



FACULTAD DE CIENCIAS

**MÁSTER EN INNOVACIÓN EN NUTRICIÓN,
SEGURIDAD Y TECNOLOGÍA ALIMENTARIAS**

Dña. Laura Sanjulián Fernández

**MICRO-ARN EN LECHE BOVINA E IMPLICACIONES
EN LA SALUD DEL CONSUMIDOR**

Trabajo Fin de Máster

Febrero 2020

ÍNDICE

Índice de figuras	3
Índice de tablas	4
Lista de abreviaturas	5
Resumen	8
Resumo	9
Abstract.....	10
1 Introducción	11
1.1 Biogénesis y mecanismos de acción de los micro-ARNs.....	12
1.2 Estabilidad de los micro-ARNs y transferencia entre individuos.....	13
2 Objetivos	15
3 Metodología del trabajo	16
3.1 Búsqueda bibliográfica	16
3.1.1 Criterios de inclusión y exclusión de estudios.....	17
3.1.2 Selección de los micro-ARNs objeto de estudio	17
3.2 Material y métodos	18
3.2.1 Material.....	18
3.2.2 Métodos	20
4 Resultados y discusión	27
4.1 Micro-ARN 148a	27
4.2 Micro-ARN 200c	30
4.3 Micro-ARN 29b	31
4.4 Micro-ARN 125b.....	34
4.5 Resultados de la extracción de micro-ARNs de los exosomas de leche bovina	35

5 Conclusiones	41
Bibliografía.....	42

Índice de figuras

Figura 1. Distribución de las publicaciones de micro-ARN desde su descubrimiento en 1993 hasta la actualidad, en base a los resultados de la búsqueda del término “micro-RNA” en PubMed ¹⁵	12
Figura 2. Representación esquemática de la síntesis de micro-ARN (Fuente: elaboración propia, ©BioRender 2020)	13
Figura 3. Implicaciones del micro-ARN 29b sobre el proceso carcinogénico (Fuente: elaboración propia, ©BioRender 2020).....	32
Figura 4. Diagrama de cajas para el test t de Student (Tabla 14) de los valores CT de los micro-ARNs estudiados. Cada caja está compuesta por dos cuartiles representando el rango intercuartílico Q2-Q3, con una línea negra en el medio que se corresponde con la mediana. Los bigotes están en el rango intercuartílico 1,5.....	36
Figura 5. Gráfico de barras para las medias de los valores CT de cada uno de los grupos controles (C) y tratadas (T) de cada micro-ARN teniendo en cuenta el momento de toma de muestras	39

Índice de tablas

Tabla 1. Niveles de evidencia según la escala de la <i>Scottish Intercollegiate Guidelines Network</i> (SIGN) ³²	17
Tabla 2. Ranking de los 10 micro-ARNs más abundantes en los exosomas de leche humana y bovina (de mayor a menor presencia)	18
Tabla 3. Preparación de PBS a pH 7,4	20
Tabla 4. Contenido del kit <i>Total Exosome RNA and Protein Isolation</i>	22
Tabla 5. Preparación del <i>Poly (A) Reaction Mix</i>	23
Tabla 6. Preparación del <i>Ligation Reaction Mix</i>	23
Tabla 7. Preparación del <i>RT Reaction Mix</i>	24
Tabla 8. Preparación del <i>miR-Amp Reaction Mix</i>	24
Tabla 9. Condiciones de incubación de las distintas reacciones en termociclador para amplificación de los micro-ARNs aislados en la leche	24
Tabla 10. Secuencias de los micro-ARNs analizados en suero lácteo (exosomas).....	25
Tabla 11. Preparación <i>PCR Reaction Mix</i>	25
Tabla 12. Condiciones de temperatura para la PCR.....	25
Tabla 13. Análisis de la expresión inicial (tiempo 0) de micro-ARNs en individuos control y tratados	35
Tabla 14. Análisis de la expresión de micro-ARNs en muestras control y tratadas sin tener en cuenta el momento de muestreo	36
Tabla 15. Análisis de la evolución de las diferencias entre los grupos según el momento de muestreo.....	38

Lista de abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADN-c: Ácidos desoxirribonucleico complementario.

AGO 2: Argonauta 2.

AlkP: *Alkaline phosphatase*.

AMP: Adenosín monofosfato.

AMPK: *AMP-activated protein kinase*.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

ARN-pri: ARN primario.

BCAA: *Branched-chain essential amino acids*.

BCKD: *Branched-chain α -keto acid dehydrogenase*.

bST: *Bovine somatotropin*.

C: Controles.

CCK: Colecistoquinina.

CF: Concentración final de la disolución o diluida.

CLA: Ácido linoleico conjugado.

CT: *Cycle threshold*.

DGCR8: Cofactor Pasha.

DMT2: Diabetes mellitus tipo 2.

DNMT: *DNA-methyltransferase*.

FTO: *Fat mass -and obesity- associated gene*.

GTPasa: Guanosina trifosfatasa.

IAM: Infarto agudo de miocardio.

IC: Intervalo de confianza.

IGF-1: *Insuline-like growth factor*.

IMC: Índice de masa corporal.

INS: insulina.

M⁶A: N6-metiladenosina.

MCL-1: *Myeloid cell leukemia 1*.

Micro-ARN: Micro-ácido ribonucleico.

Micro-ARN-pri: Micro-ARN primario.

mTORC1: *Metabolic sensor mammalian target of rampamycin complex 1*.

PBS: Phosphate buffered saline.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

Pre-micro-ARN: Precursor de micro-ARN.

QK: Quanking.

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

RANK-L: *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*.

RASSF1: Proteína RAS asociada al dominio de la familia 1.

rbST: *Recombinant bovine somatotropin*.

RISC: *RNA-induced silencing complex*.

RNasa III: ribonucleasa tipo III.

RT: *Reverse transcription*.

SIGN: *Scottish Intercollegiate Guidelines Network*.

T: Tratadas.

TEM: Transición epitelio-mesénquima.

TRAcP: *Tartrate acid phosphatase*.

Tregs: Células T reguladoras.

TRIAL: *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand.*

UTR: *Untranslated region.*

Resumen

Micro-ARN en leche bovina e implicaciones en la salud del consumidor

La leche, y en particular la bovina, constituye uno de los componentes fundamentales de la dieta humana, dada la gran variedad de nutrientes que aporta, tales como proteínas, lípidos, lactosa, minerales, vitaminas, así como otros componentes bioactivos. Entre estos últimos se encuentran los micro-ARNs, pequeños fragmentos de ácido ribonucleico (ARN) no codificante que se liberan a la leche en forma libre o encapsulados en vesículas extracelulares denominadas exosomas. Gracias a los exosomas estas moléculas de ARN monocatenario son capaces de sobrevivir al procesamiento industrial de la leche y a la digestión humana, posibilitando su absorción en el intestino y el consiguiente paso al torrente sanguíneo. La importancia de la presencia de estos fragmentos de ARN en los alimentos reside en la posibilidad de transmisión de micro-ARNs homólogos entre especies y en su capacidad para regular la expresión génica del consumidor a nivel postranscripcional. En el presente estudio se seleccionaron cuatro micro-ARNs, para su determinación en leche bovina, en base a criterios de homología entre las especies humana y bovina, mayor nivel de expresión en leche y mayor grado de evidencia científica acerca de sus efectos sobre la salud humana. Mediante PCR cuantitativa en tiempo real (*qPCR*) se analizó su presencia en 27 muestras procedentes de vacas control y tratadas con somatotropina bovina recombinante (*recombinant bovine somatotropin*, rbST), a fin de determinar los efectos de esta hormona sobre la expresión de los micro-ARNs. Los resultados mostraron que la rbST altera la expresión de los micro-ARNs, reduciéndola o aumentándola según el caso. El estudio de los micro-ARNs constituye una nueva vía para comprender los efectos que sobre los consumidores tienen los alimentos, en este caso la leche bovina; sin embargo, no debemos olvidar que en los alimentos conviven con otros nutrientes y componentes bioactivos con los que pueden interaccionar.

Palabras clave: micro-ARN, leche bovina, micro-ARN 148a, micro-ARN 200c, micro-ARN 29b, micro-ARN 125b, salud humana.

Resumo

Micro-ARN en leite bovino e implicacións na saúde do consumidor

O leite, e en particular o bovino, constitúe un dos compoñentes fundamentais da dieta humana, dada a gran variedade de nutrientes que achega, tales como proteínas, lípidos, lactosa, minerais, vitaminas, así como outros compoñentes bioactivos. Entre estes últimos atópanse os micro-ARNs, pequenos fragmentos de ácido ribonucleico (ARN) non codificante que se liberan ao leite en forma libre ou encapsulados en vesículas extracelulares denominadas exosomas. Grazas aos exosomas estas moléculas de ARN monocatenario son capaces de sobrevivir ao procesamento industrial do leite e á dixestión humana, posibilitando a súa absorción no intestino e o consecuente paso ao torrente sanguíneo. A importancia da presenza destes fragmentos de ARN nos alimentos reside na posibilidade de transmisión de micro-ARNs homólogos entre especies e na súa capacidade para regular a expresión xénica do consumidor a nivel postranscripcional. No presente estudo seleccionáronse catro micro-ARNs, para a súa determinación en leite bovino, en base a criterios de homoloxía entre as especies humana e bovina, maior nivel de expresión en leite e maior grao de evidencia científica acerca dos seus efectos sobre a saúde humana. Mediante PCR cuantitativa en tempo real (*qPCR*) analizouse a súa presenza en 27 mostras procedentes de vacas control e tratadas con somatotropina bovina recombinante (*recombinant bovine somatotropin*, rbST), a fin de determinar os efectos desta hormona sobre a expresión dos micro-ARNs. Os resultados mostraron que a rbST altera a expresión dos micro-ARNs, reducíndoa ou aumentándoa segundo o caso. O estudo dos micro-ARNs constitúe unha nova vía para comprender os efectos que sobre os consumidores teñen os alimentos, neste caso o leite bovino; con todo, non debemos esquecer que nos alimentos conviven con outros nutrientes e compoñentes bioactivos cos que poden interaccionar.

Palabras chave: micro-ARN, leite bovino, micro-ARN 148a, micro-ARN 200c, micro-ARN 29b, micro-ARN 125b, saúde humana.

Abstract

Micro-RNA in bovine milk and implications on consumer health

Milk, and in particular bovine, constitutes one of the main components of the human diet, given the wide variety of nutrients it provides, such as proteins, lipids, lactose, minerals, vitamins, as well as other bioactive components. Among the latter are micro-RNAs, small fragments of non-coding ribonucleic acid (RNA) that are released into the milk in free form or encapsulated in extracellular vesicles called exosomes. Thanks to the exosomes, these single-stranded RNA molecules are able to survive the industrial processing of milk and human digestion, enabling its absorption in the intestine and the subsequent passage into the bloodstream. The importance of the presence of these RNA fragments in food lies in the possibility of transmission of homologous micro-RNAs between species and in their ability to regulate the consumer gene expression at the post-transcriptional level. In the present study, four micro-RNAs were selected for their determination in bovine milk, based on criteria of homology between human and bovine species, higher level of expression in milk and greater degree of scientific evidence about their effects on human health. By quantitative real-time PCR (qPCR) its presence was analyzed in 27 samples from control cows and treated ones with recombinant bovine somatotropin (recombinant bovine somatotropin, rbST), in order to determine the effects of this hormone on the expression of micro-RNAs. The results showed that rbST alters the expression of micro-RNAs, reducing or increasing it as appropriate. The study of micro-RNAs is a new way to understand the effects that consumers have on food, in this case bovine milk; however, we must not forget that in food they coexist with other nutrients and bioactive components with which they can interact.

Key words: micro-RNA, cow milk, micro-RNA 148a, micro-RNA 200c, micro-RNA 29b, micro-RNA 125b, human health.

1 Introducción

La leche bovina y los productos lácteos son alimentos de larga tradición en la alimentación humana y ampliamente reconocidos como fuente completa y equilibrada de energía y nutrientes (lípidos, proteínas de alto valor biológico, hidratos de carbono, sales minerales y vitaminas) por lo que con frecuencia se incluyen como elementos importantes de una dieta balanceada y saludable para la población. Sin embargo, su valor no solo reside en su aporte nutricional, sino que también contienen gran cantidad de componentes biológicos como ácido linoleico conjugado (CLA), péptidos bioactivos, citoquinas, quimiocinas, hormonas y moléculas de micro ácido ribonucleico (micro-ARN)¹⁻⁴.

Los micro-ARNs han sido identificados tanto en células como en distintos fluidos biológicos (sangre, saliva, orina, líquido amniótico, leche)^{2,5,6} y se definen como moléculas de ARN monocatenario no codificante, de una longitud de entre 21 y 25 nucleótidos, capaces de unirse a las regiones no traducidas (*untranslated regions*, UTRs) de los extremos 3' del ARN mensajero (ARNm). Esto los convierte en responsables del 40-60% de la regulación de la expresión genética a nivel postranscripcional^{2,4,7-11}. Su descubrimiento data de 1993, cuando fueron identificados por Lee, Feinbaum y Ambros mientras llevaban a cabo su proyecto para la clonación del gen *lin-4* en el nematodo *Caenorhabditis elegans*¹², y se refirieron a ellos como “pequeños ARN con complementariedad antisentido”. Desde entonces, se han descubierto miles de micro-ARNs tanto en animales y plantas como en virus que se recogen en distintas bases de datos especializadas, como la *miRBase*¹³. Sin embargo, no fue hasta hace una década cuando el estudio de estas moléculas comenzó a crecer exponencialmente (Figura 1), ligado al desarrollo de nuevas técnicas de biología molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (*qPCR*), los *microarrays* de ácido ribonucleico (ARN) y micro-ARN o la secuenciación de ARN, por lo que se trata de una materia de investigación relativamente reciente. Actualmente, parte del interés que suscita se debe a su presencia en determinados alimentos como los productos lácteos y fórmulas infantiles¹⁴, así como a su posible efecto sobre procesos biológicos implicados en la salud humana.

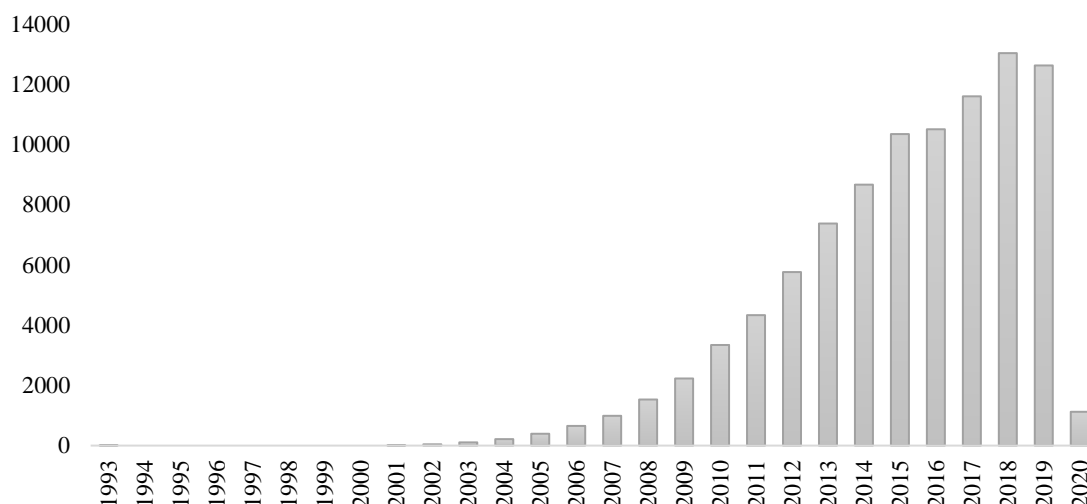


Figura 1. Distribución de las publicaciones de micro-ARN desde su descubrimiento en 1993 hasta la actualidad, en base a los resultados de la búsqueda del término “micro-RNA” en PubMed¹⁵

1.1 Biogénesis y mecanismos de acción de los micro-ARNs

Existe fuerte evidencia acerca de la implicación de los micro-ARNs en diferentes procesos biológicos tales como la proliferación y diferenciación celular, la apoptosis, el desarrollo del sistema inmune, la respuesta inmunitaria o los procesos tumorales^{4,10,16-18}, sin embargo, el desconocimiento sobre la totalidad de sus funciones es todavía importante. Los micro-ARNs derivan de la transcripción incompleta del ARNm. Estos fragmentos, inicialmente, se encuentran dentro del núcleo y presentan forma de horquilla, recibiendo el nombre de micro-ARN primario (micro-ARN-pri). Estas partículas son transcritas por la ARN polimerasa II y procesadas por la enzima ribonucleasa tipo III (RNasa III) Droscha y su cofactor Pasha (DGCR8). Este complejo escinde las regiones 3' y 5', dando lugar a una molécula precursora de micro-ARN (pre-micro-ARN) de aproximadamente 70 nucleótidos, que es transportado del núcleo al citoplasma por la exportina-5. Ya en el citoplasma, los pre-micro-ARNs son atacados por una segunda RNasa III, Dicer, que corta el lazo dando lugar a una doble cadena complementaria de micro-ARN maduro de unos 20 nucleótidos. Una de las hebras se asocia con el componente catalítico argonauta 2 (AGO 2), constituyente principal del complejo silenciador inducido por ARN (*RNA-induced silencing complex*, RISC), habilitándolo para interferir con el ARNm reprimiendo su traducción o escindiéndolo. La otra hebra normalmente es degradada, pero también puede seguir el mismo camino que su

homóloga, generando el mismo resultado^{5,8,9,18-20}. En la Figura 2 se explica de manera esquemática la biogénesis de los micro-ARNs.

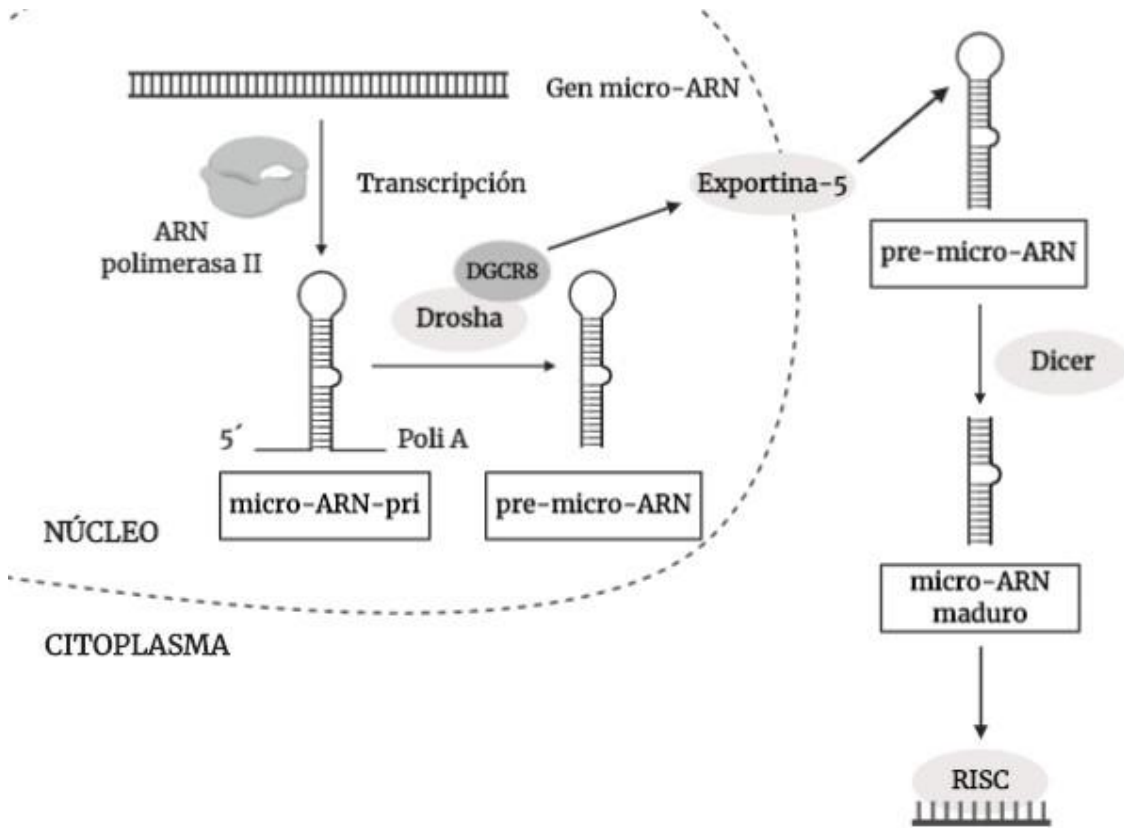


Figura 2. Representación esquemática de la síntesis de micro-ARN (Fuente: elaboración propia, ©BioRender 2020)

A pesar de que el término silenciamiento puede sugerir supresión total de la expresión, generalmente los micro-ARNs no inhiben completamente sus genes diana, si no que reducen su expresión⁵. Los mecanismos a través de los que los micro-ARN pueden actuar sobre sus genes diana son varios: *a)* degradación de ARNm; *b)* inhibición de iniciación de la traducción mediante el emparejamiento de bases con secuencias complementarias dentro de ARNm; *c)* terminación prematura de la traducción por disgregación de los ribosomas; *d)* inhibición de la elongación en la traducción; *e)* degradación de la proteína durante la traducción^{3-5,9}.

1.2 Estabilidad de los micro-ARNs y transferencia entre individuos

Los micro-ARNs de la leche no proceden de la circulación sanguínea, sino de su encapsulación en exosomas, pequeñas vesículas extracelulares con membrana o bicapa

lipídica (30-100 nm), que son liberadas por todas las células de la glándula mamaria, incluyendo células epiteliales e inmunitarias^{7,21}. La relevancia de los exosomas no solo reside en su papel como mediadores en la comunicación célula-célula^{9,22}, sino en su resistencia ante condiciones adversas^{4,9,10,20}, su estabilidad a temperatura ambiente, su capacidad para soportar los ciclos de enfriamiento/calentamiento propios del procesado de la leche, ambientes ácidos (pH estomacal) y la degradación de las ARNasas y proteasas^{10,16,19}. En conjunto, la resistencia de los exosomas a los tratamientos de procesado industrial de la leche y a la digestión del consumidor, permite que los micro-ARNs lleguen intactos y funcionales al intestino delgado^{11,23,24}, donde son absorbidos mediante diferentes mecanismos por las células intestinales y endoteliales (endocitosis, transcitosis, fusión de membrana)^{7,20,21}, y liberados a la circulación sistémica de manera dosis-dependiente. Finalmente, los micro-ARNs viajan por el torrente sanguíneo hasta los distintos tejidos donde actuarán sobre los ARNm diana, los cuales, dada la baja complementariedad necesaria para su unión, son miles^{5,6,18,25}.

Su transferencia entre individuos, como en el caso de la transmisión transplacentaria^{7,26} o la transfusión sanguínea^{7,27,28}, por ejemplo, y su presencia en la leche, han reforzado el papel de los micro-ARNs como componentes bioactivos y reavivado el interés por su transferencia a través de la dieta, especialmente entre madres e hijos durante la lactancia. Pero este paradigma puede extenderse a los micro-ARNs de la leche bovina consumida por la población adulta, pues existen fuertes evidencias tanto de su presencia en ella como del hecho de que la especie humana los absorbe en cantidades cuantitativa y biológicamente significativas^{25,29}, presentando la mayoría propiedades inmunológicas y capacidad para alterar la expresión génica en diferentes tejidos^{7,10,16,21}. La expresión de los micro-ARNs en leche es sensible a multitud de factores, relacionados, fundamentalmente, con la glándula mamaria, infecciones bacterianas (mastitis) y estado de lactación, pero también, de manera más general, con la dieta y el estado fisiológico e inmunitario^{19,20,30,31}. La repercusión de la administración de hormonas sobre los niveles de micro-ARN está avalada por la evidencia científica³¹. A este respecto, el uso de somatotropina bovina recombinante (STrb) para mantener una producción láctea elevada durante el mayor tiempo posible es de especial interés, en particular debido a la gran controversia que ha generado su uso desde su descubrimiento a finales del siglo veinte.

2 Objetivos

El objetivo del presente trabajo fin de máster es determinar la presencia de una selección de micro-ARNs en leche bovina, y valorar el efecto de la somatotropina bovina recombinante en su expresión, a fin de esclarecer su papel en diferentes aspectos de la salud humana a través de su consumo a partir de la dieta, y en particular, del consumo de leche bovina.

3 Metodología del trabajo

3.1 Búsqueda bibliográfica

Se realizó una búsqueda de artículos en las principales bases de datos disponibles en internet, consultando fundamentalmente SCOPUS y, eventualmente, PubMed, Science Direct, Cochrane Plus y Google Académico, empleando la siguiente lista de descriptores en inglés, de forma individual o combinándolos. Además, las referencias de los artículos consultados sirvieron como fuente de bibliografía adicional.

“microRNA”

“miRNA”

“exosome”

“extracellular vesicles”

“microvesicles”

“milk”

“cow milk”

“human health”

“effects”

“diet”

“food”

“micro-RNA 29b”

“micro-RNA 125b”

“micro-RNA 148a”

“micro-RNA 200c”

“cancer”

“diabetes”

3.1.1 Criterios de inclusión y exclusión de estudios

Para la elaboración de cada epígrafe se revisó la bibliografía científica existente, dando preferencia a los artículos y estudios más recientes y con mayor nivel de evidencia científica. El sistema escogido para clasificar la evidencia de los trabajos fue el propugnado por la Red Escocesa Intercolegiada sobre Guías de Práctica Clínica (*Scottish Intercollegiate Guidelines Network* o SIGN)³⁸. La escala SIGN propone dos atributos para evaluar la calidad/nivel de las evidencias científicas disponibles: *a)* el diseño del estudio y *b)* el riesgo de sesgo; asignando números del 1 al 4 y signos (++, + y -) en función de la evidencia y del riesgo de sesgo, respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1. Niveles de evidencia según la escala de la *Scottish Intercollegiate Guidelines Network* (SIGN)³²

Nivel de evidencia		Tipo de estudio
1	1++	Meta-análisis de alta calidad, revisiones sistemáticas de ensayos clínicos aleatorizados, o ensayos clínicos aleatorizados con un riesgo muy bajo de sesgo.
	1+	Meta-análisis bien realizados, revisiones sistemáticas de ensayos clínicos aleatorizados, o ensayos clínicos aleatorizados con bajo riesgo de sesgo.
	1-	Meta-análisis, revisiones sistemáticas de ensayos clínicos aleatorizados o ensayos clínicos aleatorizados con alto riesgo de sesgo.
2	2++	Revisiones sistemáticas de alta calidad de estudios caso – control o de cohortes.
	2+	Estudios caso-control o de cohortes de alta calidad con un riesgo muy bajo de confusión o sesgo, y una alta probabilidad de que la relación sea causal.
	2-	Estudios caso-control o de cohortes bien realizados con un riesgo bajo de confusión o sesgo, y una probabilidad moderada de que la relación sea causal.
3		Estudios no analíticos (por ejemplo, casos clínicos o series de casos).
4		Opinión de experto/s.

3.1.2 Selección de los micro-ARNs objeto de estudio

Tras una primera búsqueda bibliográfica de aproximación, se seleccionaron para su estudio experimental aquellos micro-ARNs que presentan idéntica secuencia de nucleótidos en las especies humana y bovina (Tabla 2). Otros criterios empleados fueron el nivel de presencia en leche bovina y la evidencia científica sobre su repercusión en la salud humana.

Tabla 2. Ranking de los 10 micro-ARNs más abundantes en los exosomas de leche humana y bovina (de mayor a menor presencia)

Leche humana (Van Herwijen y cols, 2018³³)	Leche bovina (Cai y cols, 2018³⁴)
Micro-ARN 30d-5p	Micro-ARN 148a-3p
Micro-ARN 148a-3p	Micro-ARN Let-7a
Micro-ARN 200a-3p	Micro-ARN Let-7b
Micro-ARN 200c-3p	Micro-ARN 21-5p
Micro-ARN Let-7a-5p	Micro-ARN 99a-5p
Micro-ARN 200b-3p	Micro-ARN Let-7f-5p
Micro-ARN 21-5p	Micro-ARN Let-7c
Micro-ARN Let-7b-5p	Micro-ARN 200c-3p
Micro-ARN Let-7f-5p	Micro-ARN 26a-5p
Micro-ARN 30a-5p	Micro-ARN 30d

3.2 Material y métodos

3.2.1 Material

3.2.1.1 Equipos y material auxiliar

Campana de flujo vertical.

Congelador.

Pipetas de distintos volúmenes.

Tubos Eppendorf 1,5 mL.

Microplaca de 96 pocillos.

Tubos Falco 50mL.

Baño de agua termostático.

Centrífuga Universal 16R (Hettich, Tuttlingen, Alemania).

Microcentrífuga 5415D (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania).

pHmetro (Multical pH 526, WTW, Alemania)

Sistema de PCR en tiempo real QuantStudio 12K Flex (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos).

Vórtex para la agitación de tubos

Termociclador My Cycler™ Thermal Cycler 170-9701 (Bio-Rad, California, Estados Unidos).

3.2.1.2 *Reactivos*

Agua destilada (dH₂O) (Merck Millipore, Alemania).

Ácido clorhídrico (HCl) (Merck Millipore, Alemania).

Cloruro de potasio (KCl) (Merck Millipore, Alemania).

Cloruro de sodio (NaCl) (Merck Millipore, Alemania).

Fosfato de sodio (Na₂HPO₄) (Merck Millipore, Alemania).

Fosfato de potasio (KH₂PO₄) (Merck Millipore, Alemania).

Hidróxido de sodio (NaOH) (Merck Millipore, Alemania).

Kit comercial para aislamiento de exosomas *Total Exosome Isolation (from other body fluids)* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos).

Kit commercial para extracción de ARN exosomal *Total Exosome RNA and Protein Isolation* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos).

Kit comercial para determinación de micro-ARNs *TaqMan® Advanced miRNA Assays* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos).

3.2.1.3 *Preparación de soluciones*

Solución salina amortiguada por fosfatos 1X (*Phosphate buffered saline, PBS*)

La solución salina amortiguada por fosfatos constituye una solución amortiguadora de pH comúnmente empleada para procedimientos bioquímicos. Su osmolaridad y concentración de iones (Cl⁻, Na⁺ y K⁺) es muy semejante al del líquido extracelular de los mamíferos. Esta solución se prepara a partir de cloruro de sodio (NaCl), fosfato de sodio (Na₂HPO₄) y, en algunas formulaciones, con fosfato de potasio (KH₂PO₄). Esta solución es isotónica y no-tóxica para las células de los mamíferos. El PBS se emplea como vehículo neutro para células, ya que no modifica el perfil de expresión y funcionamiento celular normal. Esta solución es empleada comúnmente para lavar células a través de centrifugación. El PBS puede ser empleado como diluyente para métodos de desecación

de biomoléculas, ya que las moléculas de agua presentes en el PBS se adhieren alrededor de la biomolécula permitiendo inmovilizarla a una superficie sólida. Esta monocapa de agua evita que la biomolécula sea desnaturalizada (o sufra modificaciones conformacionales) en el proceso de desecación³⁵.

Para preparar el PBS se pesaron las cantidades de reactivos indicados en la Tabla 3. A continuación, se añadieron 800 mL de agua destilada y agitó la solución mediante el uso de un agitador magnético hasta obtener la disolución total de los reactivos añadidos. El pH de la solución fue determinado con un pHmetro (Multical pH 526, WTW, Alemania) y ajustado a 7,4 empleando HCl (Merck Millipore, Alemania) o NaOH (Merck Millipore) según fuera necesario. Después de ajustar el pH el volumen fue llevado a un 1L con agua destilada. El PBS fue almacenado a temperatura ambiente hasta su uso.

Tabla 3. Preparación de PBS a pH 7,4

Sales	C _F	1000 mL
NaCl	138 mM	8,06 g
KCl	3 mM	0,22 g
Na ₂ HPO ₄	8.1 mM	1,15 g
KH ₂ PO ₄	1,5 mM	0,20 g
dH ₂ O	-	1,00 L

3.2.2 Métodos

3.2.2.1 *Recolección y preparación de las muestras*

Un total de 27 muestras de leche fueron utilizadas en este estudio. Las muestras de leche fueron recolectadas en un estudio previo llevado a cabo en el laboratorio. En él se incluyeron un total de 9 vacas Holstein de primera o segunda lactación, con edades comprendidas entre 1,5 y 4 años, y que llevaban el mismo tiempo de lactación en el momento de iniciarse el trabajo. De esos 9 animales, seis fueron tratados con rbST cuando se encontraban entorno al día 67 (± 4) de lactación (pico de lactación) y tres fueron utilizados como control. Las muestras utilizadas en este trabajo fueron recolectadas de forma individual de cada vaca en la sala de ordeño 10 días antes de la administración de la primera dosis de rbST (tiempo 0) y los días 5 (tiempo 1) y 8 (tiempo 2) después del tratamiento. Los procedimientos experimentales se desarrollaron tras la evaluación y aprobación de las correspondientes autoridades regionales (Servicio de Ganadería del Gobierno Provincial de Lugo, Consejería del Medio Rural, Galicia), siguiendo las guías

europas y la legislación nacional sobre experimentación animal, en particular la Directiva 2010/63/EU relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos, y su trasposición al marco jurídico nacional. Todos los procedimientos fueron llevados a cabo respetando el bienestar animal y sin causar más dolor, sufrimiento, estrés o daño prolongado que el equivalente al causado por la introducción de una aguja, de acuerdo con las buenas prácticas veterinarias.

Para la obtención del suero lácteo se emplearon un total de 45 mL de leche de cada una de las muestras incluidas en el estudio. En primer lugar, las muestras se centrifugaron a 2.100 xg durante 10 minutos a 4°C. Tras la centrifugación se obtienen tres capas. La primera se corresponde con un sedimento de células. La segunda capa está constituida por un sobrenadante de suero lácteo y la tercera es una capa de grasa. Se retira esta última capa de grasa con una espátula de metal y se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo de 50 mL y se centrifuga por segunda vez a 2.100 xg durante 10 minutos para eliminar los restos de grasa. Finalmente, el suero lácteo se pasa a un nuevo tubo de 50 mL y se conserva hasta su uso.

3.2.2.2 Extracción de exosomas de la leche

El aislamiento y extracción de los exosomas se ha realizado usando el kit *Total Exosome Isolation* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos) mediante el protocolo del fabricante para otros fluidos corporales. Las muestras de suero lácteo se descongelaron en un baño termostático a una temperatura de entre 25 y 37 °C hasta que estén completamente líquidas. Una vez descongeladas, las muestras se transfieren a un microtubo de 1,5 mL y se mezclan con 200 µL de 1X PBS y 200 µL de reactivo *Total exosome isolation*, para luego incubarlas durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se centrifuga a 10.000 xg durante 10 minutos (5415D, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania). Finalmente, se descarta el sobrenadante y se conserva el pellet, donde se encuentran los exosomas.

Para resuspender los exosomas, se añadieron 50 µL de 1X PBS, se homogenizaron agitando con el vórtex y se centrifugaron (10.000 xg durante 5 minutos a temperatura ambiente). El sobrenadante, un concentrado de exosomas, se transfiere a un nuevo tubo de 1,5 mL, para el aislamiento de los micro-ARNs.

3.2.2.3 Aislado de los micro-ARNs

La extracción y purificación de los micro-ARN de los exosomas se realizó usando el kit *Total Exosome RNA and Protein Isolation* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos), cuyo contenido aparece recogido en la Tabla 4, siguiendo las instrucciones del fabricante. Así pues, sobre el concentrado de exosomas se añadieron 150 μL de 1X PBS y 200 μL de 2X *Denaturing Solution* y se incubaron en hielo durante 5 minutos, tras lo que se incorporaron 400 μL de fenol:cloroformo ácido y se sometieron a centrifugación (10.000 $\times g$ durante 5 minutos a temperatura ambiente) para extraer la fase acuosa (300 μL /muestra).

Tabla 4. Contenido del kit *Total Exosome RNA and Protein Isolation*

Materiales	Cantidad	Temperatura de almacenamiento
<i>Wash Solution 1</i> Añadir 21mL de etanol 100% antes de usar	9 mL	Temperatura ambiente
<i>Wash Solution 2/3</i> Añadir 40 mL de etanol al 100% antes de usar	10 mL	Temperatura ambiente
Tubos colectores	80	Temperatura ambiente
Filtros	40	Temperatura ambiente
PBS	25 mL	4 °C
<i>2X Denaturing Solution*</i> Añadir 375 μL de 2-mercaptoetanol antes de usar	25 mL	4 °C
Fenol:cloroformo ácido	50 mL	4 °C
<i>Elution solution</i>	5 mL	4 °C

*Calentar a 30°C antes de usar para disolver el precipitado.

La fase acuosa se mezcló con 375 μL de etanol al 100%, se transfirieron a un nuevo tubo con cartucho de filtro y se centrifugaron (10.000 $\times g$ durante 15 segundos a temperatura ambiente) para que la mezcla pasara a través del filtro. El fluido filtrado se descartó y se repitió la centrifugación hasta que toda la mezcla pasó a través del filtro. A continuación, se realizaron tres lavados añadiendo 700 μL de *Wash Solution 1*, 500 μL de *Wash Solution 2/3* y 500 μL de *Wash Solution 2/3* respectivamente, centrifugando cada vez que se adicionó reactivo (10.000 $\times g$ durante 15 segundos a temperatura ambiente) y descartando el filtrado. Tras el último lavado, los filtros se colocaron en nuevos tubos, sobre los que se añadieron 50 μL de *Elution Solution* o agua libre de nucleasas y se centrifugaron (10.000 $\times g$ durante 15 segundos a temperatura ambiente), para repetir la elución

añadiendo la misma alícuota. El fluido recogido contiene el micro-ARN y debe ser conservado en hielo, o almacenado a -20 °C.

3.2.2.4 Síntesis de ADN complementario y RT-qPCR

El ensayo *TaqMan® Advanced miRNA Assays* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos) cuantifica los niveles de expresión de los micro-ARNs maduros a través de un sistema de *qPCR*, pero requiere previa modificación del micro-ARN maduro, incorporando una cola de poli A en el extremo 3', que servirá de cebador para transcripción reversa (*reverse transcription*, RT); y un adaptador en el extremo 5', necesario para la reacción de amplificación para sintetizar a partir de ese micro-RNA maduro un ADN complementario (ADN-c).

Para la primera etapa se prepararon 90 µL de *Poly (A) Reaction Mix* (Tabla 5), para mezclar 3 µL de este con 2 µL de muestra (fluido resultante del paso anterior) e incubarlos en el termociclador My Cycler™ Thermal Cycler 170-9701 (Bio-Rad, California, Estados Unidos) de acuerdo con las condiciones de la Tabla 9.

Tabla 5. Preparación del *Poly (A) Reaction Mix*

Componentes	1 muestra	30 muestras
Solución amortiguadora de poli A	0,5 µL	15 µL
ATP	0,5 µL	15 µL
Enzima poli A	0,3 µL	9 µL
Agua libre de nucleasas	1,7 µL	51 µL
Volumen total	3,0 µL	90 µL

En la segunda etapa, se incorporó el adaptador al extremo 5' mediante la adición de 10 µL de *Ligation Reaction Mix* (preparado según la Tabla 6) a la mezcla anterior y se incubaron en el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la Tabla 9.

Tabla 6. Preparación del *Ligation Reaction Mix*

Componentes	1 muestra	30 muestras
<i>5X DNA Ligase Buffer</i>	3,0 µL	90 µL
<i>50% PEG 8000*</i>	4,5 µL	135 µL
<i>25X Ligation Adaptor</i>	0,6 µL	18 µL
ARN ligasa**	1,5 µL	45 µL
Agua libre de nucleasas	0,4 µL	12 µL
Volumen total	10,0 µL	300 µL

*Muy viscoso, retirar del congelador previamente y pipetear despacio para que se cargue bien la pipeta.

**No homogeneizar con vórtex antes de usar.

Una vez realizadas estas modificaciones, se procede a la transcripción reversa para la obtención de ADN-c. Se prepararon 450 μL de *RT Reaction Mix* (Tabla 7), se añadieron 15 μL sobre cada uno de los microtubos anteriores y se incubaron en las condiciones especificadas en la Tabla 9.

Tabla 7. Preparación del *RT Reaction Mix*

Componentes	1 muestra	30 muestras
<i>5X RT Buffer</i>	6,0 μL	120 μL
<i>dNTP Mix</i>	1,2 μL	36 μL
<i>20X Universal RT Primer</i>	1,5 μL	45 μL
<i>10X RT Enzyme Mix</i>	3,0 μL	90 μL
Agua libre de nucleasas	3,3 μL	99 μL
Volumen total	15,0 μL	450 μL

El paso previo a la PCR en tiempo real es la reacción de amplificación, para aumentar de manera uniforme la cantidad de las cadenas de ADN-c. Se preparó una cantidad suficiente *miR-Amp Reaction Mix* (Tabla 8) para mezclar 45 μL de este con 5 μL del producto de la reacción de transcripción inversa, e incubarlos según la Tabla 9.

Tabla 8. Preparación del *miR-Amp Reaction Mix*

Componentes	1 muestra	30 muestras
<i>2X miR-Amp Master Mix</i>	25,0 μL	750 μL
<i>20X miR-Amp Primer Mix</i>	2,5 μL	75 μL
Agua libre de nucleasas	17,5 μL	525 μL
Volumen total	45,0 μL	1350 μL

Tabla 9. Condiciones de incubación de las distintas reacciones en termociclador para amplificación de los micro-ARNs aislados en la leche

Reacción	Fase	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Incorporación de la cadena de poliA	Poliadenilación	37 °C	45 minutos	-
	Stop reacción	65 °C	10 minutos	-
	Mantenimiento	4 °C	Indefinido	-
Incorporación del adaptador	Ligado	16 °C	60 minutos	-
	Mantenimiento	4 °C	Indefinido	-
Transcripción reversa	Transcripción reversa	42 °C	15 minutos	-
	Stop reacción	85 °C	5 minutos	-
	Mantenimiento	4 °C	Indefinido	-
Amplificación del microARN	Activación enzimática	95 °C	5 minutos	1
	Desnaturalización	95 °C	3 segundos	14
	Reconocimiento/Extensión	60 °C	30 segundos	
	Stop reacción	99 °C	5 minutos	1
	Mantenimiento	4 °C	Indefinido	1

Por último, para los cuatro micro-ARNs seleccionados (Tabla 10) se prepararon los diferentes *PCR Reaction Mix* (Tabla 11), empleando los *TaqMan® Advanced miRNA Assay (20X)* específicos para cada uno de ellos.

Tabla 10. Secuencias de los micro-ARNs analizados en suero lácteo (exosomas)

Nombre micro-ARN	Secuencia
hsa-miR-148a-3p	5'-UCAGUGCACUACAGAACUUUGU-3'
mmu-miR-200c-3p	5'-UAAUACUGCCGGUAAUGAUGGA-3'
hsa-miR-125b-5p	5'-UCCUGAGACCCUAAUCUGUGA-3'
rno-miR-29b-3p	5'-UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU-3'

Tabla 11. Preparación *PCR Reaction Mix*

Componentes	1 muestra	30 muestras
<i>TaqMan® Advanced Master Mix (2X)</i>	10 µL	300 µL
<i>TaqMan® Advanced miRNA Assay (20X)</i>	1 µL	30 µL
Agua libre de nucleasas	4 µL	120 µL
Volumen total	15 µL	450 µL

En una microplaca de 96 pocillos se depositaron 15 µL del *PCR Reaction Mix* junto con 5 µL solución de ADN-c, repitiendo este paso para cada uno de los primers. Una vez lista, se selló la placa con una cobertura adhesiva y se procedió a su lectura con el equipo para PCR en tiempo real QuantStudio™ 12K Flex (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos), programándolo según la Tabla 11.

Tabla 12. Condiciones de temperatura para la PCR

Fase	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Activación enzimática	95 °C	20 segundos	1
Desnaturalización	95 °C	1 segundos	40
Reconocimiento/Extensión	60 °C	20 segundos	

Los valores de ciclo umbral (*Cycle Threshold, CT*) de los micro-ARNs maduros específicos se midieron y calcularon automáticamente utilizando el *software* Applied Biosystems™ real-time PCR Analysis Modules (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos).

3.2.2.5 *Análisis estadístico*

Los valores expresados son los extraídos tras la cuantificación con *qPCR*, es decir, son los valores CT. Para el análisis estadístico se empleó del programa Prism8, © 2018 GraphPad Software (San Diego, California), comprobando, en primer lugar, la normalidad (test de Kolmogorov-Smirnov) y la homocedasticidad (test de Levene para igualdad de varianzas) de los resultados obtenidos, para luego realizar las siguientes pruebas paramétricas, *a*) test *t* de Student para muestras independientes para detectar las posibles diferencias entre muestras control (todos los animales a tiempo 0 y animales del grupo control a tiempos 1 y 2) y muestras de leche obtenidas después de tratamiento con rbST; *b*) ANOVA de un factor, por una parte para los controles y por otra para las tratadas, junto con su correspondiente test de Tukey para comparaciones múltiples, con el objetivo de comprobar las diferencias entre los grupos en función del momento de la toma de muestras (tiempo 0, 1 y 2). Un *p*-valor menor de 0,05 se consideró diferencia estadísticamente significativa.

4 Resultados y discusión

La identificación y caracterización de los micro-ARNs de la leche es un campo de estudio emergente en la investigación láctea cuya importancia reside en la necesidad de comprender su presencia/ausencia en la leche. El presente trabajo constituye una primera aproximación a la determinación de sus niveles de concentración en leche, por lo que, a pesar de haber seleccionado micro-ARNs cuya presencia en leche bovina está respaldada por la evidencia científica, cabe la posibilidad de que no sean detectados, bien por ausencia o bien porque las concentraciones son ínfimas, pues las condiciones que van a determinar la presencia/ausencia de expresión de un micro-ARN concreto son múltiples y variadas^{19,30,31}. Entre estas condiciones se incluye la administración de tratamientos hormonales encaminados a incrementar la producción lechera. Existen evidencias de la capacidad que tienen las hormonas lactogénicas para aumentar la expresión de los micro-ARNs de la familia 29 y el 148a en los exosomas de la leche^{30,36}.

De manera normal la glándula pituitaria del ganado bovino sintetiza somatotropina bovina (*bovine somatotropin*, bST), hormona peptídica con efecto galactopoyético, es decir, estimula la síntesis leche de la glándula mamaria. Una vez que se alcanza el pico de lactación, entorno al día 65 tras el parto, los niveles de bST comienzan a disminuir y con ellos la producción lechera. A pesar de que el empleo de rbST está prohibido en los países de la Unión Europea por cuestiones relacionadas con el bienestar animal y el rechazo por parte de los consumidores, en países como Estados Unidos, México o Brasil sí se permite. La administración de esta hormona extiende el pico de lactación del animal en el tiempo, logrando incrementar la producción. Dado que existen evidencias de la influencia de las hormonas lactogénicas en la expresión de los micro-ARNs en leche, y teniendo en cuenta el contexto de globalización actual, comprobar la repercusión de la rbST experimentalmente sobre unas moléculas incipientes como los micro-ARNs podría resultar de especial interés^{31,37}.

4.1 Micro-ARN 148a

La mayoría de los estudios acerca de la bioactividad de los micro-ARNs de la leche giran en torno al micro-ARN 148a, uno de los más abundantes tanto en leche humana como bovina^{7,38,39}, es decir, se conserva totalmente entre las especies humana y bovina, actuando, por lo tanto, sobre las mismas dianas que su homólogo humano. Este micro-

ARN está implicado en varios procesos, entre los que se incluyen el desarrollo, la adipogénesis, el control del apetito, la inmunidad, la proliferación celular y la homeostasis⁷.

Uno sus efectos corroborados es la represión de la ADN metiltransferasa (*DNA methyltransferase*, DNMT) 1, DNMT1, enzima inhibidora de la expresión génica, mediante la supresión de su transcripción. La regulación de esta enzima juega un papel esencial tanto en el desarrollo como en el control del crecimiento de mamíferos, pues es responsable de la metilación de la citosina del ADN en los islotes CpG, regiones del ADN que codifican para aproximadamente el 70% de los promotores de los genes en humanos- interviniendo en el silenciamiento genético. Su inhibición se traducirá en una menor metilación de los promotores de genes relacionados con el desarrollo en los islotes CpG, como *FOXP3* (factor de transcripción maestro de las células T reguladoras, Tregs), la insulina (*INS*), el factor de crecimiento ligado a la insulina 1 (*insulin-like growth factor-1*, *IGF-1*) o el gen asociado a la masa grasa y la obesidad (*fat mass -and obesity-associated gene*, *FTO*), y, en consecuencia, en una mayor expresión de estos últimos^{7,36,39}. La desmetilación de *FOXP3*, favorecida también por la desregulación de DNMT3B (enzima responsable de la inhibición epigenética de *FOXP3*) por parte del micro-ARN 148a, en las células Treg va a llevar a una mayor expresión de la proteína FOXP3, que favorece la diferenciación de estas células a células Treg antiinflamatorias, mecanismo fundamental para el desarrollo normal de la tolerancia inmunológica y la prevención de las alergias^{7,36,40}. La menor metilación de *INS* en las células β productoras de insulina da lugar a una mayor liberación de insulina, relacionada con una mayor resistencia hepática a la misma, así como con mayor riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), habiéndose asociado este efecto, fundamentalmente, a los productos lácteos no fermentados, en los que la presencia de micro-ARNs es mayor, pues el proceso de fermentación hace mella en sus niveles de expresión^{36,38,41}. La sobreexpresión de *FTO* está relacionada con enfermedades como la obesidad, DMT2, enfermedades neurodegenerativas o el cáncer de mama^{36,42}.

El incremento de FTO, que funciona como demetilasa de N6-metiladenosina ARNm (m^6A), implicada en el silenciamiento genético mediante metilación, aumenta la actividad transcripcional. Entre los genes desmetilados por acción de FTO se incluye el factor de transcripción pro-adipogénico *RUNX1T1*, cuya expresión aumenta favoreciendo la

adipogénesis y el depósito de adipocitos. Aumentan también los ARNm para grelina - hormona relacionada con el apetito- y los niveles séricos del péptido y, por lo tanto, la emisión de señales orexigénicas. Mediante el incremento de la expresión del receptor dopaminérgico D2, FTO estimula los circuitos dopaminérgicos del mesencéfalo, involucrados en la señal la recompensa frente a la ingesta^{36,42}. Activa, además, el mecanismo de diferenciación mTORC1 de las células β del páncreas, productoras de insulina, y promueve la gluconeogénesis asociada a una mayor expresión de la glucosa-6- fosfato y la fosfoenolpiruvato quinasa mitocondrial⁴².

Paralelamente, el micro-ARN 148a va a promover la hiperfagia y, en consecuencia, aumentará del índice de masa corporal (IMC) y los depósitos de grasa, mediante el silenciamiento de la retroalimentación negativa generada por la interacción entre la colecistoquinina (CCK), hormona de la saciedad, y su receptor CCK2R ante la abundancia de alimentos, mediante el bloqueo de este último³⁶.

También se ha relacionado este micro-ARN con la supresión de moduladores negativos de factores de transcripción lipogénicos, dando lugar a un mayor depósito de adipocitos, sin embargo no se ha profundizado sobre los mecanismos implicados³⁶.

El papel del micro-ARN 148a como factor diabetogénico está siendo objeto de estudio por su interacción con la proteína quinasa activada por adenosín monofosfato (AMP) (*AMP-activated protein kinase, AMPK*). Durante la lactancia, la diferenciación de las células β pancreáticas está mediada por el sensor metabólico diana de rampamicina para mamíferon complejo 1 (*metabolic sensor mammalian target of rampamycin complex 1, mTORC1*). En el momento del destete, y asociado a la ingesta de alimentos, se activa la diferenciación de células β pancreáticas mediada por AMPK, un mecanismo más complejo y específico, que resulta en células β pancreáticas adultas. El micro-ARN 148a vehiculado por la leche consumida, actúa directamente sobre AMPK, inhibiéndola, y activando la diferenciación de células β pancreáticas mediada por mTORC1. Este proceso resulta en células inmaduras caracterizadas por una secreción de insulina alterada e insuficiente, hecho fuertemente relacionado con la DMT2, y niveles elevados de glucosa en sangre³⁸.

De manera general, el micro-ARN 148a de la leche promueve la ingesta, inhibe los mecanismos de saciedad, promueve el depósito de adipocitos, la ganancia de peso e

interviene en procesos diabetogénicos, por lo que puede caracterizarse como promotor del síndrome metabólico.

4.2 Micro-ARN 200c

El micro-ARN 200c participa en varios procesos asociados con el desarrollo y la progresión del cáncer, como la conservación de las características de las células madre, la alteración de la regulación de la muerte programada, o la quimiosensibilidad⁴³. Sus funciones más documentadas tienen que ver con la supresión de la transición epitelio-mesénquima (TEM), uno de los primeros pasos en el desarrollo de la metástasis que favorece la motilidad de las células tumorales; es decir, el micro-ARN 200c reprime el avance del cáncer^{5,29,43,44}. La TEM es un proceso mediante el que las células epiteliales pierden su polaridad y la capacidad de adhesión célula-célula, adquiriendo en su lugar propiedades migratorias e invasivas. Durante la reparación de tejidos y el desarrollo embrionario constituye un mecanismo esencial; sin embargo, durante la edad adulta solo ciertos tipos de células son susceptibles de sufrir esta transición. Las células tumorales malignas son una de esas excepciones, siendo capaces, durante la tumorigénesis, de reactivar este proceso, beneficiándose de las cualidades que les aporta, motilidad y capacidad de invasión, necesarias para la diseminación de las células tumorales⁴⁴⁻⁴⁶. Incidiendo sobre los factores de transcripción ZEB1 y ZEB2, inductores de la TEM y supresores transcripcionales de la E-cadherina, el micro-ARN 200c disminuye significativamente los niveles de ARNm para estos factores, reduciendo su expresión. En vista de una menor expresión de sus inhibidores, los niveles de E-cadherina, proteína implicada en la represión de la TEM, se ven incrementados, ralentizando la migración celular y la invasión durante la progresión del cáncer^{3,5,43,44,47}. De forma simultánea, el micro-ARN 200c inhibe el factor de crecimiento inductor de la migración direccional, propio de las células cancerosas metastásicas^{44,46}. Estudios *in vitro* con células del carcinoma mamario, han observado que la administración de micro-ARN 200c induce la transición mesénquima-epitelio mediante el incremento de los niveles de E-cadherina e inhibe la migración de las células tumorales⁴⁴.

Una de las dianas del micro-ARN 200c de descubrimiento reciente es la proteína de unión al ARN Quanking (QK), también relacionada con la TEM por su papel en las modificaciones llevadas a cabo para dotar a las células de la capacidad para migrar e

invadir. La inhibición de su expresión a nivel postranscripcional es otra de las vías por las que el micro-ARN 200c previene la TEM⁴⁸⁻⁵⁰.

4.3 Micro-ARN 29b

La familia de los micro-ARN 29 la integran tres miembros, 29a, 29b y 29c, todos ellos involucrados en varias enfermedades. En el caso de la leche, se ha observado que la presencia de micro-ARN 29b en suero sanguíneo de los consumidores es dosis-dependiente^{20,40}. Concretamente este micro-ARN se ha relacionado con diferentes mecanismos relacionados con el cáncer, como la apoptosis, la proliferación celular o la TEM (Figura 3), inhibiendo la expresión de oncogenes y promoviendo la de supresores tumorales⁵¹⁻⁵³, habiéndose relacionado niveles bajos de micro-ARN 29b con formas más agresivas de la enfermedad, sugiriendo que reestablecerlos puede llevar a una mejora del pronóstico^{52,53}.

En su papel como inhibidor del proceso carcinogénico, actúa directamente sobre las ADN metiltransferasas DNMT3A y DNMT3B, uniéndose a la UTR de su extremo 3' y bloqueando su expresión. De forma indirecta, suprime la expresión de la DNMT1 mediante el bloqueo del transactivador Sp1. Estas enzimas son responsables del silenciamiento genético mediante metilación, por lo que su inhibición va a traducirse en una menor metilación de los promotores de genes supresores tumorales y, por lo tanto, en una mayor expresión de estos, inhibiendo la carcinogénesis^{42,51}.

Uno de los mecanismos a través de los que el micro-ARN 29b favorece la apoptosis consiste en evitar la supresión de *P53*, factor de transcripción importante en el control de la expresión de genes relacionados con la regulación del crecimiento, la senescencia, la apoptosis y la integridad del genoma en respuesta al estrés^{51,52}. El micro-ARN 29b interacciona con los promotores de los genes antiapoptóticos *P85α* (subunidad reguladora de la quinasa PI3) y *CDC42* (guanosina trifosfatasa, GTPasa), disminuyendo su expresión. Estos genes son responsables de la regulación negativa de *P53*, por lo que la inhibición de estos va a generar una mayor expresión de *P53*, favoreciendo la apoptosis^{51,52}. Por otra parte, va a incidir de forma directa en la promoción de genes proapoptóticos, como BIM, y supresores tumorales, como PDCD4⁵¹. La secuencia de las células mieloides de la leucemia 1 (*myeloid cell leukemia 1*, MCL-1) en las células β del páncreas y del colangiocarcinoma es otra de las dianas del micro-ARN 29b. Las MCL-1

poseen capacidad antiapoptótica, asociada a niveles elevados de proteínas Mcl-1. Su interacción con el micro-ARN 29b da lugar a la reducción de los niveles de la proteína Mcl-1, provocando un incremento de la sensibilidad de las células cancerosas a la citotoxicidad del ligando inductor de apoptosis relacionada con el factor de necrosis tumoral (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*, TRIAL)^{51,53,54}. Sin embargo, conviene ser cautelosos al sugerir el incremento de los niveles de micro-ARN 29b como terapia inhibitoria de MCL-1 para el tratamiento del cáncer, pues algunos autores sugieren que podría causar cardiocitotoxicidad^{54,55}.

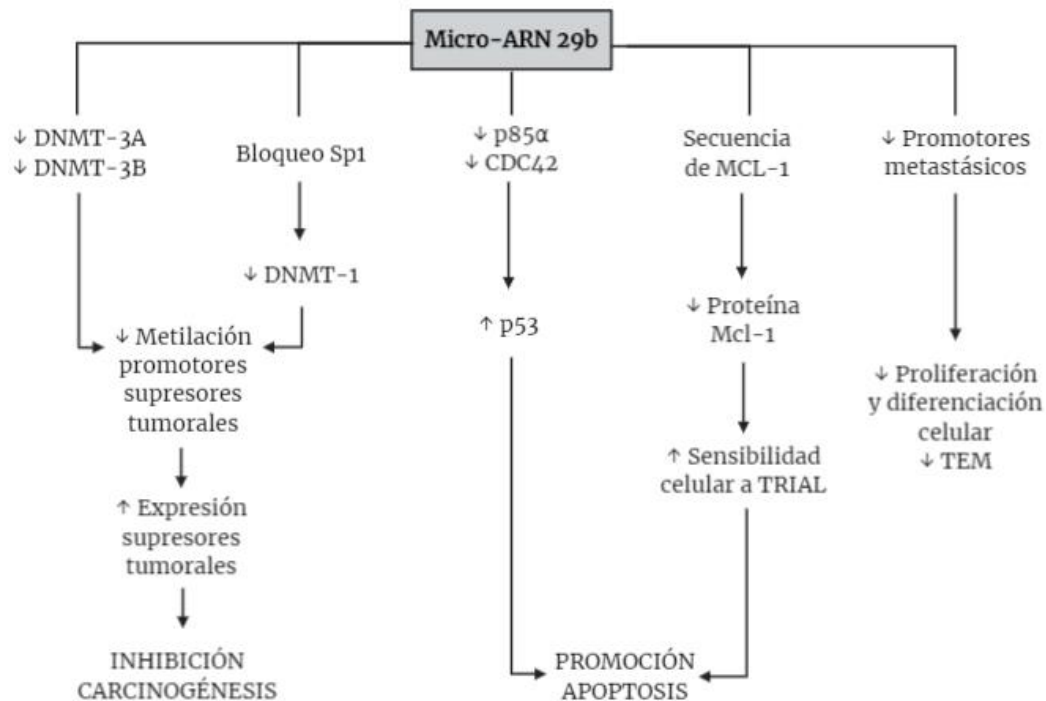


Figura 3. Implicaciones del micro-ARN 29b sobre el proceso carcinogénico (Fuente: elaboración propia, ©BioRender 2020)

Además de su potencial anticancerígeno, el micro-ARN 29b también funcionan como promotor de la DMT2^{25,38,42}, por las mismas vías que el micro-ARN 148a; y como modulador de *FTO*. La regulación de *FTO* puede darse a través de dos caminos a) interaccionando con Sp1 se inhibe la DNMT-1, promoviendo la desmetilación de las células CpG en el intrón 1 de *FTO*, dando lugar a una mayor expresión de *FTO*; y b) actuando sobre el ARNm de la dihidrolipoil transilasa (E2) suprime la actividad del complejo mitocondrial deshidrogenasa de α -cetoácidos de cadena ramificada (*branched-chain α -keto acid dehydrogenase*, BCKD) y el catabolismo mitocondrial de aminoácidos esenciales de cadena ramificada (*branched-chain essential amino acids*, BCAA),

umentando la disponibilidad de estos últimos, requeridos para la activación de *FTO*⁴², y característicos de la resistencia a la insulina y de la DMT2, de la que el micro-ARN 29b es promotor^{38,42,56}. En lo que respecta a los efectos asociados a la sobreexpresión de FTO nos remitimos al apartado 4.1 *Micro-ARN 148a* en el que se ha profundizado sobre ellos.

No son muchos los estudios existentes encaminados a examinar el papel de los micro-ARNs sobre la homeostasis del tejido esquelético, sin embargo, la mayoría coinciden al destacar el papel del micro-ARN 29b como promotor de la mineralización ósea, favoreciendo la diferenciación de los osteoblastos y suprimiendo la de los osteoclastos mediante una serie de mecanismos. El micro-ARN 29b va a promover la osteoblastogénesis regulando negativamente factores antiosteogénicos, como la histona deacetilasa 4, el *TGFβ3* o el *DUSP2*. La expresión de estos genes suprime la maduración de las células mesenquimales osteoblásticas reduciendo la presencia de la proteína celular Runx2 y su actividad. El Runx2 es un factor de transcripción clave, junto con la fosfatasa alcalina (*alkaline phosphatase*, AlkP), para la expresión de los principales genes relacionados con la diferenciación de los osteoblastos y la formación ósea, por lo que el bloqueo de sus inhibidores favorece la osteoblastogénesis. Paralelamente, regula la acumulación de las proteínas de colágeno durante la maduración de la matriz extracelular, disminuyendo la actividad de *COL1A1*, *COL5A3* y *COL4A2* -genes que participan en la síntesis de colágeno-, facilitando la deposición mineral mediante la promoción de la maduración de la matriz de colágeno fibrilar, previniendo la fibrosis del tejido óseo^{57,58}. Su papel sobre la formación de los osteoclastos y su función todavía no está claro, pero sí se han emitido ciertas hipótesis acerca de la manera en que esto sucede. Los osteoblastos, los osteocitos y las células del estroma estimulan, como parte de la homeostasis, la diferenciación de los osteoclastos mediante la liberación del receptor activador del factor nuclear kappa-B (*receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*, RANK-L), que se une a su receptor RANK ubicado en la superficie de los osteoclastos, estimulándolos para sintetizar enzimas degradativas, como la fosfatasa tartrato ácida (*tartrate acid phosphatase*, TRAcP), la catepsina K o las metaloproteasas de la matriz, responsables de la resorción ósea. Se ha observado que el micro-ARN 29b actúa sobre los osteoclastos alterando la expresión de los receptores RANK de su superficie, provocando que no se pueda interaccionar con RANK-L, y en consecuencia, la no liberación de enzimas catalíticos^{58,59}.

4.4 Micro-ARN 125b

El micro-ARN 125b ha sido relacionado con multitud de procesos biológicos, sin embargo, ninguno de ellos está totalmente claro. Se ha observado que este micro-ARN puede presentar tanto actividad oncogénica como antitumoral dependiendo del tejido sobre el que actúe. Esta lateralidad puede explicarse a la vista de la diana sobre la que actúa, el factor de transcripción *P53*, clave en la apoptosis y en la supresión tumoral; así que, en función del tejido del que se trate, la incidencia del micro-ARN 125b resultará en una menor expresión de p53, bloqueando la apoptosis, funcionando en este caso como factor oncogénico; o en un incremento de la misma, actuando como supresor tumoral^{5,36}.

Se ha observado también su implicación en la mejora de las causas del infarto agudo de miocardio (IAM). La apoptosis y la necrosis de los cardiomiocitos son procesos celulares claves en el desarrollo del IAM. Las proteínas RAS asociadas al dominio de la familia 1 (RASSF1) son GTPasas implicadas en diferentes mecanismos relacionados con la proliferación, la diferenciación celular, la adhesión célula-célula, la migración y la apoptosis. En lo que respecta al IAM, estas proteínas inhiben la hipertrofia cardíaca y promueven la apoptosis de los cardiomiocitos antes y después de él. Micro-ARN 125b interactúa con RASSF, disminuye los niveles de ARNm y la expresión de su proteína, y reduce la apoptosis de los cardiomiocitos, mejorando la función cardíaca después del IAM⁶⁰.

Kozlova y cols. (2019)⁶¹ fueron pioneros en realizar un estudio experimental relacionando la expresión del micro-ARN 125b con la progresión de la esclerosis sistémica, enfermedad crónica rara de causa desconocida caracterizada por fibrosis difusa y daños en la microvasculatura en piel, articulaciones y órganos internos. Estas alteraciones vasculares estimulan la síntesis de factores inflamatorios y la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, que van a generar colágeno y fibronectina, componentes de la matriz extracelular que favorecen la fibrosis. En individuos sanos, este proceso se compensaría mediante mecanismos que llevarían los miofibroblastos a la apoptosis. Este equipo concluyó que el micro-ARN 125b es un factor promotor de la enfermedad, pues actúa sobre los factores inductores de la apoptosis suprimiendo su actividad inhibiendo la apoptosis y favoreciendo la fibrosis, la proliferación de los miofibroblastos y la progresión de la enfermedad.

4.5 Resultados de la extracción de micro-ARNs en los exosomas de leche bovina

Tras su extracción de los exosomas de la leche, la cuantificación de las concentraciones de los micro-ARNs seleccionados se realizó mediante el registro del incremento de la fluorescencia en PCR, estableciendo en 40 el límite de detección, es decir, si los valores CT de fluorescencia alcanzan ese valor se considera que no hay presencia de ese micro-ARN. Es decir, los valores CT son inversamente proporcionales a la presencia de los micro-ARNs en la muestra. A partir de los valores CT de las muestras de leche analizadas se realizó un estudio estadístico descriptivo e inferencial.

En primer lugar, se realizó un test *t* Student para muestras independientes en el que se enfrentaron individuos control y tratados a tiempo 0 para cada micro-ARN (Tabla 13), verificando que no existen diferencias iniciales entre los animales.

Tabla 13. Análisis de la expresión inicial (tiempo 0) de micro-ARNs en individuos control y tratados

microARNs	Valor CT medio para controles	Valor CT medio para tratadas	IC 95%	<i>p</i> -valor
148a	35,64	34,35	-2,686; 0,12	0,0674
200c	28,28	28,41	-2,991; 3,233	0,9291
29b	30,23	29,51	-3,711; 2,277	0,5889
125b	38,53	36,29	-5,020; 0,5421	0,0987

El análisis se realizó con los datos obtenidos para los animales control y tratados a tiempo 0.

Los intervalos de confianza (IC) 95% y los *p*-valores fueron calculados empleando el test *t* de Student para muestras independientes.

Los *p*-valores en negrita indican significación estadística (*p*-valor < 0.05).

En una primera aproximación estadística, se analizó mediante un test *t* de Student para muestras independientes la existencia de diferencias entre las muestras control y aquellas obtenidas tras el tratamiento con rbST, sin tener en cuenta el momento de muestreo. Con esta prueba se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el caso del micro-ARN 29b, pudiendo afirmarse, a la vista de las medias (Tabla 14), que la administración de STrb disminuye la expresión de este micro-ARN en la leche. Para una visión gráfica de los resultados, Figura 4.

Tabla 14. Análisis de la expresión de micro-ARNs en muestras control y tratadas sin tener en cuenta el momento de muestreo

Micro-ARNs	Valor CT medio para controles	Valor CT medio para tratadas	IC 95%	<i>p</i> -valor
148a	33,99	37,56	-0,4029; 7,524	0,0761
200c	29,41	30,46	-1,269; 3,382	0,3584
29b	31,23	33,95	0,03613; 5,393	0,0472
125b	38,15	38,27	-1,592; 1,841	0,8824

El análisis se realizó con 15 muestras control y 12 tratadas.

Los intervalos de confianza (IC) 95% y los *p*-valores fueron calculados empleando el test *t* de Student para muestras independientes.

Los *p*-valores en negrita indican significación estadística (*p*-valor < 0.05).

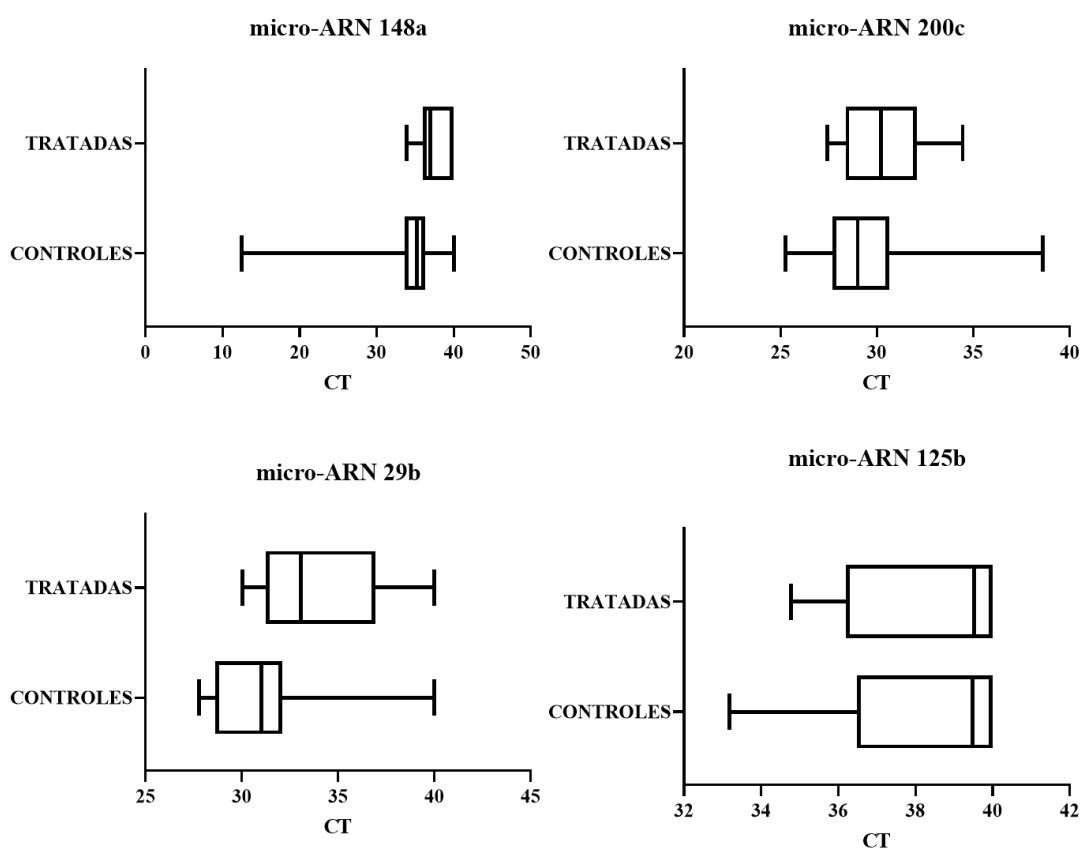


Figura 4. Diagrama de cajas para el test *t* de Student (Tabla 14) de los valores CT de los micro-ARNs estudiados. Cada caja está compuesta por dos cuartiles representando el rango intercuartílico Q2-Q3, con una línea negra en el medio que se corresponde con la mediana. Los bigotes están en el rango intercuartílico 1,5.

Mediante una prueba ANOVA de un factor (momento de muestreo) realizada a cada grupo de controles y tratadas para cada micro-ARN profundizamos sobre la progresión de los niveles de expresión en el tiempo y su respuesta a la administración de rbST (Tabla 15).

Para el micro-ARN 148a se detectaron diferencias en el grupo de animales tratados, y en particular entre las muestras a tiempo 0 y tiempo 2 (A-C), y tiempo 1 y 2 (B-C). Prestando atención a las medias, se observa que, para las muestras control, a pesar de que no se han detectado diferencias estadísticamente significativas, los valores CT sufren un ligero descenso gradual, pudiendo interpretarse como un incremento de la presencia del micro-ARN (Figura 5). En el caso de las muestras de los individuos tratados con rbST, los valores CT aumentan discretamente (Figura 5), es decir, lo que se traduce en una menor expresión del micro-ARN, que podría estar asociado con la administración de la hormona. En vista de los resultados obtenidos para las muestra control, podría afirmarse que el contenido en micro-ARN 148a aumenta conforme avanza el estado de lactación, hecho respaldado por la evidencia científica^{19,55}. El contenido de la leche en este micro-ARN, pese a no ser estable, la convierte en susceptible de ser considerada promotora de diabetes y obesidad.

En lo que respecta al micro-ARN 200c, al igual que en el caso anterior, se detectaron diferencias en el grupo de animales tratados, y concretamente entre las muestras a tiempo 0 y tiempo 2 (A-C), y tiempo 1 y 2 (B-C). En el caso de los controles, las medias de los valores CT experimentan un descenso a tiempo 0, mayor expresión, para luego aumentar a tiempo 2, menor expresión (Figura 5). Esta tendencia podría responder a la evolución del estado de lactación, es decir, una vez alcanzado el pico de lactación, la producción lechera disminuye y con ella los niveles de micro-ARNs. Para las muestras de los individuos a los que se les administró la hormona, se observa un incremento paulatino de las medias de los valores CT (Figura 5), es decir, se produce una caída en los niveles de expresión del micro-ARN 200c, que podrían asociarse con el tratamiento recibido. Por lo tanto, de cara a aprovechar el papel antitumoral que este micro-ARN confiere a la leche, sería interesante centrar futuros ensayos en sus niveles de expresión antes de alcanzar el pico de lactación.

Tabla 15. Análisis de la evolución de las diferencias entre los grupos según el momento de muestreo

Micro-ARNs	Grupos de individuos	ANOVA	Valor	Valor	Valor	Test de Tukey para comparación múltiple		
			CT medio A	CT medio B	CT medio C	A-B	A-C	B-C
148a	Controles	0,7466	34,35	33,52	30,84	0,7394 (IC 95%: - 5,323; 6,997)	0,9187 (IC 95%: - 48,33; 55,39)	0,9434 (IC 95%: - 45,37; 50,75)
	Tratadas	0,0033	35,64	35,81	39,30	0,8727 (IC 95%: - 1,254; 0,9176)	0,0076 (IC 95%: - 5,933; 1,402)	0,0192 (IC 95%: - 6,209; 0,7898)
200c	Controles	0,1388	28,41	28,12	33,94	0,9940 (IC 95%: - 15,60; 16,17)	0,2810 (IC 95%: - 20,64; 9,566)	0,1946 (IC 95%: - 18,29; 6,654)
	Tratadas	0,0012	28,28	28,68	32,25	0,8807 (IC 95%: - 0,3968; 0,8158)	0,0121 (IC 95%: - 3,964; 0,8417)	0,0061 (IC 95%: - 3,567; 0,6449)
29b	Controles	0,0623	29,51	29,46	36,74	0,9996 (IC 95%: - 0,05400; 2,075)	0,1420 (IC 95%: - 7,229; 2,177)	0,0212 (IC 95%: - 7,283; 0,7924)
	Tratadas	0,1021	30,23	34,84	33,06	0,0673 (IC 95%: - 4,605; 1,545)	0,1865 (IC 95%: - 2,834; 1,356)	0,7350 (IC 95%: - 1,771; 2,295)
125b	Controles	0,2165	36,29	37,38	40	0,7586 (IC 95%: - 1,082; 1,423)	0,0738 (IC 95%: - 3,706; 0,7745)	0,5390 (IC 95%: - 2,624; 2,103)
	Tratadas	0,0092	38,54	36,54	40	0,1879 (IC 95%: - 1,990; 0,9548)	0,2016 (IC 95%: - 1,467; 0,7250)	0,0051 (IC 95%: - 3,457; 0,5979)

Para cada grupo (controles y tratadas) se analizaron las diferencias existentes en función del día de muestreo (factor).

Para el test de Tukey se estableció: A=tiempo 0; B= tiempo 1; C=tiempo 2.

Los p-valores en negrita indican significación estadística (p -valor < 0.05).

La expresión del micro-ARN 29b presenta diferencias estadísticamente significativas entre las muestras controles a tiempo 1 y 2, que se traducen en una reducción de la expresión (Figura 5), que podría deberse a la evolución del estado de lactación. A pesar de que entre las muestras de los animales tratados con rbST no hay resultados significativos, las medias revelan que tras la administración de la hormona (tiempo 1) la expresión del micro-ARN disminuye, para después recuperarse discretamente (tiempo 2). En lo que respecta a este micro-ARN los resultados son contradictorios, y más si se tiene en cuenta la bibliografía existente, que defiende el incremento de los niveles de expresión conforme avanza la lactación⁶², así como el aumento de los mismo en respuesta al tratamiento hormonal³⁶. De confirmarse un patrón de expresión que alcanza su pico máximo al final de la lactación, el micro-ARN 29b reforzaría, junto con el micro-ARN 148a, el papel de la leche como factor de riesgo para el desarrollo de diabetes y obesidad; en contraposición su expresión ha sido asociada con la promoción de la mineralización ósea.

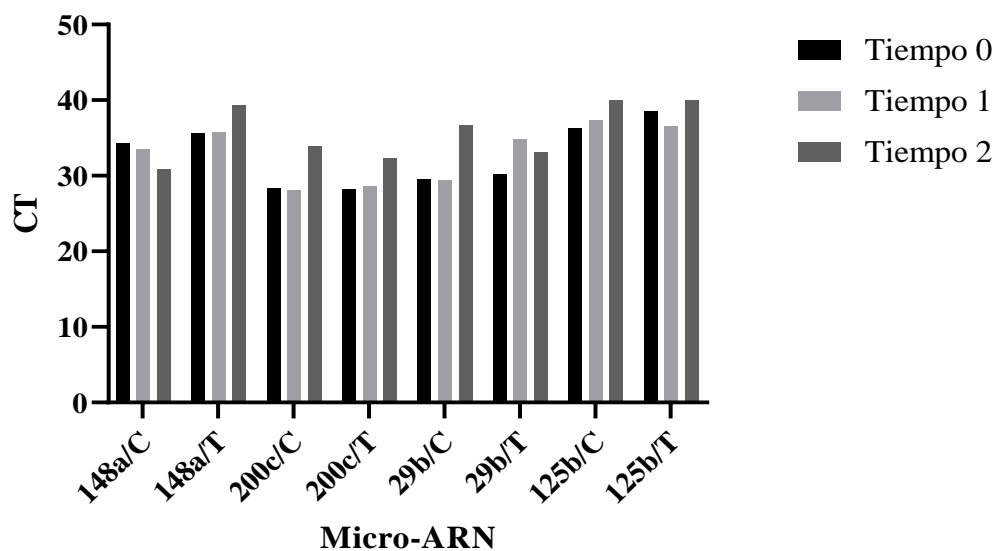


Figura 5. Gráfico de barras para las medias de los valores CT de cada uno de los grupos controles (C) y tratadas (T) de cada micro-ARN teniendo en cuenta el momento de toma de muestras

Para el micro-ARN 125b el análisis ANOVA revela la existencia de diferencias significativas entre las medias de los valores CT de los individuos a los que se les ha suministrado rbST, en particular entre muestras a tiempo 1 y 2. Prestando atención a las medias, tras la administración de la hormona (tiempo 1) la expresión del micro-ARN aumenta, y luego cae (tiempo 2) hasta niveles de concentración no detectables (Figura 5).

En el caso de los controles, el incremento gradual de las medias indica una tendencia decreciente de la expresión del micro-ARN 125b, que puede estar relacionada con la progresión de la lactación. Por lo que, en base a los resultados obtenidos, podría decirse que la rbST favorece su expresión. Dado que la bibliografía científica existente se contrapone, resulta complicado emitir un juicio acerca de si su presencia en la leche representa un beneficio o un perjuicio.

5 Conclusiones

Los micro-ARNs son componentes bioactivos de los alimentos novedosos y de gran interés científico, cuya repercusión sobre la salud del consumidor entraña innumerables incógnitas. Incógnitas que han convertido su absorción, estabilidad y efectos sobre los mamíferos, en particular sobre los humanos, en cuestiones de intenso debate. Los resultados más concluyentes otorgan a la leche bovina la condición de factor epigenético 1) promotor de la diabetes y la obesidad, asociado a su contenido en los micro-ARNs 148a y 29b; 2) supresor tumoral, relacionado con los micro-ARNs 200c y 29b; y 3) promotor de la mineralización ósea, por su contenido en 29b. Los resultados más inciertos son aquellos en los que se implica al micro-ARN 125b, pues el conocimiento de los procesos en los que participa y los mecanismos a través de los que lo hace no es tan sólido, hecho que podría estar relacionado con su menor presencia en leche en comparación con los anteriores micro-ARNs. Respecto a las consecuencias de la administración de rbST sobre los niveles de expresión de los micro-ARNs seleccionados en este trabajo, los resultados revelan que el efecto es diferente según el micro-ARN, observándose que esta hormona lactogénica disminuye la presencia de 148a, 200c y 29b, y aumenta la de 125b. Teniendo en cuenta que la leche es un fluido vivo, no estático y en el que conviven multitud de nutrientes y componentes bioactivos, resulta utópico estudiar el papel de los micro-ARNs sobre la salud del consumidor de manera aislada. Por ello, para hacer una aproximación fiel a la realidad deberían tenerse en cuenta las relaciones de sinergia y antagonismo que se pueden producir entre los componentes de la leche y otros alimentos. Del mismo modo, el procesado de un mayor número de muestras podría arrojar datos más esclarecedores en lo que respecta a sus niveles de expresión en leche bovina.

Bibliografía

1. Aranceta J, Serra L. *Leche, Lácteos y Salud*. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2005.
2. Izumi H, Tsuda M, Sato Y, et al. Bovine milk exosomes contain microRNA and mRNA and are taken up by human macrophages. *J Dairy Sci*. 2015;98(5):2920-2933. doi:10.3168/jds.2014-9076.
3. Khan S, Ayub H, Khan T, Wahid F. MicroRNA biogenesis, gene silencing mechanisms and role in breast, ovarian and prostate cancer. *Biochimie*. 2019;167:12-24. doi:10.1016/j.biochi.2019.09.001.
4. Izumi H, Kosaka N, Shimizu T, Sekine K, Ochiya T, Takase M. Bovine milk contains microRNA and messenger RNA that are stable under degradative conditions. *J Dairy Sci*. 2012;95(9):4831-4841. doi:10.3168/jds.2012-5489.
5. Mohr AM, Mott JL. Overview of microRNA biology. *Semin Liver Dis*. 2015;35(1):3-11. doi:10.1055/s-0034-1397344.
6. Lu TX, Rothenberg ME. MicroRNA. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(4):1202-1207. doi:10.1016/j.jaci.2017.08.034.
7. Benmoussa A, Provost P. Milk MicroRNAs in Health and Disease. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2019;18(3):703-722. doi:10.1111/1541-4337.12424.
8. Howell PM, Li X, Riker AI, Xi Y. MicroRNA in melanoma. *Ochsner J*. 2010;10(2):83-92.
9. Cui J, Zhou B, Ross SA, Zempleni J. Nutrition , microRNAs , and Human Health 1 - 4. 2017:105-112. doi:10.3945/an.116.013839.Exosomes.
10. Rani P, Yenuganti VR, Shandilya S, Onteru SK, Singh D. miRNAs: The hidden bioactive component of milk. *Trends Food Sci Technol*. 2017;65:94-102. doi:10.1016/j.tifs.2017.05.007.
11. Li R, Dudemaine PL, Zhao X, Lei C, Ibeagha-Awemu EM. Comparative analysis of the miRNome of bovine milk fat, whey and cells. *PLoS One*. 2016;11(4):1-21. doi:10.1371/journal.pone.0154129.

12. Feinbaum R, Ambros V, Lee R. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;116(116):843-854.
13. Manchester TU of. miRBase. <http://mirbase.org/>.
14. Kakimoto Y, Matsushima Y, Tanaka M, et al. MicroRNA profiling of gastric content from breast-fed and formula-fed infants to estimate last feeding: a pilot study. *Int J Legal Med*. 2019. doi:10.1007/s00414-019-02226-7.
15. National Center for Biotechnology Information. microRNA. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=microRNA>. Accessed November 21, 2019.
16. Alsaweed M, Lai CT, Hartmann PE, Geddes DT, Kakulas F. Human milk miRNAs primarily originate from the mammary gland resulting in unique miRNA profiles of fractionated milk. *Sci Rep*. 2016;6(October 2015):1-13. doi:10.1038/srep20680.
17. Zhang L, Chen T, Yin Y, Zhang CY, Zhang YL. Dietary microRNA-A Novel Functional Component of Food. *Adv Nutr*. 2019;10(4):711-721. doi:10.1093/advances/nmy127.
18. Nolte-'t Hoen ENM, Van Rooij E, Bushell M, et al. The role of microRNA in nutritional control. *J Intern Med*. 2015;278(2):99-109. doi:10.1111/joim.12372.
19. Gigli I, Maizon DO. microRNAs and the mammary gland: A new understanding of gene expression. *Genet Mol Biol*. 2013;36(4):465-474. doi:10.1590/S1415-47572013005000040.
20. Van Hese I, Goossens K, Vandaele L, Opsomer G. Invited review: MicroRNAs in bovine colostrum—Focus on their origin and potential health benefits for the calf. *J Dairy Sci*. 2020;103(1):1-15. doi:10.3168/jds.2019-16959.
21. Zempleni J. Milk exosomes: beyond dietary microRNAs. *Genes Nutr*. 2017;12(1):10-13. doi:10.1186/s12263-017-0562-6.
22. Aqil F, Munagala R, Jeyabalan J, et al. Milk exosomes - Natural nanoparticles for siRNA delivery. *Cancer Lett*. 2019;449(January):186-195. doi:10.1016/j.canlet.2019.02.011.

23. Kura B, Parikh M, Slezak J, et al. Relationship between HDL functional characteristics and cardiovascular health and potential impact of dietary patterns: A narrative review. *Nutrients*. 2019;11(6):2920-2933. doi:10.3390/nu11061231.
24. Liao Y, Du X, Li J, Lönnerdal B. Human milk exosomes and their microRNAs survive digestion in vitro and are taken up by human intestinal cells. *Mol Nutr Food Res*. 2017;61(11):1-11. doi:10.1002/mnfr.201700082.
25. Zempleni J, Baier SR, Howard KM, Cui J. Gene regulation by dietary microRNAs. *Can J Physiol Pharmacol*. 2015;93(12):1097-1102. doi:10.1139/cjpp-2014-0392.
26. Hönig J, Mižikova I, Nardiello C, et al. Transmission of microRNA antimiRs to mouse offspring via the maternal–placental–fetal unit. *Rna*. 2018;24(6):865-879. doi:10.1261/rna.063206.117.
27. Huang H, Zhu J, Fan L, et al. MicroRNA Profiling of Exosomes Derived from Red Blood Cell Units: Implications in Transfusion-Related Immunomodulation. *Biomed Res Int*. 2019;2019. doi:10.1155/2019/2045915.
28. Provost P. The clinical significance of platelet microparticle-associated microRNAs. *Clin Chem Lab Med*. 2017;55(5):657-666. doi:10.1515/cclm-2016-0895.
29. Baier SR, Nguyen C, Xie F, Wood JR, Zempleni J. MicroRNAs are absorbed in biologically meaningful amounts from nutritionally relevant doses of cow milk and affect gene expression in peripheral blood mononuclear cells, HEK-293 kidney cell cultures, and mouse livers 1-3. *J Nutr Biochem Mol Genet Mech*. 2014;14(June):2468-2474. doi:10.1093/advances/nmy127.
30. Melnik BC, Kakulas F, Geddes DT, et al. Milk miRNAs: Simple nutrients or systemic functional regulators? *Nutr Metab*. 2016;13(1):1-5. doi:10.1186/s12986-016-0101-2.
31. Muroya S, Hagi T, Kimura A, Aso H, Matsuzaki M, Nomura M. Lactogenic hormones alter cellular and extracellular microRNA expression in bovine mammary epithelial cell culture. *J Anim Sci Biotechnol*. 2016;7(1):1-10. doi:10.1186/s40104-016-0068-x.
32. Harbour R, Miller J. A new system for grading recommendations in evidence based

guidelines. *Educ debate*.

33. Herwijnen MJC van, Driedonks TAP, Snoek BL, et al. Abundantly Present miRNAs in Milk-Derived Extracellular Vesicles Are Conserved Between Mammals. *Front Nutr*. 2018;5(September):1-6. doi:10.3389/fnut.2018.00081.
34. Cai M, He H, Jia X, et al. Genome-wide microRNA profiling of bovine milk-derived exosomes infected with *Staphylococcus aureus*. *Cell Stress Chaperones*. 2018;23(4):663-672. doi:10.1007/s12192-018-0876-3.
35. Laboratorio de Genómica Viral y Humana. Preparación de Phosphate Buffered Saline (PBS) Procedimiento : Tabla de preparación : Notas : Referencias : *Fac Med UASLP*. 2008:9-10. http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell_Buffer_PBS.pdf.
36. Melnik BC, Schmitz G. MicroRNAs: Milk's epigenetic regulators. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2017;31(4):427-442. doi:10.1016/j.beem.2017.10.003.
37. Lamas A, Regal P, Vázquez B, Miranda JM, Cepeda A, Franco CM. Tracing recombinant bovine somatotropin ab(use) through transcriptomics: the potential of bovine somatic cells in a multi-dose longitudinal study. *Sci Rep*. 2019;9(1):1-12. doi:10.1038/s41598-019-41343-6.
38. Melnik BC. Milk exosomal miRNAs: Potential drivers of AMPK-To-mTORC1 switching in β -cell de-differentiation of type 2 diabetes mellitus. *Nutr Metab*. 2019;16(1):1-13. doi:10.1186/s12986-019-0412-1.
39. Melnik BC. Milk disrupts p53 and DNMT1, the guardians of the genome: Implications for acne vulgaris and prostate cancer. *Nutr Metab*. 2017;14(1):1-12. doi:10.1186/s12986-017-0212-4.
40. Melnik BC, John SM, Schmitz G. Milk: An epigenetic inducer of FoxP3 expression. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(3):937-938. doi:10.1016/j.jaci.2016.04.039.
41. Yu S, Zhao Z, Sun L, Li P. Fermentation Results in Quantitative Changes in Milk-Derived Exosomes and Different Effects on Cell Growth and Survival. *J Agric Food Chem*. 2017;65(6):1220-1228. doi:10.1021/acs.jafc.6b05002.
42. Melnik BC. Milk: An epigenetic amplifier of FTO-mediated transcription?

- Implications for Western diseases. *J Transl Med.* 2015;13(1):1-22. doi:10.1186/s12967-015-0746-z.
43. Palmer JD, Soule BP, Simone BA, Zaorsky NG, Jin L, Simone NL. MicroRNA expression altered by diet: Can food be medicinal? *Ageing Res Rev.* 2014;17:16-24. doi:10.1016/j.arr.2014.04.005.
 44. Korpai M, Lee ES, Hu G, Kang Y. The miR-200 Family Inhibits Transition and Cancer Cell Migration by Direct Targeting of E-cadherin Transcriptional Repressors ZEB1 and ZEB2 *. 2008;283(22):14910-14914. doi:10.1074/jbc.C800074200.
 45. Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanism of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal.* 2014. doi:10.1126/scisignal.2005189.
 46. Burk U, Schubert J, Wellner U, et al. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT invasion in cancer cells. 2008;9(6). doi:10.1038/embor.2008.74.
 47. Baier SR, Nguyen C, Xie F, Wood JR, Zemleni J. MicroRNAs Are Absorbed in Biologically Meaningful Amounts from Nutritionally Relevant Doses of Cow Milk and Affect Gene Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells, HEK-293 Kidney Cell Cultures, and Mouse Livers. *J Nutr.* 2014;144(10):1495-1500. doi:10.3945/jn.114.196436.
 48. Kim EJ, Kim JS, Lee S, et al. QKI, a miR-200 target gene, suppresses epithelial-to-mesenchymal transition and tumor growth. 2019. doi:10.1002/ijc.32372.
 49. Braicu C, Buiga R, Cojocneanu R, et al. Connecting the dots between different networks : miRNAs associated with bladder cancer risk and progression. 2019;6:1-17.
 50. Pillman KA, Phillips CA, Roslan S, et al. miR-200/375 control epithelial plasticity-associated alternative splicing by repressing the RNA-binding protein Quaking. 2018:1-20. doi:10.15252/embj.201899016.
 51. Jiang H, Zhang G, Wu JH, Jiang CP. Diverse roles of miR-29 in cancer (Review). *Oncol Rep.* 2014;31(4):1509-1516. doi:10.3892/or.2014.3036.
 52. Kriegel AJ, Liu Y, Fang Y, Ding X, Liang M. The miR-29 family: Genomics, cell

- biology, and relevance to renal and cardiovascular injury. *Physiol Genomics*. 2012;44(4):237-244. doi:10.1152/physiolgenomics.00141.2011.
53. Xiong Y, Fang JH, Yun JP, et al. Effects of microRNA-29 on apoptosis, tumorigenicity, and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2010;51(3):836-845. doi:10.1002/hep.23380.
 54. Slusarz A, Pulakat L. The two faces of miR-29. *J Cardiovasc Med*. 2015;16(7):480-490. doi:10.2459/JCM.0000000000000246.
 55. Do DN, Li R, Dudemaine PL, Ibeagha-Awemu EM. MicroRNA roles in signalling during lactation: An insight from differential expression, time course and pathway analyses of deep sequence data. *Sci Rep*. 2017;7(March):1-19. doi:10.1038/srep44605.
 56. Melnik B. The Pathogenic Role of Persistent Milk Signaling in mTORC1- and Milk- MicroRNA-Driven Type 2 Diabetes Mellitus. *Curr Diabetes Rev*. 2015;11(1):46-62. doi:10.2174/1573399811666150114100653.
 57. Li Z, Hassan MQ, Jafferji M, et al. Biological functions of miR-29b contribute to positive regulation of osteoblast differentiation. *J Biol Chem*. 2009;284(23):15676-15684. doi:10.1074/jbc.M809787200.
 58. Rossi M, Pitari MR, Amodio N, et al. miR-29b negatively regulates human osteoclastic cell differentiation and function: Implications for the treatment of multiple myeloma-related bone disease. *J Cell Physiol*. 2013;228(7):1506-1515. doi:10.1002/jcp.24306.
 59. Lozano C, Duroux-Richard I, Firat H, Schordan E, Apparailly F. MicroRNAs: Key regulators to understand osteoclast differentiation? *Front Immunol*. 2019;10(MAR). doi:10.3389/fimmu.2019.00375.
 60. Xiaochuan B, Qianfeng J, Min X, Xiao L. RASSF1 promotes cardiomyocyte apoptosis after acute myocardial infarction and is regulated by miR-125b. *J Cell Biochem*. 2019;(August 2018):489-496. doi:10.1002/jcb.29236.
 61. Kozlova A, Pachera E, Maurer B, et al. Regulation of Fibroblast Apoptosis and Proliferation by MicroRNA-125b in Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol*. 2019;71(12):2068-2080. doi:10.1002/art.41041.

62. Gao D, Ning N, Wang C, et al. Dairy products consumption and risk of type 2 diabetes: systematic review and dose-response meta-analysis. *PLoS One*. 2013;8(9):e73965.