. doi:10.1016/j.tcb.2011.12.001.
- Chen, X., Xu, X., Pan, B., Zeng, K., Xu, M., Liu, X., He, B., Pan, Y., Sun, H. and Wang, S. (2018) "miR-150-5p suppresses tumor progression by targeting VEGFA in colorectal cancer", *Aging*. Impact Journals LLC, 10(11), pp. 3421–3437. doi:10.18632/aging.101656.
- Chendrimada, T. P., Gregory, R. I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K. and Shiekhattar, R. (2005) "TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing", *Nature*. Nature Publishing Group, 436(7051), pp. 740–744. doi:10.1038/nature03868.
- Cheng, C., Bhardwaj, N. and Gerstein, M. (2009) "The relationship between the evolution of microRNA targets and the length of their UTRs", *BMC Genomics*, 10(1), p. 431. doi:10.1186/1471-2164-10-431.
- Cheng, L., Sun, X., Scicluna, B. J., Coleman, B. M. and Hill, A. F. (2014) "Characterization and deep sequencing analysis of exosomal and non-exosomal miRNA in human urine", *Kidney International*. Elsevier, 86(2), pp. 433–444. doi:10.1038/ki.2013.502.
- Chivukula, R. R., Shi, G., Acharya, A., Mills, E. W., Zeitels, L. R., Anandam, J. L., Abdelnaby, A. A., Balch, G. C., Mansour, J. C., Yopp, A. C., Maitra, A. and Mendell, J. T. (2014) "An essential mesenchymal function for miR-143/145 in intestinal epithelial regeneration", *Cell*. NIH Public Access, 157(5), pp. 1104–1116. doi:10.1016/j.cell.2014.03.055.
- Choi, S. E., Fu, T., Seok, S., Kim, D. H., Yu, E., Lee, K. W., Kang, Y., Li, X., Kemper, B. and Kemper, J. K. (2013) "Elevated microRNA-34a in obesity reduces NAD⁺ levels and SIRT1 activity by directly targeting NAMPT", *Aging Cell*. NIH Public Access, 12(6), pp. 1062–1072. doi:10.1111/ace.12135.

Chui, P. C., Guan, H. P., Lehrke, M. and Lazar, M. A. (2005) "PPAR γ regulates adipocyte cholesterol metabolism via oxidized LDL receptor 1", *Journal of Clinical Investigation*, 115(8), pp. 2244–2256. doi:10.1172/JCI24130.

Clara, R., Schumacher, M., Ramachandran, D., Fedele, S., Krieger, J. P., Langhans, W. and Mansouri, A. (2017) "Metabolic Adaptation of the Small Intestine to Short- and Medium-Term High-Fat Diet Exposure", *Journal of Cellular Physiology*. Wiley-Liss Inc., 232(1), pp. 167–175. doi:10.1002/jcp.25402.

Clare, S., John, V., Walker, A. W., Hill, J. L., Abreu-Goodger, C., Hale, C., Goulding, D., Lawley, T. D., Mastroeni, P., Frankel, G., Enright, A. J., Vigorito, E. and Dougan, G. (2013) "Enhanced susceptibility to citrobacter rodentium infection in microRNA-155-Deficient mice", *Infection and Immunity*. American Society for Microbiology (ASM), 81(3), pp. 723–732. doi:10.1128/IAI.00969-12.

Clegg, D. J., Brown, L. M., Woods, S. C. and Benoit, S. C. (2006) "Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin", *Diabetes*, 55(4), pp. 978–987. doi:10.2337/diabetes.55.04.06.db05-1339.

Clevers, H. (2006) "Wnt/ β -Catenin Signaling in Development and Disease", *Cell*. Cell Press, pp. 469–480. doi:10.1016/j.cell.2006.10.018.

Co, J. Y., Margalef-Català, M., Li, X., Mah, A. T., Kuo, C. J., Monack, D. M. and Amieva, M. R. (2019) "Controlling Epithelial Polarity: A Human Enteroid Model for Host-Pathogen Interactions", *Cell Reports*. Elsevier B.V., 26(9), pp. 2509–2520.e4. doi:10.1016/j.celrep.2019.01.108.

Cole, C., Sobala, A., Lu, C., Thatcher, S. R., Bowman, A., Brown, J. W. S., Green, P. J., Barton, G. J. and Hutvagner, G. (2009) "Filtering of deep sequencing data reveals the existence of abundant Dicer-dependent small RNAs derived from tRNAs", *RNA*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 15(12), pp. 2147–2160. doi:10.1261/rna.1738409.

Condorelli, G., Latronico, M. V. G. and Cavarretta, E. (2014) "MicroRNAs in cardiovascular diseases: Current knowledge and the road ahead", *Journal of the American College of Cardiology*. Elsevier, 63(21), pp. 2177–2187. doi:10.1016/j.jacc.2014.01.050.

Correia, C. N., Nalpas, N. C., McLoughlin, K. E., Browne, J. A., Gordon, S. V., MacHugh, D. E. and Shaughnessy, R. G. (2017) "Circulating microRNAs as potential biomarkers of infectious disease", *Frontiers in Immunology*, 8(FEB), p. 1. doi:10.3389/fimmu.2017.00118.

Corsten, M. F., Dennert, R., Jochems, S., Kuznetsova, T., Devaux, Y., Hofstra, L., Wagner, D. R., Staessen, J. A., Heymans, S. and Schroen, B. (2010) "Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease", *Circulation: Cardiovascular Genetics*. Lippincott Williams & Wilkins Hagerstown, MD, 3(6), pp. 499–506. doi:10.1161/CIRCGENETICS.110.957415.

Cortez, M. A., Valdecanas, D., Zhang, X., Zhan, Y., Bhardwaj, V., Calin, G. A., Komaki, R., Giri, D. K., Quini, C. C., Wolfe, T., Peltier, H. J., Bader, A. G., Heymach, J. V., Meyn, R. E. and Welsh, J. W. (2014) "Therapeutic delivery of mir-200c enhances radiosensitivity in lung cancer", *Molecular Therapy*. American Society of Gene & Cell Therapy, 22(8), pp. 1494–1503. doi:10.1038/mt.2014.79.

Crosnier, C., Stamataki, D. and Lewis, J. (2006) "Organizing cell renewal in the intestine: Stem cells, signals and combinatorial control", *Nature Reviews Genetics*, pp. 349–359. doi:10.1038/nrg1840.

Cruz-Gil, S., Sánchez-Martínez, R., Wagner-Reguero, S., Stange, D., Schölch, S., Pape, K. and

Ramírez de Molina, A. (2019) "A more physiological approach to lipid metabolism alterations in cancer: CRC-like organoids assessment", *PLOS ONE*. Edited by C. Liu, 14(7), p. e0219944. doi:10.1371/journal.pone.0219944.

Curtale, G., Rubino, M. and Locati, M. (2019) "MicroRNAs as Molecular Switches in Macrophage Activation.", *Frontiers in immunology*. Frontiers Media SA, 10, p. 799. doi:10.3389/fimmu.2019.00799.

Dai, Lixia, Wang, W., Zhang, S., Jiang, Q., Wang, R., Dai, Lei, Cheng, L., Yang, Y., Wei, Y. and Deng, H. (2012) "Vector-based miR-15a/16-1 plasmid inhibits colon cancer growth in vivo", *Cell Biology International*. Wiley-Blackwell, 36(8), pp. 765–770. doi:10.1042/cbi20110404.

Dalmasso, G., Nguyen, H. T. T., Yan, Y., Laroui, H., Charania, M. A., Ayyadurai, S., Sitaraman, S. V and Merlin, D. (2011) "Microbiota modulate host gene expression via micrornas", *PLoS ONE*. Public Library of Science, 6(4), p. e19293. doi:10.1371/journal.pone.0019293.

Dangla-Valls, A., Molinuevo, J. L., Altirriba, J., Sánchez-Valle, R., Alcolea, D., Fortea, J., Rami, L., Balasa, M., Muñoz-García, C., Ezquerro, M., Fernández-Santiago, R., Lleó, A., Lladó, A. and Antonell, A. (2017) "CSF microRNA Profiling in Alzheimer's Disease: a Screening and Validation Study", *Molecular Neurobiology*. Springer US, 54(9), pp. 6647–6654. doi:10.1007/s12035-016-0106-x.

Darmoul, D., Lacasa, M., Baricault, L., Marguet, D., Sapin, C., Trotot, P., Barbat, A. and Trugnan, G. (1992) "Dipeptidyl peptidase IV (CD 26) gene expression in enterocyte-like colon cancer cell lines HT-29 and Caco-2. Cloning of the complete human coding sequence and changes of dipeptidyl peptidase IV mRNA levels during cell differentiation.", *The Journal of biological chemistry*, 267(7), pp. 4824–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1347043> (Accessed: October 16, 2019).

Das, S., Ferlito, M., Kent, O. A., Fox-Talbot, K., Wang, R., Liu, D., Raghavachari, N., Yang, Y., Wheelan, S. J., Murphy, E. and Steenbergen, C. (2012) "Nuclear miRNA regulates the mitochondrial genome in the heart", *Circulation Research*. NIH Public Access, 110(12), pp. 1596–1603. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.267732.

Dávalos, A. and Fernández-Hernando, C. (2013) "From evolution to revolution: MiRNAs as pharmacological targets for modulating cholesterol efflux and reverse cholesterol transport", *Pharmacological Research*. NIH Public Access, pp. 60–72. doi:10.1016/j.phrs.2013.02.005.

Davalos, A., Goedeke, L., Smibert, P., Ramirez, C. M., Warriar, N. P., Andreo, U., Cirera-Salinas, D., Rayner, K., Suresh, U., Pastor-Pareja, J. C., Esplugues, E., Fisher, E. A., Penalva, L. O. F., Moore, K. J., Suarez, Y., Lai, E. C. and Fernandez-Hernando, C. (2011) "miR-33a/b contribute to the regulation of fatty acid metabolism and insulin signaling", *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 108(22), pp. 9232–9237. doi:10.1073/pnas.1102281108.

Dávalos, A., Henriques, R., Latasa, M. J., Laparra, M. and Coca, M. (2019) "Literature review of baseline information on non-coding RNA (ncRNA) to support the risk assessment of ncRNA-based genetically modified plants for food and feed", *EFSA Supporting Publications*. Wiley, 16(8). doi:10.2903/sp.efsa.2019.en-1688.

Dávalos, A. and Suárez, Y. (2013) "MiRNA-based therapy: From bench to bedside", *Pharmacological Research*, 75, pp. 1–2. doi:10.1016/j.phrs.2013.06.010.

Davis, B. N., Hilyard, A. C., Lagna, G. and Hata, A. (2008) "SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation", *Nature*. NIH Public Access, 454(7200), pp. 56–61. doi:10.1038/nature07086.

- Davis, W., Boyd, J. T., Ile, K. E. and Tew, K. D. (2004) "Human ATP-binding cassette transporter-2 (ABCA2) positively regulates low-density lipoprotein receptor expression and negatively regulates cholesterol esterification in Chinese hamster ovary cells", *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1683(1–3), pp. 89–100. doi:10.1016/j.bbalip.2004.04.009.
- Deng, S., Zhu, S., Wang, B., Li, X., Liu, Y., Qin, Q., Gong, Q., Niu, Y., Xiang, C., Chen, J., Yan, J., Deng, Shijiang, Yin, T., Yang, M., Wu, H., Wang, C. and Zhao, G. (2014) "Chronic pancreatitis and pancreatic cancer demonstrate active epithelial-mesenchymal transition profile, regulated by miR-217-SIRT1 pathway", *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd, 355(2), pp. 184–191. doi:10.1016/j.canlet.2014.08.007.
- Deng, X., Cao, M., Zhang, J., Hu, K., Yin, Z., Zhou, Z., Xiao, X., Yang, Y., Sheng, W., Wu, Y. and Zeng, Y. (2014) "Hyaluronic acid-chitosan nanoparticles for co-delivery of MiR-34a and doxorubicin in therapy against triple negative breast cancer", *Biomaterials*. Elsevier, 35(14), pp. 4333–4344. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.02.006.
- Dinger, M. E., Amara, P. P., Mercer, T. R., Pang, K. C., Bruce, S. J., Gardiner, B. B., Askarian-Amiri, M. E., Ru, K., Soldà, G., Simons, C., Sunkin, S. M., Crowe, M. L., Grimmond, S. M., Perkins, A. C. and Mattick, J. S. (2008) "Long noncoding RNAs in mouse embryonic stem cell pluripotency and differentiation", *Genome Research*, 18(9), pp. 1433–1445. doi:10.1101/gr.078378.108.
- Djuranovic, S., Nahvi, A. and Green, R. (2012) "miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay", *Science*. NIH Public Access, 336(6078), pp. 237–240. doi:10.1126/science.1215691.
- Dosh, R. H., Jordan-Mahy, N., Sammon, C. and Le Maitre, C. L. (2019) "Long-term in vitro 3D hydrogel co-culture model of inflammatory bowel disease", *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 9(1). doi:10.1038/s41598-019-38524-8.
- Ebert, M. S. and Sharp, P. A. (2012) "Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes.", *Cell*. NIH Public Access, 149(3), pp. 515–24. doi:10.1016/j.cell.2012.04.005.
- Ekström, K., Valadi, H., Sjöstrand, M., Malmhäll, C., Bossios, A., Eldh, M. and Lötval, J. (2012) "Characterization of mRNA and microRNA in human mast cell-derived exosomes and their transfer to other mast cells and blood CD34 progenitor cells", *Journal of Extracellular Vesicles*. Taylor & Francis, 1(1). doi:10.3402/jev.v1i0.18389.
- Esau, C., Davis, S., Murray, S. F., Yu, X. X., Pandey, S. K., Pear, M., Watts, L., Booten, S. L., Graham, M., McKay, R., Subramaniam, A., Propp, S., Lollo, B. A., Freier, S., Bennett, C. F., Bhanot, S. and Monia, B. P. (2006) "miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting", *Cell Metabolism*. Cell Press, 3(2), pp. 87–98. doi:10.1016/j.cmet.2006.01.005.
- Esau, C., Kang, X., Peralta, E., Hanson, E., Marcusson, E. G., Ravichandran, L. V., Sun, Y., Koo, S., Perera, R. J., Jain, R., Dean, N. M., Freier, S. M., Bennett, C. F., Lollo, B. and Griffey, R. (2004) "MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation", *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 279(50), pp. 52361–52365. doi:10.1074/jbc.C400438200.
- Eskildsen, T., Taipaleenmäki, H., Stenvang, J., Abdallah, B. M., Ditzel, N., Nossent, A. Y., Bak, M., Kauppinen, S. and Kassem, M. (2011) "MicroRNA-138 regulates osteogenic differentiation of human stromal (mesenchymal) stem cells in vivo", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 108(15), pp. 6139–6144. doi:10.1073/pnas.1016758108.
- Eulalio, A., Huntzinger, E., Nishihara, T., Rehwinkel, J., Fauser, M. and Izaurralde, E. (2009)

"Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation", *RNA*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 15(1), pp. 21–32. doi:10.1261/rna.1399509.

Farh, K. K. H., Grimson, A., Jan, C., Lewis, B. P., Johnston, W. K., Lim, L. P., Burge, C. B. and Bartel, D. P. (2005) "The widespread impact of mammalian microRNAs on mRNA repression and evolution", *Science*. American Association for the Advancement of Science, 310(5755), pp. 1817–1821. doi:10.1126/science.1121158.

Feinbaum, R., Ambros, V. and Lee, R. (2004) "The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*", *Cell*, 116(116), pp. 843–854. Available at: [http://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674\(93\)90529-Y.pdf?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F009286749390529Y%3Fshowall%3Dtrue](http://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674(93)90529-Y.pdf?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F009286749390529Y%3Fshowall%3Dtrue) (Accessed: February 22, 2018).

Feingold, E. A., Good, P. J., Guyer, M. S., Kamholz, S., Liefer, L., Wetterstrand, K., Collins, F. S., Gingeras, T. R., Kampa, D., Sekinger, E. A., Cheng, J., Hirsch, H., Ghosh, S., Zhu, Z., Patel, S., Piccolboni, A., Yang, A., Tammanna, H., Bekiranov, S., Kapranov, P., Harrison, R., Church, G., Struhl, K., Ren, B., Kim, T. H., Barrera, L. O., Qu, C., van Calcar, S., Luna, R., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G., Guigo, R., Antonarakis, S. E., Birney, E., Brent, M., Pachter, L., Reymond, A., Dermitzakis, E. T., Dewey, C., Keefe, D., Denoeud, F., Lagarde, J., Ashurst, J., Hubbard, T., Wesselink, J. J., Castelo, R., Eyas, E., Myers, R. M., Sidow, A., Batzoglu, S., Trinklein, N. D., Hartman, S. J., Aldred, S. F., Anton, E., Schroeder, D. I., Marticke, S. S., Nguyen, L., Schmutz, J., Grimwood, J., Dickson, M., Cooper, G. M., Stone, E. A., Asimenos, G., Brudno, M., Dutta, A., Karnani, N., Taylor, C. M., Kim, H. K., Robins, G., Stamatoyannopoulos, G., Stamatoyannopoulos, J. A., Dorschner, M., Sabo, P., Hawrylycz, M., Humbert, R., Wallace, J., Yu, M., Navas, P. A., McArthur, M., Noble, W. S., Dunham, I., Koch, C. M., Andrews, R. M., Clelland, G. K., Wilcox, S., Fowler, J. C., James, K. D., Groth, P., Dovey, O. M., Ellis, P. D., Wraight, V. L., Mungall, A. J., Dhami, P., Fiegler, H., Langford, C. F., Carter, N. P., Vetrie, D., Snyder, M., Euskirchen, G., Urban, A. E., Nagalakshmi, U., Rinn, J., Popescu, G., Bertone, P., Hartman, S., Rozowsky, J., Emanuelsson, O., Royce, T., Chung, S., Gerstein, M., Lian, Z., Lian, J., Nakayama, Y., Weissman, S., Stolc, V., Tongprasit, W., Sethi, H., Jones, S., Marra, M., Shin, H., Schein, J., Clamp, M., Lindblad-Toh, K., Chang, J., Jaffe, D. B., Kamal, M., Lander, E. S., Mikkelsen, T. S., Vinson, J., Zody, M. C., de Jong, P. J., Osoegawa, K., Nefedov, M., Zhu, B., Baxevas, A. D., Wolfsberg, T. G., Crawford, G. E., Whittle, J., Holt, I. E., Vasicek, T. J., Zhou, D., Luo, S., Green, E. D., Bouffard, G. G., Margulies, E. H., Portnoy, M. E., Hansen, N. F., Thomas, P. J., McDowell, J. C., Maskeri, B., Young, A. C., Idol, J. R., Blakesley, R. W., Schuler, G., Miller, W., Hardison, R., Elnitski, L., Shah, P., Salzberg, S. L., Pertea, M., Majoros, W. H., Haussler, D., Thomas, D., Rosenbloom, K. R., Clawson, H., Siepel, A., Kent, W. J., Weng, Z., Jin, S., Halees, A., Burden, H., Karaoz, U., Fu, Y., Yu, Y., Ding, C., Cantor, C. R., Kingston, R. E., Dennis, J., Green, R. D., Singer, M. A., Richmond, T. A., Norton, J. E., Farnham, P. J., Oberley, M. J., Inman, D. R., McCormick, M. R., Kim, H., Middle, C. L., Pirrung, M. C., Fu, X. D., Kwon, Y. S., Ye, Z., Dekker, J., Tabuchi, T. M., Gheldof, N., Dostie, J. and Harvey, S. C. (2004) "The ENCODE (ENCyclopedia of DNA Elements) Project", *Science*, pp. 636–640. doi:10.1126/science.1105136.

Feng, B., Yaol, P. M., Li, Y., Devlin, C. M., Zhang, D., Harding, H. P., Sweeney, M., Rong, J. X., Kuriakose, G., Fisher, E. A., Marks, A. R., Ron, D. and Tabas, I. (2003) "The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages", *Nature Cell Biology*, 5(9), pp. 781–792. doi:10.1038/ncb1035.

Feng, Z., Zhang, L., Zhou, J., Zhou, S., Li, L., Guo, X., Feng, G., Ma, Z., Huang, W. and Huang, F. (2017) "mir-218-2 promotes glioblastomas growth, invasion and drug resistance by targeting CDC27", *Oncotarget*. Impact Journals LLC, 8(4), pp. 6304–6318. doi:10.18632/oncotarget.13850.

Fernández-sanjurjo, M., Gonzalo-calvo, D. De, Díez-robles, S., Dávalos, A. and Iglesias-gutiérrez, E. (2016) "Circulating microRNA as regulators of the molecular response in exercise in healthy

people", *Arch Med Deporte*, 33(6), pp. 394–403.

Fesler, A., Liu, H. and Ju, J. (2018) "Modified miR-15a has therapeutic potential for improving treatment of advanced stage colorectal cancer through inhibition of BCL2, BMI1, YAP1 and DCLK1", *Oncotarget*. Impact Journals LLC, 9(2), pp. 2367–2383. doi:10.18632/oncotarget.23414.

Finlay, B. B. and Falkow, S. (1990) "Salmonella interactions with polarized human intestinal caco-2 epithelial cells", *Journal of Infectious Diseases*, 162(5), pp. 1096–1106. doi:10.1093/infdis/162.5.1096.

Flum, M., Kleemann, M., Schneider, H., Weis, B., Fischer, S., Handrick, R. and Otte, K. (2018) "miR-217-5p induces apoptosis by directly targeting PRKCI, BAG3, ITGAV and MAPK1 in colorectal cancer cells", *Journal of Cell Communication and Signaling*. Springer Netherlands, 12(2), pp. 451–466. doi:10.1007/s12079-017-0410-x.

Folch, J., Lees, M. and Stanley, G. H. S. (1957) "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues.", *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), pp. 497–509. doi:10.1111/j.1745-6584.2010.00771.x.

Fontana, L., Fiori, M. E., Albin, S., Cifaldi, L., Giovannazzi, S., Forloni, M., Boldrini, R., Donfrancesco, A., Federici, V., Giacomini, P., Peschle, C. and Fruci, D. (2008) "Antagomir-17-5p abolishes the growth of therapy-resistant neuroblastoma through p21 and BIM", *PLoS ONE*. Public Library of Science, 3(5), p. e2236. doi:10.1371/journal.pone.0002236.

Fordham, R. P., Yui, S., Hannan, N. R. F., Soendergaard, C., Madgwick, A., Schweiger, P. J., Nielsen, O. H., Vallier, L., Pedersen, R. A., Nakamura, T., Watanabe, M. and Jensen, K. B. (2013) "Transplantation of expanded fetal intestinal progenitors contributes to colon regeneration after injury", *Cell Stem Cell*, 13(6), pp. 734–744. doi:10.1016/j.stem.2013.09.015.

Friedman, R. C., Farh, K. K.-H., Burge, C. B. and Bartel, D. P. (2009) "Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs.", *Genome research*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 19(1), pp. 92–105. doi:10.1101/gr.082701.108.

Fu, H., Feng, J., Liu, Q., Sun, F., Tie, Y., Zhu, J., Xing, R., Sun, Z. and Zheng, X. (2009) "Stress induces tRNA cleavage by angiogenin in mammalian cells", *FEBS Letters*, 583(2), pp. 437–442. doi:10.1016/j.febslet.2008.12.043.

Gallo, A., Tandon, M., Alevizos, I. and Illei, G. G. (2012) "The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes", *PLoS ONE*. Public Library of Science, 7(3), p. e30679. doi:10.1371/journal.pone.0030679.

Gan, Z., Rumsey, J., Hazen, B. C., Lai, L., Leone, T. C., Vega, R. B., Xie, H., Conley, K. E., Auwerx, J., Smith, S. R., Olson, E. N., Kralli, A. and Kelly, D. P. (2013) "Nuclear receptor/microRNA circuitry links muscle fiber type to energy metabolism", *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation, 123(6), pp. 2564–2575. doi:10.1172/JCI67652.

Garcia-Calvo, M., Lisnock, J. M., Bull, H. G., Hawes, B. E., Burnett, D. A., Braun, M. P., Crona, J. H., Davis, H. R., Dean, D. C., Detmers, P. A., Graziano, M. P., Hughes, M., MacIntyre, D. E., Ogawa, A., O'Neil, K. A., Iyer, S. P. N., Shevell, D. E., Smith, M. M., Tang, Y. S., Makarewicz, A. M., Ujjainwalla, F., Altmann, S. W., Chapman, K. T. and Thornberry, N. A. (2005) "The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1)", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 102(23), pp. 8132–8137. doi:10.1073/pnas.0500269102.

Gasparini, P., Cascione, L., Landi, L., Carasi, S., Lovat, F., Tibaldi, C., Ali, G., D'Incecco, A., Minuti, G., Chella, A., Fontanini, G., Fassan, M., Cappuzzo, F. and Croce, C. M. (2015) "microRNA

classifiers are powerful diagnostic/prognostic tools in ALK- , EGFR- , and KRAS -driven lung cancers", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(48), pp. 14924–14929. doi:10.1073/pnas.1520329112.

Gilad, S., Meiri, E., Yagev, Y., Benjamin, S., Lebanony, D., Yerushalmi, N., Benjamin, H., Kushnir, M., Cholak, H., Melamed, N., Bentwich, Z., Hod, M., Goren, Y. and Chajut, A. (2008) "Serum microRNAs are promising novel biomarkers.", *PloS one*. Public Library of Science, 3(9), p. e3148. doi:10.1371/journal.pone.0003148.

Goedeke, L., Rotllan, N., Canfrán-Duque, A., Aranda, J. F., Ramírez, C. M., Araldi, E., Lin, C. S., Anderson, N. N., Wagschal, A., De Cabo, R., Horton, J. D., Lasunción, M. A., Näär, A. M., Suárez, Y. and Fernández-Hernando, C. (2015) "MicroRNA-148a regulates LDL receptor and ABCA1 expression to control circulating lipoprotein levels", *Nature Medicine*. NIH Public Access, 21(11), pp. 1280–1288. doi:10.1038/nm.3949.

Goedeke, L., Rotllan, N., Ramírez, C. M., Aranda, J. F., Canfrán-Duque, A., Araldi, E., Fernández-Hernando, A., Langhi, C., de Cabo, R., Baldán, Á., Suárez, Y. and Fernández-Hernando, C. (2015) "miR-27b inhibits LDLR and ABCA1 expression but does not influence plasma and hepatic lipid levels in mice", *Atherosclerosis*. NIH Public Access, 243(2), pp. 499–509. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.09.033.

Goodrich, J. K., Waters, J. L., Poole, A. C., Sutter, J. L., Koren, O., Blekhman, R., Beaumont, M., Van Treuren, W., Knight, R., Bell, J. T., Spector, T. D., Clark, A. G. and Ley, R. E. (2014) "Human genetics shape the gut microbiome", *Cell*. NIH Public Access, 159(4), pp. 789–799. doi:10.1016/j.cell.2014.09.053.

Goto, Y. (2019) "Epithelial Cells as a Transmitter of Signals From Commensal Bacteria and Host Immune Cells", *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media SA, 10, p. 2057. doi:10.3389/fimmu.2019.02057.

Van Greevenbroek, M. M. J., Van Meer, G., Erkelens, D. W. and De Bruin, T. W. A. (1996) "Effects of saturated, mono-, and polyunsaturated fatty acids on the secretion of apo B containing lipoproteins by Caco-2 cells", *Atherosclerosis*. Elsevier Ireland Ltd, 121(1), pp. 139–150. doi:10.1016/0021-9150(95)05712-9.

Gregory, R. I., Yan, K., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N. and Shiekhattar, R. (2004) "The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs", *Nature*. Nature Publishing Group, 432(7014), pp. 235–240. doi:10.1038/nature03120.

Grey, F., Tirabassi, R., Meyers, H., Wu, G., McWeeney, S., Hook, L. and Nelson, J. A. (2010) "A viral microRNA down-regulates multiple cell cycle genes through mRNA 5'UTRs", *PLoS Pathogens*. Public Library of Science, 6(6), p. e1000967. doi:10.1371/journal.ppat.1000967.

Griffiths-Jones, S., Saini, H. K., van Dongen, S. and Enright, A. J. (2008) "miRBase: tools for microRNA genomics.", *Nucleic acids research*. Oxford University Press, 36(Database issue), pp. D154-8. doi:10.1093/nar/gkm952.

Grimson, A., Farh, K. K. H., Johnston, W. K., Garrett-Engle, P., Lim, L. P. and Bartel, D. P. (2007) "MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing", *Molecular Cell*. NIH Public Access, 27(1), pp. 91–105. doi:10.1016/j.molcel.2007.06.017.

Grove, K. L., Fried, S. K., Greenberg, A. S., Xiao, X. Q. and Clegg, D. J. (2010) "A microarray analysis of sexual dimorphism of adipose tissues in high-fat-diet-induced obese mice", *International Journal of Obesity*. NIH Public Access, 34(6), pp. 989–1000. doi:10.1038/ijo.2010.12.

Gu, S., Jin, L., Zhang, Y., Huang, Y., Zhang, F., Valdmanis, P. N. and Kay, M. A. (2012) "The loop

position of shRNAs and pre-miRNAs is critical for the accuracy of dicer processing in vivo", *Cell*. NIH Public Access, 151(4), pp. 900–911. doi:10.1016/j.cell.2012.09.042.

Gupta, R. A., Shah, N., Wang, K. C., Kim, J., Horlings, H. M., Wong, D. J., Tsai, M. C., Hung, T., Argani, P., Rinn, J. L., Wang, Y., Brzoska, P., Kong, B., Li, R., West, R. B., Van De Vijver, M. J., Sukumar, S. and Chang, H. Y. (2010) "Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis", *Nature*, 464(7291), pp. 1071–1076. doi:10.1038/nature08975.

Gustafsson, J. A., Mode, A., Norstedt, G. and Skett, P. (1983) "Sex Steroid Induced Changes in Hepatic Enzymes", *Annual Review of Physiology*, 45(1), pp. 51–60. doi:10.1146/annurev.ph.45.030183.000411.

Gwiggner, M., Martinez-Nunez, R. T., Whiteoak, S. R., Bondanese, V. P., Claridge, A., Collins, J. E., Fraser Cummings, J. R. and Sanchez-Elsner, T. (2018) "MicroRNA-31 and MicroRNA-155 are overexpressed in ulcerative colitis and regulate IL-13 signaling by targeting interleukin 13 receptor α -1", *Genes*, 9(2), p. 85. doi:10.3390/genes9020085.

Ha, M. and Kim, V. N. (2014) "Regulation of microRNA biogenesis", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 15(8), pp. 509–524. doi:10.1038/nrm3838.

Halbleib, J. M., Sääf, A. M., Brown, P. O. and Nelson, W. J. (2007) "Transcriptional modulation of genes encoding structural characteristics of differentiating enterocytes during development of a polarized epithelium in vitro", *Molecular Biology of the Cell*, 18(11), pp. 4261–4278. doi:10.1091/mbc.E07-04-0308.

Han, J., Lee, Y., Yeom, K. H., Kim, Y. K., Jin, H. and Kim, V. N. (2004) "The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing", *Genes and Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 18(24), pp. 3016–3027. doi:10.1101/gad.1262504.

Han, J., Pedersen, J. S., Kwon, S. C., Belair, C. D., Kim, Y. K., Yeom, K. H., Yang, W. Y., Haussler, D., Blelloch, R. and Kim, V. N. (2009) "Posttranscriptional Crossregulation between Drosha and DGCR8", *Cell*. NIH Public Access, 136(1), pp. 75–84. doi:10.1016/j.cell.2008.10.053.

Harfe, B. D., McManus, M. T., Mansfield, J. H., Hornstein, E. and Tabin, C. J. (2005) "The RNaseIII enzyme Dicer is required for morphogenesis but not patterning of the vertebrate limb", *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 102(31), pp. 10898–10903. doi:10.1073/pnas.0504834102.

Harrow, J., Frankish, A., Gonzalez, J. M., Tapanari, E., Diekhans, M., Kokocinski, F., Aken, B. L., Barrell, D., Zadissa, A., Searle, S., Barnes, I., Bignell, A., Boychenko, V., Hunt, T., Kay, M., Mukherjee, G., Rajan, J., Despacio-Reyes, G., Saunders, G., Steward, C., Harte, R., Lin, M., Howald, C., Tanzer, A., Derrien, T., Chrast, J., Walters, N., Balasubramanian, S., Pei, B., Tress, M., Rodriguez, J. M., Ezkurdia, I., Van Baren, J., Brent, M., Haussler, D., Kellis, M., Valencia, A., Reymond, A., Gerstein, M., Guigó, R. and Hubbard, T. J. (2012) "GENCODE: The reference human genome annotation for the ENCODE project", *Genome Research*, 22(9), pp. 1760–1774. doi:10.1101/gr.135350.111.

Hassan, M. Q., Maeda, Y., Taipaleenmaki, H., Zhang, W., Jafferji, M., Gordon, J. A. R., Li, Z., Croce, C. M., Van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Stein, G. S. and Lian, J. B. (2012) "miR-218 directs a Wnt signaling circuit to promote differentiation of osteoblasts and osteomimicry of metastatic cancer cells", *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 287(50), pp. 42084–42092. doi:10.1074/jbc.M112.377515.

Haussecker, D., Huang, Y., Lau, A., Parameswaran, P., Fire, A. Z. and Kay, M. A. (2010) "Human tRNA-derived small RNAs in the global regulation of RNA silencing", *Rna*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 16(4), pp. 673–695. doi:10.1261/rna.2000810.

- Hayashi, N., Yokotani, A., Yamamoto, M., Kososhi, M., Morita, M., Fukunishi, C., Nishizawa, N. and Gotoh, N. (2017) "Extracellular signals of a human epithelial colorectal adenocarcinoma (Caco-2) cell line facilitate the penetration of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strain through the mucin layer", *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media S.A., 7(SEP). doi:10.3389/fcimb.2017.00415.
- Hayeshi, R., Hilgendorf, C., Artursson, P., Augustijns, P., Brodin, B., Dehertogh, P., Fisher, K., Fossati, L., Hovenkamp, E., Korjamo, T., Masungi, C., Maubon, N., Mols, R., Müllertz, A., Mönkkönen, J., O'Driscoll, C., Oppers-Tiemissen, H. M., Ragnarsson, E. G. E., Rooseboom, M. and Ungell, A. L. (2008) "Comparison of drug transporter gene expression and functionality in Caco-2 cells from 10 different laboratories", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 35(5), pp. 383–396. doi:10.1016/j.ejps.2008.08.004.
- He, X., Dong, Y., Wu, C. W., Zhao, Z., Ng, S. S. M., Chan, F. K. L., Sung, J. J. Y. and Yu, J. (2012) "MicroRNA-218 inhibits cell cycle progression and promotes apoptosis in colon cancer by downregulating BMI1 polycomb ring finger oncogene", *Molecular Medicine*. The Feinstein Institute for Medical Research, 18(12), pp. 1491–1498. doi:10.2119/molmed.2012.00304.
- He, Y., Jiang, X. and Chen, J. (2014) "The role of miR-150 in normal and malignant hematopoiesis", *Oncogene*. Nature Publishing Group, pp. 3887–3893. doi:10.1038/onc.2013.346.
- Hidalgo, I. J., Raub, T. J. and Borchardt, R. T. (1989) "Characterization of the Human Colon Carcinoma Cell Line (Caco-2) as a Model System for Intestinal Epithelial Permeability", *Gastroenterology*, 96(2), pp. 736–749. doi:10.1016/S0016-5085(89)80072-1.
- Hilgendorf, C., Spahn-Langguth, H., Regårdh, C. G., Lipka, E., Amidon, G. L. and Langguth, P. (2000) "Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX co-cultured cell lines: Permeabilities via diffusion, inside- and outside-directed carrier-mediated transport", *Journal of Pharmaceutical Sciences*. John Wiley and Sons Inc., 89(1), pp. 63–75. doi:10.1002/(SICI)1520-6017(200001)89:1<63::AID-JPS7>3.0.CO;2-6.
- Hill, D. R. and Spence, J. R. (2017) "Gastrointestinal Organoids: Understanding the Molecular Basis of the Host–Microbe Interface", *CMGH*. Elsevier Inc, pp. 138–149. doi:10.1016/j.jcmgh.2016.11.007.
- Hoban, A. E., Stilling, R. M., M Moloney, G., Moloney, R. D., Shanahan, F., Dinan, T. G., Cryan, J. F. and Clarke, G. (2017) "Microbial regulation of microRNA expression in the amygdala and prefrontal cortex", *Microbiome*. BioMed Central, 5(1), p. 102. doi:10.1186/s40168-017-0321-3.
- Höglinger, D., Burgoyne, T., Sanchez-Heras, E., Hartwig, P., Colaco, A., Newton, J., Futter, C. E., Spiegel, S., Platt, F. M. and Eden, E. R. (2019) "NPC1 regulates ER contacts with endocytic organelles to mediate cholesterol egress", *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 10(1). doi:10.1038/s41467-019-12152-2.
- Huang, S., Chen, Y., Wu, W., Ouyang, N., Chen, J., Li, H., Liu, X., Su, F., Lin, L. and Yao, Y. (2013) "MiR-150 promotes human breast cancer growth and malignant behavior by targeting the pro-apoptotic purinergic P2X7 receptor", *PLoS ONE*. Edited by A. Navarro. Public Library of Science, 8(12), p. e80707. doi:10.1371/journal.pone.0080707.
- Huang, S., Lv, Z., Wen, Y., Wei, Y., Zhou, L., Ke, Y., Zhang, Y., Xu, Q., Li, L., Guo, Yinsheng, Li, D., Xie, C., Guo, Yi and Cheng, J. (2019) "miR-129-2-3p directly targets SYK gene and associates with the risk of ischaemic stroke in a Chinese population", *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. Blackwell Publishing Inc., 23(1), pp. 167–176. doi:10.1111/jcmm.13901.
- Huang, S., Wang, S., Bian, C., Yang, Z., Zhou, H., Zeng, Y., Li, H., Han, Q. and Zhao, R. C. (2012)

- "Upregulation of miR-22 Promotes Osteogenic Differentiation and Inhibits Adipogenic Differentiation of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells by Repressing HDAC6 Protein Expression", *Stem Cells and Development*. Mary Ann Liebert, Inc., 21(13), pp. 2531–2540. doi:10.1089/scd.2012.0014.
- Huang, T. C., Sahasrabudhe, N. A., Kim, M. S., Getnet, D., Yang, Y., Peterson, J. M., Ghosh, B., Chaerkady, R., Leach, S. D., Marchionni, L., Wong, G. W. and Pandey, A. (2012) "Regulation of lipid metabolism by dicer revealed through SILAC mice", *Journal of Proteome Research*, 11(4), pp. 2193–2205. doi:10.1021/pr2009884.
- Hubatsch, I., Ragnarsson, E. G. E. and Artursson, P. (2007) "Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers", *Nature Protocols*. Nature Publishing Group, 2(9), pp. 2111–2119. doi:10.1038/nprot.2007.303.
- Hunter, M. P., Ismail, N., Zhang, X., Aguda, B. D., Lee, E. J., Yu, L., Xiao, T., Schafer, J., Lee, M.-L. T., Schmittgen, T. D., Nana-Sinkam, S. P., Jarjoura, D. and Marsh, C. B. (2008) "Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles.", *PloS one*. Public Library of Science, 3(11), p. e3694. doi:10.1371/journal.pone.0003694.
- Huntzinger, E. and Izaurralde, E. (2011) "Gene silencing by microRNAs: Contributions of translational repression and mRNA decay", *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group, 12(2), pp. 99–110. doi:10.1038/nrg2936.
- Hussain, M. M. (2014) "Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation", *Current Opinion in Lipidology*. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 200–206. doi:10.1097/MOL.0000000000000084.
- Iftikhar, H. and Carney, G. E. (2016) "Evidence and potential in vivo functions for biofluid miRNAs: From expression profiling to functional testing", *BioEssays*. John Wiley & Sons, Ltd, 38(4), pp. 367–378. doi:10.1002/bies.201500130.
- Imam, J. S., Plyler, J. R., Bansal, H., Prajapati, S., Bansal, S., Rebeles, J., Chen, H. I. H., Chang, Y. F., Panneerdoss, S., Zoghi, B., Buddavarapu, K. C., Broaddus, R., Hornsby, P., Tomlinson, G., Dome, J., Vadlamudi, R. K., Pertsemelidis, A., Chen, Y. and Rao, M. K. (2012) "Genomic Loss of Tumor Suppressor miRNA-204 Promotes Cancer Cell Migration and Invasion by Activating AKT/mTOR/Rac1 Signaling and Actin Reorganization", *PLoS ONE*. Public Library of Science, 7(12), p. e52397. doi:10.1371/journal.pone.0052397.
- Iqbal, J., Parks, J. S. and Hussain, M. M. (2013) "Lipid absorption defects in intestine-specific microsomal triglyceride transfer protein and ATP-binding cassette transporter A1-deficient mice", *Journal of Biological Chemistry*, 288(42), pp. 30432–30444. doi:10.1074/jbc.M113.501247.
- Iwasaki, S., Kobayashi, M., Yoda, M., Sakaguchi, Y., Katsuma, S., Suzuki, T. and Tomari, Y. (2010) "Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes", *Molecular Cell*. Cell Press, 39(2), pp. 292–299. doi:10.1016/j.molcel.2010.05.015.
- James, P. T. (2004) "Obesity: The worldwide epidemic", *Clinics in Dermatology*. Elsevier, 22(4 SPEC. ISS.), pp. 276–280. doi:10.1016/j.clindermatol.2004.01.010.
- Janssen, H. L. A., Reesink, H. W., Lawitz, E. J., Zeuzem, S., Rodriguez-Torres, M., Patel, K., van der Meer, A. J., Patick, A. K., Chen, A., Zhou, Y., Persson, R., King, B. D., Kauppinen, S., Levin, A. A. and Hodges, M. R. (2013) "Treatment of HCV Infection by Targeting MicroRNA", *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, 368(18), pp. 1685–1694. doi:10.1056/NEJMoa1209026.

Jason Kirby, R., Zheng, S., Tso, P., Howles, P. N. and Hui, D. Y. (2002) "Bile salt-stimulated carboxyl ester lipase influences lipoprotein assembly and secretion in intestine: A process mediated via ceramide hydrolysis", *Journal of Biological Chemistry*, 277(6), pp. 4104–4109. doi:10.1074/jbc.M107549200.

Ji, J., Shi, J., Budhu, A., Yu, Z., Forgues, M., Roessler, S., Ambs, S., Chen, Y., Meltzer, P. S., Croce, C. M., Qin, L. X., Man, K., Lo, C. M., Lee, J., Ng, I. O. L., Fan, J., Tang, Z. Y., Sun, H. C. and Wang, X. W. (2009) "MicroRNA expression, survival, and response to interferon in liver cancer", *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, 361(15), pp. 1437–1447. doi:10.1056/NEJMoa0901282.

Joven, J., Espinel, E., Rull, A., Aragonès, G., Rodríguez-Gallego, E., Camps, J., Micol, V., Herranz-López, M., Menéndez, J. A., Borrás, I., Segura-Carretero, A., Alonso-Villaverde, C. and Beltrán-Debón, R. (2012) "Plant-derived polyphenols regulate expression of miRNA paralogs miR-103/107 and miR-122 and prevent diet-induced fatty liver disease in hyperlipidemic mice", *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. Elsevier, 1820(7), pp. 894–899. doi:10.1016/j.bbagen.2012.03.020.

Kämpfer, A. A. M., Urbán, P., Gioria, S., Kanase, N., Stone, V. and Kinsner-Ovaskainen, A. (2017) "Development of an in vitro co-culture model to mimic the human intestine in healthy and diseased state", *Toxicology in Vitro*. Elsevier Ltd, 45, pp. 31–43. doi:10.1016/j.tiv.2017.08.011.

Kanellopoulou, C., Muljo, S. A., Kung, A. L., Ganesan, S., Drapkin, R., Jenuwein, T., Livingston, D. M. and Rajewsky, K. (2005) "Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing", *Genes and Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 19(4), pp. 489–501. doi:10.1101/gad.1248505.

Karagkouni, D., Paraskevopoulou, M. D., Chatzopoulos, S., Vlachos, I. S., Tastsoglou, S., Kanellos, I., Papadimitriou, D., Kavakiotis, I., Maniou, S., Skoufos, G., Vergoulis, T., Dalamagas, T. and Hatzigeorgiou, A. G. (2018) "DIANA-TarBase v8: A decade-long collection of experimentally supported miRNA-gene interactions", *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 46(D1), pp. D239–D245. doi:10.1093/nar/gkx1141.

Kasendra, M., Tovaglieri, A., Sontheimer-Phelps, A., Jalili-Firoozinezhad, S., Bein, A., Chalkiadaki, A., Scholl, W., Zhang, C., Rickner, H., Richmond, C. A., Li, H., Breault, D. T. and Ingber, D. E. (2018) "Development of a primary human Small Intestine-on-a-Chip using biopsy-derived organoids", *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 8(1). doi:10.1038/s41598-018-21201-7.

Kawamata, T. and Tomari, Y. (2010) "Making RISC", *Trends in Biochemical Sciences*. Elsevier Current Trends, pp. 368–376. doi:10.1016/j.tibs.2010.03.009.

Ke, S. B., Qiu, H., Chen, J. M., Shi, W. and Chen, Y. S. (2018) "MicroRNA-202-5p functions as a tumor suppressor in colorectal carcinoma by directly targeting SMARCC1", *Gene*. Elsevier B.V., 676, pp. 329–335. doi:10.1016/j.gene.2018.08.064.

Kim, A. M., Tingen, C. M. and Woodruff, T. K. (2010) "Sex bias in trials and treatment must end", *Nature*. Nature Publishing Group, pp. 688–689. doi:10.1038/465688a.

Kim, C., Kim, H. K., Rettig, R. L., Kim, J., Lee, E. T., Aprelikova, O., Choi, I. J., Munroe, D. J. and Green, J. E. (2011) "MiRNA signature associated with outcome of gastric cancer patients following chemotherapy", *BMC Medical Genomics*. BioMed Central, 4, p. 79. doi:10.1186/1755-8794-4-79.

Kim, H. and Giovannucci, E. L. (2017) "Sex differences in the association of obesity and colorectal cancer risk", *Cancer Causes and Control*, 28(1), pp. 1–4. doi:10.1007/s10552-016-0831-5.

- Kim, H. J., Huh, D., Hamilton, G. and Ingber, D. E. (2012) "Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow", *Lab on a Chip*. Royal Society of Chemistry, 12(12), pp. 2165–2174. doi:10.1039/c2lc40074j.
- Kim, H. J., Li, H., Collins, J. J. and Ingber, D. E. (2016) "Contributions of microbiome and mechanical deformation to intestinal bacterial overgrowth and inflammation in a human gut-on-a-chip", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 113(1), pp. E7–E15. doi:10.1073/pnas.1522193112.
- Kim, J. T., Li, C., Weiss, H. L., Zhou, Y., Liu, C., Wang, Q. and Evers, B. M. (2019) "Regulation of Ketogenic Enzyme HMGCS2 by Wnt/ β -catenin/PPAR γ Pathway in Intestinal Cells", *Cells*. MDPI AG, 8(9), p. 1106. doi:10.3390/cells8091106.
- Kim, S. E., Paik, H. Y., Yoon, H., Lee, J. E., Kim, N. and Sung, M. K. (2015) "Sex- and gender-specific disparities in colorectal cancer risk", *World Journal of Gastroenterology*, 21(17), pp. 5167–5175. doi:10.3748/wjg.v21.i17.5167.
- Knight, S. W. and Bass, B. L. (2001) "A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*", *Science*. NIH Public Access, 293(5538), pp. 2269–2271. doi:10.1126/science.1062039.
- Kobayashi, H. and Tomari, Y. (2016) "RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins", *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. Elsevier, pp. 71–81. doi:10.1016/j.bbagr.2015.08.007.
- Kobayashi, N., Uemura, H., Nagahama, K., Okudela, K., Furuya, M., Ino, Y., Ito, Y., Hirano, H., Inayama, Y., Aoki, I., Nagashima, Y., Kubota, Y. and Ishiguro, H. (2012) "Identification of miR-30d as a novel prognostic marker of prostate cancer", *Oncotarget*. Impact Journals LLC, 3(11), pp. 1455–1471. doi:10.18632/oncotarget.696.
- Koch, S. (2017) "Extrinsic control of Wnt signaling in the intestine", *Differentiation*. Elsevier Ltd, pp. 1–8. doi:10.1016/j.diff.2017.08.003.
- Köressaar, T., Lepamets, M., Kaplinski, L., Raime, K., Andreson, R. and Remm, M. (2018) "Primer3_masker: integrating masking of template sequence with primer design software", *Bioinformatics*. Edited by J. Hancock, 34(11), pp. 1937–1938. doi:10.1093/bioinformatics/bty036.
- Koressaar, T. and Remm, M. (2007) "Enhancements and modifications of primer design program Primer3", *Bioinformatics*, 23(10), pp. 1289–1291. doi:10.1093/bioinformatics/btm091.
- Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Matsuki, Y. and Ochiya, T. (2010) "Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells", *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 285(23), pp. 17442–17452. doi:10.1074/jbc.M110.107821.
- Kosaka, N., Izumi, H., Sekine, K. and Ochiya, T. (2010) "MicroRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk", *Silence*. BioMed Central, 1(1), p. 7. doi:10.1186/1758-907X-1-7.
- Kraiczy, J., Nayak, K. M., Howell, K. J., Ross, A., Forbester, J., Salvestrini, C., Mustata, R., Perkins, S., Andersson-Rolf, A., Leenen, E., Liebert, A., Vallier, L., Rosenstiel, P. C., Stegle, O., Dougan, G., Heuschkel, R., Koo, B. K. and Zilbauer, M. (2019) "DNA methylation defines regional identity of human intestinal epithelial organoids and undergoes dynamic changes during development", *Gut*. BMJ Publishing Group, 68(1), pp. 49–61. doi:10.1136/gutjnl-2017-314817.
- Krek, A., Grün, D., Poy, M. N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E. J., MacMenamin, P., Da Piedade, I., Gunsalus, K. C., Stoffel, M. and Rajewsky, N. (2005) "Combinatorial microRNA target

predictions", *Nature Genetics*. Nature Publishing Group, 37(5), pp. 495–500. doi:10.1038/ng1536.

Kuhnert, F., Davis, C. R., Wang, H. T., Chu, P., Lee, M., Yuan, J., Nusse, R. and Kuo, C. J. (2004) "Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(1), pp. 266–271. doi:10.1073/pnas.2536800100.

Kuipers, H., Schnorfeil, F. M., Fehling, H.-J., Bartels, H. and Brocker, T. (2010) "Dicer-Dependent MicroRNAs Control Maturation, Function, and Maintenance of Langerhans Cells In Vivo", *The Journal of Immunology*, 185(1), pp. 400–409. doi:10.4049/jimmunol.0903912.

Kurtz, C. L., Fannin, E. E., Toth, C. L., Pearson, D. S., Vickers, K. C. and Sethupathy, P. (2015) "Inhibition of miR-29 has a significant lipid-lowering benefit through suppression of lipogenic programs in liver", *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 5, p. 12911. doi:10.1038/srep12911.

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001) "Identification of novel genes coding for small expressed RNAs", *Science*, 294(5543), pp. 853–858. doi:10.1126/science.1064921.

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2002) "Identification of Tissue-Specific MicroRNAs from Mouse", *Current Biology*. Cell Press, 12(9), pp. 735–739. doi:10.1016/S0960-9822(02)00809-6.

Lam, M. T. Y., Li, W., Rosenfeld, M. G. and Glass, C. K. (2014) "Enhancer RNAs and regulated transcriptional programs", *Trends in Biochemical Sciences*. Elsevier Ltd, pp. 170–182. doi:10.1016/j.tibs.2014.02.007.

Lam, Y. Y., Ha, C. W. Y., Campbell, C. R., Mitchell, A. J., Dinudom, A., Oscarsson, J., Cook, D. I., Hunt, N. H., Caterson, I. D., Holmes, A. J. and Storlien, L. H. (2012) "Increased gut permeability and microbiota change associate with mesenteric fat inflammation and metabolic dysfunction in diet-induced obese mice", *PLoS ONE*. Public Library of Science, 7(3), p. e34233. doi:10.1371/journal.pone.0034233.

Lam, Y. Y., Ha, C. W. Y., Hoffmann, J. M. A., Oscarsson, J., Dinudom, A., Mather, T. J., Cook, D. I., Hunt, N. H., Caterson, I. D., Holmes, A. J. and Storlien, L. H. (2015) "Effects of dietary fat profile on gut permeability and microbiota and their relationships with metabolic changes in mice", *Obesity*. John Wiley & Sons, Ltd, 23(7), pp. 1429–1439. doi:10.1002/oby.21122.

Lander, E. S. (2011) "Initial impact of the sequencing of the human genome", *Nature*, pp. 187–197. doi:10.1038/nature09792.

Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., Aravin, A., Pfeffer, S., Rice, A., Kamphorst, A. O., Landthaler, M., Lin, C., Socci, N. D., Hermida, L., Fulci, V., Chiaretti, S., Foà, R., Schliwka, J., Fuchs, U., Novosel, A., Müller, R. U., Schermer, B., Bissels, U., Inman, J., Phan, Q., Chien, M., Weir, D. B., Choksi, R., De Vita, G., Frezzetti, D., Trompeter, H. I., Hornung, V., Teng, G., Hartmann, G., Palkovits, M., Di Lauro, R., Wernet, P., Macino, G., Rogler, C. E., Nagle, J. W., Ju, J., Papavasiliou, F. N., Benzing, T., Lichter, P., Tam, W., Brownstein, M. J., Bosio, A., Borkhardt, A., Russo, J. J., Sander, C., Zavolan, M. and Tuschl, T. (2007) "A Mammalian microRNA Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing", *Cell*. NIH Public Access, 129(7), pp. 1401–1414. doi:10.1016/j.cell.2007.04.040.

Landsberger, M., Zhou, J., Wilk, S., Thaumüller, C., Pavlovic, D., Otto, M., Whynot, S., Hung, O., Murphy, M. F., Cerny, V., Felix, S. B. and Lehmann, C. (2010) "Inhibition of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 reduces leukocyte adhesion within the intestinal

microcirculation in experimental endotoxemia in rats", *Critical Care*. BioMed Central, 14(6), p. R223. doi:10.1186/cc9367.

Lau, N. C., Lim, L. P., Weinstein, E. G. and Bartel, D. P. (2001) "An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*", *Science*, 294(5543), pp. 858–862. doi:10.1126/science.1065062.

Lee, C. G., McCarthy, S., Gruidl, M., Timme, C. and Yeatman, T. J. (2014) "MicroRNA-147 induces a mesenchymal-to-epithelial transition (MET) and reverses EGFR inhibitor resistance", *PLoS ONE*. Public Library of Science, 9(1). doi:10.1371/journal.pone.0084597.

Lee, J., Padhye, A., Sharma, A., Song, G., Miao, J., Mo, Y. Y., Wang, L. and Kemper, J. K. (2010) "A pathway involving farnesoid X receptor and small heterodimer partner positively regulates hepatic sirtuin 1 levels via MicroRNA-34a inhibition", *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 285(17), pp. 12604–12611. doi:10.1074/jbc.M109.094524.

Lee, R. C. and Ambros, V. (2001) "An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*", *Science*, 294(5543), pp. 862–864. doi:10.1126/science.1065329.

Lee, S. J., Jiko, C., Yamashita, E. and Tsukihara, T. (2011) "Selective nuclear export mechanism of small RNAs", *Current Opinion in Structural Biology*. Elsevier Current Trends, 21(1), pp. 101–108. doi:10.1016/J.SBI.2010.11.004.

Lee, S. M., Kim, N., Yoon, H., Nam, R. H. and Lee, D. H. (2018) "Microbial changes and host response in F344 rat colon depending on sex and age following a high-fat diet", *Frontiers in Microbiology*, 9(SEP), p. 2236. doi:10.3389/fmicb.2018.02236.

Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S. and Kim, V. N. (2003) "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing", *Nature*. Nature Publishing Group, 425(6956), pp. 415–419. doi:10.1038/nature01957.

Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S. H. and Kim, V. N. (2004) "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II.", *The EMBO journal*. European Molecular Biology Organization, 23(20), pp. 4051–60. doi:10.1038/sj.emboj.7600385.

Lee, Y. S., Nakahara, K., Pham, J. W., Kim, K., He, Z., Sontheimer, E. J. and Carthew, R. W. (2004) "Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways.", *Cell*, 117(1), pp. 69–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15066283> (Accessed: May 17, 2019).

Lehmann, U., Hasemeier, B., Christgen, M., Müller, M., Römermann, D., Länger, F. and Kreipe, H. (2008) "Epigenetic inactivation of microRNA gene hsa-mir-9-1 in human breast cancer", *Journal of Pathology*. John Wiley & Sons, Ltd, 214(1), pp. 17–24. doi:10.1002/path.2251.

Leung, A. K. L., Calabrese, J. M. and Sharp, P. A. (2006) "Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 103(48), pp. 18125–30. doi:10.1073/pnas.0608845103.

Leung, A. K. L. and Sharp, P. A. (2010) "MicroRNA Functions in Stress Responses", *Molecular Cell*. Cell Press, pp. 205–215. doi:10.1016/j.molcel.2010.09.027.

Di Leva, G. and Croce, C. M. (2013) "MiRNA profiling of cancer", *Current Opinion in Genetics and Development*. NIH Public Access, pp. 3–11. doi:10.1016/j.gde.2013.01.004.

Levy, E., Mehran, M. and Seidman, E. (1995) "Caco-2 cells as a model for intestinal lipoprotein

synthesis and secretion", *FASEB Journal*, pp. 626–635. doi:10.1096/fasebj.9.8.7768354.

Lewis, B. P., Burge, C. B. and Bartel, D. P. (2005) "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets.", *Cell*. Cell Press, 120(1), pp. 15–20. doi:10.1016/j.cell.2004.12.035.

Lewis, B. P., Shih, I.-H., Jones-Rhoades, M. W. and Bartel, D. P. (2003) "Prediction of Mammalian MicroRNA Targets that they could have many more regulatory functions than those uncovered to date (Lagos-Quintana et al", *Cell*, 115, pp. 787–798. Available at: <http://genomebiology>. (Accessed: May 12, 2019).

Ley, R. E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D. and Gordon, J. I. (2005) "Obesity alters gut microbial ecology.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 102(31), pp. 11070–5. doi:10.1073/pnas.0504978102.

Li, C., Ma, D., Yang, J., Lin, X. and Chen, B. (2018) "miR-202-5p inhibits the migration and invasion of osteosarcoma cells by targeting ROCK1", *Oncology Letters*. Spandidos Publications, 16(1), pp. 829–834. doi:10.3892/ol.2018.8694.

Li, G., Anderson, R. E., Tomita, H., Adler, R., Liu, X., Zack, D. J. and Rajala, R. V. S. (2007) "Nonredundant Role of Akt2 for Neuroprotection of Rod Photoreceptor Cells from Light-Induced Cell Death", *Journal of Neuroscience*. Society for Neuroscience, 27(1), pp. 203–211. doi:10.1523/JNEUROSCI.0445-06.2007.

Li, J., Wan, Y., Guo, Q., Zou, L., Zhang, Jinyu, Fang, Y., Zhang, Jingbo, Zhang, Jinjun, Fu, X., Liu, H., Lu, L. and Wu, Y. (2010) "Altered microRNA expression profile with miR-146a upregulation in CD4+T cells from patients with rheumatoid arthritis", *Arthritis Research and Therapy*. BioMed Central, 12(3), p. R81. doi:10.1186/ar3006.

Li, L., He, M., Zhou, L., Miao, X., Wu, F., Huang, S., Dai, X., Wang, T. and Wu, T. (2015) "A solute carrier family 22 member 3 variant rs3088442 g→a associated with coronary heart disease inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response", *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., 290(9), pp. 5328–5340. doi:10.1074/jbc.M114.584953.

Li, P., Zhang, X., Wang, L., Du, L., Yang, Y., Liu, T., Li, C. and Wang, C. (2017) "lncRNA HOTAIR Contributes to 5FU Resistance through Suppressing miR-218 and Activating NF-κB/TS Signaling in Colorectal Cancer", *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. Elsevier Inc, 8, pp. 356–369. doi:10.1016/j.omtn.2017.07.007.

Li, X., He, J., Shao, M., Cui, B., Peng, F., Li, J., Ran, Y., Jin, D., Kong, J., Chang, J., Duan, L., Yang, X., Luo, Y., Lu, Y., Lin, B. and Liu, T. (2018) "Downregulation of miR-218-5p promotes invasion of oral squamous cell carcinoma cells via activation of CD44-ROCK signaling", *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson SAS, 106, pp. 646–654. doi:10.1016/j.biopha.2018.06.151.

Li, X., Kong, D., Chen, H., Liu, S., Hu, H., Wu, T., Wang, J., Chen, W., Ning, Y., Li, Y. and Lu, Z. (2016) "MiR-155 acts as an anti-inflammatory factor in atherosclerosis-Associated foam cell formation by repressing calcium-regulated heat stable protein 1", *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(1), p. 21789. doi:10.1038/srep21789.

Li, Y., Chen, G., Wang, Jun Yao, Zou, T., Liu, L., Xiao, L. and Wang, Jian Ying (2016) "Post-transcriptional regulation of Wnt co-receptor LRP6 and RNA-binding protein HuR by miR-29b in intestinal epithelial cells", *Biochemical Journal*. Portland Press Ltd, 473(11), pp. 1641–1649. doi:10.1042/BCJ20160057.

- Li, Y., Tan, W., Neo, T. W. L., Aung, M. O., Wasser, S., Lim, S. G. and Tan, T. M. C. (2009) "Role of the *miR-106b-25* microRNA cluster in hepatocellular carcinoma", *Cancer Science*, 100(7), pp. 1234–1242. doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01164.x.
- Li, Z., Qian, R., Zhang, J. and Shi, X. (2019) "MiR-218-5p targets LHFPL3 to regulate proliferation, migration, and epithelial–mesenchymal transitions of human glioma cells", *Bioscience Reports*. Portland Press Ltd, 39(3). doi:10.1042/BSR20180879.
- Liao, Y., Du, X., Li, J. and Lönnnerdal, B. (2017) "Human milk exosomes and their microRNAs survive digestion in vitro and are taken up by human intestinal cells", *Molecular Nutrition and Food Research*. John Wiley & Sons, Ltd, 61(11), p. 1700082. doi:10.1002/mnfr.201700082.
- Lim, L. P., Lau, N. C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J. M., Castle, J., Bartel, D. P., Linsley, P. S. and Johnson, J. M. (2005) "Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs", *Nature*. Nature Publishing Group, 433(7027), pp. 769–773. doi:10.1038/nature03315.
- Lin, C.-C., Liu, L.-Z., Addison, J. B., Wonderlin, W. F., Ivanov, A. V and Ruppert, J. M. (2011) "A KLF4-miRNA-206 Autoregulatory Feedback Loop Can Promote or Inhibit Protein Translation Depending upon Cell Context", *Molecular and Cellular Biology*. American Society for Microbiology (ASM), 31(12), pp. 2513–2527. doi:10.1128/MCB.01189-10.
- Lin, Q., Gao, Z., Alarcon, R. M., Ye, J. and Yun, Z. (2009) "A role of miR-27 in the regulation of adipogenesis", *FEBS Journal*. NIH Public Access, 276(8), pp. 2348–2358. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.06967.x.
- Link, J. C., Hasin-Brumshtein, Y., Cantor, R. M., Chen, X., Arnold, A. P., Lusi, A. J. and Reue, K. (2017) "Diet, gonadal sex, and sex chromosome complement influence white adipose tissue miRNA expression", *BMC Genomics*. BioMed Central Ltd., 18(1), p. 89. doi:10.1186/s12864-017-3484-1.
- Link, J. C. and Reue, K. (2017) "Genetic Basis for Sex Differences in Obesity and Lipid Metabolism", *Annual Review of Nutrition*. Annual Reviews, 37(1), pp. 225–245. doi:10.1146/annurev-nutr-071816-064827.
- Liu, F. and Di Wang, X. (2019) "miR-150-5p represses TP53 tumor suppressor gene to promote proliferation of colon adenocarcinoma", *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 9(1). doi:10.1038/s41598-019-43231-5.
- Liu, G., Friggeri, A., Yang, Y., Park, Y. J., Tsuruta, Y. and Abraham, E. (2009) "miR-147, a microRNA that is induced upon toll-like receptor stimulation, regulates murine macrophage inflammatory responses", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 106(37), pp. 15819–15824. doi:10.1073/pnas.0901216106.
- Liu, J., Carmell, M. A., Rivas, F. V., Marsden, C. G., Thomson, J. M., Song, J. J., Hammond, S. M., Joshua-Tor, L. and Hannon, G. J. (2004) "Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi", *Science*. American Association for the Advancement of Science, 305(5689), pp. 1437–1441. doi:10.1126/science.1102513.
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M. A., Hannon, G. J. and Parker, R. (2005) "MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies.", *Nature cell biology*. NIH Public Access, 7(7), pp. 719–23. doi:10.1038/ncb1274.
- Liu, S., Da Cunha, A. P., Rezende, R. M., Cialic, R., Wei, Z., Bry, L., Comstock, L. E., Gandhi, R. and Weiner, H. L. (2016) "The Host Shapes the Gut Microbiota via Fecal MicroRNA", *Cell Host and Microbe*. NIH Public Access, 19(1), pp. 32–43. doi:10.1016/j.chom.2015.12.005.

- Liu, S., Tetzlaff, M. T., Liu, A., Liegl-Atzwanger, B., Guo, J. and Xu, X. (2012) "Loss of microRNA-205 expression is associated with melanoma progression", *Laboratory Investigation*, 92(7), pp. 1084–1096. doi:10.1038/labinvest.2012.62.
- Liu, T., Guo, J. and Zhang, X. (2019) "MiR-202-5p/PTEN mediates doxorubicin-resistance of breast cancer cells via PI3K/Akt signaling pathway", *Cancer Biology and Therapy*. Taylor and Francis Inc., 20(7), pp. 989–998. doi:10.1080/15384047.2019.1591674.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method", *Methods*, 25(4), pp. 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262.
- Ludwig, N., Leidinger, P., Becker, K., Backes, C., Fehlmann, T., Pallasch, C., Rheinheimer, S., Meder, B., Stähler, C., Meese, E. and Keller, A. (2016) "Distribution of miRNA expression across human tissues.", *Nucleic acids research*. Oxford University Press, 44(8), pp. 3865–77. doi:10.1093/nar/gkw116.
- Luo, S., Chen, Y., He, R., Shi, Y. and Su, L. (2018) "Rescuing infusion of miRNA-1 prevents cardiac remodeling in a heart-selective miRNA deficient mouse", *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Academic Press, 495(1), pp. 607–613. doi:10.1016/j.bbrc.2017.11.029.
- Lytle, J. R., Yario, T. A. and Steitz, J. A. (2007) *Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. doi:10.1073/pnas.0703820104.
- Ma, X., Ma, C. and Zheng, X. (2013) "MicroRNA-155 in the pathogenesis of atherosclerosis: A conflicting role?", *Heart Lung and Circulation*. Elsevier, pp. 811–818. doi:10.1016/j.hlc.2013.05.651.
- Macias, S., Michlewski, G. and Cáceres, J. F. (2009) "Hormonal Regulation of MicroRNA Biogenesis", *Molecular Cell*. Cell Press, pp. 172–173. doi:10.1016/j.molcel.2009.10.006.
- Madison, B. B., Dunbar, L., Qiao, X. T., Braunstein, K., Braunstein, E. and Gumucio, D. L. (2002) "cis elements of the villin gene control expression in restricted domains of the vertical (crypt) and horizontal (duodenum, cecum) axes of the intestine", *Journal of Biological Chemistry*, 277(36), pp. 33275–33283. doi:10.1074/jbc.M204935200.
- Makarova, J. A., Shkurnikov, M. U., Wicklein, D., Lange, T., Samatov, T. R., Turchinovich, A. A. and Tonevitsky, A. G. (2016) *Intracellular and extracellular microRNA: An update on localization and biological role*, *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*. Urban & Fischer. doi:10.1016/j.proghi.2016.06.001.
- Mangat, R., Warnakula, S., Wang, Y., Russell, J. C., Uwiera, R., Vine, D. F. and Proctor, S. D. (2010) "Model of intestinal chylomicron over-production and Ezetimibe treatment: Impact on the retention of cholesterol in arterial vessels", *Atherosclerosis Supplements*, pp. 17–24. doi:10.1016/j.atherosclerosissup.2010.04.043.
- Mantilla-Escalante, D. C., López de Las Hazas, M. C., Gil-Zamorano, J., Del Pozo-Acebo, L., Crespo, M. C., Martín-Hernández, R., Del Saz, A., Tomé-Carneiro, J., Cardona, F., Cornejo-Pareja, I., García-Ruiz, A., Briand, O., Lasunción, M. A., Visioli, F. and Dávalos, A. (2019) "Postprandial Circulating miRNAs in Response to a Dietary Fat Challenge", *Nutrients*. NLM (Medline), 11(6). doi:10.3390/nu11061326.
- Marco, A., Ninova, M., Ronshaugen, M. and Griffiths-Jones, S. (2013) "Clusters of microRNAs emerge by new hairpins in existing transcripts", *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 41(16), pp. 7745–7752. doi:10.1093/nar/gkt534.

- Marson, A., Levine, S. S., Cole, M. F., Frampton, G. M., Brambrink, T., Johnstone, S., Guenther, M. G., Johnston, W. K., Wernig, M., Newman, J., Calabrese, J. M., Dennis, L. M., Volkert, T. L., Gupta, S., Love, J., Hannett, N., Sharp, P. A., Bartel, D. P., Jaenisch, R. and Young, R. A. (2008) "Connecting microRNA Genes to the Core Transcriptional Regulatory Circuitry of Embryonic Stem Cells", *Cell*. NIH Public Access, 134(3), pp. 521–533. doi:10.1016/j.cell.2008.07.020.
- Matera, A. G., Terns, R. M. and Terns, M. P. (2007) "Non-coding RNAs: Lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, pp. 209–220. doi:10.1038/nrm2124.
- Matsuda, A., Yan, I. K., Foye, C., Parasramka, M. and Patel, T. (2016) "MicroRNAs as paracrine signaling mediators in cancers and metabolic diseases", *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*. NIH Public Access, pp. 577–590. doi:10.1016/j.beem.2016.07.005.
- McKenna, L. B., Schug, J., Vourekas, A., McKenna, J. B., Bramswig, N. C., Friedman, J. R. and Kaestner, K. H. (2010) "MicroRNAs control intestinal epithelial differentiation, architecture, and barrier function", *Gastroenterology*. NIH Public Access, 139(5), pp. 1654–64, 1664.e1. doi:10.1053/j.gastro.2010.07.040.
- Medrikova, D., Jilkova, Z. M., Bardova, K., Janovska, P., Rossmeisl, M. and Kopecky, J. (2012) "Sex differences during the course of diet-induced obesity in mice: Adipose tissue expandability and glycemic control", *International Journal of Obesity*, 36(2), pp. 262–272. doi:10.1038/ijo.2011.87.
- Meijer, H. A., Kong, Y. W., Lu, W. T., Wilczynska, A., Spriggs, R. V., Robinson, S. W., Godfrey, J. D., Willis, A. E. and Bushell, M. (2013) "Translational repression and eIF4A2 activity are critical for microRNA-mediated gene regulation", *Science*, 340(6128), pp. 82–85. doi:10.1126/science.1231197.
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G. and Tuschl, T. (2004) "Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs", *Molecular Cell*. Cell Press, 15(2), pp. 185–197. doi:10.1016/j.molcel.2004.07.007.
- Menbari, M. N., Rahimi, K., Ahmadi, A., Elyasi, A., Darvishi, N., Hosseini, V., Mohammadi-Yeganeh, S. and Abdi, M. (2019) "MiR-216b-5p inhibits cell proliferation in human breast cancer by down-regulating HDAC8 expression", *Life Sciences*. Elsevier Inc., 237, p. 116945. doi:10.1016/j.lfs.2019.116945.
- Meunier, V., Bourrié, M., Berger, Y. and Fabre, G. (1995) "The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications.", *Cell biology and toxicology*, 11(3–4), pp. 187–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8564649> (Accessed: October 22, 2019).
- Mi, H., Muruganujan, A., Ebert, D., Huang, X. and Thomas, P. D. (2019) "PANTHER version 14: More genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools", *Nucleic Acids Research*, 47(D1), pp. D419–D426. doi:10.1093/nar/gky1038.
- Miao, L., Yao, H., Li, C., Pu, M., Yao, X., Yang, H., Qi, X., Ren, J. and Wang, Y. (2016) "A dual inhibition: MicroRNA-552 suppresses both transcription and translation of cytochrome P450 2E1", *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. Elsevier, 1859(4), pp. 650–662. doi:10.1016/j.bbagrm.2016.02.016.
- Michell, D. L. and Vickers, K. C. (2016) "Lipoprotein carriers of microRNAs", *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. NIH Public Access, 1861(12), pp. 2069–2074. doi:10.1016/j.bbalip.2016.01.011.

Middendorp, S., Schneeberger, K., Wiegerinck, C. L., Mokry, M., Akkerman, R. D. L., Van Wijngaarden, S., Clevers, H. and Nieuwenhuis, E. E. S. (2014) "Adult stem cells in the small intestine are intrinsically programmed with their location-specific function", *Stem Cells*. Wiley-Blackwell, 32(5), pp. 1083–1091. doi:10.1002/stem.1655.

Miranda, K. C., Huynh, T., Tay, Y., Ang, Y. S., Tam, W. L., Thomson, A. M., Lim, B. and Rigoutsos, I. (2006) "A Pattern-Based Method for the Identification of MicroRNA Binding Sites and Their Corresponding Heteroduplexes", *Cell*. Cell Press, 126(6), pp. 1203–1217. doi:10.1016/j.cell.2006.07.031.

Mittal, A., Chitkara, D., Behrman, S. W. and Mahato, R. I. (2014) "Efficacy of gemcitabine conjugated and miRNA-205 complexed micelles for treatment of advanced pancreatic cancer", *Biomaterials*. Elsevier, 35(25), pp. 7077–7087. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.04.053.

Mohan, M., Chow, C. E. T., Ryan, C. N., Chan, L. S., Dufour, J., Aye, P. P., Blanchard, J., Moehs, C. P. and Sestak, K. (2016) "Dietary gluten-induced gut dysbiosis is accompanied by selective upregulation of microRNAs with intestinal tight junction and bacteria-binding motifs in rhesus macaque model of celiac disease", *Nutrients*, 8(11), p. 684. doi:10.3390/nu8110684.

Mortensen, R. D., Serra, M., Steitz, J. A. and Vasudevan, S. (2011) "Posttranscriptional activation of gene expression in *Xenopus laevis* oocytes by microRNA-protein complexes (microRNPs)", *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 108(20), pp. 8281–8286. doi:10.1073/pnas.1105401108.

Muhammad, S., Tang, Q., Wei, L., Zhang, Q., Wang, G., Muhammad, B., Kaur, K., Kamchedalova, T., Gang, Z., Jiang, Z., Liu, Z. and Wang, X. (2018) "miRNA-30d serves a critical function in colorectal cancer initiation, progression and invasion via directly targeting the GNA13 gene", *Experimental and Therapeutic Medicine*. Spandidos Publications, 17(1), pp. 260–272. doi:10.3892/etm.2018.6902.

Mukhopadhyay, P., Mukherjee, S., Ahsan, K., Bagchi, A., Pacher, P. and Das, D. K. (2010) "Restoration of altered MicroRNA expression in the ischemic heart with resveratrol", *PLoS ONE*. Public Library of Science, 5(12), p. e15705. doi:10.1371/journal.pone.0015705.

Mullany, L. E., Wolff, R. K., Herrick, J. S., Buas, M. F. and Slattery, M. L. (2015) "SNP regulation of microRNA expression and subsequent colon cancer risk", *PLoS ONE*. Public Library of Science, 10(12), p. e0143894. doi:10.1371/journal.pone.0143894.

Murphy, D., Dancis, B. and Brown, J. R. (2008) "The evolution of core proteins involved in microRNA biogenesis", *BMC Evolutionary Biology*. BioMed Central, 8(1), p. 92. doi:10.1186/1471-2148-8-92.

Myers, R. M., Stamatoyannopoulos, J., Snyder, M., Dunham, I., Hardison, R. C., Bernstein, B. E., Gingeras, T. R., Kent, W. J., Birney, E., Wold, B., Crawford, G. E., Epstein, C. B., Shores, N., Ernst, J., Mikkelsen, T. S., Kheradpour, P., Zhang, X., Wang, L., Issner, R., Coyne, M. J., Durham, T., Ku, M., Truong, T., Ward, L. D., Altshuler, R. C., Lin, M. F., Kellis, M., Davis, C. A., Kapranov, P., Dobin, A., Zaleski, C., Schlesinger, F., Batut, P., Chakraborty, S., Jha, S., Lin, W., Drenkow, J., Wang, Hua, Bell, K., Bell, I., Gao, H., Dumais, E., Dumais, J., Antonarakis, S. E., Ucla, C., Borel, C., Guigo, R., Djebali, S., Lagarde, J., Kingswood, C., Ribeca, P., Sammeth, M., Alioto, T., Merkel, A., Tilgner, H., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Lassmann, T., Takahashi, H., Abdelhamid, R. F., Hannon, G., Fejes, K. T., Preall, J., Gordon, A., Sotirova, V., Reymond, A., Howald, C., Graison, E. A. Y., Chrast, J., Ruan, Y., Ruan, X., Shahab, A., Poh, W. T., Wei, C. L., Furey, T. S., Boyle, A. P., Sheffield, N. C., Song, L., Shibata, Y., Vales, T., Winter, D., Zhang, Z., London, D., Wang, Tianyuan, Keefe, D., Iyer, V. R., Lee, B. K., McDaniell, R. M., Liu, Z., Battenhouse, A., Bhinge, A. A., Lieb, J. D., Grasse, L. L., Showers, K. A., Giresi, P. G., Kim, S. K. C., Shestak, C., Pauli, F., Reddy, T. E., Gertz,

J., Partridge, E. C., Jain, P., Sprouse, R. O., Bansal, A., Pusey, B., Muratet, M. A., Varley, K. E., Bowling, K. M., Newberry, K. M., Nesmith, A. S., Dilocker, J. A., Parker, S. L., Waite, L. L., Thibeault, K., Roberts, K., Absher, D. M., Mortazavi, A., Williams, B., Marinov, G., Trout, D., King, B., McCue, K., Kirilusha, A., DeSalvo, G., Fisher, K. A., Amrhein, H., Pepke, S., Vielmetter, J., Sherlock, G., Sidow, A., Batzoglou, S., Rauch, R., Kundaje, A., Libbrecht, M., Margulies, E. H., Parker, S. C. J., Elnitski, L., Green, E. D., Hubbard, T., Harrow, J., Searle, S., Parker, S. C. J., Aken, B., Frankish, A., Hunt, T., Despacio-Reyes, G., Kay, M., Mukherjee, G., Bignell, A., Saunders, G., Boychenko, V., Brent, M., van Baren, M. J., Brown, R. H., Gerstein, M., Khurana, E., Balasubramanian, S., Lam, H., Cayting, P., Robilotto, R., Lu, Z., Derrien, T., Tanzer, A., Knowles, D. G., Mariotti, M., Haussler, D., Harte, R., Diekhans, M., Lin, M., Valencia, A., Tress, M., Rodriguez, J. M., Raha, D., Shi, M., Euskirchen, G., Grubert, F., Kasowski, M., Lian, J., Lacroute, P., Xu, Y., Monahan, H., Patacsil, D., Slifer, T., Yang, X., Charos, A., Reed, B., Wu, L., Auerbach, R. K., Habegger, L., Hariharan, M., Rozowsky, J., Abyzov, A., Weissman, S. M., Struhl, K., Lamarre-Vincent, N., Lindahl-Allen, M., Miotto, B., Moqtaderi, Z., Fleming, J. D., Newburger, P., Farnham, P. J., Fietze, S., O'Geen, H., Xu, X., Blahnik, K. R., Cao, A. R., Iyengar, S., Kaul, R., Thurman, R. E., Wang, Hao, Navas, P. A., Sandstrom, R., Sabo, P. J., Weaver, M., Canfield, T., Lee, K., Neph, S., Roach, V., Reynolds, A., Johnson, A., Rynes, E., Giste, E., Vong, S., Neri, J., Frum, T., Nguyen, E. D., Ebersol, A. K., Sanchez, M. E., Sheffer, H. H., Lotakis, D., Haugen, E., Humbert, R., Kutayin, T., Shafer, T., Noble, W. S., Dekker, J., Lajoie, B. R., Sanyal, A., Rosenbloom, K. R., Dreszer, T. R., Raney, B. J., Barber, G. P., Meyer, L. R., Sloan, C. A., Malladi, V. S., Cline, M. S., Learned, K., Swing, V. K., Zweig, A. S., Rhead, B., Fujita, P. A., Roskin, K., Karolchik, D., Kuhn, R. M., Wilder, S. P., Sobral, D., Herrero, J., Beal, K., Lukk, M., Brazma, A., Vaquerizas, J. M., Luscombe, N. M., Bickel, P. J., Boley, N., Brown, J. B., Li, Q., Huang, H., Sboner, A., Yip, K. Y., Cheng, C., Yan, K. K., Bhardwaj, N., Wang, Jing, Lochovsky, L., Jee, J., Gibson, T., Leng, J., Du, J., Harris, R. S., Song, G., Miller, W., Suh, B., Paten, B., Hoffman, M. M., Buske, O. J., Weng, Z., Dong, X., Wang, Jie, Xi, H., Tenenbaum, S. A., Doyle, F., Chittur, S., Penalva, L. O., Tullius, T. D., White, K. P., Karmakar, S., Victorsen, A., Jameel, N., Bild, N., Grossman, R. L., Collins, P. J., Trinklein, N. D., Giddings, M. C., Khatun, J., Maier, C., Wang, Ting, Whitfield, T. W., Chen, X., Yu, Y., Gunawardena, H., Feingold, E. A., Lowdon, R. F., Dillon, L. A. L., Good, P. J. and Risk, B. (2011) "A user's guide to the Encyclopedia of DNA elements (ENCODE)", *PLoS Biology*. Edited by P. B. Becker, 9(4), p. e1001046. doi:10.1371/journal.pbio.1001046.

Nakato, G., Hase, K., Sato, T., Kimura, S., Sakakibara, S., Sugiyama, M., Obata, Y., Hanazato, M., Iwanaga, T. and Ohno, H. (2016) "Epithelium-intrinsic MicroRNAs contribute to mucosal immune homeostasis by promoting M-cell maturation", *PLoS ONE*. Public Library of Science, 11(3). doi:10.1371/journal.pone.0150379.

Natoli, M., Leoni, B. D., D'Agnano, I., D'Onofrio, M., Brandi, R., Arisi, I., Zucco, F. and Felsani, A. (2011) "Cell growing density affects the structural and functional properties of Caco-2 differentiated monolayer", *Journal of Cellular Physiology*, 226(6), pp. 1531–1543. doi:10.1002/jcp.22487.

Nauli, A. M., Sun, Y., Whittimore, J. D., Atyia, S., Krishnaswamy, G. and Nauli, S. M. (2014) "Chylomicrons produced by Caco-2 cells contained ApoB-48 with diameter of 80-200 nm", *Physiological Reports*, 2(6). doi:10.14814/phy2.12018.

Nazari-Jahantigh, M., Egea, V., Schober, A. and Weber, C. (2015) "MicroRNA-specific regulatory mechanisms in atherosclerosis", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Academic Press, pp. 35–41. doi:10.1016/j.yjmcc.2014.10.021.

Negoi, I., Hostiuc, S., Sartelli, M., Negoi, R. I. and Beuran, M. (2017) "MicroRNA-21 as a prognostic biomarker in patients with pancreatic cancer – A systematic review and meta-analysis", *American Journal of Surgery*, pp. 515–524. doi:10.1016/j.amjsurg.2017.03.049.

Nelson Hayes, C. and Chayama, K. (2016) "MicroRNAs as biomarkers for liver disease and hepatocellular carcinoma", *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), p. 280. doi:10.3390/ijms17030280.

Nelson, P. T., Wang, W.-X. and Rajeev, B. W. (2008) "MicroRNAs (miRNAs) in Neurodegenerative Diseases", *Brain Pathology*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 18(1), pp. 130–138. doi:10.1111/j.1750-3639.2007.00120.x.

Neurath, M. F. (2014) "Cytokines in inflammatory bowel disease", *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, pp. 329–342. doi:10.1038/nri3661.

Nezami, B. G., Mwangi, S. M., Lee, J. E., Jeppsson, S., Anitha, M., Yarandi, S. S., Farris, A. B. and Srinivasan, S. (2014) "MicroRNA 375 mediates palmitate-induced enteric neuronal damage and high-fat diet-induced delayed intestinal transit in mice", *Gastroenterology*. W.B. Saunders, 146(2). doi:10.1053/j.gastro.2013.10.053.

Ng, E. K. O., Chong, W. W. S., Jin, H., Lam, E. K. Y., Shin, V. Y., Yu, J., Poon, T. C. W., Ng, S. S. M. and Sung, J. J. Y. (2009) "Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: A potential marker for colorectal cancer screening", *Gut*. BMJ Publishing Group, 58(10), pp. 1375–1381. doi:10.1136/gut.2008.167817.

Ning, X., Wang, C., Zhang, M. and Wang, K. (2019) "Ectopic expression of miR-147 inhibits stem cell marker and epithelial–mesenchymal transition (EMT)-related protein expression in colon cancer cells", *Oncology Research*. Cognizant Communication Corporation, 27(4), pp. 399–406. doi:10.3727/096504018X15179675206495.

Nishi, K., Nishi, A., Nagasawa, T. and Ui-Tei, K. (2013) "Human TNRC6A is an Argonaute-navigator protein for microRNA-mediated gene silencing in the nucleus", *RNA*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 19(1), pp. 17–35. doi:10.1261/rna.034769.112.

Nojima, H., Adachi, M., Matsui, T., Okawa, K., Tsukita, Shoichiro and Tsukita, Sachiko (2008) "IQGAP3 regulates cell proliferation through the Ras/ERK signalling cascade", *Nature Cell Biology*, 10(8), pp. 971–978. doi:10.1038/ncb1757.

Novák, J., Olejníčková, V., Tkáčová, N. and Santulli, G. (2015) "Mechanistic role of microRNAs in coupling lipid metabolism and atherosclerosis", in *Advances in Experimental Medicine and Biology*. NIH Public Access, pp. 79–100. doi:10.1007/978-3-319-22380-3_5.

O'Rourke, K. P., Loizou, E., Livshits, G., Schatoff, E. M., Baslan, T., Manchado, E., Simon, J., Romesser, P. B., Leach, B., Han, T., Pauli, C., Beltran, H., Rubin, M. A., Dow, L. E. and Lowe, S. W. (2017) "Transplantation of engineered organoids enables rapid generation of metastatic mouse models of colorectal cancer", *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group, 35(6), pp. 577–582. doi:10.1038/nbt.3837.

Okada, C., Yamashita, E., Lee, S. J., Shibata, S., Katahira, J., Nakagawa, A., Yoneda, Y. and Tsukihara, T. (2009) "A high-Resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery", *Science*. American Association for the Advancement of Science, 326(5957), pp. 1275–1279. doi:10.1126/science.1178705.

Oliveros, J. C. (2007) *VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams*. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>, bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html. doi:10.1017/S0266267108002022.

Olsen, P. H. and Ambros, V. (1999) "The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation", *Developmental Biology*. Academic Press, 216(2), pp. 671–680. doi:10.1006/dbio.1999.9523.

- Ørom, U. A., Nielsen, F. C. and Lund, A. H. (2008) "MicroRNA-10a Binds the 5'UTR of Ribosomal Protein mRNAs and Enhances Their Translation", *Molecular Cell*. Cell Press, 30(4), pp. 460–471. doi:10.1016/j.molcel.2008.05.001.
- Osako, Y., Seki, N., Koshizuka, K., Okato, A., Idichi, T., Arai, T., Omoto, I., Sasaki, K., Uchikado, Y., Kita, Y., Kurahara, H., Maemura, K. and Natsugoe, S. (2017) "Regulation of SPOCK1 by dual strands of pre-miR-150 inhibit cancer cell migration and invasion in esophageal squamous cell carcinoma", *Journal of Human Genetics*. Nature Publishing Group, 62(11), pp. 935–944. doi:10.1038/jhg.2017.69.
- Ottosen, S., Parsley, T. B., Yang, L., Zeh, K., Van Doorn, L. J., Van Der Veer, E., Raney, A. K., Hodges, M. R. and Patick, A. K. (2015) "In Vitro antiviral activity and preclinical and clinical resistance profile of miravirsin, a novel anti-hepatitis C virus therapeutic targeting the human factor miR-122", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology (ASM), 59(1), pp. 599–608. doi:10.1128/AAC.04220-14.
- Palmer, B. F. and Clegg, D. J. (2015) "The sexual dimorphism of obesity", *Molecular and Cellular Endocrinology*. Elsevier Ireland Ltd, pp. 113–119. doi:10.1016/j.mce.2014.11.029.
- Palmisano, B. T., Zhu, L., Eckel, R. H. and Stafford, J. M. (2018) "Sex differences in lipid and lipoprotein metabolism", *Molecular Metabolism*. Elsevier GmbH, pp. 45–55. doi:10.1016/j.molmet.2018.05.008.
- Park, J.-E., Heo, I., Tian, Y., Simanshu, D. K., Chang, H., Jee, D., Patel, D. J. and Kim, V. N. (2011) "Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing.", *Nature*. NIH Public Access, 475(7355), pp. 201–5. doi:10.1038/nature10198.
- Parker, R. and Sheth, U. (2007) "P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation", *Molecular Cell*. Cell Press, pp. 635–646. doi:10.1016/j.molcel.2007.02.011.
- Parra, P., Serra, F. and Palou, A. (2010) "Expression of adipose MicroRNAs Is sensitive to dietary conjugated linoleic acid treatment in mice", *PLoS ONE*. Public Library of Science, 5(9), p. e13005. doi:10.1371/journal.pone.0013005.
- Patel, R. S., Jakymiw, A., Yao, B., Pauley, B. A., Carcamo, W. C., Katz, J., Cheng, J. Q. and Chan, E. K. L. (2011) "High resolution of microRNA signatures in human whole saliva.", *Archives of oral biology*. NIH Public Access, 56(12), pp. 1506–13. doi:10.1016/j.archoralbio.2011.05.015.
- Peck, B. C. E., Mah, A. T., Pitman, W. A., Ding, S., Lund, P. K. and Sethupathy, P. (2017) "Functional transcriptomics in diverse intestinal epithelial cell types reveals robust MicroRNA sensitivity in intestinal stem cells to microbial status", *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 292(7), pp. 2586–2600. doi:10.1074/jbc.M116.770099.
- Peck, B. C. E., Sincavage, J., Feinstein, S., Mah, A. T., Simmons, J. G., Lund, P. K. and Sethupathy, P. (2016) "miR-30 family controls proliferation and differentiation of intestinal epithelial cell models by directing a broad gene expression program that includes SOX9 and the ubiquitin ligase pathway", *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 291(31), pp. 15975–15984. doi:10.1074/jbc.M116.733733.
- Peng, Y. and Croce, C. M. (2016) "The role of MicroRNAs in human cancer", *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Nature Publishing Group, 1(1), p. 15004. doi:10.1038/sigtrans.2015.4.
- Pereira, I., Lechanteur, A. and Sarmiento, B. (2018) "3D Model Replicating the Intestinal Function to Evaluate Drug Permeability", in *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., pp. 107–113. doi:10.1007/978-1-4939-8600-2_11.
- Petersen, C. P., Bordeleau, M. E., Pelletier, J. and Sharp, P. A. (2006) "Short RNAs repress

translation after initiation in mammalian cells", *Molecular Cell*. Cell Press, 21(4), pp. 533–542. doi:10.1016/j.molcel.2006.01.031.

Peterson, L. W. and Artis, D. (2014) "Intestinal epithelial cells: Regulators of barrier function and immune homeostasis", *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, pp. 141–153. doi:10.1038/nri3608.

Peterson, M. D. and Mooseker, M. S. (1992) "Characterization of the enterocyte-like brush border cytoskeleton of the C2BBE clones of the human intestinal cell line, Caco-2", *Journal of Cell Science*, 102(3), pp. 581–600. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1506435> (Accessed: October 16, 2019).

Pillai, R. S., Bhattacharyya, S. N., Artus, C. G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E. and Filipowicz, W. (2005) "Inhibition of translational initiation by let-7 microRNA in human cells", *Science*. American Association for the Advancement of Science, 309(5740), pp. 1573–1576. doi:10.1126/science.1115079.

Pinto, D., Gregorieff, A., Begthel, H. and Clevers, H. (2003) "Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium", *Genes and Development*, 17(14), pp. 1709–1713. doi:10.1101/gad.267103.

Pinto, M., Robine-Leon, S., Appay, M.-D., Kedinger, M., Triadou, N., Dussaulx, E., Lacroix, B., Simon-Assmann, P., Haffen, K., Fogh, J. and Zweibaum, A. (1983) "Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture", *Biology of the Cell*.

Place, R. F., Li, L.-C., Pookot, D., Noonan, E. J. and Dahiya, R. (2008) "MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences", *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 105(5), pp. 1608–1613. doi:10.1073/pnas.0707594105.

Pol, A., Gross, S. P. and Parton, R. G. (2014) "Biogenesis of the multifunctional lipid droplet: Lipids, proteins, and sites", *Journal of Cell Biology*. Rockefeller University Press, pp. 635–646. doi:10.1083/jcb.201311051.

Polytarchou, C., Hommes, D. W., Palumbo, T., Hatzia Apostolou, M., Koutsoumpa, M., Koukos, G., van der Meulen-de Jong, A. E., Oikonomopoulos, A., van Deen, W. K., Vorvis, C., Serebrennikova, O. B., Birli, E., Choi, J., Chang, L., Anton, P. A., Tsichlis, P. N., Pothoulakis, C., Verspaget, H. W. and Iliopoulos, D. (2015) "MicroRNA214 Is Associated With Progression of Ulcerative Colitis, and Inhibition Reduces Development of Colitis and Colitis-Associated Cancer in Mice.", *Gastroenterology*. NIH Public Access, 149(4), pp. 981–92.e11. doi:10.1053/j.gastro.2015.05.057.

Qi, R. L., Chen, Y., Huang, J. X. and Yang, F. Y. (2015) "Effects of conjugated linoleic acid on the expression levels of miR-27 and miR-143 in pig adipose tissue", *Genetics and Molecular Research*, 14(2), pp. 6985–6992. doi:10.4238/2015.June.26.7.

Radtke, F., Clevers, H. and Riccio, O. (2006) "From Gut Homeostasis to Cancer", *Current Molecular Medicine*. Bentham Science Publishers Ltd., 6(3), pp. 275–289. doi:10.2174/156652406776894527.

Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S. and Medzhitov, R. (2004) "Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis", *Cell*. Cell Press, 118(2), pp. 229–241. doi:10.1016/j.cell.2004.07.002.

Reczko, M., Maragkakis, M., Alexiou, P., Grosse, I. and Hatzigeorgiou, A. G. (2012) "Functional microRNA targets in protein coding sequences", *Bioinformatics*, 28(6), pp. 771–776. doi:10.1093/bioinformatics/bts043.

- Rehwinkel, J., Behm-Ansmant, I., Gatfield, D. and Izaurralde, E. (2005) "A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing.", *RNA (New York, N.Y.)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 11(11), pp. 1640–7. doi:10.1261/rna.2191905.
- Reid, G., Kirschner, M. B. and van Zandwijk, N. (2011) "Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers", *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. Elsevier, pp. 193–208. doi:10.1016/j.critrevonc.2010.11.004.
- Richmond, C. A. and Breault, D. T. (2010) "Regulation of gene expression in the intestinal epithelium", in *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier B.V., pp. 207–229. doi:10.1016/B978-0-12-381280-3.00009-9.
- De Rie, D., Abugessaisa, I., Alam, T., Arner, E., Arner, P., Ashoor, H., Åström, G., Babina, M., Bertin, N., Burroughs, A. M., Carlisle, A. J., Daub, C. O., Detmar, M., Deviatiiarov, R., Fort, A., Gebhard, C., Goldowitz, D., Guhl, S., Ha, T. J., Harshbarger, J., Hasegawa, A., Hashimoto, K., Herlyn, M., Heutink, P., Hitchens, K. J., Hon, C. C., Huang, E., Ishizu, Y., Kai, C., Kasukawa, T., Klinken, P., Lassmann, T., Lecellier, C. H., Lee, W., Lizio, M., Makeev, V., Mathelier, A., Medvedeva, Y. A., Mejhert, N., Mungall, C. J., Noma, S., Ohshima, M., Okada-Hatakeyama, M., Persson, H., Rizzu, P., Roudnicky, F., Sætrom, P., Sato, H., Severin, J., Shin, J. W., Swoboda, R. K., Tarui, H., Toyoda, H., Vitting-Seerup, K., Winteringham, L., Yamaguchi, Y., Yasuzawa, K., Yoneda, M., Yumoto, N., Zabierowski, S., Zhang, P. G., Wells, C. A., Summers, K. M., Kawaji, H., Sandelin, A., Rehli, M., Hayashizaki, Y., Carninci, P., Forrest, A. R. R. and De Hoon, M. J. L. (2017) "An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse", *Nature Biotechnology*. NIH Public Access, 35(9), pp. 872–878. doi:10.1038/nbt.3947.
- Ritland Politz, J. C., Hogan, E. M. and Pederson, T. (2009) "MicroRNAs with a nucleolar location", *RNA*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 15(9), pp. 1705–1715. doi:10.1261/rna.1470409.
- van Rooij, E., Quiat, D., Johnson, B. A., Sutherland, L. B., Qi, X., Richardson, J. A., Kelm, R. J. and Olson, E. N. (2009) "A Family of microRNAs Encoded by Myosin Genes Governs Myosin Expression and Muscle Performance", *Developmental Cell*. Cell Press, 17(5), pp. 662–673. doi:10.1016/j.devcel.2009.10.013.
- Rousset, M. (1986) "The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: Two in vitro models for the study of intestinal differentiation", *Biochimie*. Elsevier, pp. 1035–1040. doi:10.1016/S0300-9084(86)80177-8.
- Roehnal, V., Nakai, D., Hoepner, U., Fischer, T., Kamiyama, E., Takahashi, M., Yasuda, S. and Mueller, J. (2012) "Human small intestinal and colonic tissue mounted in the Ussing chamber as a tool for characterizing the intestinal absorption of drugs", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46(5), pp. 367–373. doi:10.1016/j.ejps.2012.02.025.
- Ruby, J. G., Jan, C. H. and Bartel, D. P. (2007) "Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing", *Nature*. NIH Public Access, 448(7149), pp. 83–86. doi:10.1038/nature05983.
- Runtsch, M. C., Round, J. L. and O'Connell, R. M. (2014) "MicroRNAs and the regulation of intestinal homeostasis", *Frontiers in Genetics*. Frontiers Media SA, p. 347. doi:10.3389/fgene.2014.00347.
- Sahasrabudde, N. A., Huang, T. C., Ahmad, S., Kim, M. S., Yang, Y., Ghosh, B., Leach, S. D., Gowda, H., Somani, B. L., Chaerkady, R. and Pandey, A. (2014) "Regulation of PPAR-alpha pathway by Dicer revealed through proteomic analysis", *Journal of Proteomics*. Elsevier, 108, pp. 306–315. doi:10.1016/j.jprot.2014.04.027.
- Saito, K., Negishi, M. and James Squires, E. (2013) "Sexual dimorphisms in zonal gene expression in mouse liver", *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Academic Press, 436(4),

pp. 730–735. doi:10.1016/j.bbrc.2013.06.025.

Sakai, H., Tanaka, Y., Tanaka, M., Ban, N., Yamada, K., Matsumura, Y., Watanabe, D., Sasaki, M., Kita, T. and Inagaki, N. (2007) "ABCA2 deficiency results in abnormal sphingolipid metabolism in mouse brain", *Journal of Biological Chemistry*, 282(27), pp. 19692–19699. doi:10.1074/jbc.M611056200.

Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M. L., Stammati, A. and Zucco, F. (2005) "The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: Influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics", *Cell Biology and Toxicology*. doi:10.1007/s10565-005-0085-6.

Sato, T. and Clevers, H. (2013) "Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: Mechanism and applications", *Science*. American Association for the Advancement of Science, pp. 1190–1194. doi:10.1126/science.1234852.

Sato, T., Stange, D. E., Ferrante, M., Vries, R. G. J., van Es, J. H., van den Brink, S., van Houdt, W. J., Pronk, A., van Gorp, J., Siersema, P. D. and Clevers, H. (2011) "Long-term Expansion of Epithelial Organoids From Human Colon, Adenoma, Adenocarcinoma, and Barrett's Epithelium", *Gastroenterology*. W.B. Saunders, 141(5), pp. 1762–1772. doi:10.1053/J.GASTRO.2011.07.050.

Sato, T., Vries, R. G., Snippert, H. J., Van De Wetering, M., Barker, N., Stange, D. E., Van Es, J. H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P. J. and Clevers, H. (2009) "Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche", *Nature*, 459(7244), pp. 262–265. doi:10.1038/nature07935.

Sauer, B. (1998) "Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system", *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*. Academic Press Inc., 14(4), pp. 381–392. doi:10.1006/meth.1998.0593.

Saunders, M. A., Liang, H. and Li, W.-H. (2007) "Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites", *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 104(9), pp. 3300–3305. doi:10.1073/pnas.0611347104.

Saxena, A. and Tabin, C. J. (2009) "miRNA-processing enzyme Dicer is necessary for cardiac outflow tract alignment and chamber septation", *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 107(1), pp. 87–91. doi:10.1073/pnas.0912870107.

Schaefer, J. S., Attumi, T., Opekun, A. R., Abraham, B., Hou, J., Shelby, H., Graham, D. Y., Streckfus, C. and Klein, J. R. (2015) "MicroRNA signatures differentiate Crohn's disease from ulcerative colitis", *BMC Immunology*. BioMed Central, 16(1), p. 5. doi:10.1186/s12865-015-0069-0.

Scott, G. K., Mattie, M. D., Berger, C. E., Benz, S. C. and Benz, C. C. (2006) "Rapid Alteration of MicroRNA Levels by Histone Deacetylase Inhibition", *Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 66(3), pp. 1277–1281. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3632.

Seeger, T., Fischer, A., Muhly-Reinholz, M., Zeiher, A. M. and Dimmeler, S. (2014) "Long-Term inhibition of miR-21 leads to reduction of obesity in db/db mice", *Obesity*. John Wiley & Sons, Ltd, 22(11), pp. 2352–2360. doi:10.1002/oby.20852.

Sekine, S., Ogawa, R., Ito, R., Hiraoka, N., McManus, M. T., Kanai, Y. and Hebrok, M. (2009) "Disruption of Dicer1 Induces Dysregulated Fetal Gene Expression and Promotes Hepatocarcinogenesis", *Gastroenterology*. W.B. Saunders, 136(7). doi:10.1053/j.gastro.2009.02.067.

Selbach, M., Schwanhäusser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R. and Rajewsky, N. (2008)

- "Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs", *Nature*. Nature Publishing Group, 455(7209), pp. 58–63. doi:10.1038/nature07228.
- Sen, G. L. and Blau, H. M. (2005) "Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies", *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 7(6), pp. 633–636. doi:10.1038/ncb1265.
- Shah, M. S., Davidson, L. A. and Chapkin, R. S. (2012) "Mechanistic insights into the role of microRNAs in cancer: Influence of nutrient crosstalk", *Frontiers in Genetics*. Frontiers Media SA, 3(DEC), p. 305. doi:10.3389/fgene.2012.00305.
- Shen, J., Niu, W., Zhang, Hongbo, Jun, M. and Zhang, Hongyan (2018) "Downregulation of MicroRNA-147 inhibits cell proliferation and increases the chemosensitivity of gastric cancer cells to 5-Fluorouracil by directly targeting PTEN", *Oncology Research*. Cognizant Communication Corporation, 26(6), pp. 901–911. doi:10.3727/096504017X15061902533715.
- Shi, H., Seeley, R. J. and Clegg, D. J. (2009) "Sexual differences in the control of energy homeostasis", *Frontiers in Neuroendocrinology*. NIH Public Access, pp. 396–404. doi:10.1016/j.yfrne.2009.03.004.
- Shu, J., Resende E Silva, B. V., Gao, T., Xu, Z. and Cui, J. (2017) "Dynamic and modularized MicroRNA regulation and its implication in human cancers", *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 7(1), p. 13356. doi:10.1038/s41598-017-13470-5.
- Singh, R., Yadav, V., Kumar, S. and Saini, N. (2015) "MicroRNA-195 inhibits proliferation, invasion and metastasis in breast cancer cells by targeting FASN, HMGCR, ACACA and CYP27B1", *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 5, p. 17454. doi:10.1038/srep17454.
- Soh, J., Iqbal, J., Queiroz, J., Fernandez-Hernando, C. and Hussain, M. M. (2013) "MicroRNA-30c reduces hyperlipidemia and atherosclerosis in mice by decreasing lipid synthesis and lipoprotein secretion", *Nature Medicine*. NIH Public Access, 19(7), pp. 892–900. doi:10.1038/nm.3200.
- Son, H. J., Kim, N., Song, C.-H., Nam, R. H., Choi, S. I., Kim, J. S. and Lee, D. H. (2019) "Sex-related Alterations of Gut Microbiota in the C57BL/6 Mouse Model of Inflammatory Bowel Disease", *Journal of Cancer Prevention*. Korean Society of Cancer Prevention, 24(3), pp. 173–182. doi:10.15430/jcp.2019.24.3.173.
- Sonkoly, E., Ståhle, M. and Pivarcsi, A. (2008) "MicroRNAs and immunity: Novel players in the regulation of normal immune function and inflammation", *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press, pp. 131–140. doi:10.1016/j.semcancer.2008.01.005.
- Sonnenburg, J. L. and Bäckhed, F. (2016) "Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism", *Nature*, pp. 56–64. doi:10.1038/nature18846.
- Soriano, A., Jubierre, L., Almazán-Moga, A., Molist, C., Roma, J., de Toledo, J. S., Gallego, S. and Segura, M. F. (2013) "microRNAs as pharmacological targets in cancer", *Pharmacological Research*. Academic Press, 75, pp. 3–14. doi:10.1016/J.PHRS.2013.03.006.
- Soroosh, A., Rankin, C. R., Polytarchou, C., Lokhandwala, Z. A., Patel, A., Chang, L., Pothoulakis, C., Iliopoulos, D. and Padua, D. M. (2019) "miR-24 Is Elevated in Ulcerative Colitis Patients and Regulates Intestinal Epithelial Barrier Function", *The American Journal of Pathology*. Elsevier, 189(9), pp. 1763–1774. doi:10.1016/J.AJP.2019.05.018.
- Spandidos, A., Wang, X., Wang, H., Dragnev, S., Thurber, T. and Seed, B. (2008) "A comprehensive collection of experimentally validated primers for Polymerase Chain Reaction quantitation of murine transcript abundance", *BMC Genomics*. BioMed Central, 9(1), p. 633. doi:10.1186/1471-2164-9-633.

- Spandidos, A., Wang, X., Wang, H. and Seed, B. (2010) "PrimerBank: a resource of human and mouse PCR primer pairs for gene expression detection and quantification", *Nucleic Acids Research*. Narnia, 38(suppl_1), pp. D792–D799. doi:10.1093/nar/gkp1005.
- Spence, J. R., Mayhew, C. N., Rankin, S. A., Kuhar, M. F., Vallance, J. E., Tolle, K., Hoskins, E. E., Kalinichenko, V. V., Wells, S. I., Zorn, A. M., Shroyer, N. F. and Wells, J. M. (2011) "Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro", *Nature*. NIH Public Access, 470(7332), pp. 105–110. doi:10.1038/nature09691.
- Spinosa, M., Lu, G., Su, G., Bontha, S. V., Gehrau, R., Salmon, M. D., Smith, J. R., Weiss, M. L., Mas, V. R., Upchurch, G. R. and Sharma, A. K. (2018) "Human mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles attenuate aortic aneurysm formation and macrophage activation via microRNA-147", *FASEB Journal*. FASEB, 32(11), pp. 6038–6050. doi:10.1096/fj.201701138RR.
- Sproston, N. R. and Ashworth, J. J. (2018) "Role of C-reactive protein at sites of inflammation and infection", *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A. doi:10.3389/fimmu.2018.00754.
- Srivastava, S. K., Bhardwaj, A., Singh, S., Arora, S., Wang, B., Grizzle, W. E. and Singh, A. P. (2011) "MicroRNA-150 directly targets MUC4 and suppresses growth and malignant behavior of pancreatic cancer cells", *Carcinogenesis*. Oxford Academic, 32(12), pp. 1832–1839. doi:10.1093/carcin/bgr223.
- Stalder, L., Heusermann, W., Sokol, L., Trojer, D., Wirz, J., Hean, J., Fritzsche, A., Aeschmann, F., Pfanzagl, V., Basselet, P., Weiler, J., Hintersteiner, M., Morrissey, D. V and Meisner-Kober, N. C. (2013) "The rough endoplasmic reticulum is a central nucleation site of siRNA-mediated RNA silencing", *EMBO Journal*. European Molecular Biology Organization, 32(8), pp. 1115–1127. doi:10.1038/emboj.2013.52.
- Stark, A., Brennecke, J., Bushati, N., Russell, R. B. and Cohen, S. M. (2005) "Animal MicroRNAs Confer Robustness to Gene Expression and Have a Significant Impact on 3'UTR Evolution", *Cell*. Cell Press, 123(6), pp. 1133–1146. doi:10.1016/J.CELL.2005.11.023.
- Stelzner, M., Helmrath, M., Dunn, J. C. Y., Henning, S. J., Houchen, C. W., Kuo, C., Lynch, J., Li, L., Magness, S. T., Martin, M. G., Wong, M. H. and Yu, J. (2012) "A nomenclature for intestinal in vitro cultures", *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. American Physiological Society, 302(12), p. G1359. doi:10.1152/ajpgi.00493.2011.
- Stenkamp-Strahm, C. M., Kappmeyer, A. J., Schmalz, J. T., Gericke, M. and Balemba, O. (2013) "High-fat diet ingestion correlates with neuropathy in the duodenum myenteric plexus of obese mice with symptoms of type 2 diabetes", *Cell and Tissue Research*, 354(2), pp. 381–394. doi:10.1007/s00441-013-1681-z.
- Sticht, C., De La Torre, C., Parveen, A. and Gretz, N. (2018) "Mirwalk: An online resource for prediction of microrna binding sites", *PLoS ONE*, 13(10). doi:10.1371/journal.pone.0206239.
- Su, S. F., Chang, Y. W., Andreu-Vieyra, C., Fang, J. Y., Yang, Z., Han, B., Lee, A. S. and Liang, G. (2013) "MiR-30d, miR-181a and miR-199a-5p cooperatively suppress the endoplasmic reticulum chaperone and signaling regulator GRP78 in cancer", *Oncogene*. Nature Publishing Group, 32(39), pp. 4694–4701. doi:10.1038/onc.2012.483.
- Sui, C.-J., Xu, F., Shen, W.-F., Dai, B.-H., Lu, J.-J., Zhang, M.-F. and Yang, J.-M. (2016) "MicroRNA-147 suppresses human hepatocellular carcinoma proliferation migration and chemosensitivity by inhibiting HOXC6.", *American journal of cancer research*. e-Century Publishing Corporation, 6(12), pp. 2787–2798. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28042500> (Accessed: February 11, 2020).

- Sukhotnik, I., Mor-Vaknin, N., Drongowski, R. A., Miselevich, I., Coran, A. G. and Harmon, C. M. (2004) "Effect of dietary fat on early morphological intestinal adaptation in a rat with short bowel syndrome", *Pediatric Surgery International*. Springer Verlag, 20(6), pp. 419–424. doi:10.1007/s00383-004-1168-9.
- Sun, J., Gao, B., Zhou, M., Wang, Z. zhen, Zhang, F., Deng, J. en and Li, X. (2013) "Comparative genomic analysis reveals evolutionary characteristics and patterns of microRNA clusters in vertebrates", *Gene*. Elsevier, 512(2), pp. 383–391. doi:10.1016/j.gene.2012.09.102.
- Sun, L. N., Xing, C., Zhi, Z., Liu, Y., Chen, L. yan, Shen, T., Zhou, Q., Liu, Y. H., Gan, W. J., Wang, J. R., Xu, Y. and Li, J. M. (2017) "Dicer suppresses cytoskeleton remodeling and tumorigenesis of colorectal epithelium by miR-324-5p mediated suppression of HMGXB3 and WASF-2", *Oncotarget*. Impact Journals LLC, 8(34), pp. 55776–55789. doi:10.18632/oncotarget.18218.
- Sun, M., Estrov, Z., Ji, Y., Coombes, K. R., Harris, D. H. and Kurzrock, R. (2008) "Curcumin (diferuloylmethane) alters the expression profiles of microRNAs in human pancreatic cancer cells", *Molecular Cancer Therapeutics*. American Association for Cancer Research, 7(3), pp. 464–473. doi:10.1158/1535-7163.mct-07-2272.
- Suzuki, H. I., Arase, M., Matsuyama, H., Choi, Y. L., Ueno, T., Mano, H., Sugimoto, K. and Miyazono, K. (2011) "MCPIP1 ribonuclease antagonizes dicer and terminates microRNA biogenesis through precursor microRNA degradation", *Molecular Cell*. Elsevier, 44(3), pp. 424–436. doi:10.1016/j.molcel.2011.09.012.
- Suzuki, H., Yamamoto, E., Nojima, M., Kai, M., Yamano, H. O., Yoshikawa, K., Kimura, T., Kudo, T., Harada, E., Sugai, T., Takamaru, H., Niinuma, T., Maruyama, R., Yamamoto, H., Tokino, T., Imai, K., Toyota, M. and Shinomura, Y. (2010) "Methylation-associated silencing of microRNA-34b/c in gastric cancer and its involvement in an epigenetic field defect", *Carcinogenesis*. Narnia, 31(12), pp. 2066–2073. doi:10.1093/carcin/bgq203.
- Tabet, F., Vickers, K. C., Cuesta Torres, L. F., Wiese, C. B., Shoucri, B. M., Lambert, G., Catherinet, C., Prado-Lourenco, L., Levin, M. G., Thacker, S., Sethupathy, P., Barter, P. J., Remaley, A. T. and Rye, K. A. (2014) "HDL-transferred microRNA-223 regulates ICAM-1 expression in endothelial cells", *Nature Communications*. NIH Public Access, 5, p. 3292. doi:10.1038/ncomms4292.
- Tan, H. Y., Trier, S., Rahbek, U. L., Dufva, M., Kutter, J. P. and Andresen, T. L. (2018) "A multi-chamber microfluidic intestinal barrier model using Caco-2 cells for drug transport studies", *PLoS ONE*. Public Library of Science, 13(5). doi:10.1371/journal.pone.0197101.
- Tanzer, A. and Stadler, P. F. (2004) "Molecular Evolution of a MicroRNA Cluster", *Journal of Molecular Biology*. Academic Press, 339(2), pp. 327–335. doi:10.1016/J.JMB.2004.03.065.
- Tarasov, V., Jung, P., Verdoodt, B., Lodygin, D., Epanchintsev, A., Menssen, A., Meister, G. and Hermeking, H. (2007) "Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G 1-arrest", *Cell Cycle*, 6(13), pp. 1586–1593. doi:10.4161/cc.6.13.4436.
- Tay, Y., Zhang, J., Thomson, A. M., Lim, B. and Rigoutsos, I. (2008) "MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation", *Nature*. Nature Publishing Group, 455(7216), pp. 1124–1128. doi:10.1038/nature07299.
- Taylor, D. W., Ma, E., Shigematsu, H., Cianfrocco, M. A., Noland, C. L., Nagayama, K., Nogales, E., Doudna, J. A. and Wang, H. W. (2013) "Substrate-specific structural rearrangements of human Dicer", *Nature Structural and Molecular Biology*. NIH Public Access, 20(6), pp. 662–670. doi:10.1038/nsmb.2564.

- Testa, U., Pelosi, E., Castelli, G. and Labbaye, C. (2017) "miR-146 and miR-155: Two key modulators of immune response and tumor development", *Non-coding RNA*. MDPI AG. doi:10.3390/ncrna3030022.
- Tian, F. J., An, L. N., Wang, G. K., Zhu, J. Q., Li, Q., Zhang, Y. Y., Zeng, A., Zou, J., Zhu, R. F., Han, X. S., Shen, N., Yang, H. T., Zhao, X. X., Huang, S., Qin, Y. W. and Jing, Q. (2014) "Elevated microRNA-155 promotes foam cell formation by targeting HBP1 in atherogenesis", *Cardiovascular Research*. Narnia, 103(1), pp. 100–110. doi:10.1093/cvr/cvu070.
- Tian, W., Zhu, W. and Jiang, J. (2020) "miR-150-5p suppresses the stem cell-like characteristics of glioma cells by targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway", *Cell Biology International*. John Wiley & Sons, Ltd, p. cbin.11314. doi:10.1002/cbin.11314.
- Tie, J., Pan, Y., Zhao, L., Wu, K., Liu, J., Sun, S., Guo, X., Wang, B., Gang, Y., Zhang, Y., Li, Q., Qiao, T., Zhao, Q., Nie, Y. and Fan, D. (2010) "MiR-218 inhibits invasion and metastasis of gastric cancer by targeting the robo1 receptor", *PLoS Genetics*. Edited by B. E. Clurman. Public Library of Science, 6(3). doi:10.1371/journal.pgen.1000879.
- Tomé-Carneiro, J., Larrosa, M., Yáñez-Gascón, M. J., Dávalos, A., Gil-Zamorano, J., González, M., García-Almagro, F. J., Ruiz Ros, J. A., Tomás-Barberán, F. A., Espín, J. C. and García-Conesa, M. T. (2013) "One-year supplementation with a grape extract containing resveratrol modulates inflammatory-related microRNAs and cytokines expression in peripheral blood mononuclear cells of type 2 diabetes and hypertensive patients with coronary artery disease", *Pharmacological Research*. Academic Press, 72, pp. 69–82. doi:10.1016/j.phrs.2013.03.011.
- Townley-Tilson, W. H. D., Callis, T. E. and Wang, D. (2010) "MicroRNAs 1, 133, and 206: Critical factors of skeletal and cardiac muscle development, function, and disease", *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, pp. 1252–1255. doi:10.1016/j.biocel.2009.03.002.
- Trajkovski, M., Hausser, J., Soutschek, J., Bhat, B., Akin, A., Zavolan, M., Heim, M. H. and Stoffel, M. (2011) "MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity.", *Nature*. Nature Publishing Group, 474(7353), pp. 649–53. doi:10.1038/nature10112.
- Treiber, T., Treiber, N. and Meister, G. (2019) "Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, pp. 5–20. doi:10.1038/s41580-018-0059-1.
- Truesdell, S. S., Mortensen, R. D., Seo, M., Schroeder, J. C., Lee, J. H., Letonqueze, O. and Vasudevan, S. V. (2012) "MicroRNA-mediated mRNA translation activation in quiescent cells and oocytes involves recruitment of a nuclear microRNP", *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 2, p. 842. doi:10.1038/srep00842.
- Tsoukas, M. A., Ko, B. J., Witte, T. R., Dincer, F., Elaine Hardman, W. and Mantzoros, C. S. (2015) "Dietary walnut suppression of colorectal cancer in mice: Mediation by miRNA patterns and fatty acid incorporation", *Journal of Nutritional Biochemistry*. Elsevier Inc., 26(7), pp. 776–783. doi:10.1016/j.jnutbio.2015.02.009.
- Tüfekci, K. U., Öner, M. G., Meuwissen, R. L. J. and Genç, Ş. (2014) "The role of microRNAs in human diseases", *Methods in Molecular Biology*, 1107, pp. 33–50. doi:10.1007/978-1-62703-748-8_3.
- Tullis, K. M., Krebs, C. J., Leung, J. Y. M. and Robins, D. M. (2003) "The regulator of sex-limitation gene, Rsl, enforces male-specific liver gene expression by negative regulation", *Endocrinology*. Oxford Academic, 144(5), pp. 1854–1860. doi:10.1210/en.2002-0190.
- Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A. and Burwinkel, B. (2011) "Characterization of

extracellular circulating microRNA", *Nucleic Acids Research*, 39(16), pp. 7223–7233. doi:10.1093/nar/gkr254.

Udy, G. B., Towers, R. P., Snell, R. G., Wilkins, R. J., Park, S. H., Ram, P. A., Waxman, D. J. and Davey, H. W. (1997) "Requirement of STAT5b for sexual dimorphism of body growth rates and liver gene expression", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 94(14), pp. 7239–7244. doi:10.1073/pnas.94.14.7239.

Uhlmann, S., Mannsperger, H., Zhang, J. D., Horvat, E. Á., Schmidt, C., Küblbeck, M., Henjes, F., Ward, A., Tschulena, U., Zweig, K., Korf, U., Wiemann, S. and Sahin, Ö. (2012) "Global microRNA level regulation of EGFR-driven cell-cycle protein network in breast cancer", *Molecular Systems Biology*. European Molecular Biology Organization, 8, p. 570. doi:10.1038/msb.2011.100.

Umehara, T., Mori, R., Mace, K. A., Murase, T., Abe, Y., Yamamoto, T. and Ikematsu, K. (2019) "Identification of specific miRNAs in neutrophils of type 2 diabetic mice: Overexpression of miRNA-129-2-3p accelerates diabetic wound healing", *Diabetes*. American Diabetes Association Inc., 68(3), pp. 617–630. doi:10.2337/db18-0313.

Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M. and Rozen, S. G. (2012) "Primer3—new capabilities and interfaces", *Nucleic Acids Research*, 40(15), pp. e115–e115. doi:10.1093/nar/gks596.

Vachon, P. H. and Beaulieu, J. F. (1992) "Transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line", *Gastroenterology*, 103(2), pp. 414–423. doi:10.1016/0016-5085(92)90829-N.

Vaira, V., Roncoroni, L., Barisani, D., Gaudio, G., Bosari, S., Bulfamante, G., Doneda, L., Conte, D., Tomba, C., Bardella, M. T., Ferrero, S., Locatelli, M. and Elli, L. (2014) "microRNA profiles in coeliac patients distinguish different clinical phenotypes and are modulated by gliadin peptides in primary duodenal fibroblasts", *Clinical Science*. Portland Press, 126(5), pp. 417–423. doi:10.1042/CS20130248.

Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J. and Lötvall, J. O. (2007) "Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells.", *Nature cell biology*. Nature Publishing Group, 9(6), pp. 654–9. doi:10.1038/ncb1596.

VanDussen, K. L., Marinshaw, J. M., Shaikh, N., Miyoshi, H., Moon, C., Tarr, P. I., Ciorba, M. A. and Stappenbeck, T. S. (2015) "Development of an enhanced human gastrointestinal epithelial culture system to facilitate patient-based assays", *Gut*. BMJ Publishing Group, 64(6), pp. 911–920. doi:10.1136/gutjnl-2013-306651.

Varol, D., Mildner, A., Blank, T., Shemer, A., Barashi, N., Yona, S., David, E., Boura-Halfon, S., Segal-Hayoun, Y., Chappell-Maor, L., Keren-Shaul, H., Leshkowitz, D., Hornstein, E., Fuhrmann, M., Amit, I., Maggio, N., Prinz, M. and Jung, S. (2017) "Dicer Deficiency Differentially Impacts Microglia of the Developing and Adult Brain", *Immunity*. Cell Press, 46(6), pp. 1030-1044.e8. doi:10.1016/j.immuni.2017.05.003.

Vasudevan, S., Tong, Y. and Steitz, J. A. (2007) "Switching from repression to activation: MicroRNAs can up-regulate translation", *Science*. American Association for the Advancement of Science, 318(5858), pp. 1931–1934. doi:10.1126/science.1149460.

Vickers, K. C., Landstreet, S. R., Levin, M. G., Shoucri, B. M., Toth, C. L., Taylor, R. C., Palmisano, B. T., Tabet, F., Cui, H. L., Rye, K.-A., Sethupathy, P. and Remaley, A. T. (2014) "MicroRNA-223 coordinates cholesterol homeostasis", *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 111(40), pp. 14518–14523. doi:10.1073/pnas.1215767111.

- Vickers, K. C., Palmisano, B. T., Shoucri, B. M., Shamburek, R. D. and Remaley, A. T. (2011) "MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins", *Nature Cell Biology*. NIH Public Access, 13(4), pp. 423–435. doi:10.1038/ncb2210.
- Vickers, K. C., Shoucri, B. M., Levin, M. G., Wu, H., Pearson, D. S., Osei-Hwedie, D., Collins, F. S., Remaley, A. T. and Sethupathy, P. (2013) "MicroRNA-27b is a regulatory hub in lipid metabolism and is altered in dyslipidemia", *Hepatology*. NIH Public Access, 57(2), pp. 533–542. doi:10.1002/hep.25846.
- Vihervaara, T., Uronen, R. L., Wohlfahrt, G., Björkhem, I., Ikonen, E. and Olkkonen, V. M. (2011) "Sterol binding by OSBP-related protein 1L regulates late endosome motility and function", *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(3), pp. 537–551. doi:10.1007/s00018-010-0470-z.
- Viswanathan, S. R., Daley, G. Q. and Gregory, R. I. (2008) "Selective blockade of microRNA processing by Lin28", *Science*. NIH Public Access, 320(5872), pp. 97–100. doi:10.1126/science.1154040.
- Voss, U., Sand, E., Olde, B. and Ekblad, E. (2013) "Enteric neuropathy can be induced by high fat diet in vivo and palmitic acid exposure in vitro", *PLoS ONE*, 8(12). doi:10.1371/journal.pone.0081413.
- Vychytilova-Faltejskova, P., Kiss, I., Klusova, S., Hlavsa, J., Prochazka, V., Kala, Z., Mazanec, J., Hausnerova, J., Kren, L., Hermanova, M., Lenz, J., Karasek, P., Vyzula, R. and Slaby, O. (2015) "MiR-21, miR-34a, miR-198 and miR-217 as diagnostic and prognostic biomarkers for chronic pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma", *Diagnostic Pathology*. BioMed Central Ltd., 10(1). doi:10.1186/s13000-015-0272-6.
- Wagschal, A., Najafi-Shoushtari, S. H., Wang, L., Goedeke, L., Sinha, S., Delemos, A. S., Black, J. C., Ramírez, C. M., Li, Y., Tewhey, R., Hatoum, I., Shah, N., Lu, Y., Kristo, F., Psychogios, N., Vrbanc, V., Lu, Y. C., Hla, T., De Cabo, R., Tsang, J. S., Schadt, E., Sabeti, P. C., Kathiresan, S., Cohen, D. E., Whetstone, J., Chung, R. T., Fernández-Hernando, C., Kaplan, L. M., Bernards, A., Gerszten, R. E. and Näär, A. M. (2015) "Genome-wide identification of microRNAs regulating cholesterol and triglyceride homeostasis", *Nature Medicine*. NIH Public Access, 21(11), pp. 1290–1297. doi:10.1038/nm.3980.
- Wang, F., Kohan, A. B., Henry Dong, H., Yang, Q., Xu, M., Huesman, S., Lou, D., Hui, D. Y. and Tso, P. (2014) "Overexpression of apolipoprotein C-III decreases secretion of dietary triglyceride into lymph", *Physiological Reports*. American Physiological Society, 2(3). doi:10.1002/phy2.247.
- Wang, J., Chen, J. and Sen, S. (2016) "MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics", *Journal of Cellular Physiology*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 25–30. doi:10.1002/jcp.25056.
- Wang, K., Zhang, S., Weber, J., Baxter, D. and Galas, D. J. (2010) "Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells", *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 38(20), pp. 7248–7259. doi:10.1093/nar/gkq601.
- Wang, Q., Zhou, Y., Rychahou, P., Fan, T. W. M., Lane, A. N., Weiss, H. L. and Evers, B. M. (2017) "Ketogenesis contributes to intestinal cell differentiation", *Cell Death and Differentiation*. Nature Publishing Group, 24(3), pp. 458–468. doi:10.1038/cdd.2016.142.
- Wang, X. (2003) "A PCR primer bank for quantitative gene expression analysis", *Nucleic Acids Research*, 31(24), pp. 154e – 154. doi:10.1093/nar/gng154.
- Wang, Y., Dong, D., Jiang, S., Zhang, E., Zheng, W., Mao, L., Li, W., Zhou, J., Fan, L., Cheng, R., Li, Z., Fang, Z., Gui, Y. and Li, X. (2018) "MiR-216b Post-Transcriptionally Downregulates Oncogene KRAS and Inhibits Cell Proliferation and Invasion in Clear Cell Renal Cell Carcinoma", *Cellular*

Physiology and Biochemistry. S. Karger AG, 49(5), pp. 1755–1765. doi:10.1159/000493621.

Wang, Y., Hu, X., Greshock, J., Shen, L., Yang, X., Shao, Z., Liang, S., Tanyi, J. L., Sood, A. K. and Zhang, L. (2012) "Genomic DNA Copy-Number Alterations of the let-7 Family in Human Cancers", *PLoS ONE*. Public Library of Science, 7(9), p. e44399. doi:10.1371/journal.pone.0044399.

Wang, Y., Medvid, R., Melton, C., Jaenisch, R. and Blelloch, R. (2007) "DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal", *Nature Genetics*. NIH Public Access, 39(3), pp. 380–385. doi:10.1038/ng1969.

Wang, Y. T., Tsai, P. C., Liao, Y. C., Hsu, C. Y. and Juo, S. H. H. (2013) "Circulating microRNAs have a sex-specific association with metabolic syndrome", *Journal of Biomedical Science*. BioMed Central, 20(1), p. 72. doi:10.1186/1423-0127-20-72.

Warner, G. J., Stoudt, G., Bamberger, M., Johnson, W. J. and Rothblat, G. H. (1995) "Cell toxicity induced by inhibition of acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase and accumulation of unesterified cholesterol", *Journal of Biological Chemistry*, 270(11), pp. 5772–5778. doi:10.1074/jbc.270.11.5772.

Waxman, D. J. and Holloway, M. G. (2009) "Sex differences in the expression of hepatic drug metabolizing enzymes", *Molecular Pharmacology*. American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, pp. 215–228. doi:10.1124/mol.109.056705.

Weber, J. A., Baxter, D. H., Zhang, S., Huang, D. Y., Huang, K. H., Lee, M. J., Galas, D. J. and Wang, K. (2010) "The microRNA spectrum in 12 body fluids", *Clinical Chemistry*, 56(11), pp. 1733–1741. doi:10.1373/clinchem.2010.147405.

Van De Wetering, M., Francies, H. E., Francis, J. M., Bounova, G., Iorio, F., Pronk, A., Van Houdt, W., Van Gorp, J., Taylor-Weiner, A., Kester, L., McLaren-Douglas, A., Blokker, J., Jaksani, S., Bartfeld, S., Volckman, R., Van Sluis, P., Li, V. S. W., Seepo, S., Sekhar Pedamallu, C., Cibulskis, K., Carter, S. L., McKenna, A., Lawrence, M. S., Lichtenstein, L., Stewart, C., Koster, J., Versteeg, R., Van Oudenaarden, A., Saez-Rodriguez, J., Vries, R. G. J., Getz, G., Wessels, L., Stratton, M. R., McDermott, U., Meyerson, M., Garnett, M. J. and Clevers, H. (2015) "Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients", *Cell*. Cell Press, 161(4), pp. 933–945. doi:10.1016/j.cell.2015.03.053.

Wightman, B., Ha, I. and Ruvkun, G. (1993) "Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*", *Cell*, 75(5), pp. 855–862. doi:10.1016/0092-8674(93)90530-4.

Wilhelm, L. P., Wendling, C., Védie, B., Kobayashi, T., Chenard, M., Tomasetto, C., Drin, G. and Alpy, F. (2017) "STARD 3 mediates endoplasmic reticulum-to-endosome cholesterol transport at membrane contact sites", *The EMBO Journal*. EMBO, 36(10), pp. 1412–1433. doi:10.15252/embj.201695917.

William Murray, B., Martinez, R., Lilly, E., Toshio Takahashi, U., Chen, S., Zhao, W., Liu, F., Huang, J., Ning, B. and Liu, Z. (2016) "Drug Discovery via Human-Derived Stem Cell Organoids", *Front. Pharmacol*, 7, p. 334. doi:10.3389/fphar.2016.00334.

de Wit, N. J., Bosch-Vermeulen, H., de Groot, P. J., Hooiveld, G. J., Bromhaar, M. M. G., Jansen, J., Müller, M. and van der Meer, R. (2008) "The role of the small intestine in the development of dietary fat-induced obesity and insulin resistance in C57BL/6J mice", *BMC Medical Genomics*. Springer Science and Business Media LLC, 1(1). doi:10.1186/1755-8794-1-14.

de Wit, N. J. W., Boekschoten, M. V., Bachmair, E. M., Hooiveld, G. J. E. J., de Groot, P. J., Rubio-Aliaga, I., Daniel, H. and Müller, M. (2011) "Dose-dependent effects of dietary fat on

development of obesity in relation to intestinal differential gene expression in C57BL/6J mice", *PLoS ONE*, 6(4). doi:10.1371/journal.pone.0019145.

Wojciechowska, A., Osiak, A. and Kozar-Kamińska, K. (2017) "MicroRNA in cardiovascular biology and disease", *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 26(5), pp. 868–874. doi:10.17219/acem/62915.

Wu, C., Jin, B., Chen, L., Zhuo, D., Zhang, Z., Gong, K. and Mao, Z. (2013) "MiR-30d induces apoptosis and is regulated by the Akt/FOXO pathway in renal cell carcinoma", *Cellular Signalling*. Pergamon, 25(5), pp. 1212–1221. doi:10.1016/j.cellsig.2013.01.028.

Wu, L., Fan, J. and Belasco, J. G. (2006) "MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA", *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 103(11), pp. 4034–4039. doi:10.1073/pnas.0510928103.

Wu, S., Huang, S., Ding, J., Zhao, Y., Liang, L., Liu, T., Zhan, R. and He, X. (2010) "Multiple microRNAs modulate p21Cip1/Waf1 expression by directly targeting its 3' untranslated region", *Oncogene*. Nature Publishing Group, 29(15), pp. 2302–2308. doi:10.1038/onc.2010.34.

Wu, X., Chen, W., Cai, H., Hu, J., Wu, B., Jiang, Y., Chen, X., Sun, D. and An, Y. (2018) "MiR-216b inhibits pancreatic cancer cell progression and promotes apoptosis by down-regulating KRAS", *Archives of Medical Science*. Termedia Publishing House Ltd., 14(6), pp. 1321–1332. doi:10.5114/aoms.2018.72564.

Wu, Y., Gao, C., Cai, S., Xia, M., Liao, G., Zhang, X. and Peng, J. (2019) "Circulating miR-122 Is a Predictor for Virological Response in CHB Patients With High Viral Load Treated With Nucleos(t)ide Analogs", *Frontiers in Genetics*. Frontiers Media SA, 10, p. 243. doi:10.3389/fgene.2019.00243.

Wu, Z., Han, Y., Li, Y., Li, X., Sun, T., Chen, G., Huang, Y., Zhou, Y. and Du, Z. (2016) "MIR-218-5p inhibits the stem cell properties and invasive ability of the A2B5+CD133- subgroup of human glioma stem cells", *Oncology Reports*. Spandidos Publications, 35(2), pp. 869–877. doi:10.3892/or.2015.4418.

Xiao, M., Li, J., Li, W., Wang, Y., Wu, F., Xi, Y., Zhang, L., Ding, C., Luo, H., Li, Y., Peng, L., Zhao, L., Peng, S., Xiao, Y., Dong, S., Cao, J. and Yu, W. (2017) "MicroRNAs activate gene transcription epigenetically as an enhancer trigger.", *RNA biology*. Taylor & Francis, 14(10), pp. 1326–1334. doi:10.1080/15476286.2015.1112487.

Xie, G., Wang, X., Zhao, A., Yan, J., Chen, W., Jiang, R., Ji, J., Huang, F., Zhang, Y., Lei, S., Ge, K., Zheng, X., Rajani, C., Alegado, R. A., Liu, J., Liu, P., Nicholson, J. and Jia, W. (2017) "Sex-dependent effects on gut microbiota regulate hepatic carcinogenic outcomes", *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 7. doi:10.1038/srep45232.

Xie, H., Lim, B. and Lodish, H. F. (2009) "MicroRNAs induced during adipogenesis that accelerate fat cell development are downregulated in obesity", *Diabetes*. American Diabetes Association, 58(5), pp. 1050–1057. doi:10.2337/db08-1299.

Xie, W., Li, P., Wang, Z., Chen, J., Lin, Z., Liang, X. and Mo, Y. (2014) "Rosuvastatin may reduce the incidence of cardiovascular events in patients with acute coronary syndromes receiving percutaneous coronary intervention by suppressing miR-155/SHIP-1 signaling pathway", *Cardiovascular Therapeutics*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 32(6), pp. 276–282. doi:10.1111/1755-5922.12098.

Xu, L., Yang, B. F. and Ai, J. (2013) "MicroRNA transport: A new way in cell communication", *Journal of Cellular Physiology*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1713–1719. doi:10.1002/jcp.24344.

- Xu, W., Lucas, A. S., Wang, Z. and Liu, Y. (2014) "Identifying microRNA targets in different gene regions", *BMC Bioinformatics*. BioMed Central, 15(Suppl 7), p. S4. doi:10.1186/1471-2105-15-S7-S4.
- Yang, J.-S., Maurin, T., Robine, N., Rasmussen, K. D., Jeffrey, K. L., Chandwani, R., Papapetrou, E. P., Sadelain, M., O'Carroll, D. and Lai, E. C. (2010) "Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis", *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 107(34), pp. 15163–15168. doi:10.1073/pnas.1006432107.
- Yang, J. S. and Lai, E. C. (2011) "Alternative miRNA Biogenesis Pathways and the Interpretation of Core miRNA Pathway Mutants", *Molecular Cell*. Cell Press, pp. 892–903. doi:10.1016/j.molcel.2011.07.024.
- Yang, M., Liu, W., Pellicane, C., Sahyoun, C., Joseph, B. K., Gallo-Ebert, C., Donigan, M., Pandya, D., Giordano, C., Bata, A., Nickels, J. T. and Jr. (2014) "Identification of miR-185 as a regulator of de novo cholesterol biosynthesis and low density lipoprotein uptake.", *Journal of lipid research*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 55(2), pp. 226–38. doi:10.1194/jlr.M041335.
- Yang, W. J., Yang, D. D., Na, S., Sandusky, G. E., Zhang, Q. and Zhao, G. (2005) "Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development", *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 280(10), pp. 9330–9335. doi:10.1074/jbc.M413394200.
- Yang, X., Schadt, E. E., Wang, S., Wang, H., Arnold, A. P., Ingram-Drake, L., Drake, T. A. and Lusis, A. J. (2006) "Tissue-specific expression and regulation of sexually dimorphic genes in mice", *Genome Research*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 16(8), pp. 995–1004. doi:10.1101/gr.5217506.
- Yang, X., Zhao, H., Yang, J., Ma, Y., Liu, Z., Li, C., Wang, T., Yan, Z. and Du, N. (2019) "MiR-150-5p regulates melanoma proliferation, invasion and metastasis via SIX1-mediated Warburg Effect", *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier B.V., 515(1), pp. 85–91. doi:10.1016/j.bbrc.2019.05.111.
- Yang, Y., Ma, Y., Shi, C., Chen, H., Zhang, H., Chen, N., Zhang, P., Wang, F., Yang, Jun, Yang, Jianjun, Zhu, Q., Liang, Y., Wu, W., Gao, R., Yang, Z., Zou, Y. and Qin, H. (2013) "Overexpression of miR-21 in patients with ulcerative colitis impairs intestinal epithelial barrier function through targeting the Rho GTPase RhoB", *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Academic Press, 434(4), pp. 746–752. doi:10.1016/j.bbrc.2013.03.122.
- Yao, G. D., Zhang, Y. F., Chen, P. and Ren, X. B. (2018) "MicroRNA-544 promotes colorectal cancer progression by targeting forkhead box O1", *Oncology Letters*. Spandidos Publications, 15(1), pp. 991–997. doi:10.3892/ol.2017.7381.
- Yao, J., Liang, L., Huang, S., Ding, J., Tan, N., Zhao, Y., Yan, M., Ge, C., Zhang, Z., Chen, T., Wan, D., Yao, M., Li, J., Gu, J. and He, X. (2010) "MicroRNA-30d promotes tumor invasion and metastasis by targeting galphai2 in hepatocellular carcinoma", *Hepatology*. John Wiley & Sons, Ltd, 51(3), pp. 846–856. doi:10.1002/hep.23443.
- Yao, Y. F., Li, Q. R. and Wang, H. (2018) "MiR-216b suppresses colorectal cancer proliferation, migration, and invasion by targeting SR PK1", *OncoTargets and Therapy*. Dove Medical Press Ltd., 11, pp. 1671–1681. doi:10.2147/OTT.S161835.
- Ye, D., Guo, S., Alsadi, R. and Ma, T. Y. (2011) "MicroRNA regulation of intestinal epithelial tight junction permeability", *Gastroenterology*. NIH Public Access, 141(4), pp. 1323–1333.

doi:10.1053/j.gastro.2011.07.005.

Ye, D., Wang, G., Liu, Y., Huang, W., Wu, M., Zhu, S., Jia, W., Deng, A. N. M., Liu, H. and Kang, J. (2012) "MiR-138 promotes induced pluripotent stem cell generation through the regulation of the P53 signaling", *Stem Cells*. John Wiley & Sons, Ltd, 30(8), pp. 1645–1654. doi:10.1002/stem.1149.

Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G. and Cullen, B. R. (2003) "Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs", *Genes and Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 17(24), pp. 3011–3016. doi:10.1101/gad.1158803.

Yin, H., Hu, M., Zhang, R., Shen, Z., Flatow, L. and You, M. (2012) "MicroRNA-217 promotes ethanol-induced fat accumulation in hepatocytes by down-regulating SIRT1", *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 287(13), pp. 9817–9826. doi:10.1074/jbc.M111.333534.

Yin, W. and Rogge, M. (2019) "Targeting RNA: A Transformative Therapeutic Strategy", *Clinical and Translational Science*. Blackwell Publishing Ltd, pp. 98–112. doi:10.1111/cts.12624.

Yu, H., Cook, T. J. and Sinko, P. J. (1997) "Evidence for diminished functional expression of intestinal transporters in Caco-2 cell monolayers at high passages", *Pharmaceutical Research*, 14(6), pp. 757–762. doi:10.1023/A:1012150405949.

Yu, H., Gao, G., Jiang, L., Guo, L., Lin, M., Jiao, X., Jia, W. and Huang, J. (2013) "Decreased expression of miR-218 is associated with poor prognosis in patients with colorectal cancer.", *International journal of clinical and experimental pathology*. e-Century Publishing Corporation, 6(12), pp. 2904–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24294377> (Accessed: February 10, 2020).

Yu, J., Wang, F., Yang, G. H., Wang, F. L., Ma, Y. N., Du, Z. W. and Zhang, J. W. (2006) "Human microRNA clusters: Genomic organization and expression profile in leukemia cell lines", *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Academic Press, 349(1), pp. 59–68. doi:10.1016/j.bbrc.2006.07.207.

Yui, S., Nakamura, T., Sato, T., Nemoto, Y., Mizutani, T., Zheng, X., Ichinose, S., Nagaishi, T., Okamoto, R., Tsuchiya, K., Clevers, H. and Watanabe, M. (2012) "Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5 + stem cell", *Nature Medicine*, 18(4), pp. 618–623. doi:10.1038/nm.2695.

Zekri, L., Huntzinger, E., Heimstadt, S. and Izaurralde, E. (2009) "The Silencing Domain of GW182 Interacts with PABPC1 To Promote Translational Repression and Degradation of MicroRNA Targets and Is Required for Target Release", *Molecular and Cellular Biology*. American Society for Microbiology (ASM), 29(23), pp. 6220–6231. doi:10.1128/mcb.01081-09.

Zernecke, A., Bidzhekov, K., Noels, H., Shagdarsuren, E., Gan, L., Denecke, B., Hristov, M., Köppel, T., Jahantigh, M. N., Lutgens, E., Wang, S., Olson, E. N., Schober, A. and Weber, C. (2009) "Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection", *Science Signaling*. American Association for the Advancement of Science, 2(100), pp. ra81–ra81. doi:10.1126/scisignal.2000610.

Zhang, H., Kolb, F. A., Jaskiewicz, L., Westhof, E. and Filipowicz, W. (2004) "Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III", *Cell*. Cell Press, 118(1), pp. 57–68. doi:10.1016/j.cell.2004.06.017.

Zhang, J., Li, X. Y., Hu, P. and Ding, Y. S. (2018) "LncRNA NORAD contributes to colorectal cancer progression by inhibition of miR-202-5p", *Oncology Research*. Cognizant Communication

Corporation, 26(9), pp. 1411–1418. doi:10.3727/096504018X15190844870055.

Zhang, L., Hou, D., Chen, X., Li, D., Zhu, L., Zhang, Y., Li, J., Bian, Z., Liang, X., Cai, X., Yin, Y., Wang, C., Zhang, T., Zhu, D., Zhang, D., Xu, J., Chen, Q., Ba, Y., Liu, J., Wang, Q., Chen, J., Wang, J., Wang, M., Zhang, Q., Zhang, J., Zen, K. and Zhang, C.-Y. (2012) "Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA", *Cell Research*. Nature Publishing Group, 22(1), pp. 107–126. doi:10.1038/cr.2011.158.

Zhang, R. and Su, B. (2009) "Small but influential: the role of microRNAs on gene regulatory network and 3'UTR evolution", *Journal of Genetics and Genomics*, 36(1), pp. 1–6. doi:10.1016/S1673-8527(09)60001-1.

Zhang, R., Xu, J., Zhao, J. and Bai, J. (2017) "Mir-30d suppresses cell proliferation of colon cancer cells by inhibiting cell autophagy and promoting cell apoptosis", *Tumor Biology*. SAGE Publications Ltd, 39(6), p. 1010428317703984. doi:10.1177/1010428317703984.

Zhang, W., Jia, J., Liu, Z., Si, D., Ma, L. and Zhang, G. (2019) "Circulating microRNAs as biomarkers for Sepsis secondary to pneumonia diagnosed via Sepsis 3.0", *BMC Pulmonary Medicine*, 19(1), p. 93. doi:10.1186/s12890-019-0836-4.

Zhang, X., Wang, Z., Li, W., Huang, R., Zheng, D. and Bi, G. (2019) "MicroRNA-217-5p ameliorates endothelial cell apoptosis induced by ox-LDL by targeting CLIC4", *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.numecd.2019.09.027.

Zhang, X., Zuo, X., Yang, B., Li, Z., Xue, Y., Zhou, Y., Huang, J., Zhao, X., Zhou, J., Yan, Y., Zhang, H., Guo, P., Sun, H., Guo, L., Zhang, Y. and Fu, X. D. (2014) "MicroRNA directly enhances mitochondrial translation during muscle differentiation", *Cell*. NIH Public Access, 158(3), pp. 607–619. doi:10.1016/j.cell.2014.05.047.

Zhang, Y. G., Wu, S., Xia, Y. and Sun, J. (2014) "Salmonella-infected crypt-derived intestinal organoid culture system for host–bacterial interactions", *Physiological Reports*. American Physiological Society, 2(9). doi:10.14814/phy2.12147.

Zhang, Y., Viennois, E., Zhang, M., Xiao, B., Han, M. K., Walter, L., Garg, P. and Merlin, D. (2016) "PepT1 Expression Helps Maintain Intestinal Homeostasis by Mediating the Differential Expression of miRNAs along the Crypt-Villus Axis", *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6, p. 27119. doi:10.1038/srep27119.

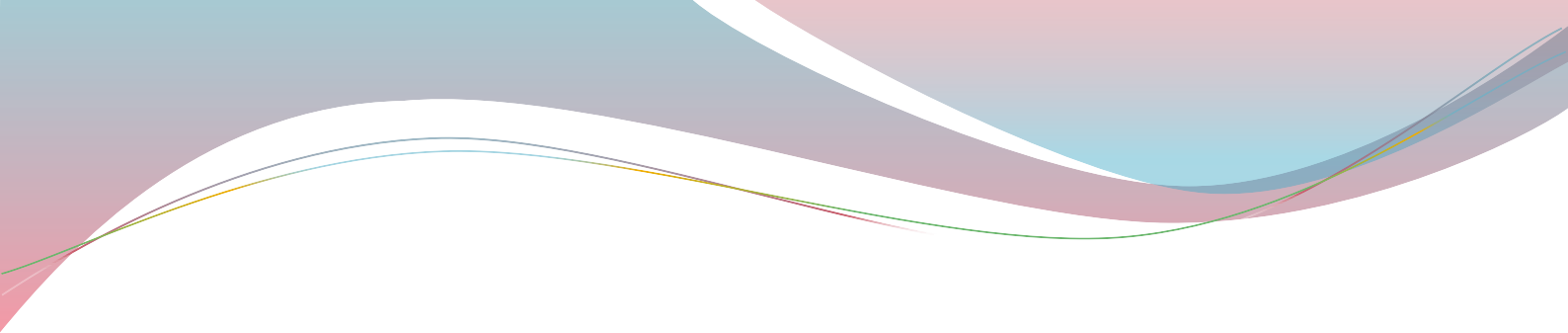
Zhao, H. J., Ren, L. L., Wang, Z. H., Sun, T. T., Yu, Y. N., Wang, Y. C., Yan, T. T., Zou, W., He, J., Zhang, Y., Hong, J. and Fang, J. Y. (2014) "MiR-194 deregulation contributes to colorectal carcinogenesis via targeting AKT2 pathway", *Theranostics*, 4(12), pp. 1193–1208. doi:10.7150/thno.8712.

Zhao, Y., Ransom, J. F., Li, A., Vedantham, V., von Drehle, M., Muth, A. N., Tsuchihashi, T., McManus, M. T., Schwartz, R. J. and Srivastava, D. (2007) "Dysregulation of Cardiogenesis, Cardiac Conduction, and Cell Cycle in Mice Lacking miRNA-1-2", *Cell*. Cell Press, 129(2), pp. 303–317. doi:10.1016/j.cell.2007.03.030.

Zheng, D., Wang, X., Antonson, P., Gustafsson, J. Å. and Li, Z. (2018) "Genomics of sex hormone receptor signaling in hepatic sexual dimorphism", *Molecular and Cellular Endocrinology*. Elsevier Ireland Ltd, 471, pp. 33–41. doi:10.1016/j.mce.2017.05.025.

Zheng, S., Hoos, L., Cook, J., Tetzloff, G., Davis, H., van Heek, M. and Hwa, J. J. (2008) "Ezetimibe improves high fat and cholesterol diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice", *European Journal of Pharmacology*. Elsevier, 584(1), pp. 118–124. doi:10.1016/j.ejphar.2008.01.045.

- Zhi, Q., Guo, X., Guo, L., Zhang, R., Jiang, J., Ji, J., Zhang, Jianian, Zhang, Jun, Chen, X., Cai, Q., Li, jianfang, Liu, B., Zhu, Z. and Yu, Y. (2013) "Oncogenic miR-544 is an Important Molecular Target in Gastric Cancer", *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. Bentham Science Publishers Ltd., 13(2), pp. 270–275. doi:10.2174/1871520611313020013.
- Zhou, F. and Zempleni, J. (2019) "Maternal Dicer Knockout Impairs Growth and Gut Health in Nursing Wild-type Pups in Mice (P11-137-19)", *Current Developments in Nutrition*. American Society for Nutrition, 3(Supplement_1). doi:10.1093/cdn/nzz048.p11-137-19.
- Zhou, Q., Costinean, S., Croce, C. M., Brasier, A. R., Merwat, S., Larson, S. A., Basra, S. and Verne, G. N. (2015) "MicroRNA 29 targets nuclear factor- κ B-repressing factor and claudin 1 to increase intestinal permeability", *Gastroenterology*. W.B. Saunders, 148(1), pp. 158-169.e8. doi:10.1053/j.gastro.2014.09.037.
- Zhou, Q., Li, M., Wang, Xiaoyan, Li, Q., Wang, T., Zhu, Q., Zhou, X., Wang, Xin, Gao, X. and Li, X. (2011) "Immune-related microRNAs are abundant in breast milk exosomes", *International Journal of Biological Sciences*. Ivyspring International Publisher, 8(1), pp. 118–123. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22211110> (Accessed: May 26, 2019).
- Zhou, Q., Souba, W. W., Croce, C. M. and Verne, G. N. (2010) "MicroRNA-29a regulates intestinal membrane permeability in patients with irritable bowel syndrome", *Gut*, 59(6), pp. 775–784. doi:10.1136/gut.2009.181834.
- Zhu, B., Chen, H., Zhang, X., Pan, Y., Jing, R., Shen, L., Wang, X., Ju, S., Jin, C. and Cong, H. (2018) "Serum miR-30d as a novel biomarker for multiple myeloma and its antitumor role in U266 cells through the targeting of the MTDH/PI3K/Akt signaling pathway", *International Journal of Oncology*. Spandidos Publications, 53(5), pp. 2131–2144. doi:10.3892/ijo.2018.4532.
- Zhu, J. and Han, S. (2019) "miR-150-5p promotes the proliferation and epithelial-mesenchymal transition of cervical carcinoma cells via targeting SRCIN1", *Pathology Research and Practice*. Elsevier GmbH, 215(4), pp. 738–747. doi:10.1016/j.prp.2019.01.004.
- Zhu, K., Ding, H., Wang, W., Liao, Z., Fu, Z., Hong, Y., Zhou, Y., Zhang, C. Y. and Chen, X. (2016) "Tumor-suppressive miR-218-5p inhibits cancer cell proliferation and migration via EGFR in non-small cell lung cancer", *Oncotarget*. Impact Journals LLC, 7(19), pp. 28075–28085. doi:10.18632/oncotarget.8576.
- Zhu, W. and Ji, X. (2019) "The Impact of MicroRNA-133a on Prognosis and Clinicopathological Parameters for Digestive System Cancers: a Comprehensive Study Based on Meta-Analysis and TCGA Database", *Pathology and Oncology Research*. doi:10.1007/s12253-019-00619-y.
- Zwaka, T. P., Hombach, V. and Torzewski, J. (2001) "C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: Implications for atherosclerosis", *Circulation*. Lippincott Williams and Wilkins, 103(9), pp. 1194–1197. doi:10.1161/01.CIR.103.9.1194.



ANEXOS

1. TABLAS SUPLEMENTARIAS

Tabla suplementaria 1. Datos de la dieta aterogénica comercial para roedores TD 02028.

Fórmula g/Kg		
Caseína	195.0	
DL-Metionina	3.0	
Sacarosa	325.46	
Almidón de maíz	150.0	
Grasa de leche anhidra	210.0	
Colesterol	12.5	
Ácido cólico	5.0	
Celulosa	50.0	
Mezcla de minerales, AIN-76 (170915)	35.0	
Carbonato cálcico	4.0	
Mezcla de vitamina, Teklad (40060)	10.0	
Etoxiquina, antioxidante	0.04	
Información nutricional		
	% por peso	% Kcal de
Proteínas	17.3	15.4
Carbohidratos	46.9	41.9
Grasas	21.2	42.6
Kcal/g	4.5	

Fórmula e información nutricional de la dieta aterogénica comercial suministrada a los animales durante los experimentos “Long” y “Short”. Se trata de una modificación de la dieta TD88137 para incrementar el colesterol añadido a 1.25% y agregar 0,5% de ácido cólico.

Tabla suplementaria 2. Lista de genes incluidos en *Lipoprotein Signaling and Cholesterol Metab RT 2 Profiler PCR Array*.

Lista de genes	
Receptores de LDL	Cxcl16, Ldlr, Lrp10, Lrp12, Lrp1b, Lrp6, Olr1, Stab1, Stab2, Vldlr.
Proteínas asociadas al receptor de LDL	Lrpap1, Pcsk9, Snx17.
Proteínas asociadas a LDL	Ankra2, Apoa4, Cdh13, Colec12, Crp, Scarf1, Sorl1.
Proteínas Asociadas HDL	Apoa1, Apod, Apof, Apol8.
Transportadores de colesterol	Abca1, Abcg1, Apoa1, Apoe, Stard3.
Flujo de colesterol	Abca1, Abcg1, Apoa1, Apoa4, Apoe.
Transporte inverso del colesterol	Abca1, Apoa1, Apoa2, Apoa4, Apoe, Lcat.
Otros genes transporte del colesterol	Apob, Ldlr, Npc1l1, Osbpl5.
Absorción del colesterol	Cel, Ldlr, Npc1l1.
Catabolismo del colesterol	Akr1d1, Apoe, Cel, Cyp39a1, Cyp46a1, Cyp7a1, Scarf1, Snx17, Trerf1.
Homeostasis del colesterol	Abca1, Abcg1, Angptl3, Apoa1, Apoa2, Apoa4, Apoe, Lcat, Ldlr, Ldlrap1, Pcsk9.
Biosíntesis de colesterol	Acaa2, Cnbp, Cyb5r3, Cyp51, Dhcr24, Dhcr7, Ebp, Fdft1, Fdps, Hmgcr, Hmgcs1, Hmgcs2, Idi1, Idi2, Mvd, Mvk, Npc1l1, Nsdhl, Pmvk, Prkaa1, Prkaa2, Prkag2, Tm7sf2.
Otros genes metabolismo del colesterol	Abca2, Apob, Apoc3, Apof, Apol8, Cyp11a1, Cyp7b1, Cela3b, Hdlbp, Il4, Insig1, Insig2, Lep, Lipe, Mbtps1, Nr0b2, Nr1h4, Osbpl1a, Osbpl5, Ppard, Scap, Soat1, Soat2, Sorl1, Srebf1, Srebf2, Stard3, Vldlr.

Clasificación de la lista de genes incluidos en el *array*.

Tabla suplementaria 3. Tabla de genes según el diseño de la matriz.

Posición	UniGene	GenBank	Símbolo	Descripción
A01	Mm.277376	NM_013454	Abca1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1
A02	Mm.2210	NM_007379	Abca2	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 2
A03	Mm.470747	NM_009593	Abcg1	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1
A04	Mm.245724	NM_177470	Acaa2	Acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2 (mitochondrial 3-oxoacyl-Coenzyme A thiolase)
A05	Mm.262635	NM_145364	Akr1d1	Aldo-keto reductase family 1, member D1
A06	Mm.28341	NM_013913	Angptl3	Angiopoietin-like 3
A07	Mm.491346	NM_023472	Ankra2	Ankyrin repeat, family A (RFXANK-like), 2
A08	Mm.26743	NM_009692	Apoa1	Apolipoprotein A-I
A09	Mm.389209	NM_013474	Apoa2	Apolipoprotein A-II
A10	Mm.4533	NM_007468	Apoa4	Apolipoprotein A-IV
A11	Mm.221239	NM_009693	Apob	Apolipoprotein B
A12	Mm.390161	NM_023114	Apoc3	Apolipoprotein C-III
B01	Mm.2082	NM_007470	Apod	Apolipoprotein D
B02	Mm.305152	NM_009696	ApoE	Apolipoprotein E
B03	Mm.26513	NM_133997	Apof	Apolipoprotein F
B04	Mm.125650	NM_001081970	Apol8	Apolipoprotein L 8
B05	Mm.334841	NM_019707	Cdh13	Cadherin 13
B06	Mm.236017	NM_009885	Cel	Carboxyl ester lipase
B07	Mm.297477	NM_026419	Cela3b	Chymotrypsin-like elastase family, member 3B
B08	Mm.290251	NM_013493	Cnbp	Cellular nucleic acid binding protein
B09	Mm.218571	NM_130449	Colec12	Collectin sub-family member 12
B10	Mm.28767	NM_007768	Crp	C-reactive protein, pentraxin-related
B11	Mm.425692	NM_023158	Cxcl16	Chemokine (C-X-C motif) ligand 16
B12	Mm.22560	NM_029787	Cyb5r3	Cytochrome b5 reductase 3
C01	Mm.302865	NM_019779	Cyp11a1	Cytochrome P450, family 11, subfamily a, polypeptide 1
C02	Mm.17991	NM_018887	Cyp39a1	Cytochrome P450, family 39, subfamily a, polypeptide 1
C03	Mm.41911	NM_010010	Cyp46a1	Cytochrome P450, family 46, subfamily a, polypeptide 1
C04	Mm.140158	NM_020010	Cyp51	Cytochrome P450, family 51
C05	Mm.57029	NM_007824	Cyp7a1	Cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1
C06	Mm.316000	NM_007825	Cyp7b1	Cytochrome P450, family 7, subfamily b, polypeptide 1
C07	Mm.133370	NM_053272	Dhcr24	24-dehydrocholesterol reductase
C08	Mm.249342	NM_007856	Dhcr7	7-dehydrocholesterol reductase
C09	Mm.27183	NM_007898	Ebp	Phenylalkylamine Ca ²⁺ antagonist (emopamil) binding protein
C10	Mm.474432	NM_010191	Fdft1	Farnesyl diphosphate farnesyl transferase 1
C11	Mm.490094	NM_134469	Fdps	Farnesyl diphosphate synthetase
C12	Mm.30012	NM_133808	Hdlbp	High density lipoprotein (HDL) binding protein
D01	Mm.316652	NM_008255	Hmgcr	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase
D02	Mm.61526	NM_145942	Hmgcs1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1
D03	Mm.289131	NM_008256	Hmgcs2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2
D04	Mm.29847	NM_145360	Idi1	Isopentenyl-diphosphate delta isomerase
D05	Mm.313743	NM_177197	Idi2	Isopentenyl-diphosphate delta isomerase 2
D06	Mm.276360	NM_021283	Il4	Interleukin 4
D07	Mm.30221	NM_153526	Insig1	Insulin induced gene 1
D08	Mm.486216	NM_178082	Insig2	Insulin induced gene 2
D09	Mm.1593	NM_008490	Lcat	Lecithin cholesterol acyltransferase
D10	Mm.3213	NM_010700	Ldlr	Low density lipoprotein receptor
D11	Mm.482148	NM_145554	Ldlrap1	Low density lipoprotein receptor adaptor protein 1
D12	Mm.277072	NM_008493	Lep	Leptin
E01	Mm.158548	NM_010719	Lipe	Lipase, hormone sensitive
E02	Mm.472719	NM_022993	Lrp10	Low-density lipoprotein receptor-related protein 10
E03	Mm.39874	NM_172814	Lrp12	Low density lipoprotein-related protein 12
E04	Mm.441398	NM_053011	Lrp1b	Low density lipoprotein-related protein 1B (deleted in tumors)
E05	Mm.321990	NM_008514	Lrp6	Low density lipoprotein receptor-related protein 6
E06	Mm.277661	NM_013587	Lrpap1	Low density lipoprotein receptor-related protein associated protein 1
E07	Mm.206934	NM_019709	Mbtps1	Membrane-bound transcription factor peptidase, site 1
E08	Mm.28146	NM_138656	Mvd	Mevalonate (diphospho) decarboxylase
E09	Mm.28088	NM_023556	Mvk	Mevalonate kinase

E10	Mm.212492	NM_207242	Npc1l1	NPC1-like 1
E11	Mm.346759	NM_011850	Nr0b2	Nuclear receptor subfamily 0, group B, member 2
E12	Mm.3095	NM_009108	Nr1h4	Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4
F01	Mm.38792	NM_010941	Nsdhl	NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like
F02	Mm.293626	NM_138648	Olr1	Oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1
F03	Mm.259470	NM_207530	Osbpl1a	Oxysterol binding protein-like 1A
F04	Mm.21199	NM_024289	Osbpl5	Oxysterol binding protein-like 5
F05	Mm.133268	NM_153565	Pcsk9	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
F06	Mm.34242	NM_026784	Pmvk	Phosphomevalonate kinase
F07	Mm.328914	NM_011145	Ppard	Peroxisome proliferator activator receptor delta
F08	Mm.27004	NM_001013367	Prkaa1	Protein kinase, AMP-activated, alpha 1 catalytic subunit
F09	Mm.48638	NM_178143	Prkaa2	Protein kinase, AMP-activated, alpha 2 catalytic subunit
F10	Mm.33649	NM_145401	Prkag2	Protein kinase, AMP-activated, gamma 2 non-catalytic subunit
F11	Mm.288741	NM_001001144	Scap	SREBF chaperone
F12	Mm.10486	NM_001004157	Scarf1	Scavenger receptor class F, member 1
G01	Mm.6118	NM_153680	Snx17	Sorting nexin 17
G02	Mm.28099	NM_009230	Soat1	Sterol O-acyltransferase 1
G03	Mm.358862	NM_146064	Soat2	Sterol O-acyltransferase 2
G04	Mm.121920	NM_011436	Sorl1	Sortilin-related receptor, LDLR class A repeats-containing
G05	Mm.278701	NM_011480	Srebf1	Sterol regulatory element binding transcription factor 1
G06	Mm.38016	NM_033218	Srebf2	Sterol regulatory element binding factor 2
G07	Mm.220821	NM_138672	Stab1	Stabilin 1
G08	Mm.279611	NM_138673	Stab2	Stabilin 2
G09	Mm.489827	NM_021547	Stard3	START domain containing 3
G10	Mm.489613	NM_028454	Tm7sf2	Transmembrane 7 superfamily member 2
G11	Mm.260989	NM_172622	Trerf1	Transcriptional regulating factor 1
G12	Mm.4141	NM_013703	Vldlr	Very low density lipoprotein receptor
H01	Mm.391967	NM_007393	Actb	Actin, beta
H02	Mm.163	NM_009735	B2m	Beta-2 microglobulin
H03	Mm.304088	NM_008084	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H04	Mm.3317	NM_010368	Gusb	Glucuronidase, beta
H05	Mm.2180	NM_008302	Hsp90ab1	Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1
H06	N/A	SA_00106	MGDC	Mouse Genomic DNA Contamination
H07	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H08	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H09	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H10	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H11	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H12	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control

Tabla de genes según el diseño de la matriz *RT2 Profiler PCR Array Mouse Lipoprotein Signaling & Cholesterol Metabolism*.**Tabla suplementaria 4. miRNAs comunes para los genes candidatos entre las diferentes herramientas de predicción utilizadas.**

GEN	miRNAs COMUNES	
<i>Hmgcs2</i>	TargetScan, miRWalk y DIANA-TarBase	miR-497a-5p, miR-193b-3p, miR-193a-3p, miR-194-2-3p
	TargetScan y DIANA-TarBase	miR-322-5p, miR-195a-5p, miR-16-5p, miR-15a-5p, miR-126a-5p, miR-692, miR-215-5p, miR-192-5p
	miRWalk y DIANA-TarBase	miR-125a-3p, miR-140-3p, miR-145a-3p, miR-328-3p, miR-671-5p, miR-421-3p, miR-1954
	TargetScan y miRWalk	miR-669h-5p, miR-409-3p, miR-6349, miR-7059-5p, miR-7211-5p, miR-6384, miR-6901-3p, miR-7019-3p, miR-7056-3p, miR-7242-3p, miR-6419, miR-1907, miR-15b-5p, miR-6388, miR-7656-5p, miR-6963-5p, miR-1938, miR-6988-5p, miR-7078-5p, miR-698-5p, miR-7682-3p, miR-6966-3p, miR-7038-3p, miR-3108-3p, miR-6979-3p, miR-1962, miR-7068-5p, miR-879-5p, miR-8114, miR-7062-5p, miR-6979-5p, miR-1943-5p, miR-7016-5p, miR-6967-5p, miR-149-3p, miR-6965-5p, miR-7235-5p, miR-7047-5p, miR-3103-5p, miR-27b-3p, miR-6985-3p, miR-673-5p, miR-3473a, miR-185-5p, miR-504-3p, miR-344g-5p, miR-344-5p, miR-344d-1-5p, miR-344d-3-5p, miR-344c-5p, miR-1970, miR-6992-5p, miR-6918-3p, miR-107-3p, miR-103-3p, miR-383-3p, miR-1934-5p, miR-133b-5p, miR-28c, miR-28b, miR-6986-5p, miR-7072-5p, miR-6418-5p, miR-3076-5p, miR-6937-3p, miR-6976-3p, miR-343, miR-6925-3p, miR-6949-3p, miR-7017-3p, miR-324-5p, miR-1950, miR-3092-5p, miR-7053-5p, miR-7231-5p, miR-3572-5p, miR-7118-5p, miR-491-5p, miR-7003-5p, miR-5129-5p, miR-1946a, miR-7052-3p, miR-7215-3p, miR-7083-3p, miR-3552, miR-6937-5p, miR-7026-5p, miR-7031-5p, miR-129b-5p, miR-130a-5p, miR-

		7215-5p, miR-6896-3p, miR-7028-3p, miR-207, miR-6946-3p, miR-7225-3p, miR-6909-3p, miR-511-5p, miR-431-5p, miR-7084-3p, miR-6934-3p, miR-877-3p, miR-7214-3p, miR-124-5p, miR-668-5p, miR-7677-5p, miR-8091, miR-7211-3p, miR-3060-5p, miR-7056-5p, miR-6372, miR-6516-5p, miR-3084-3p, miR-6962-3p, miR-216c-3p, miR-7043-3p, miR-7015-5p, miR-6965-3p, miR-6922-3p, miR-2136, miR-7055-5p, miR-6926-5p, miR-1197-3p, miR-6996-3p, miR-3535, miR-376b-5p, miR-6938-3p, miR-7671-5p, miR-149-5p, miR-370-3p, miR-883b-5p, miR-6985-5p, miR-1894-3p, miR-351-3p, miR-200c-3p, miR-429-3p, miR-678, miR-6898-3p, miR-1251-3p, miR-3101-3p, miR-7231-3p, miR-686, miR-129-5p, miR-6969-3p, miR-5101, miR-3112-3p, miR-6537-5p, miR-501-5p
	TargetScan, miRWalk y DIANA-TarBase	miR-365-3p
	TargetScan y DIANA-TarBase	miR-223-3p, miR-1a-3p
	miRWalk y DIANA-TarBase	let-7g-5p, miR-124-3p
Olr1	TargetScan y miRWalk	miR-200b-3p, miR-200c-3p, miR-31-5p, miR-6370, miR-149-5p, miR-7087-3p, miR-7679-5p, miR-7116-5p, miR-7094-1-5p, miR-6928-5p, miR-7003-5p, miR-491-5p, miR-5129-5p, miR-6358, miR-6376, miR-292b-3p, miR-125a-3p, miR-7033-5p, miR-509-5p, miR-3057-3p, miR-188-3p, miR-27a-5p, miR-3061-5p, miR-6949-5p, miR-6946-5p, miR-361-3p, miR-6975-3p, miR-452-3p, miR-3569-3p, miR-344f-5p, miR-5119, miR-3084-3p, miR-6962-3p, miR-652-5p, miR-7012-3p, miR-6385, miR-211-3p, miR-6906-5p, miR-92a-1-5p, miR-29b-1-5p, miR-326-3p, miR-330-5p, miR-6898-3p, miR-351-3p, miR-1898, miR-19b-1-5p, miR-668-5p, miR-467e-5p, miR-3073a-3p, miR-1912-3p, miR-7090-5p, miR-669k-5p, miR-1927, miR-25-3p, miR-207, miR-495-3p, miR-6913-3p, miR-7116-3p, miR-296-3p, miR-3473f, miR-669a-3-3p, miR-669a-3p, miR-669o-3p, miR-669h-3p, miR-669k-3p, miR-7670-5p, miR-7229-5p, let-7f-2-3p, miR-669m-3p, miR-467b-3p, miR-467d-3p, miR-467c-3p, miR-467e-3p, miR-467f, let-7a-1-3p, let-7b-3p, let-7c-2-3p, miR-669l-3p, miR-669d-2-3p, miR-3475-5p, miR-96-3p, miR-3572-5p, miR-1894-3p, miR-3089-5p, miR-1195, miR-6537-5p, miR-1955-3p, miR-504-5p, miR-7006-3p, miR-7670-3p, miR-129b-5p, miR-677-5p, miR-486b-3p, miR-486a-3p, miR-5112, miR-5623-5p, miR-7242-3p, miR-6998-5p, miR-5107-5p, miR-7676-5p, miR-6408, miR-7237-5p, miR-8098, miR-7686-5p, miR-7048-3p, miR-7077-3p, miR-141-5p, miR-6769b-3p, miR-669p-3p, miR-5619-5p, miR-1958, miR-8097, miR-7661-5p, miR-7241-3p, miR-6238, miR-450b-3p, miR-6352, miR-1892, miR-7662-3p, miR-505-5p, miR-7080-5p, miR-28a-5p, miR-708-5p, miR-7021-5p, miR-7659-5p, miR-5133, miR-6972-5p, miR-5114, miR-3475-3p, miR-7094b-2-5p, miR-3099-5p, miR-677-3p, miR-7007-5p, miR-3074-2-3p, miR-1942, miR-6388, miR-7018-5p, miR-7236-5p, miR-205-3p, miR-6899-3p, miR-6948-3p, miR-1948-5p, miR-6920-5p, miR-339-3p, miR-6925-5p, miR-7051-5p, miR-320-5p, miR-6346, miR-6350, miR-761, miR-214-3p, miR-383-3p, miR-466q, miR-7018-3p, miR-7023-3p, miR-7080-3p, miR-3079-3p, miR-7070-3p, miR-344g-3p, miR-6996-5p, miR-7227-5p, miR-3061-3p, miR-7004-5p, miR-7682-3p, miR-7021-3p, miR-6362, miR-7242-5p, miR-1912-5p, miR-3106-5p, miR-7217-5p, miR-3105-5p, miR-7220-5p, miR-7025-5p, miR-466d-5p, miR-466k, miR-466i-5p, miR-6903-3p, miR-466n-5p, miR-669n, miR-7043-3p, miR-7221-3p, miR-134-5p, miR-497a-3p, miR-6900-5p, miR-7665-3p, miR-496a-5p, miR-453, miR-3066-5p, miR-7227-3p, miR-6984-5p, miR-7668-5p, miR-3470b, miR-742-3p, miR-3473g, miR-292b-5p, miR-8117, miR-488-5p, miR-7033-3p, miR-802-3p, miR-1264-5p, miR-6397, miR-139-3p, miR-6950-5p, miR-490-3p, miR-196b-5p, miR-196a-5p, miR-6356, miR-664-3p, miR-3058-5p, miR-6981-3p, miR-3100-5p, miR-7052-5p, miR-6963-5p, miR-7656-5p, miR-6922-5p, miR-705, miR-6993-5p, miR-6935-5p, miR-7008-5p, miR-134-3p, miR-3620-5p, miR-7229-3p, miR-542-3p, miR-3100-3p, miR-7010-3p, miR-6942-3p, miR-7653-5p, miR-466g, miR-7022-3p, miR-669c-3p, miR-7212-3p, miR-302d-5p, miR-302b-5p, miR-466i-3p, miR-760-5p, miR-3113-3p, miR-6379, miR-7688-3p, miR-7652-3p, miR-6943-3p, miR-6949-3p, miR-7084-3p, miR-1968-3p, miR-1224-3p, miR-7681-3p, miR-325-5p, miR-448-3p, miR-669j, miR-669i, miR-221-3p, miR-222-3p, miR-146a-5p, miR-6991-5p, miR-6387, miR-6349, miR-206-3p, miR-7210-5p, miR-7218-5p, miR-346-3p, miR-7001-5p, miR-3544-5p, miR-488-3p, miR-471-3p, miR-217-3p, miR-200c-5p, miR-682, miR-6516-5p, miR-3112-3p, miR-6366, miR-494-5p, miR-3970, miR-377-5p, miR-672-5p, miR-329-5p, miR-193b-5p, miR-7009-5p, miR-6964-5p, miR-450a-2-3p, miR-5120, miR-27a-3p, miR-27b-3p, miR-673-5p, miR-409-5p, miR-1933-5p, miR-1199-3p, miR-743b-5p, miR-6948-5p, miR-7215-5p, miR-692, miR-7065-3p, miR-29b-2-5p, miR-6715-3p, miR-466l-3p, miR-9769-5p, miR-96-5p, miR-7674-3p, miR-532-3p, miR-693-3p, miR-6363, miR-6896-5p, miR-34a-3p, miR-6537-3p, miR-361-5p, miR-470-5p, miR-19a-5p, miR-199a-3p, miR-199b-3p, miR-7042-5p, miR-6407, miR-873a-3p, miR-7031-5p, miR-181d-5p, miR-181a-5p, miR-5620-5p, miR-7689-5p, miR-6360, miR-145b, miR-145a-5p, miR-5624-3p, miR-6540-5p, miR-5625-3p, miR-6371, miR-7211-3p, miR-8091, miR-7050-5p, miR-344i, miR-7053-5p, miR-3092-5p, miR-6980-5p, miR-6941-5p, miR-7119-5p, miR-7023-5p, miR-7024-5p, miR-7069-5p, miR-3060-3p, miR-493-5p, miR-669c-5p, miR-192-3p, miR-3109-3p, miR-5627-3p, miR-344d-3-5p, miR-344d-1-5p, miR-344c-5p, miR-344g-5p, miR-344b-5p, miR-344-5p, miR-7089-3p, miR-3473c, miR-7649-3p, miR-6393, miR-6920-3p, miR-18b-3p, miR-135a-2-3p, miR-7046-5p, miR-135b-3p, miR-6937-5p, miR-127-5p, miR-1896, miR-216b-5p, miR-6337, miR-7047-5p, miR-5110, miR-7081-5p, miR-8100, miR-7011-5p, miR-6982-5p, miR-7056-5p, miR-363-5p, miR-493-3p, miR-3084-5p, miR-219a-1-3p, miR-7053-3p, miR-3058-3p, miR-93-3p, miR-3098-3p, miR-683, miR-674-3p, miR-7647-3p, miR-8095, miR-6237, miR-3618-3p, miR-710, miR-125b-2-

		3p, miR-3059-5p, miR-29a-5p, miR-691, miR-378a-5p, miR-3074-5p, miR-466f-3p, miR-6343, miR-652-3p, miR-16-2-3p, miR-744-5p, miR-503-5p, miR-302a-3p, miR-302d-3p, miR-93-5p, miR-17-5p, miR-20b-5p, miR-106a-5p, miR-7049-5p, miR-6955-3p, miR-3085-5p, miR-7014-5p, miR-669h-5p, miR-698-5p, miR-7078-5p, miR-3086-3p, miR-543-3p, miR-743a-5p, miR-871-5p, miR-5132-3p, miR-6359, miR-191-3p, miR-7063-3p, miR-6999-3p, miR-7087-5p, miR-704, miR-7661-3p, miR-3077-3p, miR-8103, miR-208b-5p, miR-208a-5p, miR-6415
Soat1	TargetScan, miRWalk y DIANA-TarBase	miR-186-5p, miR-381-3p, miR-23a-3p, miR-378a-3p, miR-15a-5p, miR-15b-5p
	TargetScan y DIANA-TarBase	miR-23b-3p, miR-16-5p, miR-142a-5p
	miRWalk y DIANA-TarBase	miR-29b-3p, miR-152-3p, miR-181a-5p, miR-204-5p, miR-122-5p, miR-20a-5p, miR-21a-3p, miR-29a-3p, miR-29c-3p, miR-31-5p, miR-92a-3p, miR-210-3p, miR-378a-5p, miR-675-3p, miR-706, miR-92b-3p
	TargetScan y miRWalk	miR-501-3p, miR-500-3p, miR-590-5p, let-7b-5p, let-7g-5p, let-7e-5p, let-7c-5p, let-7d-5p, miR-98-5p, let-7i-5p, miR-1961, let-7k, let-7a-5p, let-7f-5p, miR-6343, miR-6937-5p, miR-216c-3p, miR-6908-5p, miR-6996-5p, miR-493-3p, miR-340-3p, miR-337-3p, miR-674-3p, miR-6999-3p, miR-30a-3p, miR-30d-3p, miR-7006-3p, miR-1966-3p, miR-6946-3p, miR-1903, miR-10b-3p, miR-7033-5p, miR-207, miR-7028-3p, miR-6910-3p, miR-5709-3p, miR-7670-5p, miR-205-3p, miR-5098, miR-8099, miR-351-3p, miR-1936, miR-6537-3p, miR-465a-3p, miR-465c-3p, miR-465b-3p, miR-6372, miR-7674-5p, miR-1902, miR-1934-5p, miR-133b-5p, miR-107-5p, miR-103-2-5p, miR-103-1-5p, miR-7231-3p, miR-686, miR-6943-3p, miR-470-3p, miR-6938-3p, miR-5116, miR-742-5p, miR-199b-5p, miR-199a-5p, miR-6953-5p, miR-6921-5p, miR-423-5p, miR-1249-5p, miR-6982-5p, miR-1843b-5p, miR-3057-5p, miR-6397, miR-6913-5p, miR-30c-2-3p, miR-30c-1-3p, miR-6958-5p, miR-1941-5p, miR-504-3p, miR-6995-5p, miR-1982-5p, miR-92a-1-5p, miR-380-5p, miR-5615-5p, miR-8095, miR-7074-5p, miR-7118-5p, miR-6901-5p, miR-6715-5p, miR-344g-5p, miR-344d-1-5p, miR-344c-5p, miR-344d-3-5p, miR-344b-5p, miR-344-5p, miR-7665-3p, miR-6240, miR-873a-3p, miR-7086-5p, miR-7084-5p, miR-877-5p, miR-1839-5p, miR-202-3p, miR-6985-5p, miR-883b-5p, miR-764-3p, miR-3058-3p, miR-7681-5p, miR-7237-3p, miR-697, miR-7011-5p, miR-6942-5p, miR-6916-5p, miR-7081-5p, miR-5110, miR-6981-5p, miR-1224-5p, miR-327, miR-7222-5p, miR-191-3p, miR-5125, miR-3106-3p, miR-9768-3p, miR-3110-5p, miR-7052-3p, miR-6934-3p, miR-6936-5p, miR-511-5p, miR-1947-5p, miR-678, miR-669h-5p, miR-145a-5p, miR-145b, miR-6344, miR-6516-5p, miR-682, miR-7053-3p, miR-1195, miR-3089-5p, miR-3088-3p, miR-135b-5p, miR-7022-3p, miR-215-3p, miR-8103, miR-1969, miR-3063-5p, miR-5114, miR-7094b-2-5p, miR-3475-3p, miR-6972-5p, miR-5133, miR-804, miR-466e-5p, miR-466p-5p, miR-466a-5p, miR-1187, miR-511-3p, miR-1198-5p, miR-139-3p, miR-5108, miR-379-5p, miR-1193-5p, miR-7237-5p, miR-7092-3p, miR-22-5p, miR-6932-3p, miR-26b-3p, miR-200a-3p, miR-141-3p, miR-669p-3p, miR-3094-3p, miR-302d-5p, miR-302c-5p, miR-701-3p, miR-466q, miR-669c-3p, miR-467f, miR-7212-3p, miR-3112-5p, miR-878-5p, miR-6385, miR-211-3p, miR-6967-3p, miR-672-3p, miR-1897-5p, miR-3475-5p, miR-3097-5p, miR-5622-3p, miR-374c-3p, miR-1941-3p, miR-5107-5p, miR-486a-3p, miR-486b-3p, miR-6954-5p, miR-326-5p, miR-7653-5p, miR-7681-3p, miR-7010-5p, miR-7683-3p, miR-3101-3p, miR-879-5p, miR-6980-5p, miR-6979-5p, miR-7076-5p, miR-7030-5p, miR-7075-5p, miR-6971-5p, miR-6909-5p, miR-6930-5p, miR-3104-5p, miR-6933-3p, miR-6984-5p, miR-7227-3p, miR-875-3p, miR-679-5p, miR-378c, miR-7b-5p, miR-6917-5p, miR-7651-5p, miR-7088-5p, miR-7669-5p, miR-6934-5p, miR-7672-5p, miR-7044-5p, miR-7677-5p, miR-3102-5p.2-5p, miR-700-5p, miR-6418-5p, miR-3076-5p, miR-425-5p, miR-7229-3p, miR-6932-5p, miR-6896-5p, miR-135b-3p, miR-693-3p, miR-503-5p, miR-6353, miR-497a-5p, miR-6342, miR-1907, miR-6419, miR-3060-3p, miR-7073-3p, miR-6929-3p, miR-1943-3p, miR-200a-5p, miR-200b-5p, miR-6953-3p, miR-3057-3p, miR-6960-3p, miR-218-1-3p, miR-466g, let-7a-2-3p, let-7c-1-3p, miR-493-5p, miR-592-3p, miR-101a-5p, miR-3620-3p, miR-294-5p, miR-292a-5p, miR-295-5p, miR-290a-5p, miR-293-5p, miR-712-5p, miR-205-5p, miR-379-3p, miR-698-3p, miR-7065-3p, miR-29b-1-5p, miR-3473b, miR-3473e, miR-3083-5p, miR-7679-5p, miR-3064-5p, miR-3085-3p, miR-7652-3p, miR-149-5p, miR-1298-3p, miR-6922-3p, miR-758-3p, miR-153-5p, miR-669n, miR-669b-5p, miR-378b, miR-34b-5p, miR-449b, miR-34c-5p, miR-449a-5p, miR-34a-5p, miR-449c-5p, miR-6939-5p, miR-1948-3p, miR-183-3p, miR-6360, miR-3103-3p, miR-1191a, miR-7025-3p, miR-494-3p, miR-3970, miR-672-5p, miR-377-5p, miR-329-5p, miR-7666-5p, miR-222-5p, miR-7652-5p, miR-340-5p, miR-8107, miR-6411, miR-6987-5p, miR-1958, miR-7224-5p, miR-323-5p, miR-194-1-3p, miR-6926-5p, miR-7055-5p, miR-194-2-3p, miR-677-5p, miR-33-3p, miR-324-3p

Tabla de miRNAs de ratón (miR) comunes entre las diferentes herramientas de predicción utilizadas para la búsqueda de interacciones mRNA-miRNA para cada uno de los genes seleccionados, representados en los diagramas de Venn de la Figura 29.

Tabla suplementaria 5. miRNAs intestinales alterados tras el tratamiento largo (20 semanas) con dieta hipercalórica.

<i>miRNA</i>	<i>Fold Change</i>	<i>P-value</i>	<i>P (Benjamini-Hochberg)</i>	<i>miRNA</i>	<i>Fold Change</i>	<i>P-value</i>	<i>P (Benjamini-Hochberg)</i>
let-7i	-2.24359	0.00000084	0.01182	let-7d*	1.34577	0.057677353	0.17089
miR-542-5p	-2.5516	0.000012698	0.01235	miR-582-5p	-1.38239	0.058530831	0.17089
miR-21	-2.46434	0.000014868	0.01235	miR-1959	-1.64464	0.058893358	0.17324
miR-154	-2.72854	0.000017718	0.01235	miR-673-5p	-2.48782	0.060783814	0.17508
miR-1897-5p	7.62534	0.000038729	0.01247	miR-203*	-1.81683	0.063052922	0.17508
miR-23a	-1.90358	0.000042246	0.01265	miR-298	-2.38694	0.063153147	0.17868
miR-133a	-2.7478	0.000054926	0.01265	miR-532-5p	-1.5626	0.064696874	0.17868
miR-598	-2.49986	0.000060055	0.01302	miR-155	-2.00128	0.0656296	0.17868
miR-133b	-2.62356	0.000074025	0.01302	miR-212-3p	-1.52649	0.06798201	0.18098
miR-9	-2.65221	0.000087273	0.01348	miR-205	-2.00449	0.068745213	0.18522
miR-199a-3p	-2.24771	0.000098851	0.01447	miR-500	-1.58707	0.069107876	0.18713
miR-143	-2.11177	0.000099189	0.01447	miR-21*	-1.41898	0.069380997	0.18791
miR-103	1.66844	0.000147381	0.01447	miR-744	-1.67565	0.069903581	0.19031
miR-425	-2.00327	0.000148197	0.01447	miR-615-3p	-1.93491	0.07202662	0.19543
miR-130b	-3.18414	0.000169523	0.01527	let-7i*	-1.38382	0.072569807	0.20503
miR-486	-4.56556	0.000177788	0.01527	miR-187	-1.99179	0.072750877	0.20503
miR-23a*	-2.48837	0.00021784	0.01527	miR-296-3p	1.60433	0.073576019	0.20581
miR-27b	-1.96312	0.00022073	0.01527	miR-134	2.26858	0.074244748	0.21378
miR-136	-2.79737	0.00022247	0.01539	miR-25	-1.62251	0.077550915	0.2155
miR-140*	-1.66693	0.000257442	0.01539	miR-532-3p	-1.35823	0.078394756	0.21833
miR-148b	-1.9382	0.000263349	0.01588	miR-34c	-1.79655	0.08181846	0.21867
miR-384-5p	-4.25525	0.000264289	0.01588	miR-1930	1.66937	0.083275318	0.22145
miR-146a	-2.59633	0.000267395	0.01652	miR-1961	1.37835	0.085758656	0.22314
miR-449c	11.04929	0.00030518	0.0168	miR-574-3p	-1.53803	0.087890027	0.23167
miR-342-5p	-2.06715	0.000314507	0.0168	miR-425*	-1.57757	0.088930372	0.23722
miR-1894-5p	-3.89922	0.000317862	0.01695	let-7b*	-1.7641	0.092718979	0.23754
miR-217	-3.76382	0.000324124	0.01821	miR-340-3p	-1.73195	0.092980656	0.23754
miR-26b	-3.19225	0.000330073	0.01821	miR-34b-5p	-2.49865	0.093883781	0.23754
miR-185	-2.51246	0.000361769	0.01821	miR-431	-1.83484	0.096616788	0.23908
miR-26a	-2.75199	0.000364737	0.01839	miR-320	-1.40448	0.096837405	0.24165
miR-1	-2.67189	0.000366954	0.01853	miR-222	-2.09948	0.096859663	0.24362
miR-29b	-2.27513	0.00038818	0.01869	miR-379	-1.74012	0.098540749	0.24623
miR-151-3p	-2.02665	0.00040989	0.01925	miR-300	-1.85203	0.100283524	0.25118
miR-147	-3.60113	0.000439477	0.0215	miR-31	-1.21656	0.100297465	0.25318
miR-16	-2.78506	0.000508564	0.0224	miR-694	-25.63894	0.102770354	0.25318
miR-15a	-1.99077	0.000577746	0.02464	miR-148a*	1.98067	0.103133311	0.25318
miR-127	-3.79075	0.000578576	0.02464	miR-1982,1	-2.03022	0.103445659	0.25318
miR-125b-5p	-2.16786	0.000591755	0.02492	miR-382	-1.88347	0.105144668	0.25451
miR-669e	5.83967	0.000606217	0.02505	let-7g	-1.34294	0.107981478	0.25451
miR-191	-1.67697	0.000647077	0.0262	miR-340-5p	-1.81033	0.109477526	0.26749
miR-7b	-2.40735	0.000686352	0.02692	miR-191	1.10363	0.110313941	0.26914
miR-181a	-2.2644	0.000763298	0.02692	miR-151-5p	-1.8555	0.112107759	0.26914
miR-145	-2.26494	0.00076408	0.0272	miR-32	-1.5353	0.115520275	0.27116
miR-138	-2.35467	0.00079839	0.02749	miR-20a	-1.67252	0.122003953	0.27116
miR-1894-3p	2.54075	0.000798777	0.02749	miR-677	1.40417	0.122900873	0.272
miR-467e	-2.45374	0.00111787	0.02749	miR-378	-1.34862	0.128092122	0.2774
miR-22	-1.86976	0.001124001	0.0275	miR-671-5p	1.83623	0.129560397	0.27829
miR-33	-3.66561	0.001161717	0.0275	miR-450b-3p	-2.11894	0.131705808	0.27829
miR-27a	-1.98539	0.001200493	0.02773	miR-2137	-1.98654	0.132355235	0.28187
miR-411	-2.50998	0.00128834	0.02801	miR-128	-1.29432	0.134482333	0.28229
miR-337-3p	-3.83633	0.001342284	0.02801	miR-329	-1.64144	0.135964369	0.28862
miR-363-3p	-2.18056	0.001353807	0.02886	miR-34a	-1.32665	0.141625391	0.28862
miR-10a	-2.16769	0.001467067	0.02886	miR-26b*	1.32356	0.146796355	0.28862
miR-29c	-1.70675	0.001482644	0.0295	miR-1247	1.82294	0.147055245	0.28881
miR-666-3p	-3.2576	0.001502432	0.02965	miR-224	-1.4403	0.14714038	0.29122
miR-183	-2.19979	0.001504216	0.02977	miR-409-5p	-1.87233	0.148579142	0.29331
miR-503	-3.35691	0.001507665	0.02984	miR-1839-3p	1.35147	0.150663309	0.29364
miR-96	-2.13617	0.001621491	0.02984	miR-7a-1*	-1.41537	0.152383623	0.29559
miR-29a*	-1.67125	0.001645639	0.02984	miR-1981	2.20549	0.154516436	0.29858
miR-142-5p	-3.2384	0.001691357	0.02984	miR-1195	1.58676	0.158133742	0.30283
miR-125a-5p	-1.93471	0.001755755	0.03047	miR-203	-1.60131	0.160490603	0.31314
miR-369-5p	-1.66959	0.001767445	0.03075	miR-466k	1.78721	0.160855392	0.31534

let-7c	-1.64655	0.001855479	0.03145	miR-361	-1.44478	0.161440742	0.31909
miR-148a	-2.09207	0.001871871	0.03148	miR-146b	-1.80583	0.162848522	0.32102
miR-20b	-5.03726	0.001964787	0.03148	miR-103-2*	1.69835	0.163322031	0.32102
miR-322	-2.24504	0.002198681	0.03148	miR-194	-1.25442	0.172188478	0.32137
miR-301b	-2.0379	0.002211547	0.03177	miR-542-3p	1.5253	0.173883597	0.32603
miR-106a	-1.91673	0.002224275	0.03192	miR-700	2.06719	0.174338772	0.33929
miR-31*	1.62357	0.002226811	0.03198	miR-15b*	-1.48859	0.176438485	0.34186
miR-30c	-1.67015	0.00238562	0.03287	miR-214*	-1.38943	0.176745703	0.34288
miR-1966	3.89355	0.002422717	0.03398	miR-455	-1.40107	0.177844506	0.34288
miR-467a	-2.32143	0.002452761	0.03398	miR-337-5p	-1.42845	0.181938053	0.34509
miR-144	-5.22547	0.002473022	0.03407	let-7d	-1.36274	0.183260432	0.34769
let-7e	-2.04429	0.002533444	0.03465	miR-708*	1.4257	0.183648369	0.35417
miR-142-3p	-2.63101	0.00255488	0.03465	miR-667	-1.70036	0.186579015	0.35464
miR-704	-2.40575	0.002670998	0.03465	miR-30c-1*	-2.32723	0.187432544	0.35464
miR-101b	-1.96825	0.002699853	0.03465	miR-186*	-1.86282	0.193201356	0.3597
miR-1947	-4.04527	0.002842245	0.03465	miR-495	-2.19205	0.193301649	0.3597
miR-362-3p	-1.75472	0.002940421	0.03465	miR-322*	-1.63078	0.193385245	0.36047
miR-130a	-1.82935	0.002958527	0.03465	miR-338-3p	-1.32247	0.194096609	0.36096
miR-1968	3.98777	0.003019458	0.03471	miR-490-5p	-1.52275	0.196310396	0.36274
miR-92b	-3.51429	0.003285992	0.03591	miR-423-5p	-1.21019	0.201048854	0.36291
miR-190	-2.0083	0.003322798	0.03632	miR-30a	-1.59658	0.20368982	0.36984
miR-326	-1.81854	0.003354871	0.03642	miR-331-3p	-1.53764	0.207196081	0.37123
miR-350	-2.22812	0.003424157	0.03665	miR-742	-1.82764	0.21703552	0.37123
miR-101a	-1.68801	0.003488828	0.03742	miR-804	1.40182	0.220263833	0.3794
miR-24	-1.83351	0.003556837	0.03742	miR-195*	-1.25773	0.222748079	0.3794
miR-339-3p	-4.23952	0.003701669	0.03815	miR-1964-3p	-2.45863	0.223789994	0.38721
miR-449a	-2.47393	0.004177994	0.03937	miR-467d	-2.19612	0.227691989	0.41562
miR-377	-4.33403	0.004930207	0.0397	miR-672	-1.55061	0.237641817	0.42175
miR-139-3p	-2.5898	0.00493847	0.03994	miR-30e	-1.36708	0.240133074	0.42318
miR-99b	-1.85451	0.005045335	0.03994	miR-1937c	1.83704	0.242101482	0.42318
miR-374	-1.8688	0.005120648	0.03994	miR-30a*	-1.22677	0.242235413	0.42318
miR-182	-1.84024	0.005638018	0.03994	miR-466f-5p	-1.47598	0.244500195	0.42611
miR-107	-1.58056	0.005666451	0.03994	miR-207	-1.83326	0.252365659	0.42902
miR-497	-1.62546	0.005780754	0.04022	miR-1951	1.89137	0.254088476	0.43146
miR-345-3p	3.11111	0.005948428	0.04025	miR-29b-1*	-1.48862	0.254132217	0.43146
miR-466j	2.26953	0.005959782	0.04025	miR-429	-1.23356	0.259095541	0.43259
miR-467b	-2.52486	0.006099402	0.04231	let-7a-2*	1.27293	0.259217545	0.43568
miR-99a	-2.56624	0.006123556	0.04234	miR-22*	-1.12984	0.260499715	0.4395
miR-93*	-2.16135	0.006231731	0.04456	miR-1957	1.47118	0.261583465	0.45386
miR-501-3p	-1.93573	0.006357016	0.04504	miR-376a	-1.93223	0.263611895	0.46355
miR-19b	-1.68691	0.006406079	0.0452	miR-215	-1.70544	0.264470591	0.46471
miR-1898	4.39913	0.006705897	0.04522	miR-181a-1*	1.42357	0.270266286	0.4714
miR-15b	-1.94166	0.006718678	0.04522	miR-1937a	2.06917	0.272482939	0.47299
miR-488	-4.23284	0.006926063	0.04522	miR-7a	-1.15213	0.272784848	0.47576
miR-17	-1.84617	0.007022619	0.04533	miR-297a	-1.51742	0.280184593	0.48641
miR-200a	-1.56917	0.00711044	0.04681	miR-297b-3p	-1.84146	0.280329366	0.48641
miR-543	-5.57407	0.007301091	0.04682	let-7e*	1.55852	0.286878965	0.48744
miR-221	-1.58797	0.007328207	0.04692	miR-28*	-1.17764	0.308767611	0.48744
miR-199a-5p	-1.61953	0.007369302	0.04785	miR-98	-1.38878	0.314180178	0.49753
miR-674	1.52678	0.007585748	0.04955	miR-676	-1.47302	0.316722135	0.50957
miR-376b	-3.53091	0.007718658	0.05017	miR-1937b	1.84814	0.317310919	0.51212
miR-339-5p	-1.67969	0.007957241	0.05079	miR-490-3p	-1.45999	0.32087553	0.51281
miR-140	-2.13093	0.008093318	0.05097	miR-381	5.09725	0.323938337	0.51488
miR-369-3p	-2.48458	0.008155604	0.05103	miR-706	-1.18259	0.327524027	0.52297
miR-145*	-1.79847	0.008295832	0.05218	miR-744*	1.32444	0.329255726	0.52297
miR-195	-1.7072	0.008398785	0.05219	miR-546	-1.94145	0.332494182	0.52393
miR-1306	-2.20621	0.008480201	0.05278	miR-541	-1.83546	0.348201566	0.52465
miR-124	-2.19975	0.00878229	0.05348	miR-16-1*	-1.35947	0.356577138	0.52465
miR-450b-5p	-2.78693	0.00918968	0.05365	miR-467b*	1.30911	0.358412045	0.5259
miR-219-5p	-2.07315	0.009218338	0.05365	miR-2145	-1.19695	0.364520867	0.5259
miR-30d	-1.72856	0.009309503	0.05402	miR-669i	1.23446	0.379350194	0.52676
miR-192	-1.59411	0.009595943	0.05479	miR-18b	-1.49916	0.380065642	0.53257
miR-214	-1.87927	0.009703543	0.05713	miR-1274a	1.76988	0.382739586	0.53624
miR-330	-2.34059	0.009797368	0.05742	miR-129-2-3p	1.18319	0.38284762	0.53624
miR-200b	-1.69398	0.009799637	0.05742	let-7f-2*	-1.28831	0.391778343	0.53624
miR-181c	-2.09911	0.00995773	0.05905	miR-92a-2*	1.35016	0.402294048	0.54249
miR-299	-2.03735	0.010046277	0.05905	miR-423-3p	-1.10095	0.405342538	0.54623
miR-139-5p	-1.6264	0.010468603	0.05968	miR-200a*	1.05728	0.409607732	0.54875

miR-186	-1.81872	0.01065935	0.05983	miR-1839-5p	-1.1638	0.417682392	0.55269
miR-324-5p	-1.86995	0.010764667	0.05983	miR-375	-1.35519	0.418162426	0.55269
miR-325	-1.84344	0.010906073	0.06324	miR-125b-2-3p	1.27933	0.41999402	0.55304
miR-153	-4.80066	0.011240525	0.06357	let-7f-1*	1.22424	0.422498164	0.5534
miR-193	-2.45574	0.011285711	0.06379	miR-28	-1.25687	0.422689913	0.55645
miR-1895	2.55859	0.011584677	0.06572	miR-1198-5p	-1.21155	0.425092164	0.55926
miR-328	-2.0042	0.012033495	0.06572	miR-191*	1.23082	0.425831454	0.56335
miR-126-3p	-1.39469	0.012215028	0.06692	miR-30d*	-1.14886	0.427593704	0.56335
miR-223	-1.91164	0.012451448	0.06699	miR-194-2*	-1.11303	0.433385591	0.56455
miR-138-1*	-1.68479	0.012463017	0.06699	let-7a-1*	-1.16864	0.438185936	0.56857
miR-1946a	2.39723	0.012551704	0.06919	miR-1934	-1.28779	0.439626089	0.57593
miR-338-5p	-2.86751	0.012637601	0.07014	miR-410	-1.35009	0.445851135	0.57836
miR-708	-3.01702	0.012693773	0.07389	miR-411*	-1.39273	0.450034333	0.58094
miR-434-3p	-2.19223	0.012865381	0.07397	miR-200b*	1.12502	0.458566834	0.58934
miR-351	-2.37834	0.012988642	0.07443	miR-466d-3p	-1.33174	0.45870699	0.59299
miR-137	-1.7708	0.013036343	0.07494	miR-126-5p	-1.12991	0.4601224	0.59759
miR-335-5p	-2.53315	0.013788198	0.07511	miR-200c*	-1.28421	0.461536968	0.59759
miR-380-3p	-2.58017	0.013884538	0.0753	miR-291a-5p	-1.35956	0.473667938	0.60089
miR-674*	1.57611	0.014703295	0.07601	miR-1935	-1.46621	0.474397836	0.60438
miR-100	-2.74532	0.014953475	0.07739	miR-709	-2.71522	0.476554886	0.60702
miR-669a-5p	-3.61488	0.015096397	0.07847	miR-669l	1.35465	0.481096475	0.61348
miR-23b	-1.53161	0.015244722	0.07847	miR-27b*	-1.45027	0.488493706	0.61455
miR-1907	2.45555	0.01537705	0.08042	miR-34b-3p	-1.35032	0.491726958	0.61455
miR-423-3p	-1.70252	0.015507588	0.08433	miR-681	1.5051	0.49509098	0.62194
miR-299*	-2.47761	0.01610813	0.08508	miR-758	-1.31786	0.503445608	0.62331
miR-592	-2.8398	0.016205999	0.08679	miR-192*	1.03807	0.507763516	0.6253
miR-93	-1.60699	0.016335471	0.0886	miR-1191	-1.58121	0.513850476	0.62755
miR-149	-2.22239	0.016756993	0.0886	miR-1939	1.22634	0.514121947	0.64909
let-7f	-2.19463	0.017453191	0.09154	miR-501-5p	1.12644	0.522410195	0.64944
miR-345-5p	-1.90109	0.018095628	0.0927	miR-211	-1.29649	0.525920153	0.66732
miR-193b	-2.58153	0.018260774	0.09271	miR-466h-5p	1.29144	0.532760432	0.68331
miR-188-5p	-2.04392	0.018386111	0.09369	let-7g*	1.07653	0.535248656	0.68331
miR-19a	-1.7853	0.018908459	0.09369	miR-669d	-1.53332	0.536172385	0.69373
miR-218	-1.43624	0.019014888	0.10063	miR-297c	-1.24691	0.543880062	0.69581
miR-1196	3.207	0.019336767	0.10199	miR-130b*	-1.14345	0.546340987	0.69699
miR-301a	-3.8857	0.01970248	0.10334	miR-692	-1.37092	0.552599119	0.70092
miR-181b	-2.00147	0.019950138	0.10535	miR-376c*	-1.3798	0.572883047	0.70092
let-7b	-1.45045	0.019984549	0.1056	miR-1983	1.25384	0.574501537	0.71204
miR-874	-2.03634	0.020229113	0.10875	miR-582-3p	1.17617	0.591668171	0.71204
miR-27a*	-1.84957	0.021624689	0.11039	miR-30e*	1.04442	0.608498781	0.72207
miR-324-3p	-1.75212	0.021867961	0.11039	miR-491	-1.30567	0.608613036	0.72746
miR-296-5p	-3.50793	0.021969837	0.11039	miR-421	-1.12362	0.62256781	0.72889
miR-467c	-3.23989	0.022811256	0.11225	miR-466f-3p	1.2006	0.62503381	0.73706
miR-106b	-1.51305	0.023193604	0.11225	miR-467g	-1.24866	0.631358596	0.74429
miR-9*	-2.06495	0.023497199	0.11227	miR-691	1.37409	0.631397429	0.74851
miR-18a	-1.5934	0.024963326	0.11231	miR-26a-1*	1.09431	0.643465271	0.74851
miR-200c	-1.39225	0.025223206	0.11372	miR-135a	-1.20712	0.644298532	0.75304
miR-127*	-2.43532	0.025439871	0.11419	miR-210	-1.08671	0.654828653	0.75304
miR-760-3p	-3.09944	0.02636046	0.11479	miR-212-5p	1.18203	0.661196366	0.75314
miR-30b	-1.55875	0.026473096	0.11774	miR-1944	-1.07574	0.672900377	0.75483
miR-450a	-3.73377	0.027091402	0.11899	miR-1929	1.06566	0.681007316	0.79165
miR-330*	2.29573	0.027391481	0.11923	miR-141*	1.05292	0.686383179	0.7956
miR-106b*	1.29589	0.028430831	0.12083	miR-409-3p	1.7786	0.687906404	0.79976
miR-468	2.13165	0.028964462	0.12206	miR-1982*	1.13343	0.693667856	0.79976
miR-466a-3p	-4.06429	0.030661856	0.12569	let-7a	-1.12199	0.695117273	0.8124
miR-101a*	-1.28885	0.030845438	0.12569	miR-122	-1.18723	0.696730042	0.83069
miR-365	-1.82351	0.031189832	0.12569	miR-1186	-1.28217	0.699819778	0.83215
miR-150	-2.3929	0.031554269	0.12784	miR-872*	1.05737	0.735561457	0.83537
miR-141	-1.50899	0.031776227	0.12808	miR-19b-1*	1.16701	0.747899291	0.84262
miR-434-5p	-1.84056	0.032010767	0.12865	miR-379*	-1.21557	0.747950372	0.86005
miR-152	-1.49214	0.03321339	0.13274	miR-1249	-1.07397	0.761415836	0.86044
miR-652	-1.68283	0.033835056	0.1337	miR-1952	1.27425	0.78023896	0.86608
miR-132	-1.29497	0.033991268	0.13388	miR-15a*	1.06401	0.783298099	0.86608
miR-877	-1.73121	0.035001372	0.13388	miR-291b-5p	-1.15118	0.788024211	0.86608
miR-342-3p	-1.48993	0.03687409	0.13437	miR-872	1.02778	0.79656719	0.87663
miR-715	2.23634	0.037371201	0.13791	miR-30c-2*	-1.06606	0.814780231	0.87709
miR-18a*	-1.84533	0.038301586	0.13823	miR-188-3p	1.15671	0.824181667	0.87948
miR-204	-1.88814	0.03944791	0.13823	miR-654-3p	-1.11707	0.82685513	0.8813

miR-362-5p	-1.76914	0.039458857	0.13889	miR-103	-1.04821	0.839360332	0.88225
miR-451	-3.74524	0.040950813	0.13889	miR-682	-1.1202	0.841578586	0.89124
miR-29a	-1.69818	0.041657025	0.13946	miR-20b*	1.05111	0.845650312	0.8945
miR-455*	-5.56832	0.041850267	0.14436	miR-466d-5p	-1.02344	0.849192557	0.89811
miR-1949	1.24785	0.042603075	0.14457	miR-193*	-1.1208	0.862373984	0.90762
miR-184	-1.50332	0.042672375	0.14559	miR-496	-1.05253	0.867340992	0.92091
miR-99b*	1.59427	0.046035675	0.14821	miR-154*	1.05596	0.872653776	0.93076
miR-20a*	-2.21561	0.046864358	0.14879	miR-1199	-1.04574	0.883731087	0.9361
miR-484	-1.42163	0.047696773	0.15025	miR-10b	-1.05117	0.930136449	0.9474
miR-29c*	-1.61672	0.050854825	0.15236	miR-33*	-1.02187	0.934063552	0.94944
miR-762	1.89455	0.051941201	0.15633	miR-720	1.02334	0.958620014	0.9723
miR-125a-3p	-2.43804	0.05226792	0.15962	miR-378*	-1.00684	0.960494318	0.9723
miR-129-5p	-2.01014	0.053576025	0.16092	miR-802	1.01034	0.965750852	0.97563
miR-1900	1.33777	0.053625659	0.1636	miR-712	-1.01379	0.969208841	0.97712
miR-466f	2.52279	0.053860823	0.16642	miR-17*	-1.00546	0.974478307	0.98006
miR-710	-1.7427	0.054106811	0.16642	miR-671-3p	1.01663	0.976089953	0.98006
miR-669b	2.08554	0.055018046	0.16743	miR-467h	-1.00733	0.981674383	0.98367
miR-181d	-2.43797	0.055477501	0.17089	miR-199b*	1.00276	> 0.99	> 0.99

Listado completo de los miRNAs analizados y los resultados de *Fold change* (Tratado vs. Control), valor-p y el valor-p ajustado por múltiples comparaciones (método Benjamini-Hochberg) para el experimento de 20 semanas (Long) en ratones macho C57BL/6. N = 4 para cada uno de los grupos.

Tabla suplementaria 6. miRNAs intestinales alterados tras el tratamiento corto (Short, 4 días) con dieta hipercalórica.

miRNA	Fold Change	P-value	P (Benjamini-Hochberg)	miRNA	Fold Change	P-value	P (Benjamini-Hochberg)
miR-218-2-3p	-11.64725	0.000060837	0.03048	let-7e-3p	-1.25255	0.5859312	> 0.99
miR-346-5p	-6.98594	0.000107912	0.03048	miR-744-5p	-1.12393	0.5865383	> 0.99
miR-879-3p	-8.11892	0.000158204	0.03048	miR-137-3p	1.26946	0.592171558	> 0.99
miR-10b-3p	8.51092	0.000227522	0.03288	miR-376b-3p	-1.28017	0.59357091	> 0.99
miR-138-1-3p	3.0443	0.000511794	0.0493	miR-291b-5p	1.23379	0.594530761	> 0.99
miR-466b-5p	-5.95447	0.000606616	0.05009	miR-297c-5p	-1.27551	0.594968531	> 0.99
miR-147-3p	-3.58123	0.000701969	0.05072	miR-433-5p	-1.32931	0.595172339	> 0.99
miR-1894-3p	-3.8418	0.001703526	0.1094	miR-365-3p	-1.17609	0.598890559	> 0.99
miR-544-3p	-3.72996	0.002511558	0.13197	miR-340-3p	-1.18295	0.599203912	> 0.99
miR-711	4.09938	0.002999617	0.14448	miR-142-3p	-1.16954	0.599871089	> 0.99
miR-344-3p	3.60712	0.003590845	0.15965	miR-20a-3p	1.22027	0.600561138	> 0.99
miR-146b-3p	4.07155	0.006277028	0.25915	miR-10b-5p	-1.1558	0.602655049	> 0.99
miR-666-3p	-4.36703	0.008251496	0.31796	miR-325-3p	-1.18423	0.602720585	> 0.99
miR-673-5p	-6.52681	0.010999306	0.37398	miR-27a-3p	-1.16344	0.604446446	> 0.99
miR-466k	5.35207	0.017460241	0.51657	miR-501-3p	1.19443	0.60772722	> 0.99
miR-216b-5p	-7.66976	0.017930361	0.51657	miR-124-3p	1.1922	0.610024791	> 0.99
miR-212-3p	2.15494	0.018768258	0.51657	miR-92a-2-5p	1.30452	0.610298481	> 0.99
miR-208b-3p	-2.78608	0.019776257	0.51958	miR-207	1.31246	0.614950758	> 0.99
miR-370-3p	2.95073	0.021766603	0.547	let-7b-5p	-1.17199	0.616157496	> 0.99
miR-452-5p	2.11554	0.024926584	0.60032	miR-449a-5p	1.23926	0.618261807	> 0.99
miR-764-5p	2.31675	0.031533839	0.67506	miR-543-3p	-1.31095	0.619132083	> 0.99
miR-491-3p	-1.92819	0.042453533	0.80674	miR-219-1-3p	1.40203	0.623775993	> 0.99
miR-216a-5p	-5.19735	0.043268094	0.80674	miR-145a-3p	-1.19004	0.624109672	> 0.99
miR-298-5p	1.84308	0.045590019	0.82347	miR-15b-5p	-1.18667	0.626774397	> 0.99
miR-291a-5p	2.93613	0.048801452	0.85476	miR-762	-1.10977	0.626861413	> 0.99
miR-1898	3.27007	0.051084098	0.85668	miR-106b-3p	-1.18478	0.629766766	> 0.99
miR-384-3p	2.3736	0.054707148	0.85668	miR-135a-5p	-1.18609	0.630624788	> 0.99
miR-1982.1-3p	-29.37791	0.055007306	0.85668	miR-466j	1.51484	0.634725429	> 0.99
miR-344d-3p	2.57038	0.057829671	0.85668	miR-130b-5p	-1.19976	0.637854179	> 0.99
miR-16-1-3p	-1.83483	0.059140081	0.85668	miR-191-3p	1.18288	0.640397019	> 0.99
miR-1900	-1.89191	0.059285712	0.85668	miR-182-5p	-1.14771	0.641020646	> 0.99
miR-1983	1.96326	0.0624705	0.8612	miR-206-3p	1.32712	0.641575055	> 0.99
miR-139-3p	2.33009	0.062578522	0.8612	miR-139-5p	-1.14311	0.644680166	> 0.99
miR-672-5p	1.94149	0.065266069	0.86958	miR-200a-5p	-1.14532	0.646957376	> 0.99
miR-293-3p	-2.19099	0.069199748	0.86958	miR-200b-5p	-1.15967	0.650928017	> 0.99

miR-873a-5p	-3.59892	0.071629396	0.86958	miR-704	1.31819	0.655560048	> 0.99
miR-294-5p	2.44894	0.075068701	0.86958	miR-30d-3p	-1.17488	0.655718162	> 0.99
miR-713	-2.17465	0.075977158	0.86958	miR-411-3p	-1.1067	0.656903741	> 0.99
miR-1933-3p	-2.09647	0.076131187	0.86958	miR-1186a	-1.33014	0.65697166	> 0.99
miR-1941-3p	-1.85572	0.079357668	0.86958	miR-31-5p	-1.143	0.657266084	> 0.99
miR-669c-5p	-3.17367	0.083194677	0.86958	miR-340-5p	-1.24824	0.657839873	> 0.99
miR-686	2.44257	0.083221163	0.86958	miR-590-3p	-1.13338	0.660706464	> 0.99
miR-184-3p	-1.65907	0.083338779	0.86958	miR-351-5p	-1.16644	0.664218112	> 0.99
miR-383-5p	-2.23219	0.084039579	0.86958	miR-539-5p	1.41299	0.66654165	> 0.99
miR-669d-5p	-2.27755	0.084580429	0.86958	let-7d-3p	1.20265	0.668243391	> 0.99
miR-105	-2.39681	0.085973413	0.86958	miR-331-3p	1.21612	0.671085209	> 0.99
miR-684	-3.08901	0.087120239	0.86958	miR-669l-5p	-1.32946	0.671705545	> 0.99
miR-1957a	2.39005	0.093775061	0.88266	miR-1967	-1.15052	0.672713077	> 0.99
miR-676-3p	-1.98462	0.094680146	0.88266	miR-434-5p	-1.19731	0.673277774	> 0.99
miR-692	4.0434	0.099457111	0.88475	miR-708-3p	-1.32149	0.675948082	> 0.99
miR-466f	-3.15779	0.101272013	0.88475	miR-199a-3p	-1.13876	0.679062229	> 0.99
miR-296-5p	-1.57183	0.102557074	0.88475	miR-337-5p	1.25718	0.682507307	> 0.99
miR-331-5p	2.44599	0.107872735	0.90319	miR-322-5p	-1.13895	0.684571918	> 0.99
miR-483-3p	2.62343	0.109383461	0.90319	miR-140-5p	-1.13629	0.685057121	> 0.99
miR-669j	-2.29181	0.112202211	0.90341	miR-466d-5p	-1.48641	0.686284305	> 0.99
miR-490-5p	-1.50458	0.113332763	0.90341	miR-19b-1-5p	-1.1978	0.687205032	> 0.99
miR-1903	-2.94919	0.114099118	0.90341	miR-29a-3p	-1.13958	0.688595375	> 0.99
miR-1195	1.39523	0.116556619	0.9104	miR-203-3p	-1.12344	0.689549912	> 0.99
miR-18a-5p	1.63322	0.119343326	0.91974	miR-425-5p	-1.12786	0.689689533	> 0.99
miR-23a-5p	2.35382	0.125128687	0.9416	miR-450b-5p	-1.5746	0.693804051	> 0.99
miR-691	-1.76236	0.1264122	0.9416	miR-338-3p	-1.15152	0.695971915	> 0.99
miR-195a-3p	-2.19468	0.127067514	0.9416	miR-342-3p	-1.12655	0.699927365	> 0.99
miR-217-5p	-2.7237	0.130049903	0.94212	miR-1951	1.18429	0.704262138	> 0.99
let-7a-2-3p	-1.85536	0.133095836	0.94212	miR-1247-5p	-1.26577	0.704982829	> 0.99
miR-291a-3p	3.33745	0.14046778	0.9782	miR-1198-5p	-1.12166	0.707020165	> 0.99
miR-148a-5p	-2.01388	0.147842151	> 0.99	miR-141-3p	-1.12134	0.708069519	> 0.99
miR-1952	1.4747	0.148856628	> 0.99	miR-203-5p	-1.10476	0.710517378	> 0.99
miR-33-3p	-1.68673	0.151823876	> 0.99	miR-145a-5p	-1.15826	0.710660106	> 0.99
miR-323-5p	-2.20908	0.152166954	> 0.99	miR-574-3p	-1.13825	0.710732772	> 0.99
miR-465b-5p	-1.68905	0.157533285	> 0.99	miR-362-3p	1.16066	0.710804116	> 0.99
miR-125b-2-3p	-3.359	0.158148243	> 0.99	let-7a-5p	-1.11518	0.7119387	> 0.99
miR-200c-5p	1.57622	0.158453065	> 0.99	miR-9-3p	1.25334	0.714065266	> 0.99
miR-450a-5p	-3.27217	0.159353788	> 0.99	miR-199a-5p	-1.11771	0.71749773	> 0.99
miR-26b-3p	-1.50525	0.176657375	> 0.99	miR-377-3p	1.14902	0.717666944	> 0.99
miR-30d-5p	-1.41027	0.178148695	> 0.99	miR-1839-3p	-1.13203	0.71826314	> 0.99
miR-1955-5p	-2.93677	0.181796719	> 0.99	miR-425-3p	-1.13056	0.718784912	> 0.99
miR-7a-1-3p	-1.65223	0.182733342	> 0.99	miR-466c-5p	1.21219	0.72367387	> 0.99
miR-132-3p	1.60322	0.185589665	> 0.99	miR-125b-5p	-1.11161	0.727251317	> 0.99
miR-205-5p	-1.98896	0.187548108	> 0.99	miR-500-3p	1.12981	0.729793303	> 0.99
miR-598-3p	-2.26185	0.189237959	> 0.99	miR-191-5p	-1.13106	0.730772097	> 0.99
miR-667-3p	-1.45165	0.190835211	> 0.99	miR-742-5p	1.15708	0.731198299	> 0.99
miR-376c-3p	-1.43906	0.193315658	> 0.99	miR-29a-5p	-1.14794	0.732320788	> 0.99
miR-382-3p	-1.95013	0.195603891	> 0.99	miR-199b-5p	-1.11505	0.735038454	> 0.99
miR-297b-5p	1.90733	0.195841123	> 0.99	miR-212-5p	1.16709	0.736487918	> 0.99
miR-202-3p	1.5245	0.201683698	> 0.99	miR-300-3p	1.15558	0.738369058	> 0.99
miR-297a-5p	-1.62323	0.205672888	> 0.99	miR-1949	1.09385	0.740873768	> 0.99
miR-1249-3p	-1.80068	0.206710964	> 0.99	miR-210-3p	1.09775	0.741157365	> 0.99
miR-503-5p	-1.37387	0.206948884	> 0.99	miR-183-3p	1.11796	0.742679782	> 0.99
miR-153-3p	-1.60144	0.212817186	> 0.99	miR-411-5p	1.14022	0.744236383	> 0.99
miR-330-5p	-2.36816	0.214966763	> 0.99	miR-374b-5p	-1.07626	0.750272875	> 0.99
miR-18b-5p	2.24682	0.215406658	> 0.99	miR-125a-5p	-1.09694	0.751574987	> 0.99
miR-1902	1.83783	0.221687038	> 0.99	miR-190b-5p	-1.13355	0.751749964	> 0.99
miR-511-5p	-1.96046	0.227332827	> 0.99	miR-2137	1.08868	0.752559156	> 0.99
miR-1966-5p	1.51871	0.227413817	> 0.99	miR-804	1.14551	0.752668095	> 0.99
miR-486-3p	-1.51481	0.228690241	> 0.99	miR-181d-5p	-1.11368	0.754980699	> 0.99
miR-448-3p	1.59062	0.232235867	> 0.99	miR-16-5p	-1.09714	0.755555694	> 0.99
miR-138-5p	-1.72903	0.234862605	> 0.99	miR-19a-3p	1.09502	0.757699319	> 0.99
miR-214-3p	-1.40869	0.235795056	> 0.99	miR-433-3p	-1.16942	0.758306676	> 0.99
miR-362-5p	1.56813	0.236000106	> 0.99	miR-133b-3p	-1.11637	0.759200963	> 0.99
miR-694	1.53168	0.24209657	> 0.99	miR-34b-5p	-1.15565	0.760059909	> 0.99
miR-468-3p	1.74211	0.245792443	> 0.99	miR-196b-5p	1.22869	0.760586152	> 0.99
miR-211-5p	1.47146	0.252389949	> 0.99	miR-30e-5p	-1.09867	0.760937747	> 0.99
miR-339-5p	-1.24602	0.253855178	> 0.99	miR-504-5p	-1.51828	0.761139062	> 0.99

miR-467g	-1.75703	0.254522615	> 0.99	let-7c-5p	-1.09255	0.76203237	> 0.99
miR-297a-3p	-1.49965	0.258742394	> 0.99	miR-200c-3p	-1.08833	0.763980212	> 0.99
miR-503-3p	-1.65648	0.262669209	> 0.99	miR-1927	1.09159	0.764316862	> 0.99
miR-700-3p	-1.81017	0.26334553	> 0.99	miR-381-3p	-1.13035	0.76575073	> 0.99
miR-1947-5p	1.9733	0.271239657	> 0.99	miR-30c-2-3p	1.1521	0.76576613	> 0.99
miR-127-5p	-1.88915	0.27187539	> 0.99	miR-1306-3p	-1.19961	0.769481264	> 0.99
miR-181c-5p	-1.40886	0.277144509	> 0.99	miR-136-5p	1.14415	0.776262197	> 0.99
miR-330-3p	-1.53261	0.287927868	> 0.99	miR-192-5p	-1.0923	0.776554576	> 0.99
miR-742-3p	1.69031	0.287930568	> 0.99	miR-466f-5p	1.12718	0.776874897	> 0.99
let-7c-1-3p	-1.31729	0.299483496	> 0.99	miR-144-3p	1.12128	0.779022213	> 0.99
miR-101a-5p	-1.54403	0.299579411	> 0.99	miR-301a-3p	1.09572	0.779087668	> 0.99
miR-1929-5p	-1.36297	0.300059397	> 0.99	miR-335-3p	-1.10412	0.779549594	> 0.99
miR-193a-5p	-1.39229	0.300634861	> 0.99	miR-1982-5p	-1.15463	0.780320169	> 0.99
miR-350-3p	-1.3411	0.302414645	> 0.99	miR-541-5p	-1.08252	0.782467972	> 0.99
miR-491-5p	1.59591	0.303660521	> 0.99	miR-122-5p	-1.16585	0.783407364	> 0.99
miR-7b-5p	-1.49681	0.305147389	> 0.99	let-7i-3p	-1.09586	0.785561687	> 0.99
miR-671-3p	1.45414	0.305773223	> 0.99	miR-423-3p	-1.0726	0.785758069	> 0.99
miR-323-3p	1.58409	0.307144975	> 0.99	miR-20b-5p	1.18572	0.788575492	> 0.99
miR-1948-3p	-1.91082	0.310251364	> 0.99	miR-149-5p	-1.11285	0.789846549	> 0.99
miR-29c-5p	-1.36488	0.312247995	> 0.99	miR-467h	-1.14263	0.7938012	> 0.99
miR-190a-5p	-1.35176	0.313941714	> 0.99	miR-495-3p	-1.07286	0.796734038	> 0.99
miR-542-3p	-1.52315	0.32000726	> 0.99	miR-25-3p	-1.06985	0.799795476	> 0.99
miR-126-5p	-1.385	0.324969405	> 0.99	miR-99b-5p	-1.08912	0.801578642	> 0.99
miR-92b-3p	1.50074	0.33099734	> 0.99	miR-335-5p	-1.10184	0.801707029	> 0.99
miR-129-5p	1.91574	0.331512517	> 0.99	miR-99b-3p	-1.1892	0.803748203	> 0.99
miR-326-3p	-1.30327	0.331973006	> 0.99	miR-674-5p	-1.07881	0.805339432	> 0.99
miR-7a-5p	1.33628	0.340237218	> 0.99	miR-682	-1.17255	0.807057375	> 0.99
miR-802-5p	-1.33657	0.342101235	> 0.99	miR-101a-3p	-1.08004	0.807659505	> 0.99
miR-378a-5p	-1.38797	0.342453856	> 0.99	miR-193b-3p	1.0617	0.814439439	> 0.99
miR-34a-5p	-1.27147	0.343768536	> 0.99	miR-1196-5p	1.10281	0.815912001	> 0.99
miR-409-3p	1.79948	0.348160267	> 0.99	miR-376c-5p	-1.20075	0.816773668	> 0.99
miR-706	1.36961	0.350485421	> 0.99	let-7e-5p	1.08153	0.816797999	> 0.99
miR-871-5p	-1.35466	0.360231146	> 0.99	miR-154-3p	-1.10283	0.817713546	> 0.99
miR-301b-3p	1.54551	0.363622694	> 0.99	miR-30a-5p	-1.07811	0.819119728	> 0.99
miR-26a-1-3p	-1.49251	0.365672096	> 0.99	miR-195a-5p	-1.08519	0.81977851	> 0.99
miR-1956	-1.5883	0.366827451	> 0.99	miR-671-5p	-1.05944	0.821705831	> 0.99
miR-654-3p	-1.34617	0.36702438	> 0.99	miR-222-3p	-1.08426	0.822146976	> 0.99
miR-466h-5p	-1.50982	0.367654647	> 0.99	let-7a-1-3p	1.06901	0.822255762	> 0.99
miR-188-3p	-1.72783	0.369070508	> 0.99	miR-466f-3p	1.09256	0.825992152	> 0.99
miR-34b-3p	1.75613	0.371111858	> 0.99	miR-615-3p	-1.16881	0.827155867	> 0.99
miR-34c-3p	1.68328	0.373395033	> 0.99	miR-540-5p	1.11009	0.828866311	> 0.99
miR-375-3p	-1.29205	0.376208521	> 0.99	miR-669n	-1.07253	0.829390246	> 0.99
miR-29b-1-5p	-1.63113	0.37776123	> 0.99	miR-188-5p	1.13344	0.829506513	> 0.99
miR-130a-3p	-1.85838	0.37997398	> 0.99	miR-100-5p	-1.06475	0.83631691	> 0.99
miR-467f	-1.31021	0.383792748	> 0.99	miR-409-5p	-1.16123	0.837708528	> 0.99
miR-194-5p	-1.29386	0.383927097	> 0.99	miR-21a-5p	-1.06509	0.840166419	> 0.99
miR-1897-5p	1.34439	0.386342646	> 0.99	miR-339-3p	1.06001	0.844510464	> 0.99
miR-494-3p	-1.3281	0.386952976	> 0.99	miR-186-3p	1.0608	0.844925348	> 0.99
miR-369-3p	1.49953	0.393363081	> 0.99	miR-93-3p	-1.07537	0.847623523	> 0.99
miR-709	1.19289	0.394319293	> 0.99	miR-133a-5p	1.10821	0.854053781	> 0.99
miR-96-5p	-1.28925	0.398635712	> 0.99	let-7i-5p	1.05653	0.855878712	> 0.99
miR-215-5p	-1.3359	0.401824309	> 0.99	miR-1946a	1.05186	0.856630067	> 0.99
miR-874-3p	-1.37542	0.403153939	> 0.99	miR-21a-3p	-1.03945	0.857575725	> 0.99
miR-187-3p	-1.38202	0.405092153	> 0.99	miR-24-3p	-1.05933	0.859121462	> 0.99
miR-376b-5p	1.85596	0.40587493	> 0.99	miR-497-5p	-1.04852	0.86036073	> 0.99
miR-338-5p	-1.41743	0.40754166	> 0.99	miR-1895	-1.04638	0.860444706	> 0.99
miR-322-3p	-1.45259	0.409856526	> 0.99	miR-125a-3p	1.05846	0.860575015	> 0.99
miR-15a-3p	-1.42523	0.412022596	> 0.99	miR-466a-3p	1.08727	0.862494148	> 0.99
miR-33-5p	-1.33179	0.412929007	> 0.99	miR-221-3p	-1.04214	0.86436267	> 0.99
miR-369-5p	1.80967	0.415346451	> 0.99	miR-542-5p	-1.06338	0.866471277	> 0.99
miR-31-3p	-1.32609	0.416272431	> 0.99	miR-467b-3p	-1.0742	0.868991239	> 0.99
miR-129-2-3p	-2.28972	0.420092991	> 0.99	miR-107-3p	1.0548	0.870207299	> 0.99
miR-27b-5p	-1.31561	0.423295929	> 0.99	miR-154-5p	-1.04707	0.871584618	> 0.99
miR-488-3p	1.49569	0.427339452	> 0.99	miR-99a-5p	-1.0557	0.872590055	> 0.99
miR-181a-1-3p	-1.6869	0.431907387	> 0.99	miR-532-3p	-1.04923	0.873053275	> 0.99
miR-455-3p	-1.40351	0.437094983	> 0.99	miR-193a-3p	1.09087	0.874202954	> 0.99
miR-299a-5p	-1.53835	0.441125331	> 0.99	miR-192-3p	-1.05382	0.880036268	> 0.99
miR-382-5p	1.28485	0.443436173	> 0.99	miR-32-5p	1.05149	0.881101879	> 0.99

miR-1199-5p	-1.29809	0.447441273	> 0.99	miR-146b-5p	1.04239	0.881211004	> 0.99
let-7f-2-3p	-1.35505	0.448486094	> 0.99	miR-429-3p	1.04586	0.881507597	> 0.99
miR-140-3p	-1.24458	0.44859151	> 0.99	miR-455-5p	1.05236	0.883801843	> 0.99
miR-18a-3p	1.3156	0.450216927	> 0.99	miR-106b-5p	1.04591	0.883848845	> 0.99
miR-296-3p	-1.29768	0.453082278	> 0.99	miR-204-5p	-1.06466	0.883889387	> 0.99
miR-142-5p	-1.28664	0.455495029	> 0.99	miR-421-3p	-1.04866	0.884730045	> 0.99
miR-28a-3p	-1.25588	0.467050303	> 0.99	miR-17-3p	-1.03373	0.885057078	> 0.99
miR-712-5p	1.18902	0.468130714	> 0.99	miR-23a-3p	-1.04635	0.885510167	> 0.99
miR-151-3p	-1.2429	0.468895798	> 0.99	miR-324-3p	-1.04004	0.885965929	> 0.99
miR-434-3p	-1.40536	0.469382501	> 0.99	miR-223-3p	-1.04135	0.886679996	> 0.99
miR-467b-5p	1.43985	0.470753554	> 0.99	miR-674-3p	-1.04665	0.88689722	> 0.99
miR-30b-5p	-1.23268	0.474730118	> 0.99	miR-128-3p	-1.05159	0.887817943	> 0.99
miR-1928	-1.27833	0.474966943	> 0.99	miR-194-2-3p	-1.02609	0.887920009	> 0.99
miR-423-5p	-1.17326	0.475493819	> 0.99	let-7f-5p	-1.04292	0.890439234	> 0.99
miR-127-3p	-1.31209	0.476681901	> 0.99	miR-27b-3p	-1.04684	0.892669835	> 0.99
miR-3107-5p	-1.30448	0.477947982	> 0.99	let-7d-5p	-1.04125	0.895763565	> 0.99
miR-146a-5p	-1.1969	0.479931631	> 0.99	miR-487b-3p	-1.0841	0.8963353	> 0.99
miR-29c-3p	-1.25179	0.480097441	> 0.99	miR-34c-5p	1.03206	0.899774469	> 0.99
miR-710	-1.52665	0.48064677	> 0.99	miR-28a-5p	-1.03708	0.900245669	> 0.99
miR-1b-5p	-1.46867	0.481174641	> 0.99	miR-410-3p	-1.0412	0.902059396	> 0.99
miR-133a-3p	-1.23399	0.482994994	> 0.99	miR-451a	1.03724	0.905618539	> 0.99
miR-214-5p	-1.27818	0.489406048	> 0.99	miR-300-5p	1.05501	0.9065987	> 0.99
miR-125b-1-3p	-1.67415	0.491009127	> 0.99	miR-431-5p	1.04501	0.906663035	> 0.99
miR-551b-3p	-1.30823	0.491117545	> 0.99	miR-379-3p	1.0442	0.908269452	> 0.99
miR-669e-5p	-1.49545	0.491672514	> 0.99	miR-670-5p	-1.06342	0.90907178	> 0.99
miR-27a-5p	-1.2706	0.494586274	> 0.99	miR-106a-5p	1.04177	0.909407748	> 0.99
miR-1964-3p	-1.68115	0.495631095	> 0.99	miR-10a-3p	-1.06291	0.912326254	> 0.99
miR-150-5p	-1.27138	0.496941287	> 0.99	miR-490-3p	-1.03151	0.916862907	> 0.99
miR-669b-5p	-1.65245	0.498650291	> 0.99	miR-324-5p	1.03726	0.917016237	> 0.99
miR-151-5p	-1.23275	0.498895587	> 0.99	miR-770-5p	-1.05492	0.919062822	> 0.99
miR-546	1.50636	0.499559855	> 0.99	miR-872-3p	1.04253	0.920172959	> 0.99
miR-196a-2-3p	1.28689	0.49985521	> 0.99	miR-345-5p	1.02937	0.92362213	> 0.99
miR-30c-5p	-1.24615	0.500226236	> 0.99	miR-345-3p	1.05242	0.924839849	> 0.99
miR-17-5p	1.2617	0.500878029	> 0.99	miR-708-5p	1.03778	0.926131281	> 0.99
let-7g-3p	-1.29798	0.501338234	> 0.99	miR-450b-3p	1.06365	0.92616089	> 0.99
miR-540-3p	1.49409	0.503479369	> 0.99	miR-532-5p	1.03485	0.929034813	> 0.99
miR-30e-3p	-1.22078	0.505471536	> 0.99	miR-1a-3p	-1.03016	0.932253335	> 0.99
miR-466d-3p	1.40675	0.505901747	> 0.99	miR-669a-5p	-1.04653	0.933982026	> 0.99
miR-760-3p	1.42297	0.507992788	> 0.99	miR-20b-3p	-1.06274	0.936018048	> 0.99
miR-200a-3p	-1.21388	0.508022258	> 0.99	miR-129-1-3p	1.04456	0.936672833	> 0.99
miR-744-3p	-1.19879	0.50922878	> 0.99	miR-9-5p	1.03096	0.93993792	> 0.99
miR-376a-3p	-1.33359	0.52002741	> 0.99	miR-185-5p	-1.02772	0.941479171	> 0.99
miR-652-3p	-1.22144	0.520972201	> 0.99	miR-148b-3p	-1.02136	0.943314965	> 0.99
miR-384-5p	-1.66002	0.522676853	> 0.99	let-7b-3p	1.02982	0.948895996	> 0.99
miR-15a-5p	-1.1988	0.526304555	> 0.99	miR-361-5p	1.01919	0.949680171	> 0.99
miR-484	1.2093	0.527059918	> 0.99	miR-19b-3p	1.0184	0.950879015	> 0.99
miR-10a-5p	-1.18484	0.527343186	> 0.99	miR-22-3p	-1.0161	0.952337238	> 0.99
miR-30c-1-3p	1.34906	0.527411715	> 0.99	miR-877-5p	-1.05946	0.95295866	> 0.99
miR-1907	-1.5541	0.529101599	> 0.99	miR-134-5p	-1.02583	0.953063675	> 0.99
miR-496a-3p	-1.49921	0.529121753	> 0.99	miR-126-3p	-1.01843	0.953357243	> 0.99
miR-380-3p	-1.31559	0.529724713	> 0.99	miR-130b-3p	1.01539	0.956485648	> 0.99
miR-29b-3p	-1.21343	0.533501308	> 0.99	miR-467e-5p	-1.02614	0.956628131	> 0.99
miR-183-5p	-1.25568	0.53367076	> 0.99	miR-152-3p	-1.01837	0.956684514	> 0.99
miR-668-3p	1.46823	0.54070103	> 0.99	miR-15b-3p	-1.01636	0.957467307	> 0.99
miR-1981-5p	1.304	0.541236383	> 0.99	miR-337-3p	1.02933	0.958839128	> 0.99
let-7g-5p	-1.20816	0.542248856	> 0.99	miR-363-3p	-1.02687	0.959439478	> 0.99
miR-681	-1.2775	0.544839383	> 0.99	miR-141-5p	-1.01567	0.959726238	> 0.99
miR-196a-5p	1.42484	0.545511784	> 0.99	miR-592-5p	1.02687	0.959849228	> 0.99
miR-26b-5p	-1.22183	0.545596588	> 0.99	miR-93-5p	1.0175	0.960150062	> 0.99
miR-20a-5p	1.21247	0.546855081	> 0.99	miR-143-3p	1.01842	0.961328297	> 0.99
miR-378a-3p	-1.18191	0.549339966	> 0.99	miR-98-5p	1.01265	0.962221812	> 0.99
miR-1839-5p	-1.23597	0.551286721	> 0.99	miR-148a-3p	1.02499	0.962643919	> 0.99
miR-467c-5p	-1.39987	0.557488659	> 0.99	miR-30a-3p	1.01277	0.963540033	> 0.99
miR-1930-5p	-1.2353	0.558174561	> 0.99	miR-186-5p	1.01463	0.963967067	> 0.99
miR-329-3p	-1.32162	0.55858676	> 0.99	miR-101b-3p	1.01279	0.966253039	> 0.99
miR-872-5p	-1.22634	0.560623567	> 0.99	miR-328-3p	-1.0099	0.971465622	> 0.99
miR-466g	1.13835	0.562233241	> 0.99	miR-501-5p	1.01908	0.974156787	> 0.99
miR-181b-5p	-1.23382	0.563325127	> 0.99	miR-467a-5p	1.01026	0.974473286	> 0.99

miR-1961	-1.16355	0.563948042	> 0.99	miR-467d-5p	1.00969	0.976355787	> 0.99
miR-677-5p	-1.56007	0.567482938	> 0.99	miR-758-3p	-1.0119	0.977783334	> 0.99
miR-320-3p	-1.14466	0.568355728	> 0.99	miR-218-5p	1.00952	0.979237797	> 0.99
miR-379-5p	-1.28426	0.570861729	> 0.99	miR-103-3p	1.00757	0.980475762	> 0.99
miR-26a-5p	-1.21815	0.571961528	> 0.99	miR-299a-3p	-1.01495	0.981181548	> 0.99
miR-676-5p	1.39656	0.573366462	> 0.99	miR-103-2-5p	-1.00815	0.982523402	> 0.99
miR-1191	-1.22016	0.575472303	> 0.99	let-7f-1-3p	1.00676	0.983312908	> 0.99
miR-200b-3p	-1.20339	0.579741888	> 0.99	miR-219-5p	-1.00646	0.985901288	> 0.99
miR-181a-5p	-1.18609	0.58078805	> 0.99	miR-1968-5p	1.01004	0.989507805	> 0.99
miR-224-5p	-1.21863	0.581129952	> 0.99	miR-23b-3p	-1.0041	0.989938852	> 0.99
miR-1934-5p	-1.46695	0.581218057	> 0.99	miR-467d-3p	1.00219	> 0.99	> 0.99
miR-155-5p	-1.2168	0.582849306	> 0.99	miR-342-5p	1.00292	> 0.99	> 0.99
miR-1935	1.53764	0.585890589	> 0.99	miR-22-5p	1.00282	> 0.99	> 0.99

Listado completo de los miRNAs analizados y los resultados de *Fold change* (Tratado vs. Control), valor-p y el valor-p ajustado por múltiples comparaciones (método Benjamini-Hochberg) para el experimento de 4 días (Short) con animales macho C57BL/6. N = 5 para cada uno de los grupos.

Tabla suplementaria 7. miRNAs intestinales alterados tras carga oral de aceite de oliva suplementado con colesterol (Pulse, 2 horas).

miRNA	Fold Change	P-value	P (Benjamini-Hochberg)	miRNA	Fold Change	P-value	P (Benjamini-Hochberg)
miR-1198-3p	-6.31318	0.000000601	0.00038	miR-126-5p	-1.13608	0.548487366	0.98681
miR-146b-3p	5.43465	0.000009171	0.00217	miR-1964-3p	-1.47649	0.549345755	0.98681
miR-344d-3p	6.43262	0.000010398	0.00217	miR-125b-2-3p	-1.24345	0.550223002	0.98681
miR-295-3p	-4.29874	0.000036507	0.00572	miR-27a-5p	-1.27178	0.550304787	0.98681
miR-1953	-7.70450	0.000060548	0.00744	miR-1932	-1.21415	0.550716126	0.98681
miR-202-5p	3.65784	0.000071176	0.00744	let-7f-1-3p	-1.18304	0.551761047	0.98681
miR-218-2-3p	-12.77451	0.000085398	0.00765	miR-1952	1.36465	0.553444371	0.98681
miR-669k-3p	3.08565	0.000415439	0.02965	miR-674-3p	-1.15861	0.554586227	0.98681
miR-193b-5p	6.00800	0.000425593	0.02965	miR-192-3p	-1.15044	0.554735748	0.98681
miR-344c-3p	-2.62812	0.000556269	0.03488	miR-221-3p	1.10069	0.554740504	0.98681
miR-742-5p	-6.80429	0.000934505	0.05327	miR-465c-5p	-1.32945	0.555192243	0.98681
miR-669i	-2.61952	0.003287716	0.15185	miR-148b-3p	1.09497	0.561977757	0.98681
miR-21a-3p	1.87419	0.004237462	0.16606	miR-297a-5p	-1.19448	0.562952511	0.98681
miR-431-3p	-4.19093	0.006663082	0.24575	miR-466f	1.35893	0.563730854	0.98681
miR-669h-3p	-2.17928	0.008379005	0.27651	let-7g-3p	-1.13360	0.565148821	0.98681
miR-1938	3.92242	0.011373244	0.33957	miR-1941-3p	-1.12154	0.565741721	0.98681
miR-337-5p	2.78200	0.012927918	0.36473	miR-669e-5p	-1.45727	0.565772562	0.98681
miR-711	3.46159	0.013379281	0.36473	miR-127-5p	-1.16899	0.565850141	0.98681
miR-208a-5p	1.71258	0.016217771	0.40082	miR-871-5p	1.11169	0.568048282	0.98681
miR-495-3p	1.39168	0.016368189	0.40082	miR-327	-1.16365	0.568469042	0.98681
miR-300-5p	2.33113	0.016620968	0.40082	miR-709	1.15259	0.568929507	0.98681
miR-291a-5p	2.30465	0.017658152	0.40534	miR-21a-5p	1.09796	0.570184132	0.98681
miR-216a-5p	-10.26927	0.01825907	0.40534	miR-125a-3p	1.37915	0.570465044	0.98681
miR-217-5p	-11.15673	0.01874785	0.40534	miR-22-3p	1.09030	0.572148567	0.98681
miR-216b-5p	-11.09591	0.025384101	0.51752	miR-27b-5p	-1.24673	0.574862273	0.98681
miR-133a-5p	-2.54275	0.02714961	0.53196	let-7c-1-3p	1.29253	0.577895486	0.98681
miR-1929-5p	-2.89497	0.028630244	0.54397	miR-1894-3p	-1.36605	0.581248943	0.98681
miR-212-3p	1.45241	0.030170276	0.55638	miR-125b-1-3p	1.44292	0.581522332	0.98681
miR-449c-5p	1.55212	0.035099061	0.60451	miR-214-5p	-1.13151	0.585085657	0.98681
miR-879-3p	-3.41937	0.035334039	0.60451	miR-199a-3p	1.11088	0.587103006	0.98681
miR-343	2.47500	0.035672674	0.60451	miR-199b-5p	-1.13016	0.588317804	0.98681
miR-1894-5p	-2.23618	0.039274597	0.61492	miR-25-3p	1.09331	0.588778485	0.98681
miR-433-5p	-1.71165	0.041335566	0.61492	miR-532-5p	-1.13944	0.592354942	0.98681
miR-671-3p	2.76779	0.041461315	0.61492	let-7i-3p	-1.17339	0.593354878	0.98681
miR-412-3p	1.84826	0.041932827	0.61492	miR-196b-5p	-1.35680	0.593698916	0.98681
miR-129-2-3p	-3.38114	0.043805288	0.62423	miR-136-5p	-1.11937	0.599272285	0.98681
miR-770-5p	3.06709	0.045293095	0.63108	miR-351-5p	1.16588	0.5999153	0.98681
miR-466h-5p	-2.52719	0.049487627	0.67454	miR-423-5p	1.12591	0.603094582	0.98681
miR-672-5p	1.67295	0.053192922	0.69273	miR-145a-3p	-1.12580	0.603615851	0.98681
miR-1193-5p	2.15511	0.055041927	0.69273	miR-378a-5p	-1.13761	0.603933653	0.98681

miR-1951	1.70908	0.055536517	0.69273	miR-202-3p	1.51583	0.607570047	0.98681
miR-383-5p	-2.56845	0.05563155	0.69273	miR-667-3p	-1.32620	0.607888024	0.98681
miR-1895	1.61219	0.056346166	0.69273	let-7f-2-3p	-1.14141	0.610019003	0.98681
miR-762	1.68071	0.057838479	0.6974	miR-181d-5p	1.09878	0.614360251	0.98681
miR-344b-3p	-3.22535	0.060978456	0.71488	miR-1949	-1.14039	0.615347564	0.98681
miR-34c-3p	-3.17645	0.062889206	0.71488	miR-434-3p	-1.13478	0.616792815	0.98681
miR-362-3p	-1.33557	0.063908177	0.71488	miR-126-3p	1.08521	0.618360766	0.98681
miR-323-3p	3.01811	0.066513252	0.71488	miR-18a-5p	1.08630	0.619818664	0.98681
miR-450a-2-3p	2.14393	0.066733049	0.71488	miR-340-3p	-1.14246	0.621952542	0.98681
miR-296-3p	-1.54215	0.067269105	0.71488	miR-142-3p	-1.08883	0.622275906	0.98681
miR-183-3p	1.35583	0.072168811	0.74331	miR-455-5p	1.09898	0.624533879	0.98681
miR-742-3p	2.52887	0.07231559	0.74331	miR-134-5p	-1.28765	0.630102548	0.98681
miR-1981-5p	-1.86024	0.07599697	0.74793	miR-33-5p	-1.09403	0.632145991	0.98681
miR-92b-3p	2.12838	0.078787954	0.74793	miR-423-3p	1.10112	0.633509499	0.98681
miR-1947-5p	3.71134	0.079273051	0.74793	miR-130b-5p	-1.15496	0.634102328	0.98681
miR-448-3p	-1.64006	0.080096509	0.74793	miR-652-3p	1.10573	0.634885476	0.98681
miR-1247-5p	-2.00801	0.081158776	0.74793	miR-708-5p	-1.08749	0.63561159	0.98681
miR-294-5p	2.09906	0.082702466	0.74793	miR-710	1.19309	0.640912981	0.98681
miR-698-3p	-1.52980	0.083850035	0.74793	miR-669l-5p	-1.22980	0.642320276	0.98681
miR-452-5p	-1.93372	0.084693845	0.74793	miR-335-5p	1.11561	0.642742542	0.98681
miR-487b-3p	1.34654	0.090732947	0.7834	miR-187-3p	-1.14591	0.645202778	0.98681
miR-615-3p	1.73039	0.093346091	0.7834	miR-186-5p	1.06939	0.649966145	0.98681
miR-298-5p	1.71378	0.094195515	0.7834	miR-339-3p	-1.15219	0.651656757	0.98681
miR-761	-1.73545	0.094724683	0.7834	miR-466f-3p	-1.18157	0.652693148	0.98681
miR-1955-5p	-2.37944	0.094957769	0.7834	miR-15a-3p	-1.13735	0.657166246	0.98681
miR-615-5p	1.85379	0.097621107	0.78584	miR-129-5p	1.23600	0.660028731	0.98681
miR-1966-5p	3.00420	0.105591169	0.82085	miR-674-5p	-1.09322	0.660682255	0.98681
miR-1948-3p	-2.63048	0.106142894	0.82085	miR-764-5p	1.18413	0.663041734	0.98681
miR-32-5p	-1.29492	0.107351586	0.82085	miR-146b-5p	1.06129	0.665020793	0.98681
miR-18b-5p	-1.85474	0.10960623	0.82799	miR-1249-3p	-1.12810	0.665957216	0.98681
miR-465b-5p	2.29175	0.114242152	0.8517	miR-744-3p	-1.12406	0.667249367	0.98681
miR-29c-5p	-1.37690	0.116232031	0.8517	miR-429-3p	1.07316	0.667536033	0.98681
miR-384-3p	-2.43653	0.118252279	0.8517	miR-99b-5p	-1.09268	0.667825469	0.98681
miR-122-5p	-1.65085	0.119166853	0.8517	miR-10b-3p	-1.38320	0.672113146	0.98681
let-7a-2-3p	-3.09849	0.119624124	0.8517	miR-1934-5p	-1.33499	0.672233897	0.98681
miR-1967	-1.80259	0.122500194	0.8517	miR-135a-5p	1.06989	0.672347973	0.98681
miR-203-5p	-1.31562	0.124689631	0.8517	miR-205-5p	-1.15417	0.674240816	0.98681
miR-1902	1.96291	0.125012447	0.8517	miR-338-3p	-1.10586	0.675075581	0.98681
miR-501-5p	-1.51007	0.12580119	0.8517	miR-124-3p	-1.08718	0.676935767	0.98681
miR-1927	-2.10772	0.126328829	0.8517	miR-455-3p	1.08317	0.676960155	0.98681
miR-542-3p	-1.63830	0.131659494	0.8782	miR-706	1.11922	0.679200678	0.98681
miR-297a-3p	2.10121	0.137240218	0.89635	miR-194-2-3p	-1.12557	0.681728147	0.98681
miR-10a-3p	-1.57027	0.140630548	0.89975	miR-141-5p	-1.11132	0.681880421	0.98681
miR-504-5p	2.08806	0.146308795	0.92662	miR-541-5p	1.12819	0.681913186	0.98681
miR-23a-5p	-2.22490	0.149437905	0.93698	miR-194-5p	-1.06001	0.682534257	0.98681
miR-744-5p	1.27880	0.151860547	0.94274	miR-1956	1.31491	0.686034725	0.98681
miR-376a-3p	-1.50289	0.169658478	0.97336	miR-182-5p	1.08602	0.687485361	0.98681
miR-673-5p	-3.19374	0.173607836	0.97336	miR-293-3p	1.23416	0.687562472	0.98681
miR-1186a	-3.24955	0.17431818	0.97336	miR-31-5p	-1.08183	0.688475335	0.98681
miR-804	-2.21023	0.175580426	0.97336	miR-190a-5p	-1.08241	0.68921168	0.98681
miR-409-3p	1.65436	0.177295186	0.97336	miR-223-3p	1.06751	0.692223956	0.98681
miR-101a-5p	-1.45960	0.178922331	0.97336	miR-96-5p	-1.07922	0.694073332	0.98681
miR-700-3p	1.93410	0.178926078	0.97336	miR-325-3p	-1.25040	0.698132422	0.98681
miR-483-3p	1.60618	0.179419091	0.97336	miR-467b-5p	-1.07158	0.698352344	0.98681
miR-692	-1.64946	0.179644215	0.97336	miR-543-3p	-1.13367	0.700509611	0.98681
miR-34c-5p	1.19891	0.184532729	0.97336	miR-324-3p	1.07312	0.700867213	0.98681
miR-369-3p	1.29281	0.186670101	0.97336	miR-138-5p	1.02954	0.704579669	0.98681
miR-1907	1.57154	0.196005285	0.97336	miR-450a-5p	1.09991	0.705920702	0.98681
miR-17-5p	1.23269	0.197634925	0.97336	miR-379-3p	1.08437	0.706528502	0.98681
miR-532-3p	-1.39461	0.201046781	0.97336	miR-155-5p	1.09535	0.706955508	0.98681
miR-874-3p	1.37168	0.201486029	0.97336	miR-497-5p	1.06086	0.709097073	0.98681
miR-500-3p	-1.29686	0.205386036	0.97336	miR-183-5p	1.06085	0.710194828	0.98681
miR-687	-1.33448	0.206525175	0.97336	miR-490-3p	-1.09572	0.711240848	0.98681
miR-669d-5p	-1.54992	0.207757484	0.97336	miR-150-5p	-1.10909	0.711348148	0.98681
miR-433-3p	2.08174	0.210067459	0.97336	miR-214-3p	-1.08090	0.714874181	0.98681
miR-484	1.19941	0.210690786	0.97336	miR-486-3p	1.24211	0.718491511	0.98681
miR-329-3p	-1.45719	0.211063792	0.97336	miR-20b-5p	1.08622	0.719500755	0.98681
miR-7b-5p	1.18828	0.211586153	0.97336	miR-219-1-3p	-1.25041	0.724015616	0.98681

miR-670-5p	-1.75418	0.212409194	0.97336	miR-148a-5p	-1.14257	0.726076419	0.98681
miR-654-3p	1.51465	0.212642464	0.97336	miR-7a-1-3p	-1.08435	0.726603207	0.98681
miR-873a-5p	-3.15562	0.215263551	0.97336	miR-105	1.24789	0.730006142	0.98681
miR-1195	1.37715	0.215703624	0.97336	miR-382-5p	1.07320	0.733467313	0.98681
miR-574-3p	1.40599	0.215784884	0.97336	miR-16-5p	1.05997	0.733709784	0.98681
miR-30d-3p	-1.31638	0.226168288	0.98681	miR-345-3p	1.10768	0.734051868	0.98681
miR-139-3p	1.99938	0.22707416	0.98681	miR-322-3p	-1.09055	0.734517571	0.98681
miR-2137	1.39960	0.228139826	0.98681	miR-185-5p	1.06282	0.736634187	0.98681
miR-1946b	-1.64222	0.230041323	0.98681	miR-181a-1-3p	-1.12424	0.737104792	0.98681
miR-669n	-1.59581	0.232011206	0.98681	miR-222-3p	-1.07662	0.73816719	0.98681
miR-669j	-1.38206	0.234051943	0.98681	miR-1946a	-1.10662	0.738742943	0.98681
miR-434-5p	1.23517	0.23776456	0.98681	miR-380-3p	-1.13609	0.740694512	0.98681
miR-147-3p	1.28130	0.248021354	0.98681	miR-143-3p	1.06310	0.741881703	0.98681
miR-875-5p	1.63382	0.248421947	0.98681	miR-200c-3p	1.05980	0.743077254	0.98681
miR-335-3p	-1.18712	0.248533334	0.98681	miR-324-5p	1.07087	0.746880848	0.98681
miR-496a-3p	-1.59284	0.248576231	0.98681	miR-19b-1-5p	1.08767	0.753074331	0.98681
miR-466j	-2.06679	0.24933981	0.98681	let-7e-5p	1.06097	0.754154788	0.98681
miR-466k	-1.70584	0.252842476	0.98681	miR-154-5p	1.06660	0.757080419	0.98681
miR-431-5p	1.23937	0.254886311	0.98681	miR-19a-3p	1.05002	0.75750093	0.98681
miR-466b-5p	-2.08961	0.255392545	0.98681	miR-467d-5p	1.07879	0.758310153	0.98681
miR-384-5p	1.39751	0.25542332	0.98681	miR-142-5p	-1.05632	0.765470697	0.98681
miR-872-3p	-1.20384	0.257433288	0.98681	miR-200c-5p	1.08427	0.765901681	0.98681
miR-193a-5p	-1.70614	0.259166114	0.98681	miR-23b-3p	1.05336	0.773379164	0.98681
miR-1982.1-3p	-7.94614	0.266240345	0.98681	miR-1928	1.14519	0.774725235	0.98681
miR-369-5p	1.63559	0.267369116	0.98681	miR-379-5p	1.07656	0.776938774	0.98681
miR-211-5p	-1.72814	0.270209409	0.98681	miR-195a-3p	-1.10560	0.777602392	0.98681
miR-291b-5p	1.47303	0.271719563	0.98681	miR-669b-5p	-1.11788	0.777720732	0.98681
miR-210-3p	1.59123	0.274358131	0.98681	miR-363-3p	1.07409	0.781340148	0.98681
miR-490-5p	-1.26405	0.27443351	0.98681	miR-1961	1.04509	0.785793797	0.98681
miR-539-5p	-2.08499	0.275076724	0.98681	miR-376c-3p	-1.04755	0.786182735	0.98681
miR-27a-3p	1.14164	0.276516044	0.98681	miR-30c-2-3p	1.07892	0.787707267	0.98681
miR-1905	1.23801	0.278302021	0.98681	miR-200b-5p	-1.06675	0.788417038	0.98681
miR-137-3p	1.10796	0.27969605	0.98681	miR-151-3p	1.07907	0.78986141	0.98681
miR-743a-3p	-1.50361	0.282631707	0.98681	miR-467a-5p	-1.05164	0.790276923	0.98681
miR-130a-3p	1.15843	0.283300189	0.98681	miR-666-3p	-1.27016	0.79166353	0.98681
miR-26a-5p	1.24258	0.284588808	0.98681	miR-1306-3p	-1.28069	0.792909019	0.98681
miR-1940	1.47489	0.285137169	0.98681	miR-7a-5p	1.03877	0.79718129	0.98681
miR-106a-5p	1.19713	0.290705778	0.98681	miR-34a-5p	-1.04720	0.801348439	0.98681
miR-1196-5p	1.67544	0.292760076	0.98681	miR-92a-2-5p	-1.12796	0.801456252	0.98681
miR-30a-3p	-1.16479	0.296245417	0.98681	miR-467g	-1.11519	0.802338016	0.98681
miR-129-1-3p	-2.31475	0.296623897	0.98681	miR-299a-3p	1.09367	0.80295254	0.98681
miR-681	-1.46228	0.298091054	0.98681	miR-186-3p	-1.07593	0.805982213	0.98681
miR-467f	1.50226	0.301923715	0.98681	miR-760-3p	1.16207	0.8072241	0.98681
miR-320-3p	1.25175	0.310928906	0.98681	miR-381-3p	-1.08063	0.808194136	0.98681
miR-708-3p	1.67399	0.317088524	0.98681	miR-326-3p	1.05182	0.809357577	0.98681
miR-704	1.92680	0.322599669	0.98681	miR-188-3p	-1.11675	0.809391544	0.98681
miR-1b-5p	1.89133	0.327286157	0.98681	miR-712-5p	-1.05675	0.810570643	0.98681
miR-208b-3p	-1.52657	0.327469575	0.98681	miR-152-3p	-1.04932	0.813217856	0.98681
miR-191-3p	-1.28127	0.328345767	0.98681	miR-207	-1.11306	0.813327189	0.98681
miR-676-3p	-1.25334	0.332784961	0.98681	let-7f-5p	1.03698	0.814264841	0.98681
miR-802-5p	-1.17157	0.333890501	0.98681	miR-30b-5p	1.03076	0.819033449	0.98681
miR-467e-5p	-1.19174	0.338009825	0.98681	let-7g-5p	-1.04543	0.819363982	0.98681
miR-449a-5p	1.34915	0.338816496	0.98681	miR-1983	-1.06732	0.819695903	0.98681
miR-598-3p	-1.42891	0.340814499	0.98681	miR-20b-3p	1.11206	0.820185035	0.98681
miR-1191	-1.35175	0.34606123	0.98681	miR-540-5p	1.06468	0.820786768	0.98681
miR-410-3p	1.27468	0.359774979	0.98681	miR-99a-5p	-1.05190	0.820839341	0.98681
miR-30d-5p	-1.15507	0.359841184	0.98681	miR-100-5p	-1.04383	0.821213806	0.98681
miR-501-3p	-1.19549	0.364174172	0.98681	miR-421-3p	1.05905	0.821590992	0.98681
miR-224-5p	1.34101	0.367728782	0.98681	miR-877-5p	1.12310	0.826265192	0.98681
miR-466d-5p	-2.25184	0.371753957	0.98681	miR-20a-3p	-1.05949	0.828352452	0.98681
miR-28a-3p	-1.28088	0.377145119	0.98681	miR-411-5p	1.04349	0.828605781	0.98681
miR-551b-3p	1.56756	0.378966523	0.98681	miR-139-5p	1.05078	0.830799119	0.98681
miR-132-3p	1.19886	0.386558875	0.98681	miR-488-3p	1.06809	0.833552489	0.98681
miR-872-5p	-1.21882	0.387233392	0.98681	miR-491-3p	-1.06169	0.833849869	0.98681
miR-544-3p	-1.64056	0.388046953	0.98681	miR-376b-3p	1.06592	0.834049038	0.98681
miR-677-5p	-1.38318	0.388167369	0.98681	miR-200a-5p	-1.04601	0.834065511	0.98681
miR-374b-5p	1.14296	0.388258929	0.98681	miR-375-3p	1.04462	0.835438479	0.98681
miR-340-5p	-1.22171	0.388272459	0.98681	miR-9-3p	-1.07422	0.838906462	0.98681

miR-30e-3p	-1.19467	0.389124852	0.98681	miR-451a	-1.06085	0.839548675	0.98681
miR-30c-1-3p	-1.31638	0.392435459	0.98681	miR-1199-5p	1.05205	0.839979525	0.98681
miR-26b-5p	1.11252	0.395668302	0.98681	miR-93-5p	1.04180	0.844165994	0.98681
miR-409-5p	1.33936	0.395965816	0.98681	miR-1839-3p	1.06236	0.848394817	0.98681
miR-466d-3p	1.71971	0.396891493	0.98681	miR-149-5p	1.06065	0.848861975	0.98681
miR-135b-5p	1.34206	0.397027787	0.98681	miR-190b-5p	1.07691	0.849344376	0.98681
miR-297c-5p	-1.49175	0.398701082	0.98681	miR-181b-5p	1.04431	0.849648657	0.98681
miR-29a-5p	-1.17675	0.402704471	0.98681	miR-2139	1.06768	0.851633123	0.98681
miR-1935	1.73377	0.403089087	0.98681	miR-467d-3p	-1.05889	0.852144371	0.98681
let-7b-5p	1.18370	0.404455438	0.98681	miR-22-5p	-1.03637	0.853382732	0.98681
miR-10b-5p	1.13404	0.41042303	0.98681	miR-145a-5p	1.04021	0.858637965	0.98681
miR-325-5p	-1.54802	0.410970162	0.98681	miR-503-5p	1.04130	0.85891743	0.98681
miR-1198-5p	-1.26166	0.411852925	0.98681	miR-219-5p	-1.04671	0.860235154	0.98681
miR-337-3p	-1.34211	0.424692078	0.98681	miR-1943-5p	1.09015	0.865065181	0.98681
miR-743b-5p	1.39949	0.425287719	0.98681	miR-184-3p	-1.11857	0.865613099	0.98681
miR-450b-5p	-1.76937	0.431265437	0.98681	miR-465a-3p	1.03123	0.865818474	0.98681
miR-331-5p	-1.64574	0.431612879	0.98681	miR-29b-1-5p	-1.03909	0.86710366	0.98681
miR-546	-1.41336	0.432507021	0.98681	miR-330-5p	-1.04671	0.868498136	0.98681
miR-148a-3p	-1.23828	0.432732416	0.98681	miR-23a-3p	1.03142	0.868987826	0.98681
miR-153-3p	-1.19593	0.434639568	0.98681	miR-345-5p	1.03084	0.869562013	0.98681
miR-713	1.14969	0.434833868	0.98681	miR-192-5p	-1.02564	0.872621885	0.98681
miR-196a-5p	1.81486	0.436729557	0.98681	miR-30e-5p	-1.02694	0.872941167	0.98681
miR-668-3p	-1.27234	0.437757235	0.98681	miR-17-3p	-1.03333	0.875861013	0.98681
miR-2183	-1.29782	0.438122007	0.98681	miR-30c-5p	1.02523	0.877068404	0.98681
miR-346-5p	-1.63096	0.438492044	0.98681	miR-450b-3p	1.05225	0.877383586	0.98681
miR-1930-5p	-1.35242	0.440908542	0.98681	miR-28a-5p	1.02950	0.880268187	0.98681
miR-15b-3p	-1.19683	0.443833615	0.98681	miR-191-5p	-1.02331	0.881654492	0.98681
miR-503-3p	1.14847	0.446003354	0.98681	miR-127-3p	-1.04124	0.883996868	0.98681
let-7e-3p	-1.28710	0.446731894	0.98681	miR-378a-3p	-1.02483	0.885520558	0.98681
miR-196b-3p	-1.32222	0.447693946	0.98681	miR-370-3p	-1.05958	0.888136745	0.98681
miR-297b-5p	1.46299	0.451420966	0.98681	miR-141-3p	1.02048	0.891912424	0.98681
miR-1957a	1.31524	0.451549685	0.98681	miR-592-5p	-1.04656	0.8922324	0.98681
miR-138-1-3p	-1.47423	0.452146051	0.98681	miR-466c-5p	1.05782	0.893886885	0.98681
miR-99b-3p	-1.35451	0.454094163	0.98681	miR-106b-5p	1.02077	0.895403263	0.98681
miR-758-3p	1.40887	0.456327409	0.98681	miR-342-3p	1.02185	0.898305912	0.98681
miR-328-3p	1.33144	0.456542304	0.98681	miR-218-5p	1.02758	0.900563123	0.98681
let-7c-5p	1.12057	0.461549864	0.98681	miR-323-5p	1.03117	0.900583497	0.98681
let-7b-3p	1.32918	0.462670235	0.98681	miR-491-5p	1.02882	0.901206762	0.98681
miR-376b-5p	-1.27255	0.46621605	0.98681	miR-676-5p	-1.05649	0.901290855	0.98681
miR-376c-5p	1.50001	0.46837319	0.98681	miR-30a-5p	1.01903	0.905342774	0.98681
miR-130b-3p	1.08663	0.471134381	0.98681	miR-682	-1.05816	0.909458603	0.98681
miR-10a-5p	1.10594	0.472118659	0.98681	miR-125a-5p	1.02539	0.913979226	0.98681
miR-330-3p	-1.36138	0.474647785	0.98681	miR-382-3p	1.06928	0.914488203	0.98681
miR-465a-5p	1.22356	0.476551222	0.98681	miR-133b-3p	1.02378	0.915027972	0.98681
miR-694	1.30012	0.479724936	0.98681	miR-101b-3p	-1.01474	0.916794113	0.98681
miR-18a-3p	1.15425	0.479806502	0.98681	miR-350-3p	-1.01785	0.91851016	0.98681
miR-361-5p	1.56751	0.480568633	0.98681	miR-15a-5p	1.01753	0.921665986	0.98681
miR-411-3p	1.25744	0.481243856	0.98681	miR-19b-3p	1.01464	0.926918157	0.98681
miR-33-3p	-1.22942	0.482435957	0.98681	miR-181c-5p	-1.01214	0.929680841	0.98681
miR-106b-3p	-1.22990	0.48293703	0.98681	miR-27b-3p	-1.01551	0.929799251	0.98681
miR-362-5p	-1.14764	0.486292433	0.98681	miR-193b-3p	-1.02361	0.930669045	0.98681
miR-425-3p	-1.21286	0.487475467	0.98681	miR-203-3p	-1.01485	0.931262442	0.98681
miR-1a-3p	1.12265	0.490047455	0.98681	miR-103-3p	-1.01465	0.93248678	0.98681
miR-195a-5p	1.12606	0.490715937	0.98681	miR-101a-3p	-1.01464	0.932957523	0.98681
miR-93-3p	-1.20766	0.492262335	0.98681	miR-299a-5p	-1.02365	0.935049824	0.98681
miR-98-5p	1.11684	0.49255531	0.98681	miR-291a-3p	1.07087	0.935728141	0.98681
miR-540-3p	-1.26815	0.493335385	0.98681	miR-1982-5p	1.01649	0.937468221	0.98681
miR-342-5p	-1.22329	0.494883315	0.98681	miR-331-3p	1.02592	0.938403615	0.98681
miR-34b-5p	-1.10814	0.4958587	0.98681	miR-300-3p	1.01232	0.940547608	0.98681
miR-201-5p	1.66492	0.497095447	0.98681	miR-3107-5p	1.02134	0.940593264	0.98681
miR-103-2-5p	-1.17853	0.498482032	0.98681	miR-20a-5p	1.01475	0.941036439	0.98681
miR-301a-3p	1.16419	0.50018335	0.98681	miR-204-5p	-1.01470	0.942016137	0.98681
miR-188-5p	-1.14138	0.504721011	0.98681	miR-301b-3p	1.01878	0.942848887	0.98681
miR-425-5p	1.11453	0.505054234	0.98681	miR-29c-3p	-1.01129	0.944709918	0.98681
miR-466f-5p	-1.38452	0.50627627	0.98681	miR-125b-5p	-1.01577	0.944822966	0.98681
miR-1900	-1.28501	0.507865517	0.98681	miR-193a-3p	-1.01303	0.944841479	0.98681
miR-154-3p	1.53594	0.508384217	0.98681	let-7a-1-3p	-1.01332	0.949033899	0.98681
miR-1903	-1.27892	0.509629923	0.98681	miR-107-3p	1.00873	0.953310409	0.98681

miR-1897-5p	-1.36187	0.512818063	0.98681	miR-466g	-1.01903	0.953813038	0.98681
miR-511-5p	-1.57365	0.513335418	0.98681	miR-215-5p	-1.00928	0.955420656	0.98681
miR-24-3p	1.13294	0.513970099	0.98681	miR-669c-5p	-1.02283	0.955563582	0.98681
miR-146a-5p	1.11244	0.514046545	0.98681	miR-199a-5p	1.00759	0.958655932	0.98681
let-7i-5p	1.14219	0.514387931	0.98681	miR-339-5p	-1.01078	0.959469825	0.98681
miR-212-5p	-1.25180	0.515198045	0.98681	miR-29a-3p	1.00753	0.959560116	0.98681
miR-494-3p	1.19624	0.515272948	0.98681	miR-140-5p	-1.00961	0.959948834	0.98681
miR-468-3p	1.39159	0.515284321	0.98681	miR-1968-5p	-1.02476	0.960048442	0.98681
miR-1839-5p	-1.14486	0.516654085	0.98681	miR-466a-3p	-1.02628	0.960097863	0.98681
miR-16-1-3p	-1.25048	0.518397427	0.98681	miR-365-3p	-1.00981	0.961846277	0.98681
miR-467c-5p	1.19388	0.521461535	0.98681	miR-128-3p	-1.00897	0.962100172	0.98681
miR-34b-3p	1.24601	0.522649622	0.98681	miR-380-5p	-1.01398	0.963189923	0.98681
miR-200b-3p	1.11842	0.526741974	0.98681	miR-133a-3p	-1.00833	0.963544174	0.98681
miR-377-3p	1.10900	0.530955635	0.98681	miR-140-3p	-1.00780	0.965466865	0.98681
miR-206-3p	-1.63182	0.534355846	0.98681	miR-9-5p	-1.00716	0.969490526	0.98681
miR-15b-5p	1.09112	0.538422348	0.98681	miR-669a-5p	1.01125	0.969986161	0.98681
miR-144-3p	-1.18046	0.538518375	0.98681	miR-691	-1.02270	0.970662442	0.98681
let-7d-5p	1.12806	0.538801898	0.98681	miR-296-5p	-1.00912	0.970749274	0.98681
let-7a-5p	1.10788	0.542305202	0.98681	miR-322-5p	1.00495	0.981858215	> 0.99
miR-29b-3p	-1.10503	0.543872013	0.98681	miR-671-5p	1.00477	0.986154879	> 0.99
miR-151-5p	1.11245	0.544653522	0.98681	miR-181a-5p	-1.00345	0.988769985	> 0.99
let-7d-3p	1.39967	0.546667678	0.98681	miR-542-5p	1.00051	> 0.99	> 0.99
miR-26a-1-3p	-1.24326	0.547634109	0.98681	miR-344-3p	-1.00194	> 0.99	> 0.99
miR-467h	-1.26792	0.547988588	0.98681	miR-338-5p	1.00347	> 0.99	> 0.99
miR-26b-3p	-1.12595	0.548211996	0.98681	miR-31-3p	-1.00185	> 0.99	> 0.99
miR-467b-3p	-1.50605	0.548322185	0.98681	miR-200a-3p	1.00097	> 0.99	> 0.99

Listado completo de miRNAs analizados y resultados de Fold change (Tratado vs. Control), valor-p y el valor-p ajustado por múltiples comparaciones (método Benjamini-Hochberg) para el tratamiento Pulse (2 horas tras carga oral) en ratones macho C57BL/6. N = 5 para cada uno de los grupos.

Tabla suplementaria 8. Recuento *reads* normalizado para cada miRNA.

<i>miRNA</i>	Muestra 1 Control	Muestra 2 Control	Muestra 3 Control	Muestra 1 Tratada	Muestra 2 Tratada	Muestra 3 Tratada
let-7a-5p	9129.72	5788.28	7678.78	10005.89	6862.85	9391.44
let-7b-5p	8908.85	8562.46	8612.70	9362.12	9955.06	9477.66
let-7c-5p	25851.92	20208.20	21390.43	28004.29	25321.32	27396.68
let-7d-5p	4640.70	3024.88	4104.80	4803.06	3550.99	4274.69
let-7e-5p	179.48	126.62	154.44	196.07	155.24	186.62
let-7f-5p	30344.49	16553.39	23902.76	33841.09	19299.73	31306.43
let-7g-5p	31000.01	24092.44	29309.61	34023.73	26762.06	32724.98
let-7i-5p	38298.29	41729.54	43577.84	43872.04	45400.55	43867.71
let-7j	2641.02	2632.33	2354.97	2828.53	2550.86	2468.70
let-7k	3.55	1.90	2.91	3.27	3.63	4.15
miR-100-5p	20.40	15.55	23.80	12.35	23.12	22.51
miR-101a-5p	10.94	14.91	17.97	14.89	19.49	11.77
miR-103-1-5p	3348.88	3163.24	2559.92	3740.27	3295.01	3115.82
miR-103-2-5p	3389.68	3191.49	2571.57	3769.68	3318.13	3140.75
miR-103-3p	3348.88	3163.24	2559.92	3740.27	3295.01	3115.82
miR-106b-5p	690.41	870.46	785.31	696.42	834.32	702.18
miR-107-5p	410.70	303.69	275.37	495.63	387.43	391.25
miR-10a-5p	70.08	82.19	163.67	79.16	76.30	181.78
miR-10b-5p	355.41	372.24	384.64	237.47	213.70	382.94
miR-1191a	25.72	0.00	21.37	19.97	0.00	20.77
miR-1198-5p	170.02	190.72	202.03	157.95	183.97	133.65
miR-12182-5p	3.84	6.03	0.00	4.72	3.30	3.12
miR-12184-5p	11.53	10.79	11.66	8.71	11.23	9.00
miR-1224-5p	12.71	17.45	9.71	5.45	8.59	0.00
miR-122-5p	337.96	465.22	658.56	695.70	403.29	372.90
miR-1249-5p	1.18	5.08	3.89	2.18	2.64	5.89
miR-125a-5p	81.90	83.78	86.93	100.22	89.51	70.29
miR-125b-5p	20.40	24.75	34.00	17.43	21.80	21.47
miR-126a-5p	214.37	218.33	186.98	194.26	189.59	189.74
miR-128-1-5p	643.70	669.59	609.02	749.07	621.61	599.69
miR-128-2-5p	452.10	496.64	428.84	524.68	476.28	431.76

miR-1306-3p	20.70	21.90	0.00	17.43	0.00	22.85
miR-1306-5p	20.70	21.90	0.00	17.43	0.00	22.85
miR-130a-3p	5.03	4.76	5.83	4.72	4.62	2.08
miR-130a-5p	5.03	4.76	5.83	4.72	4.62	2.08
miR-130b-5p	151.39	133.28	164.15	146.33	120.56	173.12
miR-132-5p	9.17	9.20	12.63	13.80	13.21	15.93
miR-139-5p	127.44	122.49	144.24	145.97	123.20	158.23
miR-140-5p	665.28	771.77	641.07	701.87	719.05	673.44
miR-143-5p	5.32	5.71	3.40	5.81	6.61	3.46
miR-146a-5p	22.47	29.20	27.68	19.97	21.14	35.32
miR-146b-5p	606.14	616.59	426.41	527.94	507.33	430.72
miR-147-5p	0.00	13.01	9.23	14.16	19.82	10.04
miR-148a-5p	90939.14	47452.45	29265.91	82745.67	44734.68	40266.80
miR-148b-5p	1848.59	1473.73	1496.81	2032.26	1462.87	1820.88
miR-149-5p	10.94	11.74	8.74	10.17	10.90	8.31
miR-151-5p	4073.88	4294.88	5083.89	4759.12	4282.26	4904.85
miR-152-5p	19.22	23.48	25.74	22.51	16.51	21.81
miR-155-5p	97.87	72.99	105.87	80.24	71.01	102.83
miR-15a-5p	0.00	0.00	0.00	5.45	9.25	9.00
miR-15b-5p	194.26	109.80	185.52	167.03	101.73	176.24
miR-16-5p	433.47	339.87	386.59	411.03	393.38	407.18
miR-17-5p	0.00	0.00	767.34	905.20	785.77	819.55
miR-181a-5p	994.08	971.69	1070.40	945.87	953.56	1009.99
miR-181b-5p	528.97	440.78	479.83	437.53	423.44	445.96
miR-181c-5p	22.18	21.26	12.63	18.15	20.15	21.81
miR-181d-5p	456.23	309.72	371.04	374.35	314.11	431.76
miR-182-5p	22622.20	24676.98	24497.20	22998.99	25073.60	24013.21
miR-183-5p	10169.33	9012.13	11327.55	10979.72	9942.51	11479.62
miR-1839-5p	480.78	489.97	514.31	538.84	538.71	512.09
miR-1843a-5p	94.03	124.40	110.24	117.28	135.09	111.49
miR-184-5p	13.31	19.99	12.14	12.71	19.16	7.27
miR-185-5p	722.94	780.02	737.23	682.99	770.25	666.17
miR-186-5p	225.31	278.31	225.35	218.95	255.98	208.44
miR-187-5p	26.91	30.15	22.83	28.68	30.39	19.74
miR-18a-5p	18.92	22.85	21.37	15.25	20.48	19.74
miR-191-5p	6757.77	7779.27	7378.16	6426.83	7371.83	6431.43
miR-192-5p	234652.7	228923.8	201401.4	264455.5	239517.9	212698.0
miR-1936	1.48	4.44	4.86	3.63	4.29	5.54
miR-193a-5p	5.32	3.17	0.00	0.00	0.00	4.15
miR-1943-5p	0.89	7.30	6.31	3.27	2.97	6.58
miR-1945	3.55	0.00	0.00	2.90	3.63	3.81
miR-194-5p	49190.85	44736.34	34102.60	48148.60	46693.65	36503.16
miR-1947-5p	49.67	50.77	47.59	71.17	45.58	63.02
miR-195a-5p	5.03	5.71	3.89	3.27	7.93	4.50
miR-1960	3.55	8.25	1.94	9.80	8.26	6.23
miR-1964-5p	28.39	28.24	46.62	33.04	29.07	49.86
miR-1968-5p	47.60	49.82	45.17	38.49	47.89	42.59
miR-1981-5p	492.31	680.06	342.39	502.53	617.65	294.65
miR-19a-5p	18.33	0.00	0.00	17.43	20.48	14.20
miR-19b-1-5p	38.44	36.49	33.51	34.13	38.31	33.24
miR-19b-2-5p	38.73	37.45	34.00	34.49	38.64	33.24
miR-1a-1-5p	5.91	6.35	2.91	7.99	7.93	2.08
miR-1a-2-5p	5.91	6.35	2.91	7.99	7.93	2.08
miR-200a-5p	7899.69	9493.22	8116.36	7924.61	9605.94	8247.81
miR-200b-5p	49943.95	46377.94	49852.57	49583.57	43974.34	49430.77
miR-200c-5p	18836.02	17723.43	19171.45	18716.25	17502.60	18178.35
miR-203-5p	3178.86	2748.48	2367.11	3028.24	2550.86	2382.83
miR-203b-5p	11.24	15.23	6.80	14.52	13.87	13.85
miR-205-5p	92.55	97.11	85.48	75.52	85.88	68.56
miR-20a-5p	1092.54	662.92	854.28	1052.26	623.93	850.71
miR-210-5p	808.09	1229.06	677.01	953.86	1394.17	951.82
miR-212-5p	3.84	6.35	6.31	5.08	7.60	7.96
miR-215-5p	205579.71	197674.11	138304.96	238655.21	217805.71	156762.06
miR-218-5p	937.90	691.80	979.09	1548.25	1043.40	1528.31
miR-219a-5p	4.14	6.35	0.00	3.27	4.95	3.81
miR-21a-5p	35982.52	42176.99	34086.57	42280.94	48624.22	41116.48
miR-221-5p	682.13	625.48	644.47	717.48	808.23	663.05
miR-222-5p	215.26	197.07	241.86	261.07	262.58	273.18

miR-224-5p	503.54	399.53	485.66	646.68	475.95	490.62
miR-22-5p	1113.53	1543.22	914.01	1298.80	1929.58	1077.85
miR-23a-5p	200.77	260.85	277.31	235.65	260.93	230.94
miR-23b-5p	1601.70	1607.64	1999.95	1564.23	1496.89	1821.23
miR-24-1-5p	1333.22	1588.60	1428.33	1262.13	1431.49	1192.45
miR-24-2-5p	1333.22	1588.60	1428.33	1262.13	1431.49	1192.45
miR-24-3p	1333.22	1588.60	1428.33	1262.13	1431.49	1192.45
miR-25-5p	5552.88	3540.24	6785.65	5467.53	3522.91	6024.94
miR-26a-5p	17484.76	17158.56	21522.05	18084.82	16981.07	18584.15
miR-26b-5p	1646.35	994.54	1726.04	1750.13	1191.04	1825.04
miR-27a-5p	424.89	317.97	399.21	473.48	361.34	378.79
miR-27b-5p	15118.72	12518.42	10334.37	15556.21	11711.56	11996.22
miR-28a-5p	340.33	373.51	353.56	340.95	387.77	298.11
miR-296-5p	12.42	26.97	35.94	6.54	16.84	38.09
miR-298-5p	7.69	14.60	30.11	11.26	8.92	32.55
miR-29a-5p	927.25	959.95	834.85	937.16	1036.13	839.63
miR-29b-1-5p	19.81	22.85	18.46	17.07	20.81	25.62
miR-29b-2-5p	19.81	22.85	18.46	17.07	20.81	25.62
miR-29c-5p	16.56	18.09	19.91	11.98	10.90	19.04
miR-301a-5p	8.87	3.81	0.00	10.89	4.62	6.23
miR-3066-5p	8.87	7.30	4.37	12.35	9.91	4.50
miR-3068-5p	0.00	14.60	0.00	10.89	15.52	0.00
miR-3074-5p	23.36	19.99	16.51	23.60	30.39	19.04
miR-3076-5p	2.07	3.81	4.86	1.45	4.29	0.00
miR-3082-5p	7.39	4.13	1.46	6.54	4.62	4.85
miR-3095-5p	3.55	5.71	7.77	4.72	5.61	5.19
miR-3098-5p	2.37	4.76	2.91	1.82	4.95	1.38
miR-30a-5p	2783.53	2699.93	2486.58	2801.30	2759.28	2710.03
miR-30b-5p	239.80	164.70	227.77	221.49	190.25	260.03
miR-30c-5p	3513.86	2707.54	2923.19	3146.97	2427.00	2952.05
miR-30d-5p	0.00	0.00	0.00	10591.93	10531.42	11441.19
miR-30e-5p	1065.34	1287.13	910.61	1054.80	1430.83	1066.08
miR-3105-5p	8.28	7.30	8.74	6.17	8.92	6.58
miR-31-5p	986.39	846.03	875.16	905.20	918.55	848.29
miR-320-5p	1311.05	1539.42	1308.37	1255.59	1515.72	1186.22
miR-324-5p	25.43	23.80	32.54	26.87	24.44	19.74
miR-32-5p	50.56	42.21	31.08	45.39	51.20	32.89
miR-330-5p	59.73	59.03	61.19	61.73	47.89	49.51
miR-331-5p	0.00	15.87	18.94	9.44	19.49	19.74
miR-339-5p	49.38	53.00	46.14	44.30	38.97	40.86
miR-340-5p	26.61	26.97	24.28	35.22	27.08	23.20
miR-342-5p	34.00	21.90	40.80	27.60	24.44	49.51
miR-345-5p	63.57	65.69	97.62	64.99	54.17	83.10
miR-3473b	22.47	26.02	0.00	34.49	44.59	52.63
miR-3474	5.32	3.17	3.89	4.36	3.63	4.50
miR-34a-5p	105.56	78.38	56.82	105.30	81.58	80.33
miR-34b-5p	7.39	5.08	2.91	7.63	7.60	7.27
miR-34c-5p	37.55	32.05	11.66	32.32	45.25	12.81
miR-361-5p	493.79	576.61	513.83	568.61	610.05	569.22
miR-362-5p	0.00	67.91	0.00	51.92	79.27	60.25
miR-365-1-5p	11.53	10.15	13.11	7.26	9.91	16.97
miR-365-2-5p	11.53	7.30	13.11	8.35	9.91	16.97
miR-374b-5p	374.04	195.16	292.37	362.73	197.19	398.52
miR-375-5p	9619.37	10100.61	10830.23	8545.51	9247.57	9419.14
miR-378a-5p	22294.59	32533.36	20313.72	22560.00	30293.24	20954.51
miR-378d	2882.00	3779.52	2197.61	4093.20	5216.66	4254.96
miR-423-5p	2668.81	3441.55	2689.59	2705.44	3522.91	2720.42
miR-425-5p	790.94	702.91	820.77	774.85	651.01	968.78
miR-429-5p	2431.08	2144.26	2651.22	2453.82	2304.46	2759.20
miR-452-5p	9.17	9.84	3.89	9.08	7.60	9.00
miR-455-5p	5.62	6.03	1.94	2.90	4.62	4.50
miR-486a-5p	6.21	10.15	11.66	9.80	7.93	7.62
miR-499-5p	17.74	10.79	12.63	13.07	9.91	10.04
miR-500-5p	5.62	10.15	0.00	6.17	11.56	4.15
miR-501-5p	156.12	201.51	177.75	168.84	187.61	158.92
miR-5113	3.25	6.98	4.86	3.99	3.30	5.54
miR-5126	5.91	5.08	2.91	3.27	6.94	3.81
miR-574-5p	30.75	13.33	24.28	19.24	15.85	25.97

miR-582-5p	75.99	81.24	39.82	56.64	62.76	58.17
miR-598-5p	7.69	6.35	4.37	9.80	5.61	7.27
miR-652-3p	444.70	0.00	0.00	0.00	488.17	537.71
miR-652-5p	444.70	418.89	505.09	414.66	488.17	537.71
miR-664-5p	17.45	19.99	25.25	22.15	35.01	17.31
miR-671-5p	48.20	66.01	59.25	48.66	61.43	46.05
miR-674-5p	217.33	255.78	247.20	230.93	254.99	203.59
miR-676-5p	7.98	11.42	2.43	12.35	6.61	10.04
miR-6909-5p	1.48	4.76	4.37	0.00	4.95	1.73
miR-6979-5p	2.96	3.81	3.40	5.08	2.97	4.50
miR-6988-5p	5.03	6.03	1.94	6.90	4.62	4.50
miR-700-5p	38.73	28.88	37.40	35.95	32.70	36.01
miR-7033-5p	4.73	1.59	5.34	2.54	3.96	1.73
miR-704	8.87	5.39	15.06	11.98	9.58	9.35
miR-7043-5p	14.19	8.25	14.08	13.80	7.27	16.27
miR-7079-5p	0.00	3.17	2.91	6.54	4.29	3.12
miR-7091-5p	5.62	5.08	2.91	3.63	5.61	1.38
miR-7688-5p	5.62	0.00	12.14	9.44	13.87	11.77
miR-7a-5p	20231.04	24101.32	21755.65	21168.97	23724.35	20084.06
miR-7b-5p	1133.05	1233.18	1077.68	1211.66	1326.46	1102.78
miR-802-5p	66.82	55.85	46.14	56.64	57.47	48.47
miR-872-5p	103.49	95.20	137.44	91.86	93.14	87.60
miR-92a-1-5p	5928.39	4735.03	6412.66	5558.67	4480.77	6412.04
miR-92a-2-5p	819.92	599.77	1155.39	877.61	717.40	1082.00
miR-92b-5p	3.55	7.93	9.23	5.81	5.95	6.23
miR-93-5p	1705.78	1615.58	1618.71	1690.58	1520.34	1544.93
miR-96-5p	1479.88	1020.56	1317.11	1623.41	995.18	1598.60
miR-98-5p	875.21	609.61	786.28	999.61	635.49	943.51
miR-99a-5p	1013.30	1005.97	1640.08	965.84	1005.74	1496.11
miR-99b-5p	125.07	143.12	130.64	153.59	168.45	127.07

Listado de miRNAs encontrados por secuenciación masiva del transcriptoma y su recuento normalizado, para las muestras de organoides intestinales derivados de ratón, bajo las condiciones control (micelas vacías, EM en medio IntestiCult) y tratados (24 horas de incubación con micelas postprandiales en medio IntestiCult). N = 3 por grupo, muestras Control de 1 a 3 representan enteroides tratados con micelas vacías y muestras Tratadas 1 a 3 representan enteroides tratados con micelas postprandiales.

Tabla suplementaria 9. miRNAs diferencialmente expresados en enteroides tratados.

miRNA	LogFC	logCPM	P-value	FDR	miRNA	LogFC	logCPM	P-value	FDR
miR-30d-5p	17.93	12.41	2.18E-150	4.30E-148	miR-23b-5p	-0.09	10.72	7.04E-01	1
miR-15a-5p	7.52	2.23	3.74E-12	3.69E-10	miR-183-5p	0.09	13.36	7.07E-01	1
miR-218-5p	0.66	10.13	3.57E-02	1	miR-185-5p	-0.08	9.51	7.10E-01	1
miR-378d	0.61	11.87	5.54E-02	1	miR-331-5p	0.49	3.86	7.11E-01	1
miR-7079-5p	1.22	2.00	1.51E-01	1	miR-186-5p	-0.09	7.88	7.12E-01	1
miR-1224-5p	-1.50	3.28	1.56E-01	1	miR-7b-5p	0.08	10.21	7.20E-01	1
miR-1960	0.78	2.82	1.70E-01	1	miR-374b-5p	0.15	8.25	7.23E-01	1
miR-132-5p	0.49	3.70	1.91E-01	1	miR-26b-5p	0.13	10.57	7.28E-01	1
miR-222-5p	0.29	7.92	2.09E-01	1	miR-1a-1-5p	0.22	2.65	7.29E-01	1
miR-10b-5p	-0.42	8.34	2.13E-01	1	miR-1a-2-5p	0.22	2.65	7.29E-01	1
miR-107-5p	0.36	8.56	2.19E-01	1	miR-15b-5p	-0.14	7.29	7.29E-01	1
miR-3473b	1.43	4.95	2.28E-01	1	let-7d-5p	0.10	11.99	7.34E-01	1
miR-1945	1.44	1.62	2.29E-01	1	miR-574-5p	-0.16	4.48	7.36E-01	1
miR-34b-5p	0.50	2.82	2.61E-01	1	miR-3105-5p	-0.16	3.06	7.36E-01	1
let-7c-5p	0.26	14.59	2.67E-01	1	miR-92b-5p	-0.17	2.83	7.40E-01	1
miR-872-5p	-0.30	6.67	2.77E-01	1	miR-3068-5p	0.85	2.93	7.42E-01	1
miR-125b-5p	-0.37	4.58	2.89E-01	1	miR-27a-5p	0.09	8.62	7.48E-01	1
miR-205-5p	-0.26	6.41	2.99E-01	1	miR-652-5p	0.07	8.87	7.65E-01	1
miR-339-5p	-0.26	5.53	3.13E-01	1	miR-181a-5p	-0.06	9.95	7.66E-01	1
miR-29c-5p	-0.37	4.07	3.13E-01	1	miR-106b-5p	-0.07	9.58	7.69E-01	1
miR-21a-5p	0.23	15.31	3.19E-01	1	miR-320-5p	-0.07	10.40	7.69E-01	1
miR-1947-5p	0.28	5.79	3.53E-01	1	miR-30b-5p	0.09	7.77	7.70E-01	1
miR-1198-5p	-0.24	7.44	3.55E-01	1	miR-455-5p	-0.22	2.33	7.72E-01	1
miR-3076-5p	-0.86	1.77	3.77E-01	1	miR-1964-5p	0.12	5.19	7.74E-01	1
miR-7688-5p	0.99	3.24	3.78E-01	1	miR-26a-5p	-0.07	14.16	7.75E-01	1

miR-130a-3p	-0.44	2.37	3.91E-01	1	miR-486a-5p	-0.13	3.26	7.80E-01	1
miR-130a-5p	-0.44	2.37	3.91E-01	1	miR-452-5p	0.13	3.14	7.84E-01	1
miR-19a-5p	1.49	3.65	3.95E-01	1	miR-16-5p	0.06	8.63	7.86E-01	1
miR-147-5p	0.99	3.55	4.03E-01	1	miR-365-2-5p	0.15	3.57	7.90E-01	1
let-7e-5p	0.22	7.38	4.20E-01	1	miR-93-5p	-0.05	10.66	7.90E-01	1
miR-203b-5p	0.32	3.74	4.22E-01	1	miR-30a-5p	0.05	11.40	7.94E-01	1
miR-375-5p	-0.17	13.23	4.24E-01	1	miR-674-5p	-0.06	7.88	7.96E-01	1
miR-499-5p	-0.33	3.71	4.25E-01	1	miR-652-3p	1.21	7.94	7.99E-01	1
miR-224-5p	0.22	8.97	4.27E-01	1	miR-128-2-5p	0.06	8.87	8.07E-01	1
miR-3074-5p	0.28	4.52	4.27E-01	1	miR-181c-5p	0.09	4.33	8.07E-01	1
miR-210-5p	0.28	9.97	4.44E-01	1	miR-429-5p	0.06	11.26	8.08E-01	1
miR-7033-5p	-0.46	1.99	4.54E-01	1	miR-28a-5p	-0.06	8.45	8.16E-01	1
miR-301a-5p	0.74	2.70	4.57E-01	1	miR-34c-5p	0.15	4.88	8.18E-01	1
miR-221-5p	0.17	9.43	4.59E-01	1	miR-149-5p	-0.11	3.44	8.19E-01	1
let-7b-5p	0.14	13.16	4.72E-01	1	miR-203-5p	-0.06	11.40	8.20E-01	1
miR-22-5p	0.27	10.36	4.77E-01	1	miR-151-5p	0.05	12.16	8.23E-01	1
miR-24-1-5p	-0.16	10.42	4.79E-01	1	miR-1981-5p	-0.10	8.93	8.23E-01	1
miR-24-2-5p	-0.16	10.42	4.79E-01	1	miR-501-5p	-0.05	7.46	8.28E-01	1
miR-24-3p	-0.16	10.42	4.79E-01	1	miR-99a-5p	-0.08	10.21	8.32E-01	1
miR-181b-5p	-0.15	8.85	4.95E-01	1	miR-143-5p	0.11	2.53	8.33E-01	1
miR-212-5p	0.34	2.78	4.99E-01	1	miR-29a-5p	0.05	9.85	8.37E-01	1
let-7a-5p	0.22	12.99	4.99E-01	1	miR-25-5p	-0.08	12.33	8.38E-01	1
miR-99b-5p	0.17	7.15	5.00E-01	1	miR-3095-5p	-0.09	2.60	8.40E-01	1
miR-330-5p	-0.18	5.84	5.04E-01	1	miR-1943-5p	-0.16	2.38	8.47E-01	1
miR-3066-5p	0.36	3.11	5.12E-01	1	miR-802-5p	-0.06	5.81	8.48E-01	1
miR-103-1-5p	0.16	11.65	5.12E-01	1	let-7j	0.04	11.33	8.50E-01	1
miR-103-3p	0.16	11.65	5.12E-01	1	miR-92a-1-5p	-0.05	12.45	8.50E-01	1
miR-361-5p	0.14	9.12	5.13E-01	1	miR-425-5p	0.05	9.62	8.58E-01	1
let-7f-5p	0.25	14.66	5.15E-01	1	miR-19b-2-5p	-0.05	5.20	8.60E-01	1
miR-12184-5p	-0.23	3.48	5.19E-01	1	miR-101a-5p	0.09	3.97	8.60E-01	1
miR-103-2-5p	0.16	11.66	5.20E-01	1	miR-200c-5p	-0.03	14.16	8.62E-01	1
miR-324-5p	-0.19	4.71	5.42E-01	1	miR-10a-5p	0.10	6.77	8.65E-01	1
miR-664-5p	0.26	4.56	5.42E-01	1	miR-27b-5p	0.05	13.65	8.68E-01	1
let-7k	0.40	1.98	5.44E-01	1	miR-12182-5p	0.13	2.10	8.71E-01	1
miR-362-5p	1.49	5.46	5.44E-01	1	miR-32-5p	0.06	5.42	8.73E-01	1
miR-676-5p	0.38	3.21	5.46E-01	1	miR-128-1-5p	0.04	9.34	8.79E-01	1
miR-146b-5p	-0.17	9.02	5.46E-01	1	miR-200b-5p	-0.03	15.56	8.79E-01	1
let-7g-5p	0.15	14.86	5.61E-01	1	miR-92a-2-5p	0.06	9.77	8.80E-01	1
miR-6909-5p	-0.64	1.83	5.66E-01	1	miR-219a-5p	0.16	2.18	8.80E-01	1
miR-98-5p	0.18	9.66	5.69E-01	1	miR-29b-1-5p	0.05	4.42	8.81E-01	1
miR-7091-5p	-0.37	2.26	5.73E-01	1	miR-29b-2-5p	0.05	4.42	8.81E-01	1
miR-1843a-5p	0.15	6.86	5.76E-01	1	miR-342-5p	0.07	5.07	8.81E-01	1
miR-215-5p	0.18	17.55	5.77E-01	1	miR-125a-5p	0.04	6.43	8.83E-01	1
miR-598-5p	0.27	2.92	5.77E-01	1	miR-704	0.10	3.42	8.87E-01	1
miR-18a-5p	-0.18	4.35	5.84E-01	1	miR-195a-5p	0.09	2.53	8.95E-01	1
miR-1968-5p	-0.15	5.52	5.86E-01	1	miR-20a-5p	-0.05	9.74	8.96E-01	1
miR-6979-5p	0.30	2.16	5.88E-01	1	miR-194-5p	0.04	15.40	8.97E-01	1
miR-1936	0.36	2.23	5.91E-01	1	miR-19b-1-5p	-0.04	5.19	9.01E-01	1
miR-6988-5p	0.25	2.48	5.95E-01	1	miR-146a-5p	-0.05	4.74	9.01E-01	1
miR-191-5p	-0.12	12.78	5.98E-01	1	miR-7a-5p	-0.02	14.42	9.14E-01	1
miR-148b-5p	0.14	10.72	5.99E-01	1	miR-130b-5p	-0.03	7.22	9.22E-01	1
let-7i-5p	0.11	15.39	6.01E-01	1	miR-1191a	-0.21	3.93	9.26E-01	1
miR-671-5p	-0.15	5.80	6.14E-01	1	miR-423-5p	0.02	11.53	9.29E-01	1
miR-126a-5p	-0.11	7.64	6.16E-01	1	miR-31-5p	-0.02	9.81	9.30E-01	1
miR-152-5p	-0.16	4.47	6.24E-01	1	miR-23a-5p	-0.02	7.94	9.35E-01	1
miR-1839-5p	0.10	9.00	6.32E-01	1	miR-378a-5p	-0.03	14.60	9.38E-01	1
miR-193a-5p	-1.02	1.53	6.35E-01	1	miR-181d-5p	-0.02	8.56	9.43E-01	1
miR-345-5p	-0.16	6.17	6.37E-01	1	miR-100-5p	-0.03	4.34	9.48E-01	1
miR-192-5p	0.11	17.81	6.40E-01	1	miR-200a-5p	0.02	13.06	9.49E-01	1
miR-139-5p	0.12	7.10	6.43E-01	1	miR-187-5p	-0.02	4.76	9.54E-01	1
miR-5113	-0.23	2.42	6.62E-01	1	miR-140-5p	0.01	9.44	9.61E-01	1
miR-3098-5p	-0.29	1.90	6.68E-01	1	miR-365-1-5p	-0.02	3.61	9.73E-01	1
miR-184-5p	-0.22	3.89	6.69E-01	1	miR-1306-3p	-0.08	3.87	9.74E-01	1
miR-96-5p	0.14	10.39	6.69E-01	1	miR-1306-5p	-0.08	3.87	9.74E-01	1
miR-34a-5p	0.15	6.42	6.73E-01	1	miR-7043-5p	0.03	3.70	9.76E-01	1
miR-30e-5p	0.12	10.15	6.74E-01	1	miR-182-5p	0.01	14.55	9.77E-01	1
miR-500-5p	0.45	2.82	6.78E-01	1	miR-122-5p	0.01	8.94	9.82E-01	1
miR-3082-5p	0.25	2.48	6.78E-01	1	miR-298-5p	0.02	4.18	9.89E-01	1

miR-17-5p	1.71	9.10	6.79E-01	1	miR-148a-5p	0.00	15.77	9.99E-01	1
miR-582-5p	-0.16	5.98	6.88E-01	1	miR-1249-5p	0.09	2.05	1.00E+00	1
miR-340-5p	0.13	4.80	6.90E-01	1	miR-5126	-0.01	2.43	1.00E+00	1
miR-30c-5p	-0.10	11.52	6.96E-01	1	miR-700-5p	0.00	5.16	1.00E+00	1
miR-296-5p	-0.29	4.55	6.98E-01	1	miR-3474	0.00	2.28	1.00E+00	1

Listado de miRNAs encontrados por RNA-Seq y el análisis comparado de su expresión en enteroides bajo el tratamiento de 24 horas con micelas postprandiales (PPM) y respecto a la expresión de las muestras control tratadas con micelas vacías (EM). Los resultados obtenidos de la secuenciación muestran el logaritmo del *Fold change* (logFC), el logaritmo de las unidades por millón (log CPM), el valor-p (P-value) y el FDR. N = 3 por grupo.

Tabla suplementaria 10. Resultados de múltiples comparaciones por el método de Bonferroni para el análisis Two-way ANOVA de la validación de los miRNAs candidatos en duodeno de animales WT de la cohorte 2.

miR-218-2-3p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	1.5300	-0.5303	0.1772	0.0140	*
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	0.3783	0.6217	0.1905	0.0067	**
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.5300	0.3783	1.1520	0.1849	<0.0001	****
Hembras	Control vs. Tratados 2h	0.8292	0.8537	-0.0245	0.1664	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	0.8292	0.8863	-0.0572	0.1614	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	0.8537	0.8863	-0.0327	0.1664	>0.9999	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	0.8292	0.1708	0.1726	0.9840	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.5300	0.8537	0.6766	0.1712	0.0009	***
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	0.3783	0.8863	-0.5080	0.1805	0.0224	*
miR-138-1-3p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	1.6150	-0.6152	0.2726	0.0870	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	0.3030	0.6970	0.2726	0.0422	*
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.6150	0.3030	1.3120	0.2633	<0.0001	****
Hembras	Control vs. Tratados 2h	0.8870	0.8113	0.0758	0.2498	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	0.8870	1.2870	-0.4003	0.2420	0.3154	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	0.8113	1.2870	-0.4761	0.2559	0.2085	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	0.8870	0.1130	0.2595	>0.9999	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.6150	0.8113	0.8039	0.2633	0.0115	*
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	0.3030	1.2870	-0.9844	0.2559	0.0011	**
miR-147-3p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	3.3520	-2.3520	0.6737	0.0033	**
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	1.4990	-0.4991	0.6737	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	3.3520	1.4990	1.8530	0.6509	0.0201	*
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.3030	2.7950	-1.4910	0.6175	0.0598	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.3030	1.4970	-0.1934	0.5981	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	2.7950	1.4970	1.2980	0.6325	0.1384	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	1.3030	-0.3035	0.6415	>0.9999	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	3.3520	2.7950	0.5568	0.6509	>0.9999	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	1.4990	1.4970	0.0023	0.6325	>0.9999	ns
miR-217-5p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	1.7660	-0.7657	0.6333	0.7007	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	1.4880	-0.4879	0.6333	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.7660	1.4880	0.2778	0.6118	>0.9999	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.8260	1.4230	0.4033	0.6333	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.8260	1.8270	-0.0009	0.6167	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.4230	1.8270	-0.4042	0.5946	>0.9999	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	1.8260	-0.8262	0.6541	0.6410	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.7660	1.4230	0.3428	0.6118	>0.9999	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	1.4880	1.8270	-0.3391	0.5946	>0.9999	ns

miR-216b-5p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	1.3350	-0.3348	0.7195	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	1.3610	-0.3609	0.7195	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.3350	1.3610	-0.0261	0.6951	>0.9999	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	3.3820	1.4240	1.9590	0.6595	0.0144	*
	Control vs. Tratados 4h	3.3820	2.0340	1.3480	0.6388	0.1217	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.4240	2.0340	-0.6108	0.6755	>0.9999	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	3.3820	-2.3820	0.6851	0.0035	**
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.3350	1.4240	-0.0887	0.6951	>0.9999	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	1.3610	2.0340	-0.6735	0.6755	0.9727	ns
miR-544-3p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	1.6280	-0.6283	0.2387	0.0352	*
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	0.7049	0.2951	0.2312	0.6259	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.6280	0.7049	0.9234	0.2312	0.0007	***
Hembras	Control vs. Tratados 2h	0.8605	1.1970	-0.3368	0.2119	0.3575	ns
	Control vs. Tratados 4h	0.8605	1.1460	-0.2860	0.2052	0.5119	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.1970	1.1460	0.0509	0.2170	>0.9999	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	0.8605	0.1395	0.2201	>0.9999	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.6280	1.1970	0.4310	0.2312	0.2073	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	0.7049	1.1460	-0.4416	0.2170	0.1443	ns
miR-129-2-3p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	1.6190	-0.6192	0.4687	0.5826	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	1.3920	-0.3916	0.4841	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.6190	1.3920	0.2276	0.4687	>0.9999	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.1790	2.4130	-1.2340	0.4773	0.0407	*
	Control vs. Tratados 4h	1.1790	1.4360	-0.2567	0.4400	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	2.4130	1.4360	0.9777	0.4891	0.1578	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	1.1790	-0.1789	0.4564	>0.9999	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.6190	2.4130	-0.7941	0.4891	0.3375	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	1.3920	1.4360	-0.0440	0.4687	>0.9999	ns
miR-208b-3p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	2.1770	-1.1770	0.2941	0.0008	***
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	0.5630	0.4370	0.2848	0.3977	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	2.1770	0.5630	1.6140	0.2848	<0.0001	****
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.1150	1.1040	0.0111	0.2674	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.1150	0.7316	0.3833	0.2674	0.4777	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.1040	0.7316	0.3723	0.2751	0.5504	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	1.1150	-0.1150	0.2773	>0.9999	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	2.1770	1.1040	1.0730	0.2848	0.0016	**
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	0.5630	0.7316	-0.1686	0.2751	>0.9999	ns
miR-202-5p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	1.1520	-0.1525	0.1507	0.9526	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	0.6901	0.3099	0.1507	0.1384	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.1520	0.6901	0.4624	0.1456	0.0085	**
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.1260	0.9260	0.2004	0.1456	0.5283	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.1260	0.7712	0.3552	0.1456	0.0574	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	0.9260	0.7712	0.1547	0.1456	0.8823	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	1.1260	-0.1264	0.1507	>0.9999	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.1520	0.9260	0.2265	0.1456	0.3824	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	0.6901	0.7712	-0.0812	0.1456	>0.9999	ns

miR-150-5p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	1.6690	-0.6688	0.4002	0.3051	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	0.9875	0.0125	0.4002	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.6690	0.9875	0.6813	0.4002	0.2869	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.2560	1.9030	-0.6465	0.3797	0.2866	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.2560	0.8456	0.4104	0.3678	0.8111	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.9030	0.8456	1.0570	0.3890	0.0279	*
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	1.2560	-0.2560	0.3797	>0.9999	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.6690	1.9030	-0.2338	0.4002	>0.9999	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	0.9875	0.8456	0.1419	0.3890	>0.9999	ns
miR-30d-5p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0010	1.1340	-0.1330	0.2245	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0010	0.8663	0.1350	0.2169	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.1340	0.8663	0.2680	0.2245	0.7178	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.1770	1.5300	-0.3533	0.2108	0.3034	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.1770	0.7200	0.4567	0.2108	0.1080	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.5300	0.7200	0.8100	0.2169	0.0017	**
Control	Machos vs. Hembras	1.0010	1.1770	-0.1754	0.2108	>0.9999	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.1340	1.5300	-0.3957	0.2245	0.2558	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	0.8663	0.7200	0.1463	0.2169	>0.9999	ns
miR-15a-5p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	1.1380	-0.1375	0.2197	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	1.0260	-0.0263	0.2197	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.1380	1.0260	0.1113	0.2197	>0.9999	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.1560	1.3310	-0.1751	0.2019	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.1560	0.9844	0.1716	0.2019	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.3310	0.9844	0.3467	0.2072	0.3031	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	1.1560	-0.1560	0.2085	>0.9999	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.1380	1.3310	-0.1936	0.2135	>0.9999	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	1.0260	0.9844	0.0418	0.2135	>0.9999	ns
miR-218-5p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	1.0530	-0.0529	0.2552	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	0.6750	0.3250	0.2466	0.5833	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.0530	0.6750	0.3779	0.2552	0.4380	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.6800	1.7270	-0.0467	0.2325	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.6800	0.8713	0.8088	0.2396	0.0047	**
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.7270	0.8713	0.8554	0.2396	0.0027	**
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	1.6800	-0.6800	0.2396	0.0207	*
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.0530	1.7270	-0.6738	0.2485	0.0288	*
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	0.6750	0.8713	-0.1963	0.2466	>0.9999	ns

Resultados de las comparaciones múltiples aplicando el test de Bonferroni para cada miRNA candidato en el duodeno en función del sexo (Machos y Hembras) y tratamiento (Control con carga oral de agua, y Tratados a las 2 horas y 4 horas tras la carga oral de aceite de oliva enriquecido con colesterol). Se indican las medias (*Mean 1* y *Mean 2*) para cada una de las comparaciones, así como la diferencia entre las medias de expresión (*Mean diff*), la desviación estándar (*SE of diff*) y el valor del valor p ajustado (*Adjusted p-value*). Se muestra la significancia estadística **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, *****p* < 0.0001, o la ausencia de esta (ns). N ≥ 8 por grupo.

Tabla suplementaria 11. Resultados de múltiples comparaciones por el método de Bonferroni para el análisis Two-way ANOVA de la validación de los miRNAs candidatos en yeyuno de animales WT de la cohorte 2.

miR-218-2-3p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	1.4730	-0.4729	0.1839	0.0416	*
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	0.8800	0.1200	0.1781	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.4730	0.8800	0.5929	0.1781	0.0056	**
Hembras	Control vs. Tratados 2h	0.8163	0.7925	0.0238	0.1721	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	0.8163	0.4911	0.3251	0.1672	0.1762	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	0.7925	0.4911	0.3014	0.1672	0.2365	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	0.8163	0.1838	0.1781	0.9248	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.4730	0.7925	0.6804	0.1781	0.0013	**
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	0.8800	0.4911	0.3889	0.1672	0.0752	ns
miR-138-1-3p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0010	1.7560	-0.7550	0.2829	0.0331	*
	Control vs. Tratados 4h	1.0010	0.6850	0.3163	0.3055	0.9210	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.7560	0.6850	1.0710	0.3055	0.0035	**
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.2310	1.0450	0.1863	0.3055	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.2310	0.8156	0.4157	0.2749	0.4156	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.0450	0.8156	0.2294	0.2982	>0.9999	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0010	1.2310	-0.2300	0.2829	>0.9999	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.7560	1.0450	0.7113	0.3055	0.0756	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	0.6850	0.8156	-0.1306	0.2982	>0.9999	ns
miR-147-3p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	0.9986	1.7490	-0.7502	0.4211	0.2453	ns
	Control vs. Tratados 4h	0.9986	0.7250	0.2736	0.4211	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.7490	0.7250	1.0240	0.4068	0.0467	*
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.2730	0.7388	0.5343	0.3860	0.5199	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.2730	0.3856	0.8874	0.3739	0.0661	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	0.7388	0.3856	0.3532	0.3954	>0.9999	ns
Control	Machos vs. Hembras	0.9986	1.2730	-0.2744	0.4010	>0.9999	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.7490	0.7388	1.0100	0.4068	0.0508	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	0.7250	0.3856	0.3394	0.3954	>0.9999	ns
miR-217-5p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	0.9986	1.8140	-0.8152	0.3401	0.0628	ns
	Control vs. Tratados 4h	0.9986	0.7557	0.2429	0.3512	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.8140	0.7557	1.0580	0.3401	0.0099	**
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.1930	1.2450	-0.0520	0.3117	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.1930	0.7511	0.4419	0.3019	0.4516	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.2450	0.7511	0.4939	0.3193	0.3876	ns
Control	Machos vs. Hembras	0.9986	1.1930	-0.1944	0.3238	>0.9999	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.8140	1.2450	0.5688	0.3285	0.2718	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	0.7557	0.7511	0.0046	0.3311	>0.9999	ns
miR-216b-5p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	1.7960	-0.7963	0.3628	0.1009	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	0.8729	0.1271	0.3747	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.7960	0.8729	0.9234	0.3628	0.0438	*
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.3120	1.2110	0.1008	0.3325	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.3120	0.7778	0.5342	0.3221	0.3133	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.2110	0.7778	0.4335	0.3406	0.6299	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	1.3120	-0.3120	0.3454	>0.9999	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.7960	1.2110	0.5850	0.3505	0.3071	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	0.8729	0.7778	0.0951	0.3532	>0.9999	ns

miR-544-3p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	1.6410	-0.6413	0.2552	0.0480	*
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	0.7271	0.2729	0.2636	0.9200	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.6410	0.7271	0.9141	0.2552	0.0027	**
Hembras	Control vs. Tratados 2h	0.9300	1.1410	-0.2113	0.2466	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	0.9300	0.7467	0.1833	0.2396	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.1410	0.7467	0.3946	0.2396	0.3218	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	0.9300	0.0700	0.2552	>0.9999	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.6410	1.1410	0.5000	0.2466	0.1473	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	0.7271	0.7467	-0.0195	0.2485	>0.9999	ns
miR-129-2-3p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	0.9988	1.3340	-0.3350	0.2327	0.4711	ns
	Control vs. Tratados 4h	0.9988	0.6486	0.3502	0.2409	0.4592	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.3340	0.6486	0.6852	0.2409	0.0202	*
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.3320	0.8725	0.4595	0.2207	0.1297	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.3320	0.6144	0.7176	0.2138	0.0049	**
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	0.8725	0.6144	0.2581	0.2261	0.7799	ns
Control	Machos vs. Hembras	0.9988	1.3320	-0.3333	0.2207	0.4148	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.3340	0.8725	0.4613	0.2327	0.1611	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	0.6486	0.6144	0.0341	0.2345	>0.9999	ns
miR-208b-3p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0010	1.7730	-0.7714	0.4187	0.2175	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0010	0.7186	0.2829	0.4187	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.7730	0.7186	1.0540	0.4187	0.0471	*
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.5180	1.4280	0.0905	0.3716	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.5180	0.9589	0.5591	0.3599	0.3835	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.4280	0.9589	0.4686	0.3806	0.6754	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0010	1.5180	-0.5166	0.3860	0.5641	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.7730	1.4280	0.3454	0.4054	>0.9999	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	0.7186	0.9589	-0.2403	0.3948	>0.9999	ns
miR-202-5p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0010	1.1190	-0.1173	0.1148	0.9380	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0010	0.6838	0.3177	0.1148	0.0250	*
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.1190	0.6838	0.4350	0.1109	0.0009	***
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.3300	0.7400	0.5900	0.1078	<0.0001	****
	Control vs. Tratados 4h	1.3300	0.5244	0.8056	0.1046	<0.0001	****
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	0.7400	0.5244	0.2156	0.1078	0.1558	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0010	1.3300	-0.3286	0.1118	0.0159	*
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.1190	0.7400	0.3788	0.1109	0.0042	**
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	0.6838	0.5244	0.1593	0.1078	0.4404	ns
miR-150-5p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	0.9988	0.8271	0.1716	0.2356	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	0.9988	0.7763	0.2225	0.2276	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	0.8271	0.7763	0.0509	0.2356	>0.9999	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	0.6200	0.7500	-0.1300	0.2146	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	0.6200	0.3600	0.2600	0.2294	0.7905	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	0.7500	0.3600	0.3900	0.2294	0.2896	ns
Control	Machos vs. Hembras	0.9988	0.6200	0.3788	0.2212	0.2827	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	0.8271	0.7500	0.0771	0.2294	>0.9999	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	0.7763	0.3600	0.4163	0.2356	0.2536	ns

miR-30d-5p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	1.2210	-0.2213	0.2699	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	0.7938	0.2063	0.2699	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.2210	0.7938	0.4275	0.2699	0.3610	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.2500	1.3230	-0.0733	0.2544	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.2500	0.7863	0.4638	0.2623	0.2518	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.3230	0.7863	0.5371	0.2623	0.1397	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	1.2500	-0.2500	0.2623	>0.9999	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.2210	1.3230	-0.1021	0.2623	>0.9999	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	0.7938	0.7863	0.0075	0.2699	>0.9999	ns
miR-15a-5p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	1.0830	-0.0825	0.2364	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	1.1160	-0.1163	0.2364	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.0830	1.1160	-0.0338	0.2364	>0.9999	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.1040	1.2490	-0.1444	0.2229	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.1040	0.8763	0.2282	0.2297	0.9779	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.2490	0.8763	0.3726	0.2297	0.3357	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	1.1040	-0.1044	0.2297	>0.9999	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.0830	1.2490	-0.1664	0.2297	>0.9999	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	1.1160	0.8763	0.2400	0.2364	0.9465	ns
miR-218-5p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	1.3010	-0.3013	0.2173	0.5180	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	1.2090	-0.2088	0.2173	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.3010	1.2090	0.0925	0.2173	>0.9999	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.1330	1.2480	-0.1144	0.2049	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.1330	0.9725	0.1608	0.2112	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.2480	0.9725	0.2753	0.2112	0.5976	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	1.1330	-0.1333	0.2112	>0.9999	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.3010	1.2480	0.0535	0.2112	>0.9999	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	1.2090	0.9725	0.2363	0.2173	0.8487	ns

Resultados de las comparaciones múltiples aplicando el test de Bonferroni para cada miRNA candidato en el yeyuno en función del sexo (Machos y Hembras) y tratamiento (Control con carga oral de agua, y Tratados a las 2 horas y 4 horas tras la carga oral de aceite de oliva enriquecido con colesterol). Se indican las medias (*Mean 1* y *Mean 2*) para cada una de las comparaciones, así como la diferencia entre las medias de expresión (*Mean diff*), la desviación estándar (*SE of diff*) y el valor del valor p ajustado (*Adjusted p-value*). Se muestra la significancia estadística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, o la ausencia de esta (ns). $N \geq 8$ por grupo.

Tabla suplementaria 12. Resultados de múltiples comparaciones por el método de Bonferroni para el análisis Two-way ANOVA de la validación de los miRNAs candidatos en ileón de animales WT de la cohorte 2.

miR-218-2-3p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0010	1.1800	-0.1788	0.1950	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0010	0.6471	0.3541	0.2018	0.2609	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.1800	0.6471	0.5329	0.2018	0.0353	*
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.0640	1.5130	-0.4489	0.2055	0.1046	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0640	0.4425	0.6219	0.1895	0.0064	**
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.5130	0.4425	1.0710	0.2106	<0.0001	****
Control	Machos vs. Hembras	1.0010	1.0640	-0.0632	0.1895	>0.9999	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.1800	1.5130	-0.3333	0.2106	0.3640	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	0.6471	0.4425	0.2046	0.2018	0.9500	ns
miR-138-1-3p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	1.1610	-0.1613	0.2721	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	0.7763	0.2238	0.2721	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.1610	0.7763	0.3850	0.2721	0.4934	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.4480	1.5740	-0.1263	0.2682	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.4480	0.5214	0.9266	0.2682	0.0038	**
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.5740	0.5214	1.0530	0.2909	0.0024	**
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	1.4480	-0.4480	0.2581	0.2700	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.1610	1.5740	-0.4130	0.2817	0.4499	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	0.7763	0.5214	0.2548	0.2817	>0.9999	ns
miR-147-3p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	0.8867	0.1133	0.2583	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	0.5063	0.4938	0.2392	0.1352	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	0.8867	0.5063	0.3804	0.2583	0.4445	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.0310	0.5989	0.4321	0.2198	0.1673	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0310	0.4013	0.6298	0.2269	0.0244	*
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	0.5989	0.4013	0.1976	0.2324	>0.9999	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	1.0310	-0.0310	0.2269	>0.9999	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	0.8867	0.5989	0.2878	0.2521	0.7800	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	0.5063	0.4013	0.1050	0.2392	>0.9999	ns
miR-217-5p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	0.9786	0.0214	0.3086	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	1.1110	-0.1114	0.3086	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	0.9786	1.1110	-0.1329	0.3187	>0.9999	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.0560	1.6080	-0.5519	0.2897	0.1919	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0560	0.5929	0.4627	0.3004	0.3943	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.6080	0.5929	1.0150	0.3086	0.0063	**
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	1.0560	-0.0556	0.2897	>0.9999	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	0.9786	1.6080	-0.6289	0.3086	0.1445	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	1.1110	0.5929	0.5186	0.3187	0.3346	ns
miR-216b-5p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	1.0400	-0.0400	0.4193	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	1.8580	-0.8575	0.4193	0.1409	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.0400	1.8580	-0.8175	0.4193	0.1732	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.1590	1.4430	-0.2835	0.3977	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.1590	0.6471	0.5119	0.4132	0.6665	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.4430	0.6471	0.7954	0.4340	0.2213	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	1.1590	-0.1590	0.3977	>0.9999	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.0400	1.4430	-0.4025	0.4193	>0.9999	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	1.8580	0.6471	1.2100	0.4340	0.0235	*

miR-544-3p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	1.0350	-0.0350	0.2805	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	1.0600	-0.0600	0.2805	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.0350	1.0600	-0.0250	0.2805	>0.9999	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.2240	1.3880	-0.1631	0.2726	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.2240	0.5243	0.7002	0.2827	0.0521	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.3880	0.5243	0.8632	0.2903	0.0146	*
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	1.2240	-0.2244	0.2726	>0.9999	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.0350	1.3880	-0.3525	0.2805	0.6473	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	1.0600	0.5243	0.5357	0.2903	0.2162	ns
miR-129-2-3p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0010	1.1860	-0.1845	0.2427	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0010	0.7400	0.2613	0.2427	0.8644	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.1860	0.7400	0.4457	0.2506	0.2488	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.2180	1.2340	-0.0160	0.2278	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.2180	0.4457	0.7721	0.2363	0.0067	**
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.2340	0.4457	0.7880	0.2427	0.0071	**
Control	Machos vs. Hembras	1.0010	1.2180	-0.2165	0.2278	>0.9999	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.1860	1.2340	-0.0480	0.2427	>0.9999	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	0.7400	0.4457	0.2943	0.2506	0.7418	ns
miR-208b-3p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	0.9988	1.1830	-0.1838	0.2917	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	0.9988	1.0680	-0.0688	0.2917	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.1830	1.0680	0.1150	0.2917	>0.9999	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.1370	1.5130	-0.3755	0.2767	0.5456	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.1370	0.5543	0.5827	0.2875	0.1467	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.5130	0.5543	0.9582	0.3019	0.0083	**
Control	Machos vs. Hembras	0.9988	1.1370	-0.1383	0.2767	>0.9999	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.1830	1.5130	-0.3300	0.2917	0.7926	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	1.0680	0.5543	0.5132	0.3019	0.2892	ns
miR-202-5p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0010	1.0190	-0.0175	0.1569	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0010	0.7763	0.2250	0.1569	0.4765	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.0190	0.7763	0.2425	0.1569	0.3887	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.1520	0.6788	0.4733	0.1489	0.0082	**
	Control vs. Tratados 4h	1.1520	0.2786	0.8734	0.1547	<0.0001	****
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	0.6788	0.2786	0.4002	0.1624	0.0535	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0010	1.1520	-0.1508	0.1489	0.9506	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.0190	0.6788	0.3400	0.1569	0.1075	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	0.7763	0.2786	0.4977	0.1624	0.0113	*
miR-150-5p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	0.9988	1.2570	-0.2584	0.3297	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	0.9988	1.4290	-0.4300	0.3186	0.5519	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.2570	1.4290	-0.1716	0.3297	>0.9999	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.3200	1.4660	-0.1456	0.2927	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.3200	0.5500	0.7700	0.3022	0.0432	*
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.4660	0.5500	0.9156	0.3096	0.0149	*
Control	Machos vs. Hembras	0.9988	1.3200	-0.3213	0.3022	0.8807	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.2570	1.4660	-0.2084	0.3211	>0.9999	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	1.4290	0.5500	0.8788	0.3186	0.0253	*

miR-30d-5p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	1.4350	-0.4350	0.4657	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	1.0160	-0.0163	0.4657	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.4350	1.0160	0.4188	0.4657	>0.9999	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.7950	1.4620	0.3328	0.4280	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.7950	0.8763	0.9188	0.4418	0.1299	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.4620	0.8763	0.5860	0.4526	0.6061	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	1.7950	-0.7950	0.4418	0.2360	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.4350	1.4620	-0.0272	0.4526	>0.9999	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	1.0160	0.8763	0.1400	0.4657	>0.9999	ns
miR-15a-5p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0010	1.2340	-0.2325	0.2504	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0010	1.1830	-0.1813	0.2504	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.2340	1.1830	0.0513	0.2504	>0.9999	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.3000	1.3270	-0.0267	0.2361	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.3000	0.7738	0.5263	0.2434	0.1082	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.3270	0.7738	0.5529	0.2434	0.0841	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0010	1.3000	-0.2988	0.2434	0.6784	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.2340	1.3270	-0.0929	0.2434	>0.9999	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	1.1830	0.7738	0.4088	0.2504	0.3293	ns
miR-218-5p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0010	1.3860	-0.3850	0.2527	0.4050	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0010	1.3750	-0.3738	0.2527	0.4394	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.3860	1.3750	0.0113	0.2527	>0.9999	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.4090	1.2790	0.1301	0.2456	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.4090	1.0480	0.3614	0.2456	0.4454	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.2790	1.0480	0.2313	0.2527	>0.9999	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0010	1.4090	-0.4076	0.2456	0.3127	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.3860	1.2790	0.1075	0.2527	>0.9999	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	1.3750	1.0480	0.3275	0.2527	0.6058	ns

Resultados de las comparaciones múltiples aplicando el test de Bonferroni para cada miRNA candidato en el ileon en función del sexo (Machos y Hembras) y tratamiento (Control con carga oral de agua, y Tratados a las 2 horas y 4 horas tras la carga oral de aceite de oliva enriquecido con colesterol). Se indican las medias (*Mean 1* y *Mean 2*) para cada una de las comparaciones, así como la diferencia entre las medias de expresión (*Mean diff*), la desviación estándar (*SE of diff*) y el valor del valor p ajustado (*Adjusted p-value*). Se muestra la significancia estadística *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001, o la ausencia de esta (ns). N ≥ 8 por grupo.

Tabla suplementaria 13. Resultados de múltiples comparaciones por el método de Bonferroni para el análisis Two-way ANOVA de la validación de los miRNAs candidatos en colon de animales WT de la cohorte 2.

miR-218-2-3p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	1.1630	-0.1629	0.2534	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	0.3625	0.6375	0.2448	0.0375	*
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.1630	0.3625	0.8004	0.2534	0.0086	**
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.1500	0.7533	0.3967	0.2308	0.2781	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.1500	0.6467	0.5033	0.2308	0.1038	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	0.7533	0.6467	0.1067	0.2308	>0.9999	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	1.1500	-0.1500	0.2379	>0.9999	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.1630	0.7533	0.4095	0.2467	0.3122	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	0.3625	0.6467	-0.2842	0.2379	0.7161	ns
miR-138-1-3p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	1.5010	-0.5014	0.3413	0.4463	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	1.2280	-0.2275	0.3298	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.5010	1.2280	0.2739	0.3413	>0.9999	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.2610	1.2190	0.0421	0.3030	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.2610	1.3700	-0.1090	0.3030	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.2190	1.3700	-0.1511	0.3109	>0.9999	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.1450	1.3430	-0.1975	0.2266	>0.9999	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.1450	1.3030	-0.1579	0.2230	>0.9999	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	1.3430	1.3030	0.0396	0.2297	>0.9999	ns
miR-147-3p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	0.9988	1.5690	-0.5700	0.3381	0.2958	ns
	Control vs. Tratados 4h	0.9988	1.4780	-0.4788	0.3381	0.4906	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.5690	1.4780	0.0913	0.3381	>0.9999	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.1900	1.3260	-0.1356	0.3107	0.2958	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.1900	1.1290	0.0611	0.3107	0.4906	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.3260	1.1290	0.1967	0.3188	>0.9999	ns
Control	Machos vs. Hembras	0.9988	1.1900	-0.1913	0.3208	>0.9999	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.5690	1.3260	0.2432	0.3286	>0.9999	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	1.4780	1.1290	0.3486	0.3286	0.8828	ns
miR-217-5p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	0.6975	0.3025	2.5200	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	2.8590	-1.8590	2.5200	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	0.6975	2.8590	-2.1610	2.5200	>0.9999	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	4.6860	7.1610	-2.4760	2.3760	0.9093	ns
	Control vs. Tratados 4h	4.6860	0.7089	3.9770	2.3760	0.3035	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	7.1610	0.7089	6.4520	2.3760	0.0281	*
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	4.6860	-3.6860	2.4490	0.4182	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	0.6975	7.1610	-6.4640	2.4490	0.0342	*
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	2.8590	0.7089	2.1500	2.4490	>0.9999	ns
miR-216b-5p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0010	0.7500	0.2513	3.3700	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0010	2.2830	-1.2810	3.3700	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	0.7500	2.2830	-1.5330	3.3700	>0.9999	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	6.6670	9.1580	-2.4910	3.0970	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	6.6670	0.7878	5.8790	3.0970	0.1918	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	9.1580	0.7878	8.3700	3.1780	0.0344	*
Control	Machos vs. Hembras	1.0010	6.6670	-5.6660	3.1970	0.2490	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	0.7500	9.1580	-8.4080	3.2750	0.0407	*
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	2.2830	0.7878	1.4950	3.2750	>0.9999	ns

miR-544-3p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	1.3710	-0.3713	0.3025	0.6781	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	1.1100	-0.1100	0.3025	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.3710	1.1100	0.2613	0.3025	>0.9999	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.1140	1.2490	-0.1349	0.2780	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.1140	1.5100	-0.3960	0.2780	0.4833	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.2490	1.5100	-0.2611	0.2852	>0.9999	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	1.1140	-0.1140	0.2870	>0.9999	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.3710	1.2490	0.1224	0.2940	>0.9999	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	1.1100	1.5100	-0.4000	0.2940	0.5409	ns
miR-129-2-3p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	1.6330	-0.6329	0.2727	0.0757	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	0.4571	0.5429	0.2727	0.1591	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.6330	0.4571	1.1760	0.2727	0.0003	***
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.5820	0.8444	0.7376	0.2344	0.0091	**
	Control vs. Tratados 4h	1.5820	0.9038	0.6783	0.2420	0.0229	*
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	0.8444	0.9038	-0.0593	0.2479	>0.9999	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	1.5820	-0.5820	0.2514	0.0767	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.6330	0.8444	0.7884	0.2571	0.0113	*
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	0.4571	0.9038	-0.4466	0.2640	0.2944	ns
miR-208b-3p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	1.4300	-0.4300	0.3809	0.7953	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	1.5060	-0.5063	0.3680	0.5277	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.4300	1.5060	-0.0763	0.3809	>0.9999	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.2420	1.3700	-0.1278	0.3470	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.2420	1.9110	-0.6689	0.3470	0.1810	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.3700	1.9110	-0.5411	0.3470	0.3781	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	1.2420	-0.2422	0.3576	>0.9999	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.4300	1.3700	0.0600	0.3709	>0.9999	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	1.5060	1.9110	-0.4049	0.3576	0.7913	ns
miR-202-5p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0010	1.1230	-0.1216	0.2228	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0010	0.9050	0.0963	0.2152	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.1230	0.9050	0.2179	0.2228	>0.9999	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.2530	0.6144	0.6389	0.2029	0.0088	**
	Control vs. Tratados 4h	1.2530	0.7467	0.5067	0.2029	0.0490	*
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	0.6144	0.7467	-0.1322	0.2029	>0.9999	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0010	1.2530	-0.2521	0.2091	0.7035	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.1230	0.6144	0.5084	0.2169	0.0710	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	0.9050	0.7467	0.1583	0.2091	>0.9999	ns
miR-150-5p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	0.6486	0.3514	0.3407	0.9242	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	0.8343	0.1657	0.3407	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	0.6486	0.8343	-0.1857	0.3519	>0.9999	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.0390	0.7022	0.3367	0.3103	0.8520	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0390	0.7911	0.2478	0.3103	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	0.7022	0.7911	-0.0889	0.3103	>0.9999	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	1.0390	-0.0389	0.3199	>0.9999	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	0.6486	0.7022	-0.0537	0.3317	>0.9999	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	0.8343	0.7911	0.0432	0.3317	>0.9999	ns

miR-30d-5p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	1.1730	-0.1725	0.3378	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	0.7200	0.2800	0.3378	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.1730	0.7200	0.4525	0.3378	0.5612	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.7320	1.3890	0.3433	0.3204	0.8693	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.7320	0.7122	1.0200	0.3104	0.0059	**
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.3890	0.7122	0.6765	0.3282	0.1353	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	1.7320	-0.7320	0.3204	0.0813	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.1730	1.3890	-0.2163	0.3378	>0.9999	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	0.7200	0.7122	0.0078	0.3282	>0.9999	ns
miR-15a-5p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	1.0580	-0.0575	0.2021	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	0.9150	0.0850	0.2021	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.0580	0.9150	0.1425	0.2021	>0.9999	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.2390	1.2200	0.0190	0.1857	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.2390	0.9200	0.3190	0.1857	0.2776	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.2200	0.9200	0.3000	0.1905	0.3665	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	1.2390	-0.2390	1.0000	0.6563	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.0580	1.2200	-0.1625	1.0580	>0.9999	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	0.9150	0.9200	-0.0050	0.9150	>0.9999	ns
miR-218-5p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	1.2510	-0.2513	0.2691	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	0.7143	0.2857	0.2785	0.9313	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.2510	0.7143	0.5370	0.2785	0.1806	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.5190	1.1930	0.3257	0.2473	0.5834	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.5190	1.0040	0.5146	0.2473	0.1295	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.1930	1.0040	0.1889	0.2537	>0.9999	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	1.5190	-0.5190	0.2553	0.1439	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.2510	1.1930	0.0579	0.2615	>0.9999	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	0.7143	1.0040	-0.2902	0.2712	0.8711	ns

Resultados de las comparaciones múltiples aplicando el test de Bonferroni para cada miRNA candidato en el colon en función del sexo (Machos y Hembras) y tratamiento (Control con carga oral de agua, y Tratados a las 2 horas y 4 horas tras la carga oral de aceite de oliva enriquecido con colesterol). Se indican las medias (*Mean 1* y *Mean 2*) para cada una de las comparaciones, así como la diferencia entre las medias de expresión (*Mean diff*), la desviación estándar (*SE of diff*) y el valor del valor p ajustado (*Adjusted p-value*). Se muestra la significancia estadística **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, *****p* < 0.0001, o la ausencia de esta (ns). N ≥ 8 por grupo.

Tabla suplementaria 14. Resultados de múltiples comparaciones por el método de Bonferroni para el análisis Two-way ANOVA de la validación de los miRNAs candidatos en hígado de animales WT de la cohorte 2.

miR-218-2-3p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	1.6380	-0.6375	0.4165	0.3996	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	0.9088	0.0913	0.4165	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.6380	0.9088	0.7288	0.3856	0.1966	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.7810	1.7400	0.0411	0.3636	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.7810	1.3000	0.4811	0.3636	0.5781	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.7400	1.3000	0.4400	0.3636	0.6984	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	1.7810	-0.7811	0.4065	0.1839	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.6380	1.7400	-0.1025	0.3747	>0.9999	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	0.9088	1.3000	-0.3913	0.3747	0.9069	ns
miR-138-1-3p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0010	1.3600	-0.3586	0.3984	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0010	0.7300	0.2714	0.3984	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.3600	0.7300	0.6300	0.3849	0.3265	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.5320	1.5960	-0.0633	0.3629	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.5320	1.2780	0.2544	0.3629	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.5960	1.2780	0.3178	0.3629	>0.9999	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0010	1.5320	-0.5308	0.3880	0.5346	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.3600	1.5960	-0.2356	0.3741	>0.9999	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	0.7300	1.2780	-0.5478	0.3741	0.4506	ns
miR-147-3p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0020	2.3030	-1.3010	1.4450	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0020	1.2610	-0.2596	1.4450	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	2.3030	1.2610	1.0410	1.3380	>0.9999	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	5.6310	4.8360	0.7956	1.2610	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	5.6310	4.4530	1.1780	1.2610	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	4.8360	4.4530	0.3822	1.2610	>0.9999	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0020	5.6310	-4.6290	1.4100	0.0061	**
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	2.3030	4.8360	-2.5330	1.3000	0.1738	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	1.2610	4.4530	-3.1920	1.3000	0.0546	ns
miR-217-5p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	0.9983	2.1080	-1.1090	0.5474	0.1469	ns
	Control vs. Tratados 4h	0.9983	1.0010	-0.0029	0.5474	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	2.1080	1.0010	1.1060	0.5068	0.1037	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	2.0500	2.4710	-0.4211	0.4778	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	2.0500	1.7720	0.2778	0.4778	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	2.4710	1.7720	0.6989	0.4778	0.4525	ns
Control	Machos vs. Hembras	0.9983	2.0500	-1.0520	0.5342	0.1664	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	2.1080	2.4710	-0.3636	0.4925	>0.9999	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	1.0010	1.7720	-0.7710	0.4925	0.3745	ns
miR-216b-5p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	1.8540	-0.8538	0.4467	0.1884	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	1.0210	-0.0213	0.4467	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.8540	1.0210	0.8325	0.4315	0.1814	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.6130	2.1740	-0.5613	0.4315	0.6014	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.6130	1.5230	0.0892	0.4194	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	2.1740	1.5230	0.6504	0.4194	0.3852	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	1.6130	-0.6125	0.4467	0.5327	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.8540	2.1740	-0.3200	0.4315	>0.9999	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	1.0210	1.5230	-0.5021	0.4194	0.7137	ns

miR-544-3p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	1.5710	-0.5713	0.3920	0.4565	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	0.7538	0.2463	0.3920	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.5710	0.7538	0.8175	0.3787	0.1092	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.5680	1.7040	-0.1367	0.3571	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.5680	1.1880	0.3800	0.3571	0.8792	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.7040	1.1880	0.5167	0.3571	0.4650	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	1.5680	-0.5678	0.3817	0.4322	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.5710	1.7040	-0.1332	0.3681	>0.9999	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	0.7538	1.1880	-0.4340	0.3681	0.7340	ns
miR-129-2-3p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	1.6490	-0.6488	0.2809	0.0770	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	0.8375	0.1625	0.2809	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.6490	0.8375	0.8113	0.2714	0.0137	*
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.4100	1.2190	0.1911	0.2558	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.4100	0.9533	0.4567	0.2558	0.2435	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.2190	0.9533	0.2656	0.2558	0.9149	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	1.4100	-0.4100	0.2735	0.4230	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.6490	1.2190	0.4299	0.2637	0.3307	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	0.8375	0.9533	-0.1158	0.2637	>0.9999	ns
miR-208b-3p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	1.8850	-0.8850	0.5692	0.3820	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	0.6713	0.3288	0.5692	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.8850	0.6713	1.2140	0.5270	0.0785	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	2.2930	2.4490	-0.1556	0.4969	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	2.2930	1.4880	0.8056	0.4969	0.3368	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	2.4490	1.4880	0.9611	0.4969	0.1790	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	2.2930	-1.2930	0.5555	0.0740	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.8850	2.4490	-0.5639	0.5122	0.8310	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	0.6713	1.4880	-0.8165	0.5122	0.3546	ns
miR-202-5p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	1.1810	-0.1814	0.1596	0.7865	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	0.9725	0.0275	0.1545	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.1810	0.9725	0.2089	0.1545	0.5512	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.3260	0.7150	0.6106	0.1451	0.0004	***
	Control vs. Tratados 4h	1.3260	0.7213	0.6043	0.1451	0.0005	***
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	0.7150	0.7213	-0.0063	0.1493	>0.9999	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	1.3260	-0.3256	0.1504	0.1091	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.1810	0.7150	0.4664	0.1545	0.0131	*
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	0.9725	0.7213	0.2513	0.1493	0.2998	ns
miR-150-5p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	1.5100	-0.5100	0.4198	0.6930	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	1.0140	-0.0138	0.4055	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.5100	1.0140	0.4963	0.4198	0.7308	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.8600	1.6830	0.1775	0.3941	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.8600	1.4570	0.4033	0.3823	0.8921	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.6830	1.4570	0.2258	0.3941	>0.9999	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	1.8600	-0.8600	0.3941	0.1038	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.5100	1.6830	-0.1725	0.4198	>0.9999	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	1.0140	1.4570	-0.4429	0.3941	0.8019	ns

miR-30d-5p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	1.8250	-0.8250	0.2706	0.0118	*
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	0.7188	0.2813	0.2706	0.9132	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.8250	0.7188	1.1060	0.2706	0.0006	***
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.0920	1.1170	-0.0244	0.2551	>0.9999	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0920	0.6143	0.4779	0.2727	0.2605	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.1170	0.6143	0.5024	0.2727	0.2171	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	1.0920	-0.0922	0.2630	>0.9999	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.8250	1.1170	0.7083	0.2630	0.0301	*
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	0.7188	0.6143	0.1045	0.2801	>0.9999	ns
miR-15a-5p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0000	1.4960	-0.4963	0.3722	0.5673	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0000	0.8238	0.1763	0.3722	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.4960	0.8238	0.6725	0.3722	0.2324	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.5430	1.9080	-0.3644	0.3509	0.9136	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.5430	1.6280	-0.0844	0.3509	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.9080	1.6280	0.2800	0.3509	>0.9999	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0000	1.5430	-0.5433	0.3617	0.4201	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.4960	1.9080	-0.4115	0.3617	0.7837	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	0.8238	1.6280	-0.8040	0.3617	0.0938	ns
miR-218-5p							
		Mean 1	Mean 2	Mean diff	SE of diff	Adjusted p-value	Summary
Machos	Control vs. Tratados 2h	1.0010	1.5490	-0.5473	0.2489	0.1006	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.0010	1.0960	-0.0948	0.2489	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.5490	1.0960	0.4525	0.2404	0.2008	ns
Hembras	Control vs. Tratados 2h	1.3540	1.7380	-0.3840	0.2336	0.3237	ns
	Control vs. Tratados 4h	1.3540	1.1610	0.1923	0.2489	>0.9999	ns
	Tratados 2h vs. Tratados 4h	1.7380	1.1610	0.5763	0.2423	0.0664	ns
Control	Machos vs. Hembras	1.0010	1.3540	-0.3523	0.2489	0.4932	ns
Tratados 2h	Machos vs. Hembras	1.5490	1.7380	-0.1890	0.2336	>0.9999	ns
Tratados 4h	Machos vs. Hembras	1.0960	1.1610	-0.0652	0.2489	>0.9999	ns

Resultados de las comparaciones múltiples aplicando el test de Bonferroni para cada miRNA candidato en el hígado en función del sexo (Machos y Hembras) y tratamiento (Control con carga oral de agua, y Tratados a las 2 horas y 4 horas tras la carga oral de aceite de oliva enriquecido con colesterol). Se indican las medias (*Mean 1* y *Mean 2*) para cada una de las comparaciones, así como la diferencia entre las medias de expresión (*Mean diff*), la desviación estándar (*SE of diff*) y el valor del valor p ajustado (*Adjusted p-value*). Se muestra la significancia estadística *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001, o la ausencia de esta (ns). N ≥ 8 por grupo.

2. FIGURAS SUPLEMENTARIAS

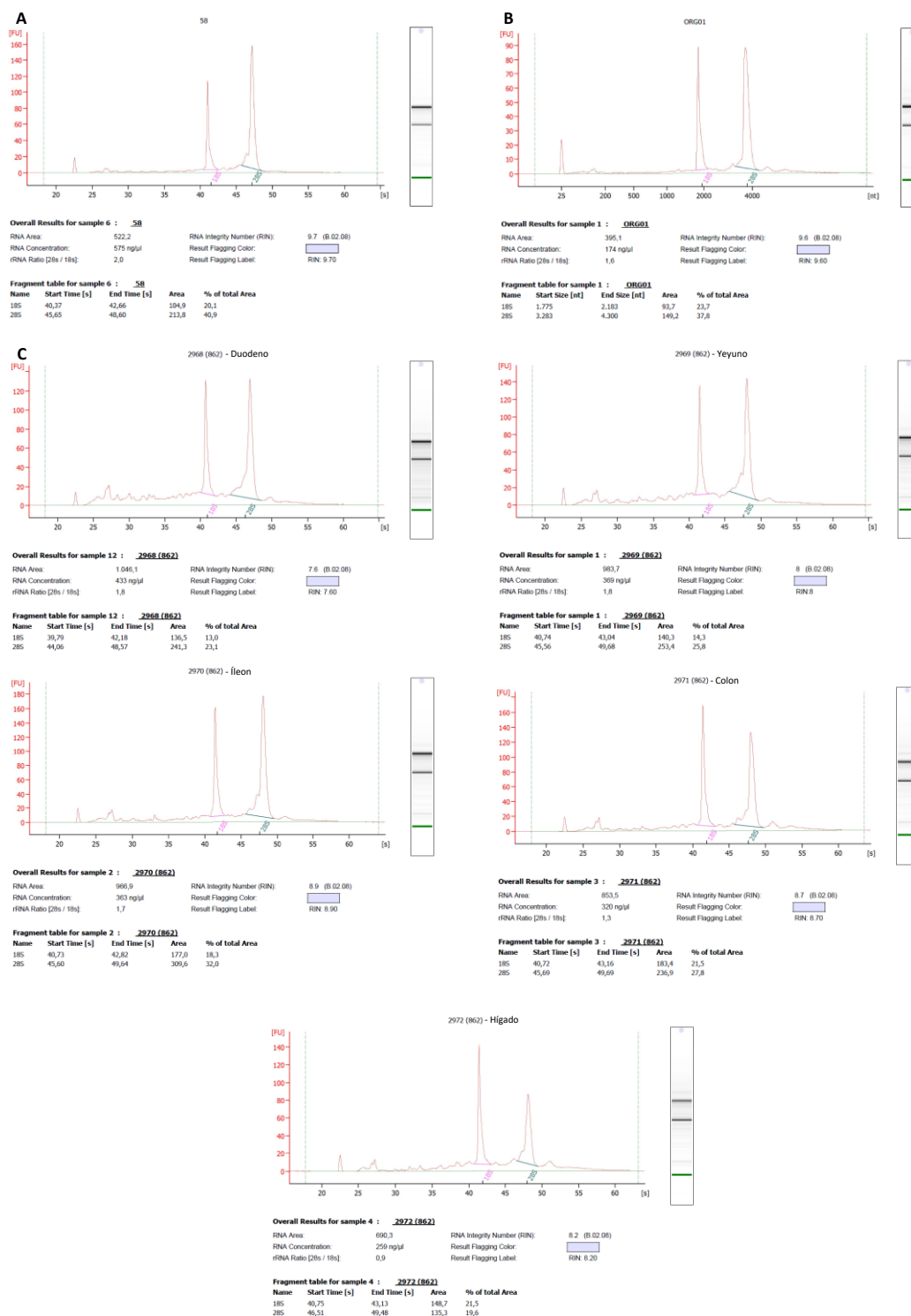


Figura suplementaria 1. Ejemplos representativos de resultados del análisis de integridad de las diferentes muestras de RNA extraídas.

Resultados representativos del análisis de las diferentes muestras enviadas para evaluar la integridad con el ensayo *Eukaryote Total RNA Nano assay* en el sistema bioanalizador *Agilent 2100 Bioanalyzer*. Se muestran las imágenes del gel y los electroferogramas así como los resultados de concentración, relación entre los RNA ribosómicos 28S y 18S, y el número RIN (*RNA Integrity number*) para las muestras de RNA extraídas de A: Células Caco-2 diferenciadas; B: Enteroides; C: Tejido (duodeno, yeyuno, ileon, colon e hígado). * Sólo las muestras derivadas de tejido se diluyen previamente a una concentración aproximada de 300ng/μL en un volumen final de 5μL para su análisis.

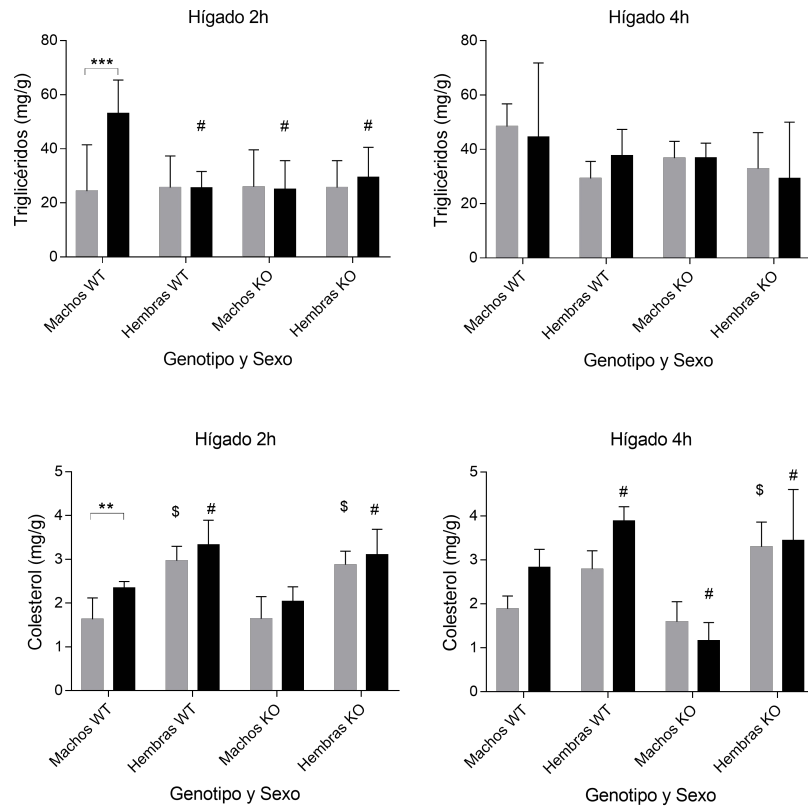


Figura suplementaria 2. Cuantificación de lípidos hepáticos en función del genotipo y diferenciando por sexos.

Cuantificación de triglicéridos y colesterol en las muestras de hígado de los animales que conforman la cohorte 2. Se observa la respuesta al tratamiento y la diferencia entre genotipo (animales WT (fl/fl, Tg/-) y animales KO (fl/fl, Tg/+)) y sexo a las dos y cuatro horas tras la administración de la carga oral con agua (Control,) o una solución de aceite de oliva enriquecida con colesterol (Tratados,). Los resultados (media $\pm$ error estándar) se expresan en mg/g. Para las diferencias en cada grupo en función del tratamiento * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$; las diferencias estadísticas entre los animales tratados para cada grupo respecto a machos WT se expresan con #; y las diferencias estadísticas entre cada grupo control con respecto a machos WT se expresa con \$. $N \geq 4$ por grupo.

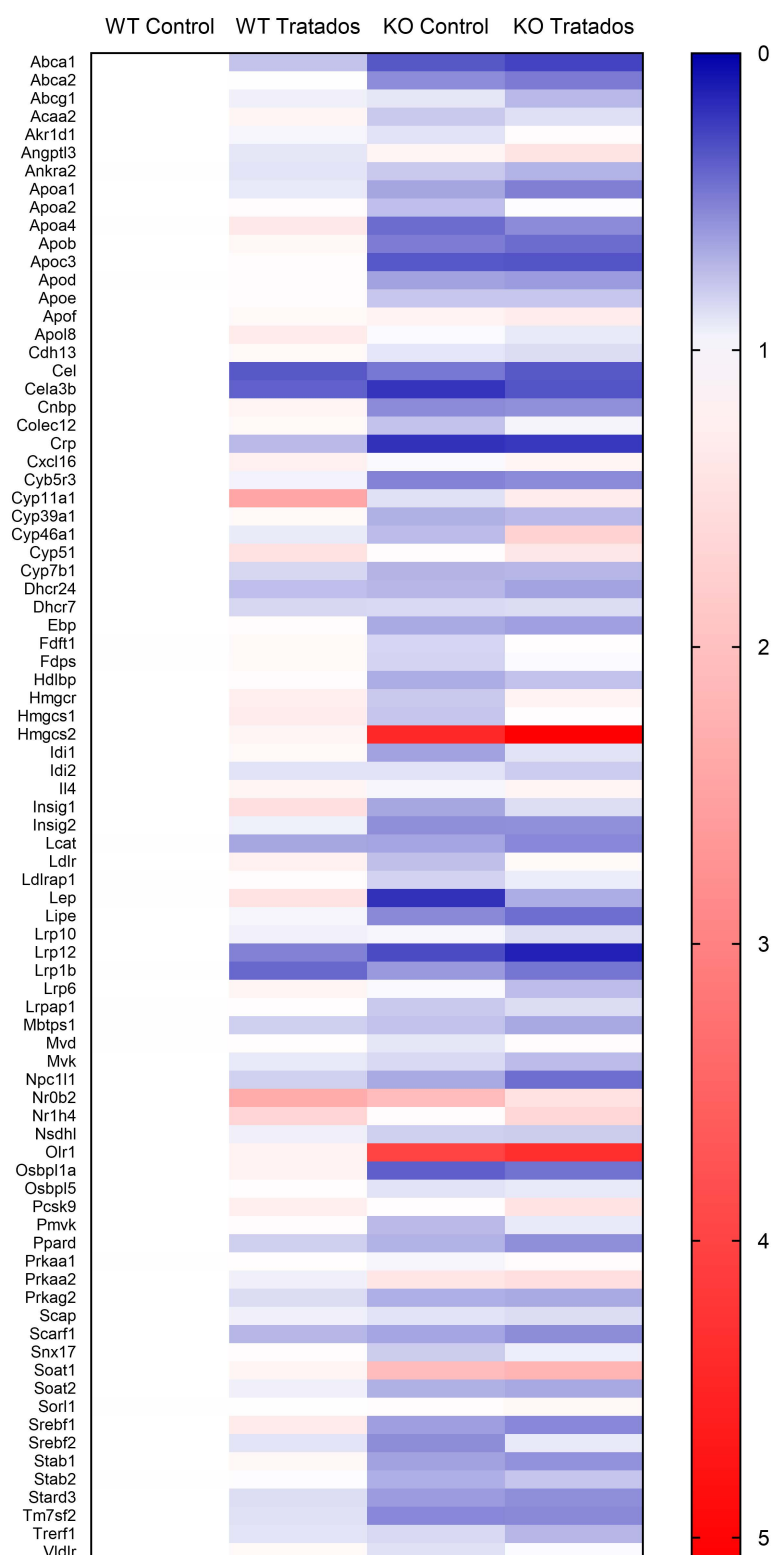


Figura suplementaria 3. Representación mediante *heatmap* de la expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) de los genes implicados en el metabolismo de lipoproteínas y colesterol.

Representación mediante *heatmap* de los resultados para el análisis de expresión de los genes incluidos en el panel prediseñado *RT2 Profiler PCR Array Mouse Lipoprotein & Cholesterol 384 Well* (4x96) (Cat nº 330231 PAMM-080ZA, Qiagen). N = 2 por grupo y 4 réplicas.

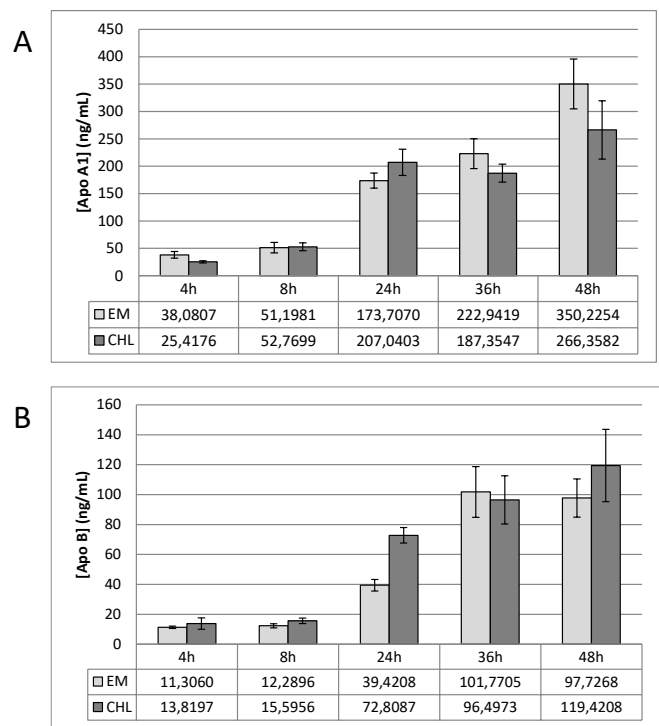


Figura suplementaria 4. Secreción de apolipoproteínas en el medio basolateral de células Caco-2 diferenciadas sobre placas Transwell®.

Gráficas representando la concentración de Apolipoproteína A1 (A) y Apolipoproteína B (B) a diferentes tiempos, en el medio basolateral de células Caco-2 diferenciadas sobre placas transwell, a las 4, 8, 24, 36 y 48 horas tras la incubación con micelas postprandiales. Se muestran las diferentes concentraciones de las apolipoproteínas en el tratamiento con micelas vacías (EM) en medio DMEM y micelas postprandiales (PPM) en medio DMEM. N = 3 para cada grupo.

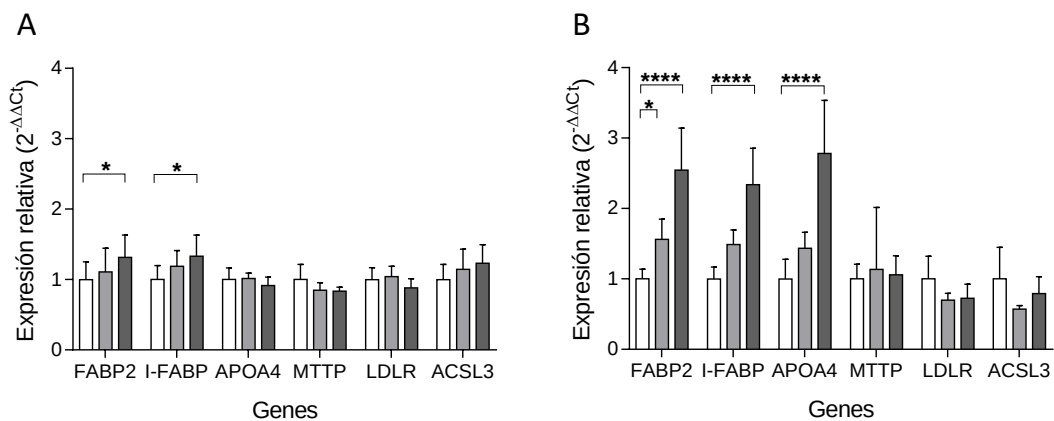


Figura suplementaria 5. Expresión relativa de diferentes genes clave en el metabolismo lipídico en células Caco-2 diferenciadas sobre placas Transwell®.

Gráficas que representan la expresión relativa de genes relacionados con el metabolismo lipídico para testar el funcionamiento del tratamiento aplicado a las células a las 4 horas (A) y 24 horas (B): Control con medio DMEM, micelas vacías (EM) en medio DMEM y micelas postprandiales (PPM) en medio DMEM. Se indica la significancia estadística *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. N = 6 para cada grupo de tratamiento, en experimentos independientes. Se observan los cambios esperados en genes implicados en el metabolismo como FABP2 (Fatty Acid Binding Protein 2), I-FABP (Intestinal-Type Fatty Acid-Binding Protein), APOA4 (Apolipoprotein A4), MTTP (Microsomal Triglyceride Transfer Protein) y LDLR (Low Density Lipoprotein Receptor) y el cambio ausente en ACSL3 (Acyl-CoA Synthetase Long Chain Family Member 3).

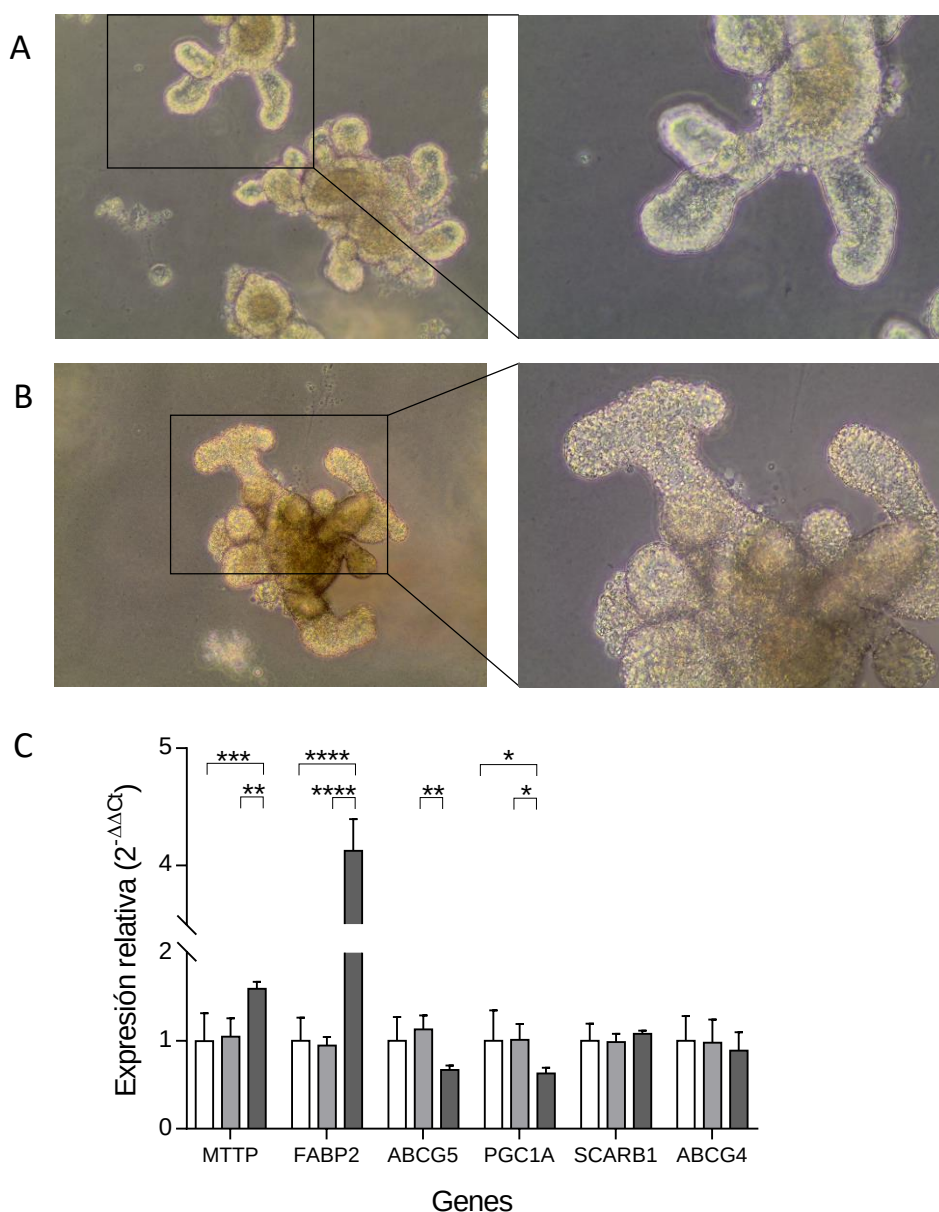


Figura suplementaria 6. Expresión relativa de diferentes genes clave del metabolismo energético en enteroides derivados de ratón.

Imágenes representativas de enteroides a las 24 horas tras el tratamiento con micelas vacías (A) o micelas postprandiales (B) con la magnificación 20x, y gráfica (C) que representa la expresión relativa de genes relacionados con el metabolismo energético para verificar el efecto de las micelas postprandiales sobre enteroides derivados de ratón a las 24 horas tras su tratamiento: □ Control con medio DMEM/F12, ▒ micelas vacías (EM) en medio DMEM/F12 y ■ micelas postprandiales (PPM) en medio DMEM/F12. Se indica la significancia estadística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. $N = 4$ para cada grupo de tratamiento. Se observan los cambios esperados en genes que codifican para proteínas implicadas en el metabolismo como MTTP (*Microsomal Triglyceride Transfer Protein*), FABP2 (*Fatty Acid Binding Protein 2*), ABCG5 (*ATP Binding Cassette Subfamily G Member 5*), PGC1A (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha*) y el cambio ausente la expresión de los genes que codifican para SCARB1 (*Scavenger Receptor Class B Member 1*) y ABCG4 (*ATP Binding Cassette Subfamily G Member 4*).

