

## **Tesis Doctoral – Doktoretza Tesia**

MicroRNAs y adipokinas: búsqueda de biomarcadores de pronóstico y respuesta terapéutica y de mediadores de mecanismos de acción

MikroRNAk eta adipokinak: pronostikoko eta erantzun terapeutikoko biomarkatzaileen eta ekintza-mekanismoen bitartekarien bilaketa

### **Doctorando / Doktoregaia:**

Asier Léniz Rodríguez

### **Directores / Zuzendariak:**

Dra. María Puy Portillo Dk.

Dr. Alfredo Fernández Quintela Dk.

Departamento de Farmacia y Ciencia de los Alimentos

Farmazia eta Elikagaien Zientziak Saila

Vitoria-Gasteiz 2022





*A quienes habrían estado orgullosos de mí*

## **Agradecimientos**

Durante estos años, la pregunta que me he hecho a mí mismo con más frecuencia ha sido ¿por qué hago esto; qué necesidad tengo de invertir tanto tiempo y esfuerzo en una tesis? Sin embargo, gracias a todos los que me han apoyado durante el proceso he ido encontrando las respuestas.

A mi familia y pareja. Me habéis visto preocupado, estresado y en alguna ocasión, planteándome tirar la toalla. Pero me habéis apoyado, me habéis animado y me habéis ayudado aun sin saber claramente qué estaba haciendo. Y todo por mí, para hacer que mantenga la ilusión y la sonrisa durante todo este trabajo. También me habéis ayudado a crecer por dentro, y de ahí saco la primera respuesta: Para realizarme

A los compañeros del laboratorio. Una parte importante del proceso de aprendizaje ha sido el contacto con vosotros. Durante esos cafés a media mañana además de despejarme y divertirme, he aprendido mucho tanto de ciencia como de nutrición. Además, siempre me he sentido apoyado. Ante cualquier duda o problema, siempre habéis estado dispuestos a ayudarme; invirtiendo en ayudarme todo el tiempo que necesitara aun sabiendo que el tiempo, precisamente, no es algo que os sobre. Y después de echarme una mano, en todo momento habéis mostrado predisposición a seguir ayudándome. Me habéis enseñado lo que es la ciencia de verdad y he visto en vosotros una ilusión contagiosa que me ha hecho encontrar una segunda respuesta: para disfrutar del proceso

A mis directores, Alfredo y María Puy. Para empezar, agradezco que hayáis invertido en mí al aceptar dirigirme la tesis y, por ende, acompañarme durante este proceso que ha durado tantos años. Aquel día en el que nos reunimos los tres por primera vez, depositasteis en mí una confianza que ni siquiera yo mismo tenía por temor a no dar la talla en un equipo de nivel académico y científico. Me habéis dado todas las facilidades que he necesitado durante estos largos años, allanándome el camino. Con vosotros he encontrado la tercera respuesta: para aprender a amar la ciencia

Sin vosotros, nunca habría llegado hasta aquí. A tod@s, GRACIAS.



# Índice

<b>Abreviaturas</b> .....	10
<b>Introducción</b> .....	1
1. MicroRNAs.....	2
1.1. Biosíntesis de miRNAs .....	2
1.2. Acción de los miRNAs en sus dianas .....	6
1.3. Interacción dieta-miRNAs y su capacidad como biomarcadores.....	7
2. Adipokinas .....	9
2.1. Leptina.....	9
2.2. Adiponectina .....	10
2.3. Vaspina .....	11
2.4. Omentina.....	12
2.5. Chemerina .....	12
2.6. NOV/CCN3.....	23
3. Niños pequeños para la edad gestacional.....	25
4. Síndrome metabólico .....	30
4.1. Etiología y fisiopatología del síndrome metabólico .....	31
4.2. Hígado graso.....	33
5. Compuestos fenólicos .....	37
5.1. Biodisponibilidad, transporte y excreción.....	39
5.2. Compuestos fenólicos de la uva.....	40
5.3. Efectos de los compuestos fenólicos de la uva .....	42
5.4. Pterostilbeno .....	44
<b>Objetivos</b> .....	94
<b>Diseño experimental y metodología</b> .....	100
<b>Resultados y discusión</b> .....	119
<b>Bibliografía</b> .....	143
<b>Conclusiones</b> .....	178
<b>Anexo</b> .....	184
Manuscrito 1 .....	186
Manuscrito 2 .....	209
Manuscrito 3 .....	237
Manuscrito 4 .....	256

Manuscrito 5 .....	275
--------------------	-----

## Aurkibidea

Laburdurak.....	
Sarrera.....	48
1. MikroRNAk.....	49
1.1. MiRNAen biosintesia.....	49
1.2. MiRNAen ekintza beren ituetan.....	53
1.3. Dieta-miRNA interakzioa eta biomarkatzaile gisa duten gaitasuna.....	54
2. Adipokinak.....	56
2.1. Leptina.....	56
2.2. Adiponektina.....	57
2.3. Vaspina.....	58
2.4. Omentina.....	59
2.5. Chemerina.....	60
2.6. NOV/CCN3.....	71
3. Haur txikiak haurdunaldirako.....	72
4. Sindrome metabolikoa.....	76
4.1. Sindrome metabolikoaren etiologia eta fisiopatologia.....	77
4.2. Gibel esteatosia.....	79
5. Konposatu fenolikoak.....	83
5.1. Bioerabilgarritasuna, garraioa eta iraztea.....	85
5.2. Mahatsaren konposatu fenolikoak.....	86
5.3. Mahatsaren konposatu fenoliken ondorioak.....	88
5.4. Pteroestilbenoa.....	89
Helburuak.....	97
Diseinu esperimental eta metodologia.....	110
Emaitzak eta eztabaida.....	131
Bibliografia.....	143
Ondorioak.....	181
Eranskina.....	184
1. Eskuizkribua.....	186
2. Eskuizkribua.....	209
3. Eskuizkribua.....	237



4. Eskuizkribua .....	256
5. Eskuizkribua .....	275

## **Abreviaturas/Laburdurak**

AdipoR1/R2: adiponectin receptor 1/2

AKT: Protein kinase B

AML: alpha mouse liver

AMPK: proteína quinasa activada por AMP/ AMP-k aktibatutako proteina kinasa

ATP: adenosín trifosfato

CART: proteína de transcripción regulada de cocaína y anfetamina

cDNA: DNA complementario/ DNA osagarria

CHREBP: carbohydrate-responsive element-binding protein

CIR: crecimiento intrauterino retardado

CMKLR1: chemokine receptor-like 1

COX: prostaglandina-endoperóxido sintasa 2

CPT1a: Carnitine palmitoyltransferase 1A

CRH: hormona liberadora de corticotropina

CRP: proteína C reactiva

Ct: Cycle threshold

Ctgf: connective tissue growth factor

Cyr61: cystein rich protein 61

DE: desviación standard

DG/HD: diabetes gestacional/haurdunaldiko diabetesa

DGAT2: Diacylglycerol O-Acyltransferase 2

DGCR8: DiGeorge critical region 8

DT2/2MD: diabetes tipo 2 / 2. motako diabetesa

EDTA: ácido etilenodiaminatetraacético / azido etilenodiaminatetraazetikoa

EPOC/BGBK: enfermedad pulmonar obstructiva crónica/biriketako gaixotasun buxatzaile kronikoa

FBS: foetal bobine serum

FDR: first degree relative

FOX: forkhead box

GH: growth hormone

GLUT4: glucosa transporter 4

HbA1c: hemoglobina glicosilada

HDL: high density lipoprotein

HGNA/GKEA: hígado graso no alcohólico / gibel koipetsu ez alkoholikoa

HOMA-IR: modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina / intsulinaren erresistentzia balioztatzeko modelo homeostatikoa

HSL: lipasa sensible a hormonas / hormonekiko sentikorra den lipasa

HTA: hipertensión arterial / hipertentsio arteriala

IGF: insulin-like growth factor

IL-6/1b: interleukina 6/1b

IMC: índice de masa corporal

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

IRS: Insulin receptor substrate

JAK-STAT: Janus kinase signal transducer and activator of the transcription

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

LDL: low density lipoprotein

LPL: lipoproteína lipasa / lipasa lipoproteína

MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos 1

miRNA: microRNA/mikroRNA

NCE: National Cholesterol Education Program

NCEP: National Cholesterol Education Program

NGS: secuenciación de nueva generación

NGT: tolerancia normal a la glucosa / glukosarekiko tolerantzia normala

NOV: nephroblastoma overexpressed

Nrf2: NF-E2-related factor 2

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno-1

PCR: polymerase chain reaction

PEG/HT: pequeño para la edad gestacional/ haurdunaldirako txikia

PI3K: fosfatidilinositol 3 kinasa

PI3K: phosphoinositide-3-kinase

PIK3R2: subunidad reguladora de fosfoinositido-3-quinasa 2 / Fosfoinositidoa erregulatzeko duen azpiunitateko-3-kinasa 2

PIP3: 3,4,5-trisphosphate

PKM: piruvate kinase

PPAR $\gamma/\alpha$ : peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma/\alpha$

PRKAB2: subunidad beta 2 no catalítica activada por la proteína quinasa AMP/

PRKRA/ PACT: interferon-inducible double stranded RNA-dependent activator

PVDF: Polyvinylidene fluoride

QUICKI: quantitative insulin sensitivity check index

RanGTP: RanGTP-dependent nuclear transport receptor exportin-5

RAR-RES2: retinoic acid receptor responder protein

RISC: RNA-induced silencing complex

RNA: ácido ribonucleico / azido ribonukleikoa

ROS: reactive oxygen species

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa / polimerasaren kate-erreakzio kuantitatiboa

SHOX: short stature homeobox

SM: Síndrome metabólico /síndrome metabolikoa

SOCS: supresores de la señalización de citocinas /

SREBP: sterol regulatory element binding protein

TBARS: azido tiobarbiturikoaren espezie erreaktiboak

TFAM: factor de transcripción A mitocondrial / mitokondrietako A transkripzio faktorea

TG: triglicéridos / triglizeridoak

TIG2: tazarotene-induced gene 2 protein

TKT: transketolasa

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

TRBP: trans-activation response RNA-binding protein

TSH: hormona estimulante de la tiroides/tiroidearen hormona estimulatzailea

UT: unidad de transcripción

UTR: untranslated región

VLDL: very low density lipoprotein

WISP: WNT1-inducible-signaling pathway protein

# Introducción

## Introducción

### **1. MicroRNAs**

Los microRNAs (miRNA) son fragmentos de RNA (19-23 nucleótidos) no codificantes, que tienen en el extremo 3` un grupo hidroxilo y en el extremo 5` presentan un grupo fosfato. Fueron descubiertos por primera vez en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, y se pueden encontrar en animales, plantas, algas y algunas especies de virus [1]. Posteriormente (en 1993) se descubrió su actividad reguladora, describiendo cómo el miRNA lin-4 regulaba negativamente la proteína LIN-14 [2]. Hoy en día se han descrito más de 300 miRNAs, tanto en roedores como en humanos, aunque se cree que el genoma humano puede codificar más de 1000 [3,4]. Es importante destacar que cada gen puede ser diana de varios, o incluso numerosos, microRNAs y a su vez, un solo miRNA es capaz de tener 100-200 dianas potenciales [5,6]. De este modo, se estima que más de un tercio de los genes están regulados por miRNAs y, por tanto, se puede decir que los miRNAs adquieren un papel fundamental en la regulación de la expresión génica de todo el genoma [7].

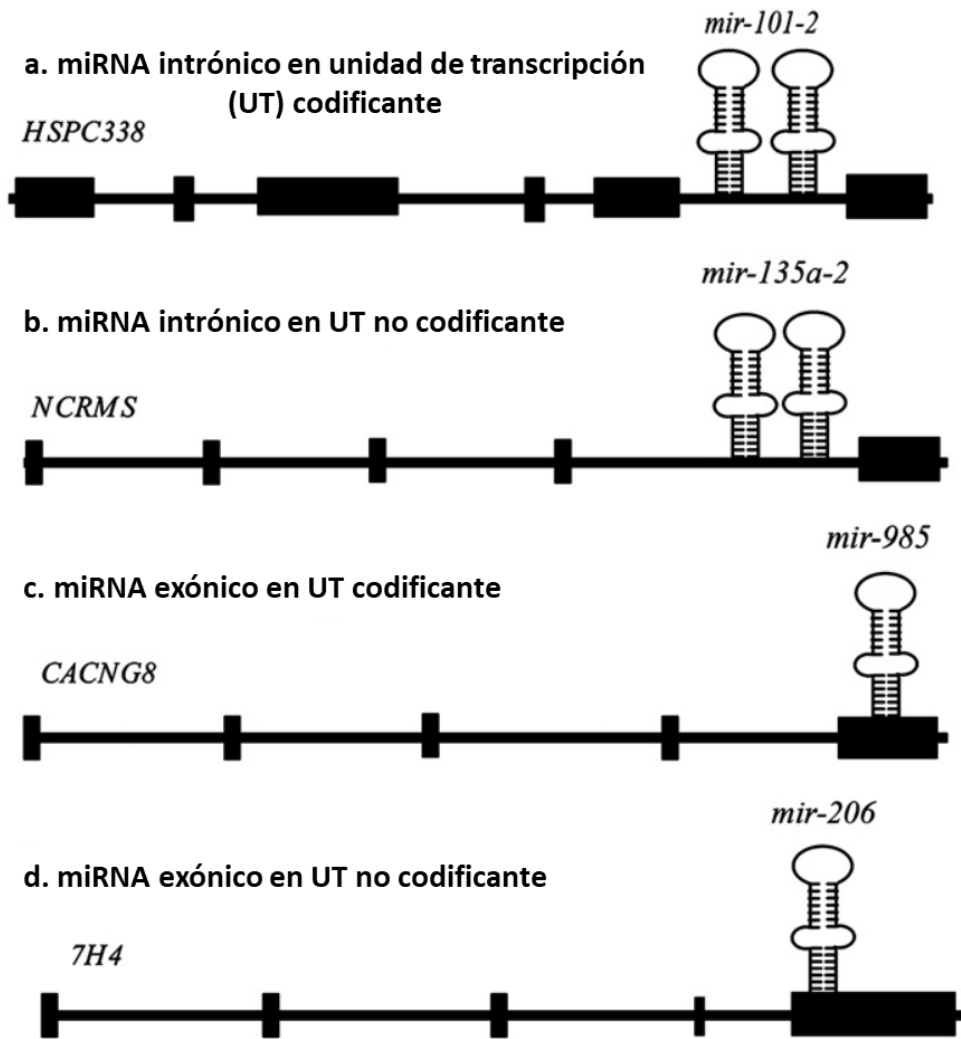
El campo de investigación en miRNAs ha experimentado un gran crecimiento en los últimos años, situación que sigue en aumento a medida que se van descubriendo otros nuevos, gracias a los rápidos avances en tecnologías relacionadas con la genómica [6].

#### **1.1. Biosíntesis de miRNAs**

##### ***1.1.1. Síntesis de pri-miRNA***

La mayor parte de los miRNAs están codificados en regiones intrónicas, y solo unos pocos en regiones exónicas [8]. Además, aproximadamente la mitad de los miRNAs se encuentra junto a otros miRNAs, formando agrupaciones (clusters), que se expresan mediante transcripciones policistrónicas [9]. Sólo unos pocos miRNAs han demostrado tener sus propios transcriptores. De esta manera, los miRNAs pueden clasificarse en miRNAs intrónicos en unidades codificantes, miRNAs intrónicos en unidades no codificantes, miRNAs exónicos en unidades codificantes y miRNAs exónicos en unidades no codificantes (Figura 1) [10].

## Introducción



**Figura 1.** Ejemplos de organización y estructura de los miRNAs. Modificado de Wahid *et al.* [10]

El principal responsable de la transcripción de miRNAs es la RNA polimerasa II, aunque se han descrito casos en los que es la polimerasa III la que lleva a cabo la transcripción [11,12]. La expresión mediada por polimerasa II permite ciertas variaciones, haciendo que la expresión de los grupos de miRNAs dependa de condiciones específicas. La regulación de los miRNAs se controla sobre todo a nivel transcripcional y se produce por modificadores epigenéticos concretos, dependiendo del tejido. En función de la situación fisiopatológica de las células, los miRNAs se expresan en mayor o menor medida. Además, al exponerse a ciertas moléculas como los inhibidores de la metilación su expresión cambia [13]. La modificación de las histonas es otro proceso que ha demostrado ejercer una regulación epigenética sobre los miRNAs. La acetilación puede relajar la



## Introducción

estructura de la cromatina y activar la transcripción, mientras que, por el contrario, la desacetilación produce una cromatina más compacta, lo que suprime la transcripción génica de miRNAs [14]. El producto de esta expresión se denomina miRNA primario o pri-miRNA y tiene una longitud de varios miles de pares de bases y una estructura de tipo "stem loop" u horquilla, con una caperuza de guanosina (cap-5') y una cola poliadenilada 3'.

### ***1.1.2. Procesado en el núcleo***

En animales, todos los miRNAs son procesados en el núcleo celular. De este proceso se encarga la proteína nuclear endoribonucleasa Drosha, formando un complejo con la proteína de unión DiGeorge critical region 8 (DGCR8). La unión de estas dos proteínas se denomina complejo microprocesador. La proteína DGCR8, también conocida como Pasha, actúa como señalizador, haciendo que la proteína Drosha corte el pri-miRNA alrededor de 11 pares de bases por debajo de la horquilla. Así, se obtiene una estructura en horquilla de 60-70 nucleótidos denominada precursor de miRNA (pre-miRNA) (Figura 2) [15,16].

Curiosamente, se ha observado en análisis por array que el complejo microprocesador es capaz de regular también muchos RNAs. De hecho, se sugiere que este complejo es capaz de unirse también a otras proteínas para regular otros procesos además de los miRNAs [16].

### ***1.1.3. Transporte del núcleo al citoplasma***

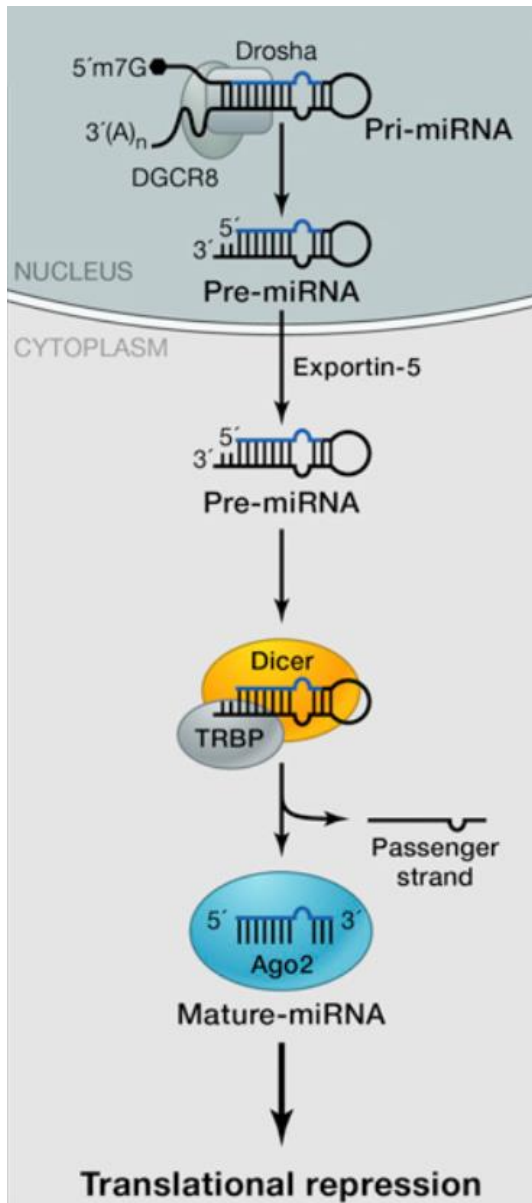
El pre-miRNA es la estructura que atraviesa la membrana nuclear hasta el citosol. Lo hace unida a la proteína "RanGTP-dependent nuclear transport receptor exportin-5" [17]. Esta proteína forma una estructura en forma de "U" que se une a la zona terminal del pre-miRNA [18]. Además de la función de transporte, la exportina-5 estabiliza el miRNA mientras atraviesa la membrana. El cofactor RanGTP, del cual la exportina-5 es dependiente, también se une al complejo, aunque posteriormente es hidrolizado en el citoplasma, dando un desacoplamiento del pre-miRNA del complejo transportador. Aunque la bibliografía relacionada con la regulación de la propia exportina-5 es escasa, se ha descrito que puede estar regulada por diversos compuestos, entre los que se encuentran las hormonas. Se especula con la posibilidad de que la regulación de la exportina-5, y por tanto la limitación de la expresión de los miRNAs, se produzca por

## Introducción

regulación de la unión del pre-miRNA al transportador, bien enmascarando la zona de unión de exportina-5, o modificando la propia estructura de la proteína (Figura 2) [17].

### ***1.1.4. Procesado citoplasmático***

Una vez que el miRNA ha alcanzado el citoplasma y se ha desacoplado del complejo transportador, es procesado por la enzima endonucleasa Dicer, que es un tipo de RNAsa III, con el fin de formar el miRNA maduro. Dicer es una proteína muy específica y altamente conservada, que se puede encontrar en la mayoría de organismos eucariotas. Aunque en algunos organismos haya diferentes tipos de Dicer, el Dicer-1 es el encargado de la maduración de los miRNAs [19]. Es una enzima esencial en este proceso; de hecho, se ha descrito que su falta de expresión tiene como resultado la formación de miRNAs aberrantes, así como la acumulación de pre-miRNAs [20,21]. Además, mediante mecanismos epigenéticos, se puede modificar la acción de Dicer para crear miRNA isoformas, que cambian la especificidad de los mismos hacia sus dianas [21]. Trabaja junto a otras proteínas, como las proteínas de la familia argonauta, y se sabe que lo hace en estrecho contacto con las proteínas "trans-activation response RNA-binding proteins" (TRBP) y la proteína kinasa "interferon-inducible double stranded RNA-dependent activator" (PRKRA, también conocida como PACT) [22]. El complejo dicer corta alrededor de 22 nucleótidos desde la base de la curva del pre-miRNA y se obtiene el dúplex de miRNA, que está formado por 2 hebras de microRNA maduro. El dúplex se acopla posteriormente a un complejo proteico de la familia argo, y se separan las dos hebras. Una de ellas seguirá unida al complejo argo, mientras que la otra, generalmente será degradada. Se ha descrito que una de las razones principales a la hora de elegir qué hebra será degradada, podría ser la termoestabilidad de los extremos del dúplex [23]. El complejo proteico que contiene la hebra de miRNA maduro, tiene la capacidad activa, y toma el nombre de "RNA-induced silencing complex" (RISC) (Figura 2).



**Figura 2.** Procesado en el núcleo, transporte del núcleo al citoplasma y procesado en el citoplasma. Modificado de Yates *et al* (2013) [15]

### 1.2. Acción de los miRNAs en sus dianas

Para que los miRNAs pueden regular sus genes diana, el complejo RISC debe unirse a su mRNA diana, habitualmente en la región 3'UTR [24,25]. Se requiere que haya complementariedad entre el mRNA y las bases 2-8 del miRNA (seed sequence), además de cierta interacción con el extremo 3' del miRNA, con el fin de poder asegurar la termoestabilidad de la unión [26]. El mecanismo por el que el miRNA elige una diana y

## Introducción

no otras ante los cientos de mRNAs compatibles no está del todo claro. No obstante, se especula con la posibilidad de que la metilación de la adenosina en la posición N6 del mRNA diana pueda jugar un papel en esta selección [27,28].

Se ha descrito que los miRNAs son capaces de llevar a cabo diversas funciones, entre las que destacan la regulación de la transcripción, la inhibición de la enlongación y traducción de los mRNAs diana, la degradación de las dianas o la reducción de la estabilidad de las proteínas recién sintetizadas por el mRNA diana [29]. Las funciones principales de los miRNAs dependen del tipo de unión el complejo RISC con el mRNA diana. En caso de darse una unión incompleta, el proceso de traducción del mRNA diana se ve inhibido, mientras que cuando se da una unión completa, se produce un proceso de degradación de la diana[28].

### **1.3. Interacción dieta-miRNAs y su capacidad como biomarcadores**

Aunque en diversos tejidos los miRNAs pueden ser altamente inestables y rápidamente degradables, debido a la presencia de RNAsas, se ha descrito que en sangre son muy estables y pueden ser utilizados como biomarcadores de enfermedades o de procesos fisiológicos [30]. Esto se debe a que los miRNAs tienen capacidad de formar complejos con proteínas, como las lipoproteínas HDL, o ser encapsulados en pequeñas vesículas, lo que evita su degradación [31]. Además de la secreción activa al torrente sanguíneo en las formas descritas, los miRNAs también se transfieren a la sangre por difusión pasiva, y es posible medirlos de manera relativamente sencilla en fluidos corporales como sangre, suero, líquido cefalorraquídeo u orina [32,33].

Recientemente, distintos estudios han analizado la presencia de exosomas, un tipo de vesículas con una doble membrana fosfolipídica que contienen miRNAs [34]. Los exosomas son unos intermediarios de alta eficiencia en la transmisión de material genético intracelular entre células de diferentes tejidos. Se pueden identificar en distintos fluidos corporales, de una manera altamente estable, y pueden cargar en su interior RNA, miRNAs, distintas proteínas o factores de transcripción, entre otras moléculas, y transportarlos desde la célula origen hasta la célula destinataria. Hay distintas células que pueden secretar exosomas, como es el caso de las células dendríticas, epiteliales y tumorales, los glóbulos rojos y los hepatocitos: Debido a las proteínas de membrana de los mismos, se cree que interactúan con receptores de las células destino (y sus proteínas

## Introducción

de membrana, como CD63), mediante unión ligando-receptor y transmiten el material genético vía endocitosis [35].

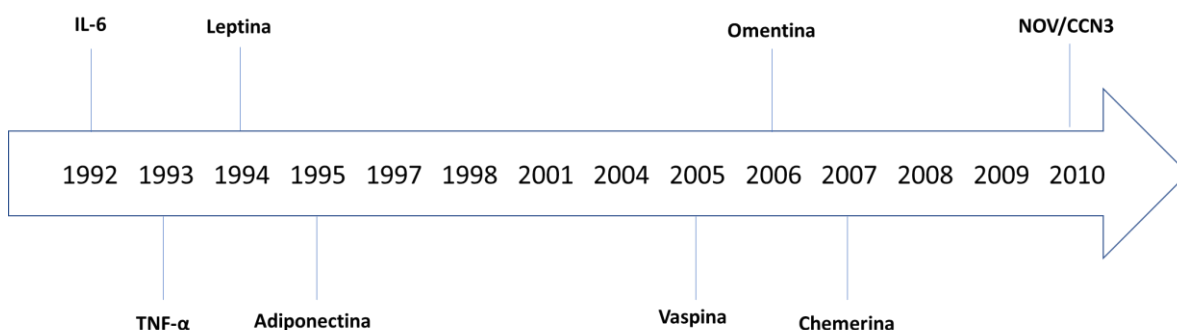
Se ha observado que los miRNAs dependen del sexo y de la condición física las personas [36,37]. Además, tanto los miRNAs circulantes como los de los exosomas, varían dependiendo de las patologías de los sujetos, pudiéndose considerar como biomarcadores no invasivos. Además, aunque su análisis sea más complejo, los exosomas presentan la ventaja de que sus proteínas de membrana pueden sugerir el origen de la misma y por tanto, saber de qué tejido proviene el miRNA encapsulado.

Respecto a la interacción entre los miRNAs y la dieta, los microRNAs también han demostrado ser indicadores del estado nutricional. Por ejemplo, la expresión de miR-204, miR-296 o miR-375 se ve disminuida ante una falta de zinc [38]. También se ha observado que mujeres con una baja concentración de 25-hidroxivitamina D expresan de forma diferente hasta 11 miRNAs, al compararlas con mujeres con alta concentración de esa vitamina [39]. De igual manera, se ha observado que algunos componentes de los alimentos regulan positiva o negativamente la expresión de ciertos miRNAs. A modo de ejemplo, la expresión de miR-let7a se ve aumentada tras la ingesta de cúrcuma, té verde o espinacas [40,41]. Entre los compuestos que modifican la expresión de miRNAs, destacan los compuestos fenólicos, que ejercen diversas funciones en el organismo a través de los miRNAs.

Por otra parte, en 2012 se identificaron miRNAs exógenos procedentes de plantas en tejidos y suero de roedores, así como en suero de humanos sanos, concluyendo que esos miRNAs eran de origen dietético [42]. En ese mismo estudio, también se observó que un miRNA presente en el arroz, el miR-168a, regulaba la expresión de una proteína asociada a un receptor de LDL. Esos resultados sugieren que hay material genético que puede soportar parte de la digestión y pasar al torrente sanguíneo.

## 2. Adipokinas

El tejido adiposo blanco tiene como función principal la acumulación de energía en forma de triglicéridos en los adipocitos. No obstante, esta visión se amplió tras el descubrimiento de la leptina en 1994 [43]. Actualmente, el tejido adiposo es considerado un órgano endocrino, probablemente el más grande de todo el organismo, con capacidad para sintetizar y liberar un elevado número de proteínas conocidas como adipokinas o adipocitokinas (Figura 3). Estas proteínas ejercen funciones de regulación autocrina, paracrina y endocrina, regulando así numerosas rutas de señalización metabólica. De hecho, se han descrito más de 700 proteínas diferentes secretadas por el tejido adiposo, aunque muchas de ellas todavía necesitan ser validadas.



**Figura 3.** Línea temporal del descubrimiento de las adipocitocinas.

### 2.1. Leptina

La leptina es sintetizada fundamentalmente en el tejido adiposo blanco, en especial el tejido subcutáneo; de hecho, las concentraciones circulantes de leptina son directamente proporcionales a la cantidad de masa grasa corporal [44]. No obstante, también se produce en el estómago. Es una proteína de 16kDa que desempeña un papel importante en la regulación de procesos metabólicos, reproductivos, neuroendocrinos y en el balance energético. También se ha descrito una acción potencial de esta adipocitocina en el sistema inmune, la cognición y el metabolismo óseo [45].

Los receptores de la leptina (Rob) se encuentran en el hipotálamo y distintos órganos como hígado, pulmón, riñón, páncreas o el mismo tejido adiposo [46]. La presencia de estos receptores refuerza la capacidad autocrina y paracrina de esta adipocitocina. El sistema de señalización de la leptina más destacado es la vía JAK-STAT (Janus kinase (JAK)/signal transducer and activator of the transcription), que regula la expresión de

## Introducción

neuropéptidos anorexígenos [47]. De forma paralela, la leptina también disminuye la síntesis de péptidos orexígenicos. En cuanto a la acción reguladora de la insulina, la leptina tiene especial relevancia la activación de la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/AKT), que estimula la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos [48].

Aunque inmediatamente tras su descubrimiento se pensó que la leptina podía constituir una herramienta eficaz para el tratamiento de la obesidad, pronto se vio que esto no iba a ser así, dado que tan solo un porcentaje extremadamente escaso de personas obesas presentan hipoleptinemia [49]. Por el contrario, la mayoría de ellas exhiben elevadas concentraciones plasmáticas de esta adipokina y resistencia a la leptina [50-52].

### **2.2. Adiponectina**

La adiponectina fue descubierta en 1995, poco después de la leptina [53]. Esta adipokina se expresa abundantemente y de forma exclusiva en el tejido adiposo blanco. Al contrario de lo que ocurre con otras adipokinas, su expresión disminuye a medida que aumenta la masa grasa [54]. Actúa básicamente a través de los receptores AdipoR1 y AdipoR2, que se encuentran presentes sobre todo en músculo esquelético y en hígado [55]. Se ha observado que esta adipokina puede mejorar la acción de la insulina y revertir la resistencia a la misma asociada a concentraciones altas de TNF $\alpha$  y respuesta reducida a PPAR $\gamma$ , mediante una activación de la AMP protein kinasa (AMPK) [56]. Además, también se ha observado que los pacientes con diabetes tipo 2 tienen una concentración en sangre de adiponectina menor, y en el caso de sujetos no diabéticos, unos niveles altos de adiponectina se relacionan con un menor riesgo de desarrollar la enfermedad [57]. Igualmente, se asocia negativamente con las concentraciones de glucosa en ayunas [58].

Esta adipokina toma especial relevancia en el hígado, ya que aumenta la oxidación de ácidos grasos y disminuye la captación de estos, la gluconeogénesis y la lipogénesis *de novo* [59]. Además, en este órgano esta adipokina disminuye la inflamación, mediante la supresión de la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF $\alpha$  o IL-6 y el aumento de la expresión de las anti-inflamatorias como IL-10 [60]. También se han descrito efectos antifibróticos debido al citado bloqueo de AMPK y PPAR $\alpha$ , mediados por las células estrelladas, disminuyendo así la expresión de genes que provocan la fibrosis hepática [61]. Por tanto, en la actualidad hay diversas investigaciones centradas en incrementar la

## Introducción

actividad de la adiponectina o de sus receptores para tratar patologías derivadas de la inflamación producida por la obesidad y la resistencia a la insulina [62,63].

En cuanto a la población infantil, una baja concentración plasmática de adiponectina podría considerarse como un predictor de aterosclerosis en la madurez, sugiriendo que esta adipokina se podría utilizar para estratificar a niños obesos por nivel de riesgo de enfermedades cardiovasculares [64].

### **2.3. Vaspina**

La vaspina (visceral adipose serpin protease inhibitor) es una proteína de 47kDa y 415 aminoácidos, que se expresa mayoritariamente en el tejido adiposo blanco visceral, aunque también en hígado, páncreas, piel o estómago. Las concentraciones elevadas de vaspina sérica se han relacionado con obesidad, alteración en la sensibilidad a la insulina y bajo nivel de condición física [65]. Presenta un efecto sensibilizador a la insulina, así como anorexígeno [66]. Así, la administración de esta adipokina a ratones por vía intraperitoneal redujo la ingesta de alimento y disminuyó las concentraciones de glucosa en sangre [67]. Además, se ha descrito que sujetos diabéticos y prediabéticos presentan concentraciones de vaspina circulantes mayores que los individuos sanos [68]. Aunque el mecanismo completo de acción de la vaspina aún está por determinar, se sabe que actúa a través de la inhibición de las proteasas de serina. Es capaz de inhibir la proteína kallikreina 7 como diana, que a su vez degrada la insulina en las cadenas A y B.

La vaspina se ha asociado a la presencia de obesidad e hipertensión arterial en sujetos con hígado graso no alcohólico [69,70]. No obstante, todavía no se dispone de suficiente evidencia para afirmar que esto no se debe a un mecanismo compensatorio ante la resistencia a la insulina e inflamación que genera esta patología. De hecho, en un estudio llevado a cabo en ratas que presentaban hipertensión espontánea, la administración intraperitoneal de esta adipokina previno el aumento de la hipertensión arterial sistólica a través de mecanismos antioxidantes y antiinflamatorios [71].

También se ha descrito que la vaspina tiene influencia en las enfermedades cardiovasculares, presentando actividad como marcador en la estenosis carotídea. En el mismo sentido, se ha observado que concentraciones plasmáticas bajas de esta adipokina, así como bajos niveles de mRNA de la misma, pueden ser predictores de otras patologías cardíacas como coronariopatías y angina inestable [66,72].



## Introducción

En el caso de los niños y adolescentes, se ha observado que las niñas presentan mayores concentraciones de vaspina que los niños, diferencia que además se acentúa con la edad hasta la pubertad. Independientemente del sexo, edad o IMC en niños, concentraciones bajas de vaspina se han asociado con mejor sensibilidad a la insulina, pero con presión arterial sistólica alta y daños en la función endotelial [73].

### **2.4. Omentina**

La omentin1, que es la isoforma más habitual, tanto en plasma como en tejido adiposo, es secretada fundamentalmente por el tejido adiposo visceral, especialmente en células estromales vasculares [74]. Ha demostrado tener efectos sensibilizadores a la insulina, mejorando de esta forma la captación de glucosa estimulada por insulina en los adipocitos [75]. La relación de la omentina circulante con la obesidad y la resistencia a la insulina es inversa. Además, las mujeres presentan mayores concentraciones de omentina circulante que los hombres. También se ha descrito que esta adipokina se correlaciona positivamente con la adiponectina, y en consecuencia, inversamente con la masa grasa [76]. En el caso de niños en edad prepubertal (7-13 años), se ha observado que la concentración sérica de omentina se correlaciona negativamente no sólo con el IMC y la circunferencia abdominal, sino también con las concentraciones de insulina y el HOMA [77]. Sin embargo, es posible encontrar también bibliografía donde se relacionan las concentraciones elevadas de omentina con alteraciones del metabolismo lipídico, pero en estos casos achacan esta relación directa a un mecanismo compensatorio [78].

En cuanto a las rutas de señalización de la omentina, todavía quedan por esclarecer todos los mecanismos involucrados. Sin embargo, se ha observado que uno de los mecanismos implicados puede ser la regulación de péptidos relacionados con el apetito, reduciendo la expresión hipotalámica de la proteína de transcripción regulada de cocaína y amfetamina (CART) y de la hormona liberadora de Corticotropina (CRH), así como L-dopa y norepinefrina [79]. En cuanto a la mejora de la resistencia a la insulina, uno de los mecanismos de acción puede ser la vía de fosforilación de la proteína quinasa b (Akt) en los adipocitos, aunque también se ha visto que la omentina puede causar un aumento la actividad de de (IRS) por activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) y, por tanto, la inhibición de una diana de la rapamicina (mTOR-p70S6K) [80,81].

### **2.5. Chemerina**

## Introducción

Dado que en la presente Tesis Doctoral la chemerina ha sido objeto de un estudio más detallado que otras adipokinas, en esta introducción se va a realizar una descripción más extensa que para el resto de adipokinas. La chemerina, conocida como "retinoic acid receptor responder protein 2" (RAR-RES2), y "tazarotene-induced gene 2 protein" (TIG2) es producida fundamentalmente en el tejido adiposo blanco, hígado, intestino y riñón, aunque puede ser identificada en todo el organismo. Se compone de 146 aminoácidos, con un peso molecular de 16kDa, y fue descrita por primera vez en 1997 [82]. La señalización está mediada por la unión a los receptores CMKLR1 (chemokine receptor-like 1), también conocidos como ChemR23 y CC-motif receptor-like 2 [83-85].

La chemerina desempeña distintas funciones relacionadas fundamentalmente con la inflamación, la adipogénesis y la homeostasis de la glucosa. En casos de obesidad, las concentraciones de chemerina se asocian directamente con la cantidad de tejido adiposo, IMC, índice cintura-cadera, concentraciones de glucosa, bajas concentraciones de HDL y triglicéridos circulantes; es decir, está relacionada con el síndrome metabólico [86]. De hecho, hay estudios que proponen la chemerina como biomarcador de estas alteraciones [87]. También se ha descrito que la chemerina, en pacientes con diabetes tipo 2, se expresa en mayor cantidad en sujetos con hipertensión arterial que en normotensos [88].

Diversos estudios han analizado la relación entre la chemerina y el metabolismo de la glucosa en sujetos adultos como se puede apreciar en la Tabla 1. Aunque la gran mayoría de estas investigaciones establecen una correlación entre las concentraciones plasmáticas de chemerina y un mal control del metabolismo glucémico, no se ha alcanzado un consenso general en torno a esta afirmación.

**Tabla 1.** Estudios que analizan la relación entre la chemerina y el metabolismo de la glucosa en adultos.

Estudios casos-control			
Autor	Situación metabólica	Cohorte	Resultado
Bozaoglu <i>et al.</i> , 2007 [86]	Personas de las Islas Mauricio con	142 sujetos con NGT	Tras ajustar por sexo, correlación significativa con :

## Introducción

	DT2	114 con DT2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Glucosa en ayunas</li> <li>• Insulina en ayunas</li> <li>• HbA1c</li> </ul>
Stejskal <i>et al.</i> , 2008 [89]	Alto riesgo de SM (prediabetes, dislipemia y obesidad)	<p>55 sujetos sanos normopeso</p> <p>181 con riesgo alto de SM (59 con SM y 122 sin SM)</p>	<p>Mayor concentración de chemerina en sujetos con SM</p> <p>Correlación positiva entre chemerina y glucosa en ayunas</p> <p>Sin correlación con índice QUICKI.</p>
Bozaoglu <i>et al.</i> , 2009 [90]	Personas latinoamericanas con DT2	<p>969 sujetos no diabéticos (400 hombres y 569 mujeres)</p> <p>173 pacientes con DT2 (63 hombres y 109 mujeres)</p>	<p>No hubo diferencias en la concentración de chemerina</p> <p>Correlación positiva con:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• glucosa plasmática en ayunas</li> <li>• insulina en ayunas</li> <li>• HOMA-IR</li> </ul>
El-Mesallamy <i>et al.</i> , 2011 [91]	Personas egipcias con DT2	<p>90 sujetos divididos en 3 grupos:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 15 sujetos sanos</li> <li>• 53 pacientes con DT2</li> <li>• 22 pacientes con DT2 e IHD.</li> </ul>	<p>Mayores concentraciones de chemerina en sujetos con DT2 y DT2 con IHD</p> <p>Correlación positiva entre chemerina y:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• IMC</li> <li>• Glucosa en ayunas</li> <li>• Insulina en ayunas</li> <li>• HOMA-IR</li> <li>• HbA1c</li> </ul>
Chu <i>et al.</i> , 2012 [92]	Personas coreanas con 3 o más criterios de SM (según NCEP III)	<p>59 hombres y 33 mujeres con sobrepeso</p> <p>IMC: <math>28.15 \pm 5.08 \text{ kg/m}^2</math></p>	<p>Sin correlaciones significativas</p>
Jialal <i>et al.</i> , 2013 [93]	SM incipiente (estado pro-inflamatorio con actividad monocítica elevada y desregulación biológica del tejido adiposo, manifestado por secreción	<p>60 sujetos control: 37 hombres y 23 mujeres</p>	<p>Mayor concentración de chemerina en sujetos con SM.</p> <p>Mayor expresión de chemerina en tejido adiposo</p>

## Introducción

	anormal de adipokinas, citokinas y quimiocinas, no complicado con DT2 o ECV)	45 sujetos con SM: 9 hombres y 36 mujeres	subcutáneo y músculo en sujetos con SM.  Correlación positiva con: <ul style="list-style-type: none"> <li>• HOMA-IR</li> <li>• CRP</li> </ul>
Takahashi <i>et al.</i> , 2013 [94]	Personas japonesas con DT2 o SM	321 sujetos adultos (213 hombres y 108 mujeres divididos en tres grupos: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 88 controles (66 hombres y 22 mujeres)</li> <li>• 187 sujetos con DT2 (88 hombres y 59 mujeres)</li> <li>• 85 sujetos con SM (59 hombres y 27 mujeres)</li> </ul>	Menores niveles de chemerina en hombres con DT2 que en controles y sujetos con SM.  Correlación negativa de chemerina con: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Glucosa en ayunas</li> <li>• HbA1c</li> </ul>
Wang <i>et al.</i> 2013 [95]	Personas chinas con SM (según IDF 2005)	30 controles (18 hombres y 12 mujeres)  Edad 51 ± 9 años  30 pacientes con SM (16 hombres y 14 mujeres). Edad 49 ± 8 años	Mayor concentración de chemerina en sujetos con SM  Correlación positiva con: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Glucosa en ayunas</li> <li>• Insulina en ayunas</li> <li>• HbA1c</li> </ul>
Zhuang <i>et al.</i> 2014 [96]	Personas con control glucémico normal y familiares de primer grado de pacientes con DT2 (FDR)	63 sujetos con NGT y 74 con FDR	Mayor concentración de chemerina en pacientes con FDR que en pacientes con NGT  Correlación positiva de chemerina com: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Glucosa plasmática</li> <li>• Insulina plasmática</li> <li>• HOMA-IR</li> </ul>

## Introducción

Adams-Huet <i>et al.</i> , 2014 [97]	SM incipiente	23 controles (6 hombres y 17 mujeres) y 19 pacientes con SM (3 hombres y 16 mujeres)	Mayor resistencia a la insulina del tejido adiposo en sujetos con SM  Correlación positiva entre chemerina
Coimbra <i>et al.</i> , 2014 [98]	Personas portuguesas con DT2	20 controles (8 hombres y 12 mujeres) y 73 pacientes con DT2 (36 hombres y 37 mujeres) divididos en 2 grupos: <ul style="list-style-type: none"><li>• grupo de mediana edad (38-64 años)</li><li>• grupo de edad avanzada (65-85 años)</li></ul>	Mayor concentración de chemerina en sujetos con DT2 y sujetos de edad avanzada
Fatima <i>et al.</i> , 2015 [99]	Personas pakistanies con DT2 preclínico	29 controles, 23 con DT2 preclínico y 22 con DT2. (edad 35-59 años)	Mayor concentración de chemerina en sujetos con DT2.
Andersson <i>et al.</i> , 2016 [100]	Hombres con DT2	13 controles y 14 sujetos con DT2 (edad 51-69 años)	Mayor concentración de chemerina en sujetos con DT2.
Habib <i>et al.</i> , 2017 [101]	Mujeres saudíes con DT2	35 controles y 45 pacientes con DT2 (30-65 años)	Mayor nivel de chemerina en sujetos con DT2.  Correlación positiva de chemerina con: <ul style="list-style-type: none"><li>• Insulina en ayunas</li><li>• HOMA-IR</li></ul>
El-Deeb <i>et al.</i> , 2018 [102]	Personas con DT2	14 controles (9 obesos y 5 no obesos) y 71 personas con prediabetes (40 obesos y 31 no obesos)	Correlación positiva de chemerina con: <ul style="list-style-type: none"><li>• HOMA-IR</li><li>• HbA1c</li><li>• PCR</li></ul>

## Introducción

Gateva <i>et al.</i> , 2018 [103]	Personas con obesidad y prediabetes	41 controles y 39 sujetos con obesidad y prediabetes (50,4 ± 10,6 años)	<p>Concentración de chemerina sin cambios significativos</p> <p>Asociación débil entre chemerina y HbA1c</p>
Yang <i>et al.</i> 2019 [104]	Personas con DT2	<p>20 sujetos NGT (12 hombres y 8 mujeres)</p> <p>50 sujetos con DT2 (27 hombres y 23 mujeres)</p> <p>30 sujetos con DT2+macroangiopatía</p>	<p>Mayor concentración de chemerina en DT2 con macroangiopatía</p> <p>Correlación positiva entre chemerina y:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• IMC</li> <li>• Glucosa a las 2 horas de ingesta</li> <li>• Glucosa en ayunas</li> <li>• HOMA-IR</li> <li>• HbA1c</li> <li>• Insulina en ayunas</li> </ul> <p>Correlación negativa con</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• HDL</li> </ul>
Ouerghi <i>et al.</i> , 2020 [105]	Hombres tunecinos con SM (según IDF)	27 controles y 11 pacientes con SM (17-21 años; IMC 19-37)	<p>Correlación positiva con:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Glucose en ayunas</li> <li>• HOMA-IR</li> </ul>
Sitar-Taut <i>et al.</i> , 2020 [106]	Personas con DT2	<p>88 sujetos en 4 grupos:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Obesidad y DT2</li> <li>• Obesidad y normogluceamia</li> <li>• Normopeso y DT2</li> <li>• Normopeso y normogluceamia</li> </ul>	<p>Concentración más elevada de chemerina en sujetos insulinoresistentes que en insulinosensibles</p> <p>Correlación positiva con HOMA-IR en grupo normopeso-normogluceamia.</p>
Shafer-Eggleton <i>et al.</i> 2020 [107]	Personas coreanas con SM	18 controles y 32 pacientes con SM (edad 24-62 años)	<p>Mayor ratio chemerina/HDL en sujetos con SM</p> <p>Correlación positiva entre ratio chemerina/HDL y:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Glucosa en ayunas</li> <li>• HOMA-IR</li> </ul>

## Introducción

Estudios transversales			
Autor	Situación metabólica	Cohorte	Resultado
Ouwens <i>et al.</i> 2012 [108]	Hombres jóvenes con normoglucesmia	20 sujetos (26-38 años) IMC 22,9 ± 2,3	Correlación negativa entre chemerina en ayunas y sensibilidad a la insulina.
Fatima <i>et al.</i> 2013 [109]	Hombres sanos	90 sujetos: 30 con normopeso, 30 con sobrepeso y 30 obesos (15-65 años)	Mayor concentración de chemerina en sujetos obesos  Asociación de la chemerina con varios fenotipos de SM
Zylla <i>et al.</i> 2017 [110]	Personas con valores normales de glucosa en ayunas y HbA1c	3.986 sujetos (1.956 hombres y 2.030 mujeres)	Correlación positiva entre chemerina y: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Glucosa plasmática</li> <li>• HbA1c</li> <li>• Citokinas inflamatorias</li> </ul>
Cheon <i>et al.</i> 2017 [111]	Personas con DT2	102 pacientes con DT2 (53 hombres y 49 mujeres)	Correlación positiva entre concentración de chemerina y grosor de del tejido adiposo visceral.  Correlación negativa con HDL.

Otros estudios			
Autor	Situación metabólica	Cohorte	Resultado
Yu <i>et al.</i> 2012 [112]	Personas con DT2	81 sujetos obesos (42 hombres y 39 mujeres) <ul style="list-style-type: none"> <li>• 41 sujetos tratados con metformina</li> <li>• 40 sujetos tratados con pioglitazona</li> </ul>	La concentración de chemerina se redujo con pioglitazona, en comapración con metformina  Mayor reducción cuando el hipoglucesmante se asocia a antioxidantes

## Introducción

		79 sujetos no diabéticos (44 hombres y 39 mujeres)	
Lee <i>et al.</i> 2013 [113]	Personas obesas tras una intervención de ejercicio físico y dieta hipocalórica	60 sujetos (40 hombres y 20 mujeres; 22-36 años))	La concentración de chemerina se redujo tras la intervención  La reducción de chemerina sérica se asoció positivamente con el cambio en HOMA-IR
Kim <i>et al.</i> , 2014 [114]	Personas obesas con DT2	32 sujetos: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 16 sujetos con intervención intensiva en estilos de vida</li> <li>• 16 sujetos con dieta y ejercicio habituales</li> </ul>	La concentración de chemerina se redujo tras la intervención  La chemerina se correlacionó positivamente con: <ul style="list-style-type: none"> <li>• HOMA-IR</li> <li>• Insulina en ayunas</li> <li>• PCR</li> </ul> Correlación negativa con la sensibilidad a la insulina
Bobbert <i>et al.</i> 2015 [115]	Personas sanas con desbalance en el control de la glucosa	245 sujetos con metabolismo de la glucosa normal.  32 sujetos con glucosa en ayunas alterada.  44 sujetos con tolerancia a la glucosa alterada.  18 sujetos con glucosa en ayunas y tolerancia a la glucosa alterados.  35 sujetos con DT2	Los modelos de regresión lineal mostraron que la chemerina puede ser un predictor de empeoramiento en la glucosa en ayunas y HbAc1.

---

SM: síndrome metabólico; NGT: tolerancia normal a la glucosa; IMC: índice de masa corporal; HOMA-IR: homeostasis model assessment of insulin resistance; DT2: diabetes tipo 2; IDF: International Diabetes Federation; IHD: isquemia miocárdica; FDR: parentesco de primer grado NCEP: National Cholesterol Education Program; RCP: proteína C reactiva; QUICKI index: quantitative insulin sensitivity check index. Tomado de Léniz *et al.* (2021) [116]



## Introducción

En lo que respecta a la inflamación, el papel de la chemerina no queda claro, ya que hay artículos que consideran esta adipokina como pro-inflamatoria y otros como anti-inflamatoria [117]. En cuanto a estudios que apuestan por un papel pro-inflamatorio de esta adipokina, cabe señalar los que muestran un aumento, tanto la chemerina bioactiva como las células capaces de expresar el receptor ChemR2, en casos de enfermedades que cursan con una inflamación crónica [118]. Sin embargo, otros estudios demuestran que esta adipokina puede inhibir la producción de citocinas anti-inflamatorias por parte de los macrófagos peritoneales en ratones, así como la captación de neutrófilos y monocitos [119]. En esta misma línea se ha descrito que ratones Chem 23 KO a los que se les administró chemerina, disminuyeron la producción de citocinas pro-inflamatorias (TNF, IL-1b, IL-6). En cuanto a los mecanismos de acción, no se han esclarecido por completo, y dependen del efecto en diferentes tejidos y de la isoforma de que se trate [120].

Finalmente, señalar que se pueden encontrar diversos estudios en los que se relaciona positivamente esta adipokina con la diabetes gestacional (DG) [121]. Presentar DG, puede conllevar diversas alteraciones para la madre, entre las que destaca una diabetes permanente posterior, y consecuencias gestacionales/perinatales, como un mayor riesgo de preeclampsia o desarrollo posterior de obesidad y resistencia a la insulina del bebé [122]. Entre los factores de riesgo para desarrollar DG se encuentran el sobrepeso, DG anteriores, historia familiar de DT2, ovario poliquístico, deficiencias de micronutrientes o edad maternal avanzada. Sin embargo, el mecanismo de acción exacto no está completamente descrito (Tabla 2).

## Introducción

**Tabla 2.** Estudios que relacionan la diabetes gestacional con la concentración de chemerina.

<b>Estudios que asocian niveles altos de chemerina con diabetes gestacional</b>			
<b>Autor</b>	<b>Cohorte</b>	<b>Trimestre de embarazo</b>	<b>Resultado</b>
Li <i>et al.</i> 2015 [123]	48 mujeres chinas con DG y 42 mujeres con NGT	De 24 a 48h tras el parto	Mayor concentración de chemerina en la DG que en las mujeres con NGT  Menor expresión de chemerina en el tejido adiposo en DG que en las mujeres con NGT  Correlación positiva de chemerina con HOMA-IR
Ademoglu <i>et al.</i> 2015 [124]	7 mujeres con DG y 32 con NGT (23 a 35 años)	Tercer trimestre	Mayor concentración de chemerina en DG  Asociación positiva con: <ul style="list-style-type: none"><li>• IMC</li><li>• HbA1c</li><li>• TG</li><li>• Insulina</li><li>• HOMA-IR</li></ul> Asociación negativa con <ul style="list-style-type: none"><li>• HDL</li></ul>
Fatima <i>et al.</i> 2017 [125]	208 mujeres pakistanís con DG y 300 con NGT (21-32 años)	Segundo trimestre	Mayor concentración de chemerina en DG que en mujeres con NGT  Asociación positiva con: <ul style="list-style-type: none"><li>• glucosa en ayunas</li><li>• peso fetal</li><li>• HOMA-IR</li></ul>
Gashlan <i>et al.</i> , 2017 [126]	26 mujeres griegas con DG y 18 con NGT (30-35 años)	Tercer trimestre	Mayor concentración de chemerina en DG que en mujeres con NGT  Asociación positiva con: <ul style="list-style-type: none"><li>• glucosa en ayunas</li></ul>

## Introducción

Tsiotra <i>et al.</i> , 2018 [127]	15 mujeres griegas con DG y obesidad y 23 non NGT. (edad 26-37 años)	Parto	<ul style="list-style-type: none"> <li>• HbA1c</li> </ul> <p>Mayor concentración de chemerina en DG que en mujeres con NGT</p> <p>Mayor expresión de chemerina en el tejido adiposo visceral en DG respecto a NGT</p> <p>Asociación positiva con:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• glucosa en ayunas</li> <li>• HbA1c</li> <li>• IMC gestacional</li> <li>• HOMA-IR</li> </ul>
Liang <i>et al.</i> , 2018 [128]	46 mujeres chinas con DG y 43 mujeres con NGT (edad 26-36 años)	Tercer trimestre y en el parto	<p>Mayor concentración de chemerina en DG que en mujeres con NGT</p> <p>Mayor expresión de chemerina en tejido adiposo subcutáneo y en placenta en DG respecto a NGT</p> <p>Asociación positiva con:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• insulina</li> <li>• HOMA-IR</li> </ul>

---

### Estudios que asocian niveles bajos de chemerina con diabetes gestacional

---

Autor	Cohorte	Trimestre de embarazo	Resultado
Yang <i>et al.</i> 2017 [129]	19 mujeres chinas con DG y 20 con NGT (24-28 años)	Primer y tercer trimestre	<p>Menor nivel de chemerina en DG que en mujeres con NGT en el primer trimestre</p> <p>Mayor nivel de chemerina en DG que en mujeres con NGT en el tercer trimestre</p>

---

### Sin diferencias en niveles de chemerina

---

Autor	Cohorte	Trimestre de embarazo	Resultado
Görkem <i>et al.</i> 2016 [130]	76 mujeres turcas con DG y 82 con NGT (18-35 años)	Segundo trimestre	Sin cambios en los niveles de chemerina
Pan y Ma, 2016 [131]	85 mujeres con DG y 85 con NGT		<p>Mayor concentración de chemerina en DG que en mujeres con NGT</p> <p>No se vieron correlaciones significativas con parámetros relacionados con el control glucémico</p>

## Introducción

Barker <i>et al.</i> 2012 [132]	69 mujeres con DG 62 con NTG	Tercer trimestre	Sin cambios en chemerina  Correlación negativa entre la sangre del cordón y la sensibilidad a la insulina de la madre
Hare <i>et al.</i> 2014 [133]	6 mujeres danesas con NGT y 9 con DG (27-33 años)	Tercer trimestre y 3-4 meses tras el parto	Sin cambios en la concentración de chemerina  Correlación positiva entre chemerina y HOMA-IR

---

DG: diabetes gestacional; NGT: tolerancia normal a la glucosa; HOMA-IR: homeostasis model assessment of insulin resistance. Modificado de Léniz *et al.* (2021) [116]

En población pediátrica se han llevado a cabo muy pocos estudios. Sledzińska *et al.* (2017) observaron que la chemerina estaba asociada a las concentraciones de insulina y a los valores de HOMA en niños de entre 5 y 17 años [134]. En cuanto a recién nacidos, se observó que estaba asociada de manera independiente con el peso al nacer, y que se expresaba en mayor medida en niños grandes para la edad gestacional que en niños con tamaño apropiado para la edad gestacional [135].

### **2.6. NOV/CCN3**

La NOV (nephroblastoma overexpressed) pertenece a la familia CCN, junto con otras 5 proteínas: ELM-1/WISP-1/CCN4 (WNT1-inducible-signaling pathway protein 1), rCop-1/WISP-2/CTGF-L/CCN5 (WNT1-inducible-signaling pathway protein 2), y WISP-3/CCN6 (WNT1-inducible-signaling pathway protein 3), Cyr61/CCN1 (cystein rich protein 61) y Ctgf/CCN2 (connective tissue growth factor) [136,137]. Se expresa en diferentes tejidos y órganos, como tejido adiposo, corteza suprarrenal, riñón, músculo, sistema nervioso central, macrófagos, plasma y líquido cefalorraquídeo [138].

Expresiones alteradas de NOV/CCN3 se han relacionado con diferentes situaciones patológicas, como enfermedades vasculares, fibrosis, organogénesis, inflamación o cáncer en estudios con animales o *in vitro* [139]. Son muy escasas las investigaciones que relacionan esta adipokina con el síndrome metabólico en humanos. En un estudio llevado a cabo por Pakradouni *et al.* (2013), se observó que personas con hiperlipidemia, pero no tratadas con fármacos hipolipemiantes, presentaban correlación positiva entre NOV/CCN3 y la cantidad de tejido adiposo, así como el IMC, proponiendo que esta proteína podría desempeñar un papel fundamental en el desarrollo de la obesidad [140].

### **Introducción**

También se observó que las mujeres presentaban concentraciones mayores de la adipokina que los hombres, probablemente por la diferente distribución de la grasa, pero no se encontraron diferencias en las concentraciones de glucosa, aunque sí en la HbA1c.

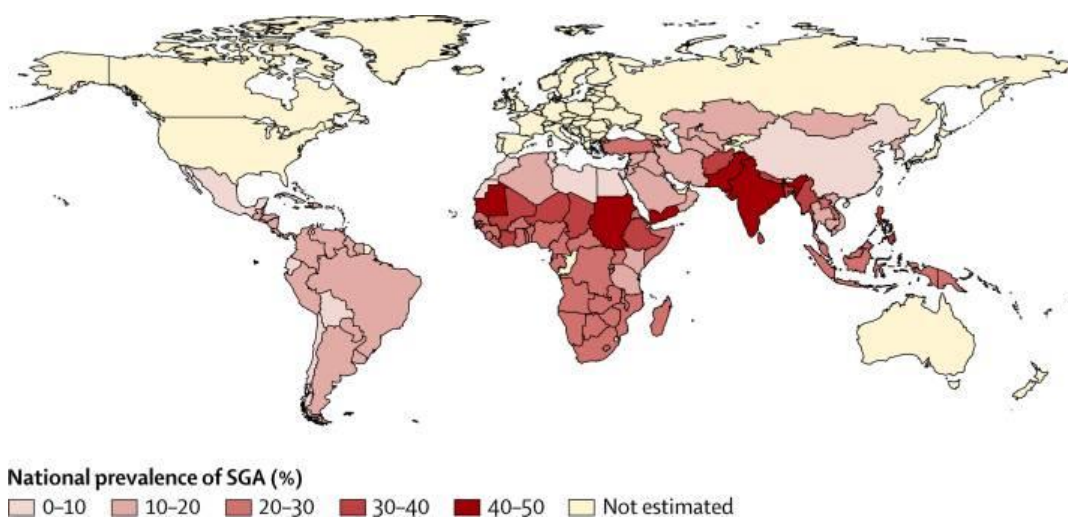
### **3. Niños pequeños para la edad gestacional**

El término “pequeño para la edad gestacional” (PEG) se utiliza para describir a un recién nacido cuyo peso y/o longitud se encuentran dos o más desviaciones estándar (DE) (percentil 3) por debajo de la media establecida para su sexo y su edad gestacional [141]. Es conveniente basarse en tablas locales, que se adecúen a la población a la que pertenece el niño. Se pueden diferenciar dos tipos de niños PEG: asimétricos, que son aquellos que presentan o bien un peso o bien una talla bajos al nacer, y los simétricos/armónicos, en los que tanto la longitud como el peso se ven afectados. Para llevar a cabo esta determinación, una fórmula muy utilizada es el índice de masa triponderal  $[(\text{peso}/\text{longitud}^3) \times 100]$ , de modo que si se obtiene un valor  $< P10$  para su edad gestacional, podría considerarse que se trata de niño PEG asimétrico.

Relacionado con la condición de niño PEG, se encuentra el término "crecimiento intrauterino retardado" (CIR), un concepto dinámico de velocidad de desarrollo fetal, que es diagnosticado durante el embarazo, y que es independiente del peso o talla al nacimiento. La condición de niño PEG tiene una especial relevancia, al tratarse de una situación que aumenta el riesgo de morbi-mortalidad en el bebé, así como el riesgo de desarrollar distintas patologías en la edad adulta.

Epidemiológicamente, la mayor parte de los estudios se centran en el peso del bebé al nacer, obviando el hecho de que un PEG asimétrico de talla baja también puede presentar consecuencias metabólicas negativas a futuro. Se estima que, en nuestro entorno, entre el 5 y el 10% de los niños nacen pequeños para edad gestacional, bien sea por presentar bajo peso, baja estatura o ambos [142]. A nivel mundial, alrededor de 32,4 millones de nacimientos son de niños PEG, situándose el 27% de los mismos en países con una renta per cápita media-baja o baja (Figura 4). Este porcentaje varía dependiendo de la región, siendo la frecuencia de un 26% en Asia del sur y del 7% en los países industrializados [141,143]. Aunque alrededor del 90% de los niños PEG presentan un "catch-up" (recuperación de peso/altura hasta alcanzar  $< 2$  DE por debajo de la media de referencia) espontáneo durante los primeros meses, el 10% restante no llevan a cabo un crecimiento recuperador y son tratados con hormona del crecimiento (GH). Aun así, no todos los niños nacidos PEG se recuperan de igual manera, y en función de la velocidad a la que alcanzan el citado "catch-up" pueden presentar trastornos neurocognitivos, metabólicos o cardiovasculares, entre otros [141,144].

## Introducción



**Figura 4.** Prevalencia estimada de nacimientos de niños PEG en países de renta media o baja. SGA: pequeño para a edad gestacional. Extraído de Lee *et al.* (2013) [145]

Los factores que pueden provocar alteraciones en el crecimiento pueden clasificarse en genéticos, nutricionales, placentarios, maternos y hormonales. Los primeros, explican hasta un tercio de los nacimientos con un peso inadecuado. Entre éstos, las cromosopatías pueden conllevar tanto un retraso en el crecimiento del bebé como una interrupción del embarazo en cortas edades gestacionales. Se ha descrito que una serie de genes denominados "short stature homeobox" (SHOX) también son una causa importante de restricción del crecimiento intrauterino. Una modificación de este gen se ha identificado en diferentes casos de niños nacidos PEG asimétricos, de baja estatura. Este gen actúa como factor de transcripción modificando la función de genes involucrados en la condrogénesis y crecimiento óseo, sobre todo de huesos largos de piernas y brazos. Además, se relaciona con patologías como la discondrosteosis de Léri-Weill, que afecta a la estatura del recién nacido. En el caso de los niños PEG, se ha encontrado en alrededor del 6% de niños nacidos PEG asimétricos [146,147].

En cuanto a los factores nutricionales, una nutrición materna inadecuada antes de la concepción y durante los primeros meses de gestación puede hacer que la placenta no se desarrolle correctamente, y que el feto no obtenga los substratos necesarios durante el periodo con mayor multiplicación celular. Durante las fases finales del embarazo, el desarrollo del feto toma prioridad en la utilización de los nutrientes de la madre, sobre todo procedente de las reservas de grasa, lo que hace que un crecimiento inadecuado produzca desnutriciones graves. El glucógeno no empieza a almacenarse en el hígado del

## Introducción

feto hasta el tercer trimestre. Micronutrientes como hierro, ácido, fólico, calcio, fósforo o zinc han demostrado ser necesarios para evitar deficiencias en el crecimiento fetal [148]. Por tanto, las recomendaciones nutricionales se deben aplicar tanto durante el embarazo como antes de la concepción [149].

Los hábitos tóxicos de la madre también han evidenciado ser un factor de riesgo para el crecimiento fetal. Así, el consumo de tóxicos como heroína, cocaína o alcohol alteran gravemente la tasa de crecimiento del feto, causando un CIR. De hecho, se ha demostrado que incluso un consumo bajo de alcohol (1 ó 2 copas al día) se asocia al CIR, aunque esta no sea una cantidad suficiente para causar un síndrome alcohólico fetal [150]. Los efectos de estos tóxicos se producen tanto de forma directa, llegando el tóxico al feto y atravesando la barrera placentaria, como de forma indirecta, produciendo patologías como infartos placentarios o inserciones patológicas de la placenta.

La placenta es el órgano encargado de regular hormonalmente el crecimiento del feto, así como el transporte de oxígeno y nutrientes. Diversos factores de crecimiento son sintetizados en este órgano, que también cuenta con diferentes receptores, por lo que se considera un órgano autocrino-paracrino. Consecuentemente, un funcionamiento inadecuado de la placenta condiciona que un bebé nazca PEG. Además, el desarrollo adecuado del bebé también puede verse condicionado en embarazos múltiples por la falta de espacio intrauterino.

El sistema endocrino toma un papel fundamental en el crecimiento intrauterino [151]. El estradiol, que es un esteroide gonadal, ha mostrado indicios de causar restricción del desarrollo fetal, sobre todo en el primer trimestre de embarazo [152]. Los factores de crecimiento IGF-I, IGF-II e IGFBP-3 se encuentran disminuidos en niños PEG, especialmente en los neonatos que presentan bajo peso [153]. La GH y la somatotropina coriónica también ejercen cierta influencia, ya que en el útero empiezan a desarrollar la actividad que presentará tras el nacimiento. Igualmente, otros factores hormonales como hGH-V (hormona de crecimiento placentario), FGF (factor de crecimiento fibroblástico) o los TGF- $\beta$  (factores de crecimiento transformadores beta) han demostrado influir en el desarrollo fetal y, por tanto, en el riesgo de alumbrar un niño PEG. No obstante, hay que destacar que, aunque los factores citados tienen pesos diferentes en el riesgo de nacer PEG, la etiología es multifactorial.



## Introducción

Respecto a las consecuencias de nacer PEG, se ha observado que puede conllevar una menor capacidad cognitiva, ya que la velocidad de crecimiento durante los primeros meses de vida de estos niños se correlaciona de forma independiente con la capacidad cognitiva a los 7 años [154]. Además, se ha evidenciado que los niños PEG que hacen un "catch-up" de forma espontánea presentan valores de desarrollo neurocognitivo mayores que los no recuperadores, aunque con el tratamiento con GH estas diferencias tienden a desaparecer. Entre las alteraciones más destacadas en esta población destacan la coordinación de la actividad motora gruesa (hasta los 2 años) y fina (de 3 a 6 años) y un bajo coeficiente intelectual a partir de los 7 años, en comparación con los niños nacidos AEG.

Otra consecuencia importante es el elevado riesgo que tienen los niños PEG de padecer obesidad en la edad adulta [155,156]. La restricción del crecimiento intrauterino puede conllevar una adaptación prenatal del sistema cardiocirculatorio, así como alteraciones en su desarrollo [157]. Igualmente, un peso bajo al nacer puede causar hipertensión arterial en la etapa adulta, aunque no queda claro que esa patología se manifieste también en la infancia [158,159]. Además, al sufrir obesidad en la adultez, se ha descrito que estas personas presentan un mayor grosor de la arteria carotídea, que es un indicador conocido de aterosclerosis subclínica, en comparación con las persona que al nacer presentaron un tamaño normal para su edad gestacional [160,161]. Pese a no haberse descrito diferencias en los perfiles lipídicos entre niños PEG y niños normales, los primeros presentan alteraciones en la lipólisis de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) mediada por lipoproteína lipasa (LPL) hasta alcanzar el primer mes [162]. Del mismo modo, se ha observado que el aumento del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) puede ser causa de una acumulación de tejido graso, en especial durante los primeros meses de vida, indicando que el aumento postnatal de IGF-1 podría tener un papel relevante en el mecanismo por el que estos niños acumulan tejido graso subcutáneo de forma rápida [163]. También se ha descrito que los niños PEG, a pesar de su menor IMC, presentan mayor resistencia a la insulina, tanto por la programación fetal como por la obesidad en sí. Esta resistencia a la insulina, aumenta desde el primer año de vida, y se exagera en los casos en los que el "catch-up" se alcanza de forma rápida [164]. También se ha descrito que a edades comprendidas entre los 10 y 12 años, los niños con sobrepeso que han nacieron PEG presentan mayor riesgo de padecer síndrome metabólico que los nacidos con un tamaño normal, pudiéndose observar una relación directa entre el estatus

## **Introducción**

de PEG y factores de riesgo como la HTA, hipertrigliceridemia, concentraciones de insulina o glucosa posprandial [165].

#### **4. Síndrome metabólico**

El síndrome metabólico (SM) fue descrito por primera vez en 1988 y, aunque su definición a día de hoy no está completamente consensuada, según la National Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Treatment Panel III (ATP-III), se puede describir como un conjunto de factores que conllevan un aumento del riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular o diabetes mellitus tipo 2 y fallecer por ello: TG elevados (>150 mg/dl), niveles de HDL bajos (<40mg/dL), obesidad abdominal (>94cm en hombres y >80cm en mujeres), glucosa alta en sangre (>100 mg/dL) e hipertensión arterial (>130/85 mmHg) [166-169]. Su prevalencia es muy elevada, pudiendo alcanzar en Europa el 41% en los hombres y el 38% en las mujeres, en personas de entre 47 y 71 años. Además, estos porcentajes aumentan progresivamente con la edad [170].

Los factores, tanto intrínsecos como extrínsecos, que han demostrado mayor influencia en esta patología son los siguientes [171]:

- Historia familiar de SM
- Edad
- Postmenopausia
- Etnia latinoamericana
- Obesidad
- Sedentarismo
- Tiempo excesivo viendo la televisión [172]
- Consumo de bebidas azucaradas [173]
- Consumo de alcohol [174]
- Patrón dietético occidental [175]
- Fumar
- Estado de forma bajo [176]
- Estatus socioeconómico bajo

## Introducción

- Ciertos tratamientos farmacológicos (antiretrovirales, clozapina) [177]

Centrándonos en la obesidad, cabe señalar que, según la OMS, la prevalencia de esta patología se ha duplicado en las últimas 3 décadas y alrededor de un tercio de los adultos mayores de 20 años presentan sobrepeso u obesidad, y es interesante mencionar que el SM ha aumentado de manera paralela [178]. Además, se estima que la mitad de los casos de diabetes y un cuarto de los casos de enfermedad cardiovascular se atribuyen al sobrepeso o la obesidad [179]. Esto pone claramente de manifiesto la estrecha relación que existe entre la obesidad y el SM.

No obstante, es importante precisar que no todos los tejidos adiposos blancos guardan la misma relación con la etiología del SM. La grasa visceral presenta patrones de expresión génica diferentes que la grasa subcutánea, y es la que se asocia con resistencia a la insulina, partículas de LDL y HDL de menor tamaño y una mayor cantidad de LDL y VLDL.

### **4.1. Etiología y fisiopatología del síndrome metabólico**

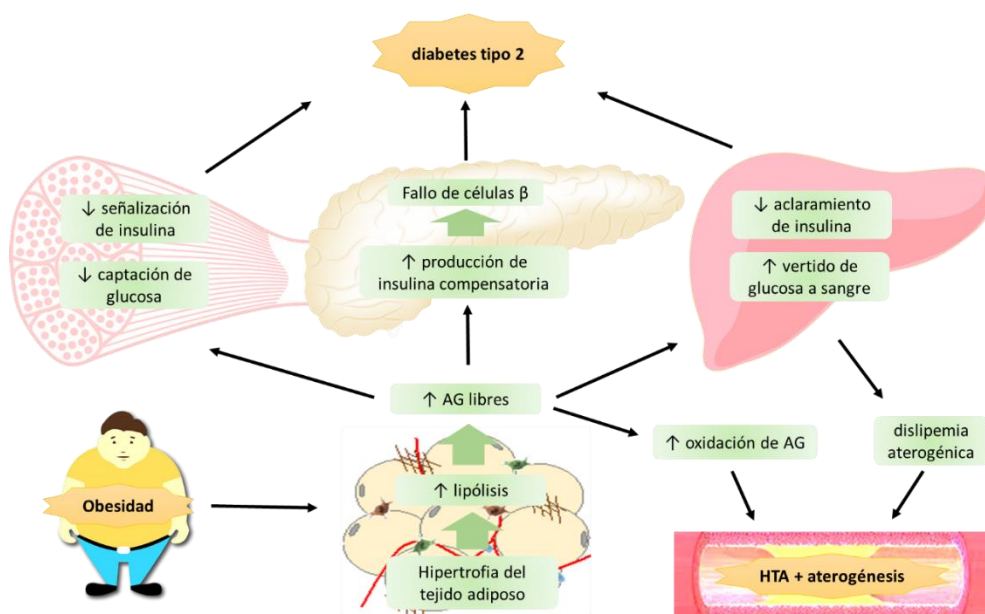
La hipertrofia del tejido adiposo provoca una mayor liberación de ácidos grasos libres, como consecuencia de una lipólisis basal más elevada, y por ende un mayor flujo de estos ácidos grasos a los diferentes tejidos del organismo (Figura 5). En el músculo esquelético, este flujo excesivo de ácidos grasos produce alteraciones en la cascada de señalización de la insulina, haciendo que su funcionalidad se vea disminuida. Esto conduce a una menor captación de glucosa por parte de este tejido, lo que contribuye a la hiperglucemia. En cuanto al hígado, la llegada de una elevada cantidad de ácidos grasos disminuye el aclaramiento de la insulina y estimula la síntesis y el vertido de glucosa a sangre, generando hiperglucemia e hiperinsulinemia, dos signos característicos de la resistencia a la insulina [180]. El efecto sobre el páncreas presenta dos etapas. En la primera la llegada de un elevado flujo de ácidos grasos incrementa la producción de insulina con el fin de compensar la hiperglucemia sanguínea y tratar de mantener la euglucemia, contribuyendo así a la hiperinsulinemia, y en la segunda reduce su producción, facilitando la evolución hacia la diabetes mellitus tipo 2 [181,182].

Por otro lado, el acceso tan elevado de ácidos grasos al hígado, que no lleva parejo la reducción de la lipogénesis *de novo*, aumenta la producción de VLDL, lo que a su vez

## Introducción

incrementa la actividad de la lipasa hepática, generando una mayor cantidad de pequeñas partículas de LDL [183]. Este tipo de partículas de LDL son más aterogénicas y propensas a la oxidación que las partículas de mayor tamaño, lo que aumenta el riesgo de padecer un evento cardiovascular.

En cuanto hipertensión arterial en el SM, su desarrollo tiene una etiología multifactorial. La resistencia a la insulina activa el sistema nervioso simpático, aumentando la actividad de los receptores de angiotensina II y reduciendo la síntesis de óxido nítrico. Además, en las personas obesas, se da un aumento de la reabsorción tubular a nivel renal, con la consecuente retención de sodio. Esto contribuye al desarrollo de la hipertensión arterial [184]. Igualmente, cuando se padece obesidad, aumenta la actividad del eje renina-angiotensina-aldosterona [185]. Además, el tejido graso hipertrófico segrega adipocinas que afectan de manera negativa a la presión arterial. Por ejemplo, la leptina activa el eje hipotálamo-pituitario-adrenal activando también el sistema simpático.



**Figura 5.** Fisiopatología del síndrome metabólico. Modificado de Susan L. Samson *et al* (2014) [179].

El desequilibrio entre capacidad antioxidante y agentes oxidantes (estrés oxidativo) que se produce fomenta una condición inflamatoria en la que se segregan diferentes citocinas pro-inflamatorias como  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , y IL-18, que desencadenan una remodelación miocárdica, mediada por hipertrofia, que acarrea eventos cardiovasculares [186]. De hecho, las alteraciones en la producción de especies reactivas por la

## Introducción

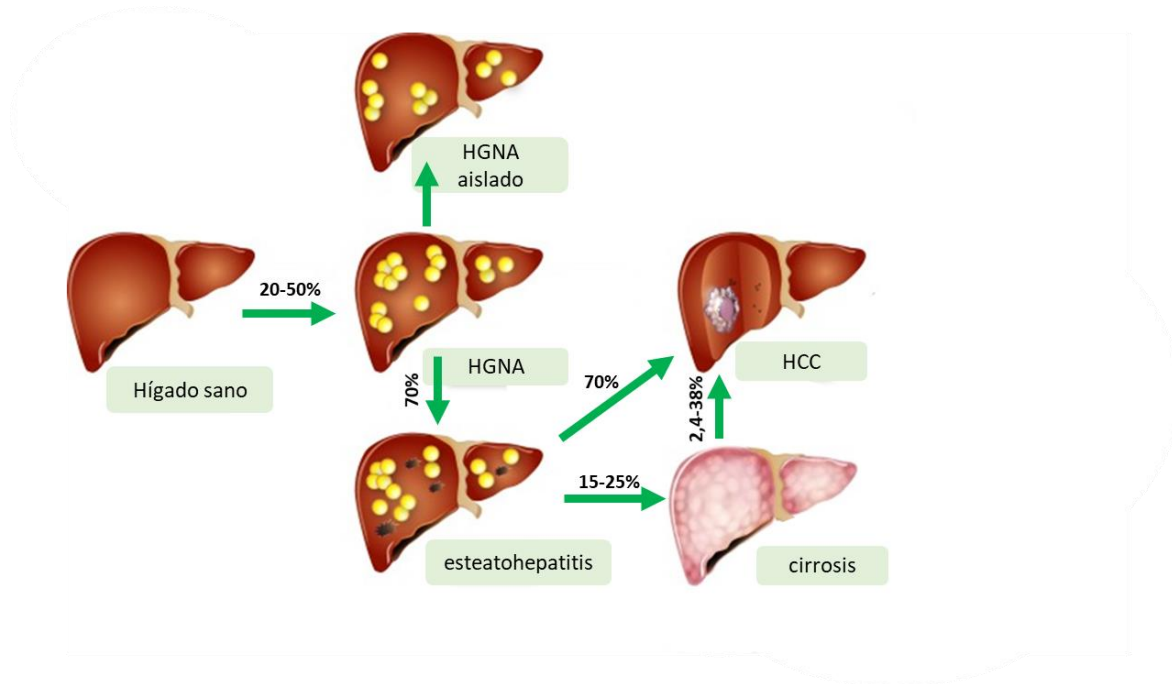
peroxidación lipídica, las modificaciones en proteínas oxidativas, la oxidación de LDL y fosfolípidos y los cambios en la expresión de genes sensibles a ROS, se consideran biomarcadores de enfermedades cardiovasculares.

### **4.2. Hígado graso**

Hoy en día se considera que el hígado graso es una manifestación del SM. En las sociedades occidentales, el hígado graso no alcohólico (HGNA) se ha convertido en un claro problema de salud pública al tratarse de la patología hepática más frecuente. Su prevalencia es 20-30% en la población general. Estas cifras se ven aumentadas en la población obesa (50-70%) y en la población diabética (60-80%), pudiendo alcanzar el 100% en personas que padecen ambas patologías (Figura 6) [187]. La prevalencia aumenta de forma paralela al desarrollo del SM, con una proporcionalidad directa con la gravedad de los síntomas de este síndrome. También, hasta la mitad de los pacientes con HTA presentan esta patología, que se ha asociado con una menor elasticidad de los vasos sanguíneos, patologías renales e incluso fallo cardíaco. Por otro lado, la hipertensión arterial también se asocia un peor pronóstico de HGNA y la aparición de fibrosis [188].

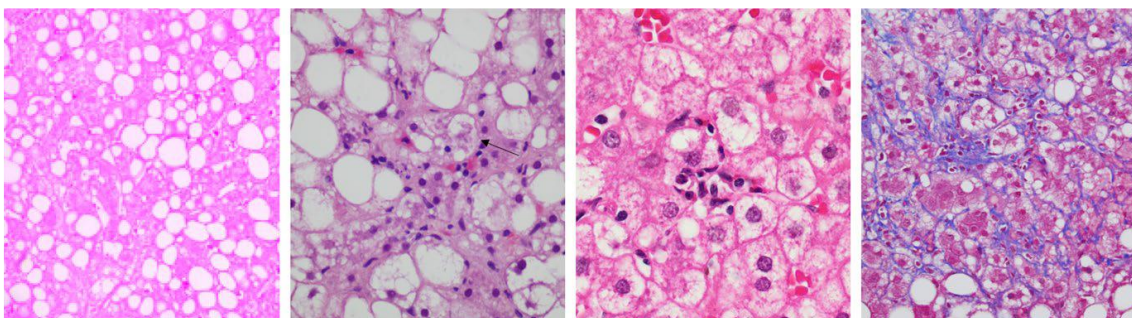
Aunque el hígado graso es una alteración que no suele producir sintomatología, tanto su prevención como su tratamiento, son necesarios ya que puede evolucionar hacia situaciones de mayor gravedad. Así, según se ha visto en un meta-análisis, en Europa hasta el 70% de las personas con HGNA pueden desarrollar esteatohepatitis (Figura 6) [189]. Esta se describe como una forma más grave de HGNA en la que se produce inflamación y un mayor daño de los hepatocitos. Esta forma de hígado graso puede tener diferentes consecuencias a nivel hepático como el desarrollo de fibrosis. Se han descrito además efectos adversos asociados al desarrollo de esteatohepatitis, que no se relacionan con el hígado, como las enfermedades cardiovasculares. Entre el 20 y el 50% de los pacientes con HGNA desarrollan cirrosis en un periodo de 10 años [190]. Además, se ha descrito que la incidencia de hepatocarcinoma en personas con cirrosis varía entre un 2,4 y un 38% [191]. Finalmente, aproximadamente un 35% de los casos de hepatocarcinoma están relacionados con la presencia de HGNA (Figura 6) [192].

## Introducción



**Figura 6.** Evolución de la esteatosis hepática a situaciones de mayor gravedad. Modificado de Diren Beyoglu et al (2013) [193].

En cuanto a su diagnóstico, la diferenciación entre HGNA y esteatohepatitis es imprecisa y hay una clara carencia de biomarcadores, tanto de la enfermedad como de la evolución de la misma. Las técnicas no invasivas para analizar este fenómeno en humanos aportan datos limitados, y los estudios llevados a cabo en animales no reflejan todas las características de las personas. Además, los estudios con biopsias de tejido hepático humano y posterior histología (Figura 7) requieren poblaciones de estudio muy extensas, con lo que estudios amplios de este tipo son poco factibles.



**Figura 7.** Evolución histológica del HGNA hasta la aparición de fibrosis hepática. Modificado de Scott L. Friedman *et al.* (2018) [188]

## Introducción

No se conocen con exactitud los mecanismos que desencadenan esta enfermedad, pero es sabido que la resistencia a la insulina desempeña un papel fundamental en su origen y desarrollo. En los adipocitos, la resistencia a la insulina aumenta la actividad de la lipasa sensible a hormonas (HSL), haciendo que aumente la lipólisis de los triglicéridos y por tanto el flujo de ácidos grasos libres hacia desde este tejido hasta el hígado. Estos ácidos grasos pueden oxidarse en las mitocondrias para conseguir ATP, incorporarse a partículas VLDL o almacenarse en el hígado en modo de triglicéridos. Además, debido a la hiperinsulinemia, aumenta la expresión de SREBP hepática y de manera paralela, debido a la hiperglucemia, aumenta ChREBP. Esto hace que el exceso de glucosa hepática se convierta en ácidos grasos que, junto a los ácidos grasos libres circulantes, acabarán esterificándose y acumulándose en forma de triglicéridos (estatosis hepática) [194].

Se sabe que en la evolución de esteatosis simple a esteatohepatitis están implicados el aumento del estrés oxidativo y en la actividad de citocinas inflamatorias [195]. Los factores pro-oxidantes predominantes en la estatosis hepática son las ROS, que se generan cuando los ácidos grasos hepáticos se oxidan. Las ROS, alteran la estabilidad proteica y dañan la estabilidad de las membranas celulares a través de una peroxidación lipídica, que además de deteriorar la función de los orgánulos, producen daño genético y aumentan la secreción de citocinas inflamatorias como TNF- $\alpha$  [196]. Al mismo tiempo, la capacidad oxidativa mitocondrial se ve reducida, acumulándose ácidos grasos en el citosol celular que hacen que se activen vías alternativas como la  $\omega$ -oxidación, lo que conlleva más formación de ROS, creándose así un círculo vicioso. Así, se fomenta un entorno inflamatorio que hace que la esteatosis avance a un estado de esteatohepatitis.

Respecto a su tratamiento, la medida más eficaz y de primera elección es una pérdida de peso mantenida mediante dieta y ejercicio físico. En la dieta, no se ha evidenciado claramente que un cambio en las proporciones de los macronutrientes mejore el HGNA, así que lo más recomendable es la restricción calórica en este tipo de pacientes. También se debe recomendar que la ingesta de fructosa se mantenga baja ya que este azúcar simple actúa negativamente sobre el progreso de la enfermedad, por una parte activando los factores de transcripción que estimulan la lipogénesis *de novo* (SREBP1c y ChREBP), y por otra disminuyendo la  $\beta$ -oxidación mitocondrial [197]. Además, es importante abstenerse de ingerir alcohol, ya que este incrementa notablemente la síntesis hepática de



## **Introducción**

triglicéridos, favoreciendo su acumulación. No obstante, en los casos en los que esta medida es insuficiente, o cuando la adherencia a este tipo de estrategia es baja., diversos compuestos bioactivos presentes en los alimentos, entre los que destacan los compuestos fenólicos, podrían ser herramientas eficaces en el manejo de esta patología.

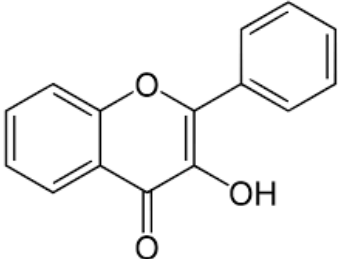
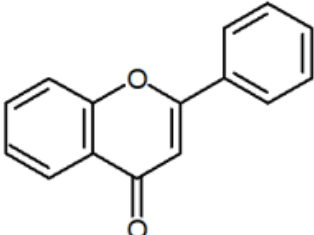
## Introducción

### 5. Compuestos fenólicos

El término compuesto fenólico, incluye a miles de compuestos de distintas procedencias. Los alimentos de origen vegetal contienen de forma natural compuestos fenólicos, que abarcan un amplio rango de estructuras moleculares complejas. Son moléculas que contienen un grupo fenol o más, que es un anillo aromático, unido a varios grupos hidroxilo. Pueden ser desde moléculas simples hasta polímeros de moléculas de hasta 30000Da [198]. Se pueden dividir según su estructura química básica en diferentes familias como se puede observar en la Tabla 3.

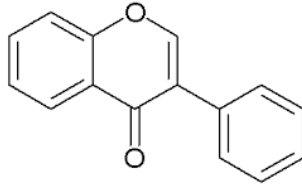
Hay compuestos fenólicos que son indispensables para que las plantas que los contienen puedan llevar a cabo sus funciones fisiológicas, mientras que otros las defienden de diferentes agresiones como la luz ultravioleta o los patógenos y, al mismo tiempo, disminuyen su estrés (hídrico, luminoso...) [199].

**Tabla 3.** Clasificación de los compuestos fenólicos.

Tipo	Estructura química	Subtipo
<b>Flavonoides</b>		
Flavonoles		<ul style="list-style-type: none"><li>• Kaempferol</li><li>• Quercetina</li></ul>
Flavonas		<ul style="list-style-type: none"><li>• Apigenina</li><li>• Luteolina</li></ul>

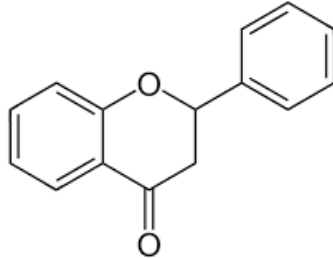
## Introducción

Isoflavonas



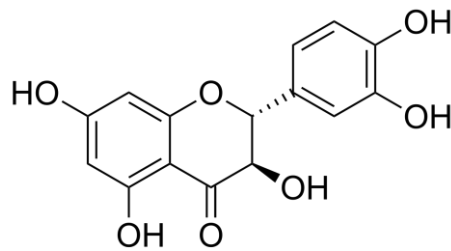
- Daidzeina
- Genisteina

Flavanonas



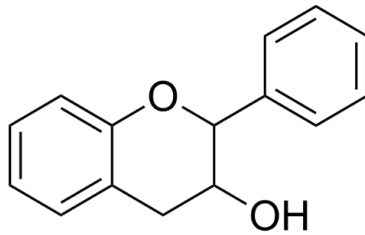
- Naringenina
- Hesperidina

Antocianidinas



- Cianidina
- Delfinidina

Flavan-3-oles

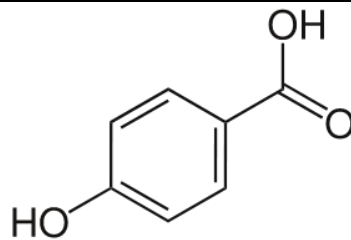


- Catequina
- Epicatequina
- Epigallocatequina
- Galocatequina

---

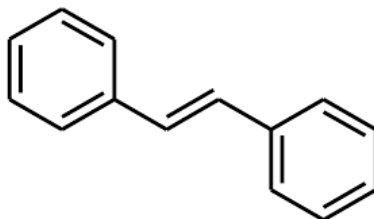
## No flavonoides

Acidos  
hidroxybenzoicos



- Acido gálico
- Acido vanílico

Estilbenos



- Resveratrol
- Piceatannol
- Pterostilbeno

## Introducción

Últimamente, el estudio de estos compuestos ha tomado gran relevancia por las propiedades preventivas de diferentes patologías como la diabetes tipo 2, las osteoporosis, las enfermedades cardiovasculares, las enfermedades degenerativas, o el cáncer, entre otras.

### **5.1. Biodisponibilidad, transporte y excreción**

La biodisponibilidad se puede definir como la cantidad de un compuesto que llega a la circulación sistémica, una vez se ha digerido, absorbido y metabolizado a través de las rutas metabólicas habituales de asimilación [199]. La velocidad y límite de absorción de los compuestos fenólicos están determinados por su estructura química. Es importante tener en cuenta que los compuestos fenólicos suelen sufrir un intenso metabolismo a nivel intestinal y hepático. Tanto los compuestos fenólicos como los metabolitos, se transportan de forma libre en sangre o unidos a proteínas plasmáticas como la albúmina [200]. Los compuestos fenólicos no absorbidos, llegan al colon donde pueden ser metabolizados por la microbiota intestinal. A su vez, los compuestos fenólicos pueden modificar la composición de la microbiota. De hecho, algunos de los efectos producidos por los compuestos fenólicos se dan a través de la modulación de la microbiota intestinal. La evidencia actual de estudios *in vitro*, preclínicos o clínicos sugiere que parte de los efectos beneficiosos sobre el cáncer colorectal y las enfermedades cardiovasculares se relacionan con cambios en subgrupos bacterianos como *Bacteroides*, *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*. [201]. En este sentido, cabe destacar que la variabilidad interindividual en concentración y distribución de bacterias intestinales puede influir en la respuesta a los efectos de los compuestos fenólicos [202].

La excreción de los compuestos fenólicos absorbidos, o sus metabolitos, se da por vía biliar o vía urinaria. La cantidad de compuestos fenólicos encontrada en la orina depende del tipo de compuesto que circula por el torrente sanguíneo, y es directamente proporcional a su concentración en plasma. A modo de ejemplo, se excretan por orina entre un 2 y un 10,3% de las catequinas absorbidas tras la ingesta de vino. En el caso concreto del resveratrol, su eliminación se produce básicamente durante las primeras 4 horas tras su ingesta y la cantidad eliminada depende de factores como el momento de la

## Introducción

ingesta, concentración o alimento con el que se ingiere. También depende del tipo de alimento con el que se ingiere. Así, se ha observado que su eliminación se retrasa hasta cuatro veces si se toma en formato de extracto de uvas que si se ingiere como vino tinto [203].

### **5.2. Compuestos fenólicos de la uva**

Diferentes estudios han analizado los componentes de las uvas (sobre todo fibra y compuestos fenólicos [204]. Estos se encuentran fundamentalmente en la piel (hollejos), las semillas y el raspón. Entre los flavonoides se encuentran las antocianidinas, las proantocianidinas y los flavanoles, y entre los no flavonoides los ácidos hidroxycinámicos. El perfil de compuestos fenólicos de la uva depende de numerosos factores, siendo uno de los más importantes la variedad de la uva. En la Tabla 4 se presenta una comparación de los compuestos fenólicos presentes en piel y semillas (componentes básicos de los extractos de uva) de diferentes variedades de uvas habituales en nuestro entorno.

**Tabla 4.** Compuestos fenólicos en distintas variedades de uva.

	<b>Tempranillo</b>	<b>Graciano</b>	<b>Cabernet Sauvignon</b>
<b>Piel</b>			
Polifenoles totales	18,0mg/g	16,2 mg/g	11,6 mg/g
Antocianidinas	596 mg/g	565 mg/g	553 mg/g
Catequinas	8,1 mg/g	0,50 mg/g	2,05 mg/g
Proantocianidinas	27,7 mg/g	25.4 mg/g	17,3 mg/g
<b>Semillas</b>			
Polifenoles totales	22,3 mg/g	28,5 mg/g	21,8 mg/g
Catequinas	54,6 mg/g	117 mg/g	76,3 mg/g
Proantocianidinas	40,7 mg/g	57,2 mg/g	53,9 mg/g


Modificado de Monagas *et al.* (2006) [205]

## Introducción

Tal y como se observa en esta la Tabla 4 y en la Tabla 5, el perfil de compuestos fenólicos de la uva también depende de la parte de la uva de que se trate, piel (hollejos), semillas o raspón). En cuanto a los extractos de uva, otros factores que también influyen son la técnica de extracción, así como de la metodología utilizada para su separación y cuantificación [206].

También existen factores extrínsecos a la planta, ligados a las circunstancias de crecimiento (factores agroambientales) que influyen en el perfil de compuestos fenólicos. En cuanto a las condiciones de cultivo, la presencia o ausencia de determinados nutrientes en el suelo puede afectar la composición fitoquímica de frutas y hortalizas, tanto cualitativa como cuantitativamente. El clima es otro aspecto importante, por lo que frutos de una misma variedad cultivada en distintas zonas presentan contenidos de compuestos fenólicos diferentes. Se ha demostrado que las altas temperaturas durante las etapas de crecimiento pueden disminuir la síntesis de antocianinas en la uva [207]. Por otro lado, el estado hídrico en la etapa de floración del ciclo de la uva tiene un efecto positivo en la síntesis de compuestos fenólicos, mientras que durante las etapas de madurez la síntesis de antocianinas y compuestos fenólicos aumenta con los déficits hídricos [208]. El estado de madurez de las diferentes frutas y verduras también tiene una influencia relevante en la composición fitoquímica. Aunque no se ha encontrado un patrón general para todos los productos, en términos generales, los frutos inmaduros presentan menor nivel de compuestos polifenólicos y contenido total de antocianinas [209].

**Tabla 5.** Principales compuestos fenólicos presentes en las diferentes partes de la uva.

Parte de la uva	Fitoquímicos predominantes
<p data-bbox="293 1525 405 1563"><b>Hollejo</b></p> 	<ul data-bbox="756 1518 1150 1747" style="list-style-type: none"><li>• Antocianidinas</li><li>• Derivados de la quercetina</li><li>• Derivados de kampferol</li><li>• Catequinas</li><li>• Resveratrol</li><li>• Ácido clorogénico</li></ul>

## Introducción

<b>Semillas</b> 	<ul style="list-style-type: none"><li>• Catequinas</li><li>• Ácido clorogénico</li><li>• Derivados de la quercetina</li><li>• Resveratrol</li></ul>
<b>Raspón</b> 	<ul style="list-style-type: none"><li>• Ácidos caftárico y coutárico</li><li>• Derivados de la quercetina</li><li>• Derivados de kampferol</li><li>• Derivados de miricetina</li><li>• Catequinas</li><li>• Astilbina y engeleina</li></ul>

Modificado de Averilla *et al.* (2020) [210]

### **5.3. Efectos de los compuestos fenólicos de la uva**

#### ***5.3.1. Presión arterial***

Varios estudios han observado que los compuestos de las uvas pueden reducir la presión arterial, tanto sistólica como diastólica. Por ejemplo, Sivaprakasapillai *et al.* (2009) analizaron los efectos de un extracto de uva a diferentes dosis en pacientes con síndrome metabólico y observaron que tanto la presión arterial sistólica como diastólica disminuían hasta 11 mmHg de una manera dosis-dependiente [211]. No obstante, en un meta-análisis publicado por Li *et al.* (2015), las mejoras fueron más modestas, 1,48 mmHg de reducción en la presión arterial sistólica y ausencia de significación estadística en la presión arterial diastólica [212]. En cuanto al tipo de hipertensión, hay pocos estudios en los que se haya analizado los polifenoles de uvas en sujetos con pre-hipertensión o con hipertensión arterial de grado uno, siendo los resultados más claros en personas con hipertensión más elevada.

#### ***5.3.2. Lípidos en sangre***

Como se ha mencionado previamente, un factor que influye en las cardiopatías y que genera el síndrome metabólico es la dislipemia. Los compuestos fenólicos pueden modificar la concentración de colesterol reduciendo su absorción y disminuyendo su transporte hacia el hígado, lo que se refleja en una reducción de la concentración plasmática del mismo. Además, también afectan a las apolipoproteínas A y B, que son factores de riesgo cardiovascular, modifican las VLDL y disminuyen las concentraciones

## Introducción

plasmáticas de triglicéridos, a través del aumento de la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL), lo que a su vez disminuye las concentraciones de LDL circulantes [213].

Además, se ha observado que los compuestos fenólicos procedentes de la uva inhiben la oxidación de LDL y, por tanto, el desarrollo de la aterosclerosis [214,215]. Efectivamente, los compuestos fenólicos de la uva han demostrado tener efecto en el estrés oxidativo, que puede producir daño a distintos niveles, habiéndose relacionado con patologías como asma, enfermedades cardiovasculares, diabetes o enfermedad obstructiva crónica (EPOC). Algunos ejemplos de la influencia de los compuestos fenólicos de la uva en el control del estrés oxidativo son los estudios de Castilla *et al.* (2008) o Albers *et al.* (2004), que observaron una disminución de superóxido ( $O_2^-$ ) tras una suplementación con zumo de uva, o la reducción el daño génico como marcador de estrés oxidativo [215,216].

### **5.3.3. Diabetes y metabolismo de la glucosa**

Recientemente, se han descrito diferentes estudios que han analizado los efectos de los compuestos fenólicos de las uvas, tanto en la prevención de la diabetes como en su tratamiento. La mayor parte de los estudios se han llevado a cabo *in vitro* o en modelos animales; los estudios en humanos se centran en su mayoría en la diabetes tipo 2. Por ejemplo, un consumo moderado de vino puede conllevar una reducción de hasta el 30% en el riesgo de padecer diabetes tipo 2 [204]. Uno de los mecanismos más aceptados en la bibliografía científica para justificar este efecto es la disminución de la IRS1 fosforilada en el aminoácido serina y la prevención de la activación de la vía glucógeno sintasa cinasa 3/ glucógeno sintasa en el hígado. Otra vía de actuación podría ser el aumento de expresión de FOXO1 y PPAR $\gamma$  musculares. También se ha demostrado que los compuestos fenólicos de la uva modifican de forma indirecta el metabolismo de la glucosa a través de su actuación sobre la microbiota. Un ejemplo de ello son las bacterias *bifidobacterium*, que se incrementan ante una ingesta de un extracto de uva [217]. No obstante, estudios como el de Ramos-Romero *et al.* (2020) observaron que los efectos beneficiosos de un extracto de uvas en los niveles de insulina, no estaban mediados por los subgrupos de microbiota más abundantes del organismo [218].

### **5.3.4. Otros**



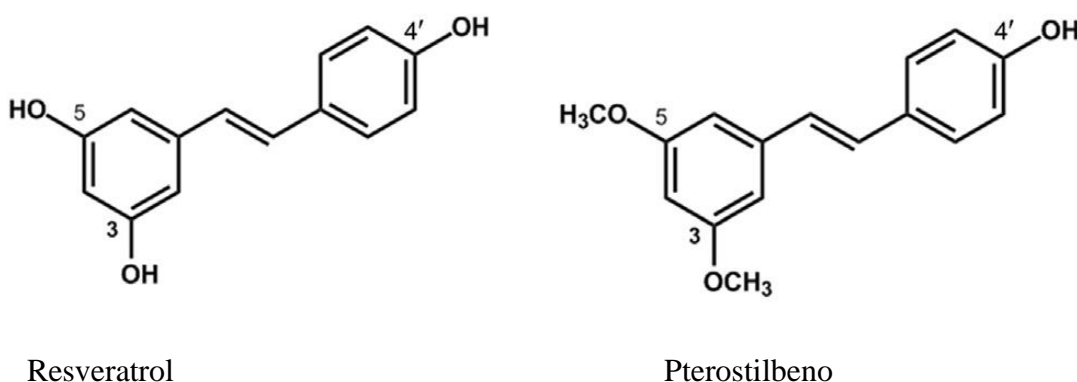
## Introducción

Otros efectos producidos por la suplementación con compuestos fenólicos de uva son la antiagregación plaquetaria, que es considerado un mecanismo cardioprotector, o la prevención de la fibrilación auricular, aunque la evidencia en estos campos aún es escasa [219,220].

### 5.4. Pterostilbeno

Los estilbenoides son un grupo de compuestos fenólicos ampliamente presentes en plantas, aceites aromáticos y plantas comestibles. Entre este tipo de compuestos, destaca el resveratrol (3,5,4 -trihydroxystilbene), que es un polifenol presente en alimentos como uva y sus derivados, como el vino tinto, frutos rojos, pistachos y cacahuets. En los últimos años, este compuesto fenólico ha sido ampliamente estudiado, al presentar numerosos efectos beneficiosos, como la acción antioxidante, la activación de la vía de la sirtuina, la mejora de la sensibilidad a la insulina y tolerancia a la glucosa y el aumento de la lipólisis, entre otros [221].

El pterostilbeno (3,5-dimethoxy-4-hydroxy-trans-stilbene) es un derivado dimetoxilado natural del resveratrol (Figura 8), que fue extraído por primera vez del sándalo, y que se encuentra sobre todo en uva, arándanos y maderas [222-224]. Este compuesto se diferencia del resveratrol porque el grupo hidroxilo es sustituido por un grupo metoxi en las posiciones 3' y 5'. Esto disminuye su metabolización en intestino e hígado, aumentando así su biodisponibilidad, y además facilita su transporte al interior de las células, al tener una estructura más lipofílica [225].



**Figura 8.** Estructura química del pterostilbeno y de resveratrol (polifenol del que procede). Imagen extraída de Tsai *et al.* (2017) [226].

## Introducción

En cuanto a sus efectos, se ha demostrado que presenta capacidad anti-inflamatoria, a través de la inhibición de la producción de IL6, TNF $\alpha$  y proteínas relacionadas con el estrés del retículo endoplasmático [227]. Del mismo modo, ha demostrado disminuir la expresión de genes pro-inflamatorios como prostaglandina-endoperóxido sintasa 2 (COX-2), óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), interleucina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) e inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) [228].

Además, se ha observado que el pterostilbeno reduce el estrés oxidativo y la producción de especies reactivas de oxígeno, como el peróxido de hidrógeno o el anión superóxido, que están implicados en el inicio y desarrollo de distintas patologías. De esta manera, se han descrito beneficios claros por el tratamiento con pterostilbeno en patologías en las que la generación de especies reactivas de oxígeno tiene un papel relevante, así como en el progreso del proceso de envejecimiento [229]. Estudios *in vitro* han puesto de manifiesto que la exposición de diferentes líneas celulares a esta molécula aumenta la producción de distintos antioxidantes como la catalasa, glutatión total, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y superóxido dismutasa [230].

También se ha observado que el pterostilbeno tiene efectos anti-diabéticos, debido a su acción citoprotectora de las células  $\beta$  pancreáticas y a la reducción del estrés oxidativo, mediado por NF-E2-related factor 2 (Nrf2) [231]. En un estudio realizado en animales que presentaban diabetes tipo 1, se observó que una administración de pterostilbeno a la dosis de 20 mg/kg/día ejercía efectos similares a la administración de 30 mg/kg/día de metformina, un antidiabético de uso habitual, concluyendo que el compuesto fenólico producía un efecto similar al de la insulina en diferentes tejidos [232]. Por otra parte, Sireesh *et al.* (2017) publicaron que el pterostilbeno también tenía efectos protectores frente a la muerte celular y el daño pancreático causados por las citocinas pro-inflamatorias [233]. Además de una mejora en las concentraciones séricas de glucosa e insulina, los animales tratados con 10 mg/kg/día de pterostilbeno presentaron menores concentraciones pancreáticas y circulantes de interleukina 1 $\beta$ , factor de necrosis tumoral  $\alpha$  e interferón  $\gamma$ , que son citocinas con efecto dañino para las células  $\beta$  pancreáticas. Sin embargo, en otro estudio similar, ratones con una diabetes tipo 1 fueron tratados con glibenclamida (una sulfonilurea), a la dosis de 600 mg/kg/día, o pterostilbeno a dosis de 10 ó 5 mg/kg/d, o una combinación de los dos compuestos, observándose que tanto en el

## Introducción

grupo tratado con el antidiabético como el tratado con ambos compuestos, pero no en el grupo tratado solo con pterostilbeno, se producía una mejora del control glucémico.

En el caso de la diabetes tipo 2, el pterostilbeno también puede llegar a tener efectos similares al producido por los antidiabéticos orales, disminuyendo los valores de hemoglobina glicosilada y aumentando la actividad de la hexokinasa y la glucosa 6P-deshidrogenasa. Así, se pueden concluir que el pterostilbeno mejora el control glucémico de la DT2 en modelos animales [234]. En el caso de la fase previa al desarrollo de la diabetes tipo 2, donde se evidencia una resistencia a la insulina, el pterostilbeno también mejora las concentraciones de glucosa e insulina en modelos animales. Un ejemplo es el del estudio realizado en nuestro grupo, en el que se evidenció un descenso del HOMA-IR y una mejora en el test de tolerancia a la glucosa en animales tratados con 15 mg/kg/día de pterostilbeno [235]. Este efecto se produjo por el aumento de la expresión proteica de GLUT4, de la fosforilación de la Akt, de la cardiotropina 1 y de la actividad de glucoquinasa, entre otros mecanismos.

Hay pocos estudios que hayan analizado los efectos del pterostilbeno en la esteatosis hepática. No obstante, el estrés oxidativo en el hígado es un importante contribuyente al desarrollo de la esteatosis hepática y por tanto, como se ha mencionado previamente, el pterostilbeno puede presentar efectos beneficiosos de forma indirecta a través de esta vía. Por ejemplo, Satheesh *et al.* (2006) observaron que en el caso de las ratas diabéticas el pterostilbeno disminuía los niveles de TBARS e hidroperóxidos lipídicos, entre otros compuestos, concluyendo que este compuesto fenólico mejoraba de esta manera el estrés oxidativo del hígado y, por tanto, el progreso de la esteatosis hepática [236].

La dislipemia también se ve mejorada por acción de este compuesto fenólico. En estudios llevados a cabo en modelos animales, el pterostilbeno ha demostrado disminuir los niveles de LDL y VLDL y aumentar los de HDL, al mismo tiempo que reduce los triglicéridos, los ácidos grasos libres y los fosfolípidos en ratas diabéticas [237]. Rimando *et al.* (2005), observaron cómo la suplementación de la dieta habitual con pterostilbeno en hámsteres disminuía las concentraciones plasmáticas de colesterol total y LDL un 18% y un 29%, respectivamente y aumentaba los de HDL un 7%. Bhakkiyalakshmi *et al.* (2016) demostraron que dosis de 5 o 10 mg/kg/día de pterostilbeno eran suficientes para evidenciar una disminución significativa de las concentraciones de colesterol total, LDL

## Introducción

y triglicéridos; sin embargo, sólo se la dosis de 10 mg/kg/día aumentó la concentración de HDL [225].

En cuanto al mecanismo de acción del pteroesstilbeno en la dislipemia, se cree que los grupos metoxi toman un papel relevante en la activación de PPAR $\alpha$ , actuando este compuesto como agonista de este factor de transcripción, y reduciendo así la hiperlipidemia. En todo caso, hay que tener en cuenta que estos resultados no tienen por qué ser extrapolables a humanos. De hecho, Riche *et al.* (2014) no reportaron cambios en la concentración de triglicéridos de personas con dislipemia tratadas con pteroesstilbeno y las de LDL se vieron aumentadas [238].

En cuanto a la seguridad del tratamiento con pteroesstilbeno, aunque la bibliografía que analiza este aspecto en humanos es escasa, se ha demostrado que este compuesto fenólico no presenta problemas de toxicidad. En el estudio llevado a cabo por Riche *et al.*(2014), en el que se administraron hasta 250 mg al día de pteroesstilbeno a adultos con dislipemia no se describieron efectos adversos [238]. Por ello, el pteroesstilbeno puede considerarse una molécula segura, aunque se requieran futuros estudios sobre ello.

Sarrera

Sarrera

## **1. MikroRNAk**

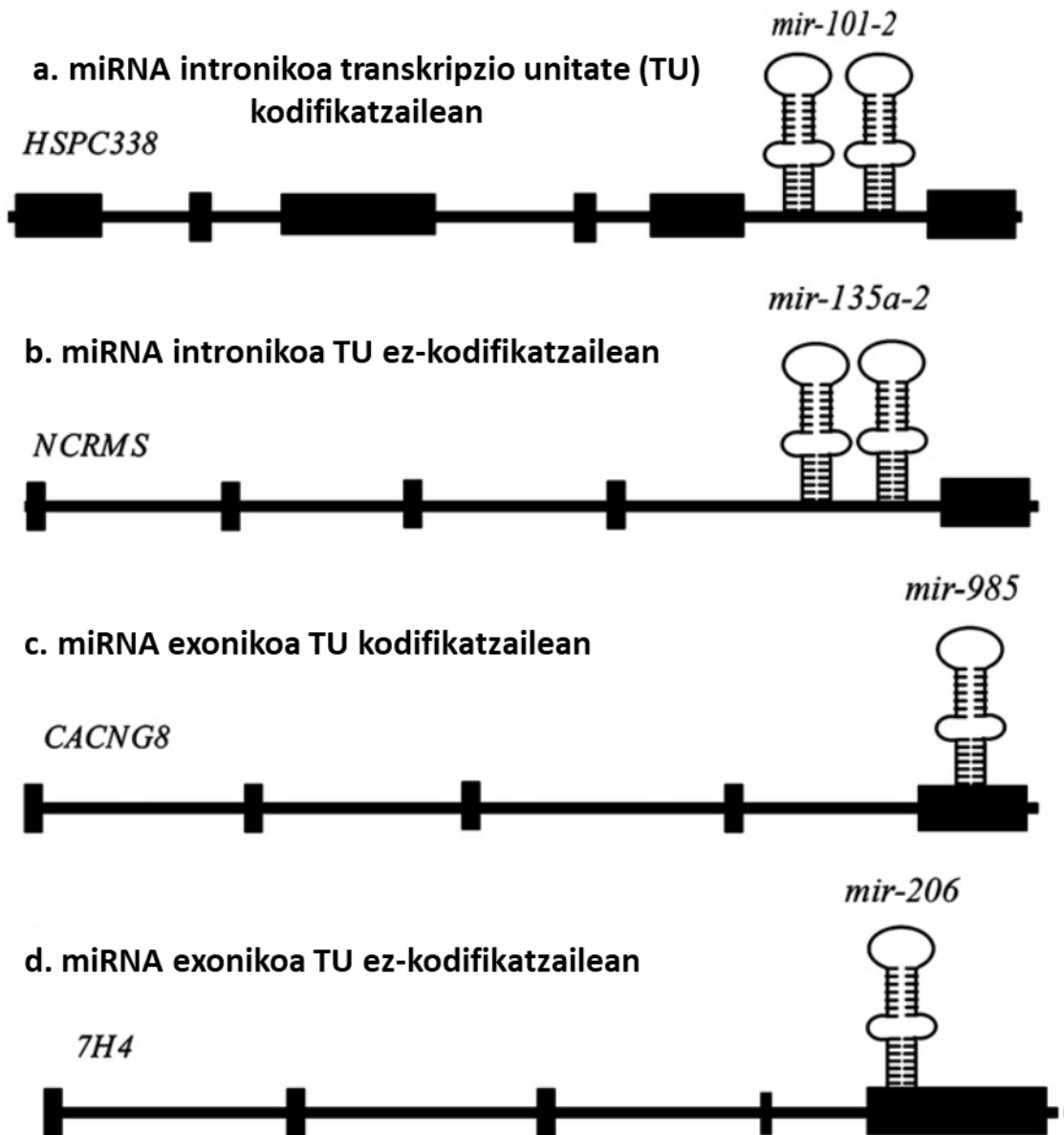
MikroRNAk (miRNA) 9-23 nukleotidoko RNA zati ez-kodifikatzaileak dira, 3' muturrean talde hidroxilo bat eta 5' muturrean talde fosfato bat dutenak. *Caenorhabditis elegans* nematodoan aurkitu ziren lehen aldiz, eta animalia, landare, alga eta birus espezie batzuetan aurki daitezke [1]. Geroago (1993an), beren jarduera erregulatzailea aurkitu zen, eta miRNA lin-4k LIN-14 proteina negatiboki nola erregulatzen zuen deskribatu [2]. Gaur egun, 300 miRNAs baino gehiago deskribatu dira, bai karraskariengan bai gizakiengan, nahiz eta uste den giza genomak 1.000 baino gehiago kodifika ditzakeela [3,4]. Garrantzitsua da azpimarratzea gene bakoitza hainbat miRNAen iturri izan daitekeela eta, aldi berean, miRNA bakar batek 100-200 iturri-mRNA potentzial izan ditzakeela [5,6]. Horrela, kalkulatu da geneen heren bat baino gehiago miRNAek erregulatzen dituztela, eta, beraz, esan daiteke miRNAek funtsezko zeregina betetzen dutela genoma osoaren espresio genikoaren erregulazioan [7].

MiRNAen ikerketa eremuak hazkunde handia izan du azken urteotan, eta halaxe jarraitzen du miRNA berriak aurkitu ahala, genomikarekin lotutako teknologien aurrerapen azkarrei esker.

### **1.1. MiRNAen biosintesia**

#### *1.1.1. Pri-miRNAen sintesia*

MiRNA gehienak eremu intronikoetan kodifikatuta daude, eta gutxi batzuk eremu exonikoetan [8]. Horrez gain, miRNAen erdiak, gutxi gorabehera, beste miRNA batzuekin batera daude, transkripzio polizistronikoen bidez osatzen diren taldeak eratuta (klusterrak) [9]. MiRNA gutxi batzuek baino ez dute frogatu transkribatzaile propioak dituztela. Horrela, miRNAk talde hauetan sailka daitezke: miRNA intronikoak unitate kodifikatzaileetan, miRNA intronikoak unitate ez-kodifikatzaileetan, miRNA exonikoak unitate kodifikatzaileetan eta miRNA exonikoak unitate ez-kodifikatzaileetan (1. irudia) [10].



**1.Irudia.** miRNAen antolaketaren eta egituraren adibideak. Wahid *et al.*-tik moldatuta [10].

MiRNAen transkripzioaren arduradun nagusia RNA polimerasa II da, nahiz eta polimerasa IIIk transkripzioa burutzen duen kasuak deskribatu diren [11,12]. Polimerasa II bidezko espresioak aldaketa zehatz batzuk ahalbidetzen ditu, miRNA taldeen espresioa baldintza espezifikoaren mende ipinita. MiRNAen erregulazioa maila transkripzionalean kontrolatzen da, batez ere, eta aldatzaile epigenetiko zehatzen bidez gertatzen, ehunaren arabera. Zelulen egoera fisiopatologikoaren arabera, miRNAk neurri handiagoan edo txikiagoan adierazten dira. Gainera, metilazioaren inhibitzaileak bezalako molekula

batzuen eraginpean jartzean, haien espresioa aldatu egiten da [13]. Histonen aldaketa prozesuak ere miRNAen erregulazio epigenetikoa egiten duela frogatu da. Azetilazioak kromatinaren egitura laxatu eta transkripzioa aktiba dezake; desazetilazioak, aldiz, kromatina trinkoagoa sortzen du, eta horrek miRNAen transkripzio genikoa eragozten du [14]. Espresio horren emaitzari miRNA primarioa edo pri-miRNA esaten zaio, eta hainbat mila oinarri-pareren luzera dauka. "STEM loop" edo urkila erako egitura du, guanosinazko txanoarekin (cap-5') eta 3' buztan poliadenilatuarekin.

### *1.1.2. Nukleo barruko prozesamendua*

Animaliengan, miRNA guztiak zelula nukleoan prozesatzen dira. Prozesu horretaz Drosha proteina nuklear endoribonukleasa arduratzen da, DGCR8 (DiGeorge critical region 8) lotura proteinarekin konplexu bat osatuz. Bi proteina horien elkarketa mikroprozesadore konplexua izendatzen da. DGCR8 proteinak (baita Pasha izena daukanak ere) seinaleztatzaile gisa jarduten du, eta, seinale horren eraginez, Drosha proteinak pri-miRNA ebakitzen du urkilaren azpitik dauden 11 base pare inguruan. Hala, 60-70 nukleotidoko urkila egitura lortzen da, miRNAren aitzindaria (pre-miRNA) izenekoa (2. irudia) [15,16].

Bitxia bada ere, array bidezko analisietan ikusi da mikroprozesadore konplexuak RNA asko erregula ditzakeela. Izan ere, konplexu hau beste proteina batzuekin batzeko gai dela iradokitzen da, miRNAez gain beste prozesu batzuk erregulatzeko [16].

### *1.1.3. Nukleotik zitoplasmarainoko garraioa*

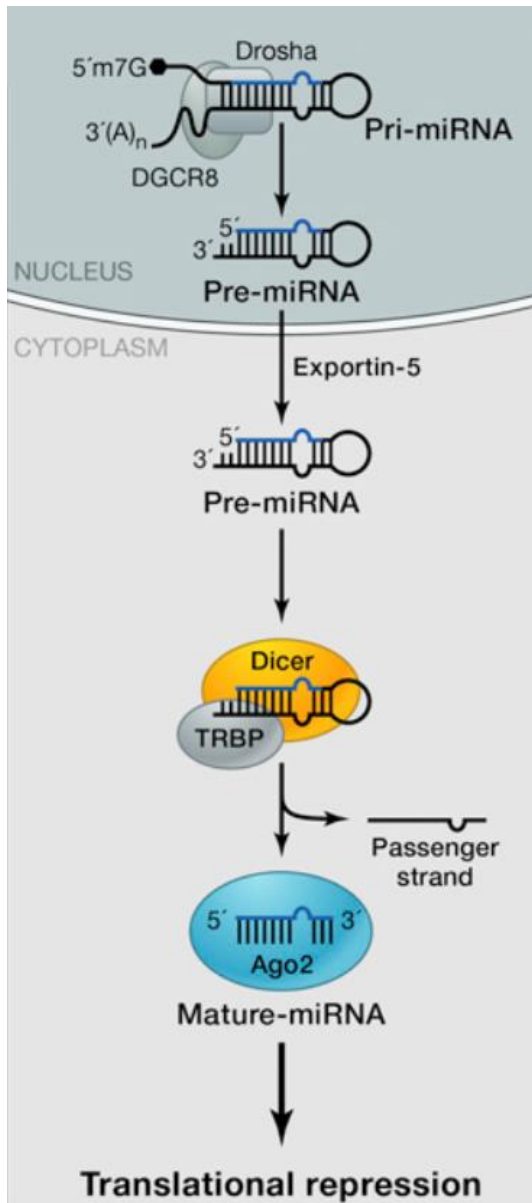
Pre-miRNA mintz nuklearra zitosoleraino zeharkatzen duen egitura da. "RanGTP-dependent nuclear transport receptor exportin-5" proteinarekin lotuta egiten du [17]. Proteina horrek «U» itxurako egitura osatzen du, eta pre-miRNA terminalaren eremura lotzen da [18]. Garraio funtzioaz gain, exportina-5ek miRNA egonkortzen du, mintza zeharkatzen duen bitartean. RanGTP kofaktorea, zeinaren esportazioa mendekoa baita, konplexuarekin ere lotzen da, nahiz eta ondoren hidrolizatu egiten den zitoplasman, pre-miRNA garraiatzaile konplexutik banatuta. Esportazioaren beraren erregulazioaren gaineko bibliografia urria den arren, hainbat konposatuk erregula dezaketela deskribatu da, besteak beste hormonek. Uste da exportina-5en erregulazioa eta, beraz, miRNAen espresioaren mugaketa pre-miRNAren eta garraiatzailearen arteko lotura erregulatuz



gerta daitekeela, bai esportazioaren lotura eremua ezkutatuz bai proteinaren egitura bera aldatuz (2. irudia) [17].

#### *1.1.4. Prozesatze zitoplasmatikoa*

MiRNA zitoplasmara iritsi eta garraiatzaile konplexutik desakoplatu ondoren, Dicer entzima, RNAsa III mota bat dena, endonukleasak prozesatzen du, miRNA heldua osatzeko. Dicer proteina oso espezifikoa eta oso kontserbatua da, organismo eukariotiko gehienetan aurki daitekeena. Nahiz eta organismo batzuetan hainbat Dicer mota egon, Dicer-1 da miRNAen heltzearen arduraduna [19]. Funtsezko entzima da prozesu horretan; izan ere, deskribatu da haren espresiorik ezaren emaitza miRNA aberranteen eraketa eta pre-miRNAen metaketa direla [20,21]. Gainera, mekanismo epigenetiko bidez, Dicerren ekintza miRNA isoformak sortzeko alda daiteke, eta horrek haien ituetarako espezifikotasuna aldatzen du [21]. Beste proteina batzuekin batera lan egiten du, hala nola argonauta familiako proteinekin, eta jakina da "trans-activation response RNA-binding proteins" (TRBP) proteinekin eta "interferon-inducible double stranded RNA-dependent activator" kinasa proteinarekin (PRKRA, PACT izenez ere ezaguna) hertsiki lotuta egiten duela [22]. Dicer konplexuak 22 nukleotido inguruan egiten du mozketa, pre-miRNA kurbaren oinarritik, eta horrela miRNA duplexa lortzen da, mikroRNA helduen 2 hariz osatua. Ondoren, duplexa argo familiako proteina konplexu batera akoplatzen da eta bi hariak banatu egiten dira. Horietako batek argo konplexuari lotuta jarraituko du, eta bestea, berriz, degradatuta izango da. Zein hari degradatuko den aukeratzeko arrazoi nagusietakoa duplexaren muturren termoeogonkortasuna izan daitekeela deskribatu da [23]. MiRNA heldua duen proteina konplexuak ahalmen aktiboa du, eta "RNA-induced silencing complex" (RISC) izendatzen da (2. irudia).



**2. Irudia** Nukleoan ematen den prozesatzea, nukleotik zitoplasmara garraiatzea eta zitoplasman prozesatzea. Yates *et al* (2013)-tik hartuta [15].

### 1.2. MiRNAen ekintza beren ituetan

MiRNAek beren itu geneak erregulatu ahal izateko, RISC konplexuak bere itu mRNAekin bat egin behar du, normalean 3'UTR eremuan [24,25]. mRNAren eta miRNAren (seed sequence) 2-8 baseen artean osagarritasuna izatea eskatzen da, miRNAren 3' muturrarekiko nolabaiteko interakzioaz gain, loturaren termoegonkortasuna ziurtatu ahal izateko [26]. MiRNAk itu bat eta ez beste batzuk

(ehunka aukeraren artean) aukeratzeko erabiltzen duen mekanismoa ez dago guztiz argi. Hala ere, mRNA ituaren N6 posizioan adenosinaren metilazioaren eragina posibilitate bat izan daiteke [27,28].

Bibliografian deskribatuenez, miRNAk hainbat funtzio betetzeko gai dira, hala nola transkripzioaren erregulazioa, itu-mRNAen loturaren eta itzulpenaren inhibizioa, ituen degradazioa edo itu-mRNAk sintetizatu berri dituen proteinen egonkortasunaren murrizketa [29]. MiRNAen funtzio nagusiak RISC konplexuaren eta itu-mRNAren arteko lotura motaren arabera dira. Lotura ez-oso gertatzen bada, mRNA diana itzultzeko prozesua inhibitu egiten da; lotura oso baldin badago, ostera, diana degradatzeko prozesua gertatzen da [28].

### **1.3. Dieta-miRNA interakzioa eta biomarkatzaile gisa duen gaitasuna**

Zenbait ehunetan miRNAk oso ezegonkorak izan eta azkar degradatu arren, RNAsen presentziaren ondorioz, odolean oso egonkorak direla eta gaixotasunen edo prozesu fisiologikoen biomarkatzaile gisa erabil daitezkeela deskribatu da [30]. Izan ere, miRNAek proteinekin konplexuak sortzeko gaitasuna dute, HDL lipoproteinekin, esate baterako, edo besikula txikietan kapsulatuak dira, eta horrek beren degradazioa saihesten du [31]. Deskribatutako formetan odol-zirkulazioarekiko jariatze aktiboaz gain, miRNAk odolera ere transferitzen dira, difusio pasiboaren bidez, eta nahiko erraz neur daitezke gorputzeko fluidoetan, odolean, serumean, likido zefalorrakideoan edo gernuan, kasu [32,33].

Duela gutxi, hainbat azterlanek exosomen presentzia aztertu dute; miRNAk barnean dituzten mintz fosfolipidiko bikoitzeko besikula-mota bat dira [34]. Eraginkortasun handiko bitartekariak dira zelulen barneko material genetiko hainbat ehunetako zelulen artean transmititzeko. Hainbat gorputz fluidotan identifika daitezke, oso modu egonkorrean, eta barnean RNA, miRNA, hainbat proteina edo transkripzio-faktoreak eramán ditzakete, beste molekula batzuen artean, jatorrizko zelulatik zelula hartzailera. Exosomak zenbait zelulak jaria ditzakete, hala nola zelula dendritikoak, epitelialak, tumoralak, globulu gorriak eta hepatozitoak. Horien mintz proteinak direla eta, zelula hartzaileen errezeptoreekin interakzioa dutela uste da (eta haien mintz-proteinekin, CD63ekin, adibidez), ligando hartzaile elkarketa eginez eta material genetiko endozitosi bidez transmitituz [35].

## Sarrera

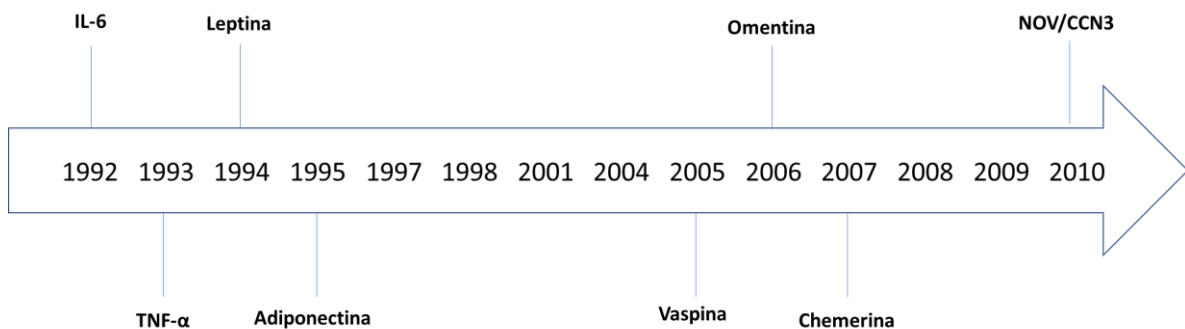
Egiaztatuta dago pertsonen sexuaren eta egoera fisikoaren arabera direla miRNAk [36,37]. Gainera, bai miRNA zirkulatuak bai exosomenak aldatu egiten dira subjektuen patologien arabera, eta, beraz, biomarkatuak ez-inbaditzaileak har daitezke. Horrez gain, nahiz eta beren analisia konplexuagoa izan, exosomek abantaila hau dute: mintz proteinek mintzaren jatorria iradoki dezaketenez, kapsulatutako miRNA zer ehunetatik datorren jakin daiteke.

MiRNAen eta dietaren arteko elkarrekintzari dagokionez, mikroRNAk nutrizio egoeraren adierazle direla ere frogatuta dago. Adibidez, zinkik ez dagoenean, miR-204, miR-296 edo miR-375-re espresioa murriztu egiten da [38]. Era berean, 25-hidroxivitamina D kontzentrazio txikia duten emakumeek modu desberdinean espresatzen dituzte 11 miRNA, bitamina horren kontzentrazio handia duten emakumeekin alderatuta [39]. Hori ez ezik, elikagaien osagai batzuek zenbait miRNAen espresioa positiboki edo negatiboki erregulatzen dutela ere ikusi da. Adibide bat jartzearren, miR-let7a kontzentrazioa areagotu egiten da kurkuma, te berdea edo espinakak hartu ondoren [40,41]. MiRNAen espresioa aldatzen duten konposatuen artean, fenolikoak nabarmen daitezke, organismoan hainbat funtzio betetzen baitituzte miRNAen bidez.

Bestalde, 2012an, landare jatorriko miRNA exogenoak identifikatu ziren karraskarien serum eta ehunetan, baita gizaki osasuntsuen serumean ere, eta miRNA horiek jatorri dietetikokoak zirela ondorioztatu zen [42]. Ikerketa horretan bertan, arrosean zegoen miRNA batek, miR-168k, LDLren errezeptore batekin erlazioatutako proteina baten espresioa erregulatzen zuela egiaztatu zen. Emaitza hauek ikusita, esan daiteke badagoela digestio prozesua jasan eta odolera igaro daitekeen material genetiko.

## 2. Adipokinak

Gantz ehun zuriaren funtzio nagusia adipozitoetan triglizerido gisara energia metatzea da. Hala ere, 1994an, ikuspegi hori zabaldu egin zen, leptina aurkitu ondoren [43]. Gaur egun, gantz ehuna organo endokrinotzat jotzen da, organismo osoko organo endokrino handiena da, ziurrenik, eta adipokina edo adipozitokina moduan ezagutzen diren proteinak sintetizatze eta askatzeko gaitasuna du (3. irudia). Proteina horiek erregulazio autokrinoko, parakrinoko eta endokrinoko funtzioak betetzen dituzte, eta, horrela, seinalezatze metabolikoko bide ugari erregulatzen dituzte. Izan ere, gantz ehunak jariatutako 700 proteina baino gehiago deskribatu dira, nahiz eta asko oraindik balioztatzeko dauden.



## 3. irudia. Adipokinen aurkikuntzaren denbora lerroa

### 2.1. Leptina

Leptina ehun adiposo zurian sintetizatzen da, nagusiki, gehienbat larruazalpeko ehunean; izan ere, leptinaren kontzentrazio zirkulatuak gorputzeko gantz masaren kantitatearekiko zuzenki proportzionalak dira [44]. Hala ere, urdailean ere gertatzen da. 16kDa-ko proteina da, eta zeregin garrantzitsua du prozesu metabolikoen, neuroendokrinoen, ugalketa prozesuen eta energia balantzearen erregulazioan. Halaber, bibliografian adipokina honek immunitate sisteman, kognizioan eta hezur metabolismoan daukan eragina deskribatu da [45].

Leptinaren errezeptoreak (Rob) hipotalamoan eta hainbat organotan daude, hala nola gibelean, biriketan, giltzurrunean, pankrean edo gantz ehunean bertan [46]. Errezeptore

horien presentziak adipokina honen gaitasun autokrinoa eta parakrinoa indartzen ditu. Leptinaren seinaleztatze sistema nabarmenena JAK-STAT (Janus kinase (JAK)/signal transducer and activator of the transcription) bidea da, neuropeptiko anorexigenoen espresioa erregulatzen duena [47]. Aldi berean, leptinak peptido orexogenikoen sintesia ere gutxitzen du. Intsulinarenekin akzio erregulatuazileari dagokionez, leptinak garrantzi berezia du fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/AKT) bidearen aktibazioan, ehun periferikoetan intsulinarekiko sentikortasuna estimulatu baitu [48].

Aurkitu zenean leptina obesitatearen tratamendurako tresna eraginkorra izan zitekeela pentsatu bazen ere, laster ikusi zen ez zela horrela izango, hipoleptinemia pertsona obesoek ehuneko oso txikian baino ez delako gertatzen [49]. Alta, gehienek adipokina honen kontzentrazio plasmatikoa handiak eta leptinarekiko erresistentzia erakusten dituzte [50-52].

## **2.2. Adiponektina**

Adiponektina 1995ean aurkitu zen, leptinaren aurkikuntzatik gutxira [53]. Adipokina hau narotasunez ageri da gantz ehun zurian, eta bertan baino ez. Beste adipokina batzuetan ez bezala, gantz masa handitu ahala haren espresioa murriztu egiten da [54]. Funtsean, gehienbat muskulu eskeletikoan eta gibelean dauden AdipoR1 eta AdipoR2 errezeptoreen bidez jarduten du [55]. Adipokina honek intsulinarenekin eragina hobe dezakeela egiaztatzen da, eta TNF $\alpha$  kontzentrazio handiekin eta PPARekin lotutako erresistentzia iraul dezakeela, AMP proteina kinasa (AMPK) aktibatuta [56]. Bestalde, ikusi da 2. motako diabetesa duten pazienteek adiponektinaren odol kontzentrazio txikiagoa dutela, eta diabetikoak ez diren subjektuen kasuan, adiponektina maila handiak gaixotasuna garatzeko arrisku txikiagoarekin lotzen dira [57]. Era berean, negatiboki lotzen da barauko glukosa kontzentrazioekin [58].

Adipokina honek garrantzi berezia du gibelean, gantz azidoen oxidazioa areagotzen duelako, eta glukoneogenesisia eta *de novo* lipogenesisia murrizten dituelako [59]. Gainera, organo horretan, adipokina honek hantura gutxitzen du, TNF $\alpha$  edo IL-6 moduko proinflamazio zitokinen produkzioa murriztuz eta IL-10 moduko hanturaren aurkako proteinen espresioa areagotuz [60]. Efektu antifibrotikoak ere deskribatu dira, AMPK eta PPAR $\alpha$  proteinen blokeoaren ondorioz, izar zelulen efektua dela kausa, eta, horrela,

gibeleko fibrosia eragiten duten geneen espresioa murriztu egiten da [61]. Beraz, gaur egun, hainbat ikerketa egiten dira adiponektinaren edo haren errezeptoreen jarduera areagotzeko, obesitateak eta intsulinarekiko erresistentziak eragindako hanturaren ondoriozko patologiak tratatzeko [62,63].

Haurrei dagokienez, adiponektinaren kontzentrazio plasmatico txikia helduaroko aterosklerosiaren iragarletzat har daiteke, eta, hortaz, badago proposatzea adipokina hau gaixotasun kardiobaskularrak izateko arrisku mailaren arabera haur gizenak estratifikatzeko erabiltzea [64].

### **2.3. Vaspina**

Vaspina (visceral adipose serpin protease inhibitor) 47kDa-ko eta 415 aminoazidoko proteina da, batez ere erraietako gantz ehun zurian ageri dena, baina baita gibelean, pankrean, azalean edo urdailean ere. Vaspina serikoaren kontzentrazio handiak obesitatearekin, intsulinarekiko sentikortasunaren alterazioarekin eta egoera fisiko eskasarekin lotu dira [65]. Intsulinarekiko efektu sentsibilizatzailea dauka, baita anorexigenoa ere [66]. Horrela, saguei adipokina hau bide intraperitonealaren bidez eman eta gero elikagai gutxiago jan zuten, eta odoleko glukosa kontzentrazioak murriztu egin zitzaizkien [67]. Gainera, subjektu diabetikoek eta prediabetikoek norbanako osasuntsuek baino vaspina zirkulatuak kontzentrazio handiagoak dituztela deskribatu da [68]. Vaspinaren ekintza mekanismo osoa oraindik zehazteke dagoen arren, badakigu serina proteasak inhibituz jarduten duela. Gai da kallikreina 7 proteina diana gisa inhibitzeko, zeinak, aldi berean, A eta B kateetan intsulina degradatzen baitu [69].

Vaspina obesitatearekin eta hipertentsio arterialarekin lotu izan da gibel koipetsu ez-alkoholikoa duten subjektuengan [70,71]. Hala ere, oraindik ezin da baieztatu, ez dagoelako ebidentzia nahikorik, hori ez dela intsulinarekiko erresistentziaren eta patologia horrek sortzen duen hanturaren aurreko konpensazio mekanismoaren ondorio. Izan ere, berezko hipertentsioa zuten arratoiekin egindako azterlan batean, adipokina hau bide intraperitonealaren bidez emateak hipertentsio arterial sistolikoa areagotzea prebenitu zuen, mekanismo antioxidatzaileen eta antiinflamatorioen bidez [69].

Halaber, vaspinak gaixotasun kardiobaskularretan eragina duela deskribatu da, eta estenosi karotideoan jarduera markatzailea daukala. Ildo beretik, ikusi da adipokina honen kontzentrazio plasmatico txikiak eta adipokinaren mRNA maila txikiak beste patologia kardiako batzuen iragarleak izan daitezkeela, koronariopatia eta angina ezegonkorrarena, esaterako [66,72].

Haur eta nerabeen kasuan, neskek mutilek baino vaspina kontzentrazio handiagoak dituztela egiaztatu da, eta aldea, gainera, pubertarora arteko adinean areagotu egiten da. Haurren sexua, adina edo GMIa alde batera utzita, vaspinaren kontzentrazio txikiak intsulinarekiko sentikortasun hobearekin lotu dira, baina presio arterial sistoliko handiarekin eta funtzio endotelialean izandako kalteekin ere bai [73].

#### **2.4. Omentina**

Omentin1 isoformarik ohikoena da, hala plasman nola gantz ehunean, eta, funtsean, erraietako gantz ehunak jariatzen du, bereziki zelula estromal baskularretan [74]. Intsulina sentsibilizatzeko efektua duela frogatu du, eta, horrela, intsulinak adipozitoetan estimulatutako glukosa bilketa hobetzen du [75]. Omentina zirkulatuzaileak obesitatearekin eta intsulinarekiko erresistentziarekin duen erlazioa alderantzizkoa da. Gainera, emakumeek omentina zirkulatuzailearen kontzentrazio handiagoa dute gizonek baino. Halaber, adipokina honek adiponektinarekin korrelazio positiboa daukala deskribatu da, eta, ondorioz, koipe-masarekin alderantzizkoa [76]. Pubertaro aurreko adinean (7-13 urte) dauden haurren kasuan, ikusi da omentinaren kontzentrazio serikoa ez dagoela soilik gorputz masa indizearekin (GMI) eta zirkunferentzia abdominalarekin korrelazioan, baita intsulinaren eta HOMArekin kontzentrazioekin ere [77]. Hala ere, aurki daiteke omentinaren kontzentrazio handiak metabolismo lipidikoaren alterazioekin lotzen dituen bibliografiarik, baina zuzeneko lotura hori konpentsazio mekanismo bati egotzen zaio [78].

Omentinaren seinaleztapen ibilbideei dagokienez, oraindik argitzeko daude tartean diren mekanismo guztiak. Dena den, ikusi da inplikaturako mekanismoetako bat apetituarekin lotutako peptidoen erregulazioa izan daitekeela, kokaina eta anfetamina transkripzio erregulatuko proteinaren (CART) eta korticotropinaren hormona askatzailearen (CRH) espresio hipotalamikoa murriztuz, baita L-dopa eta norepinefrina ere [79]. Intsulinarekiko



## Sarrera

erresistentzia hobetzeari dagokionez, ekintza mekanismoetako bat kinasa b proteinaren (Akt) fosforilazioaren bidea izan daiteke adipozitoetan, nahiz eta omentinak IRSren jarduera areago dezakeela egiaztatu den, AMP aktibatutako kinasa (AMPK) proteina aktibatuz, eta, hortaz, rapamizinen itu baten inhibizioa eragin dezakeela (mTOR-p70S6K) [80,81].

### **2.5. Chemerina**

Doktoretza tesi honetan chemerina beste adipokinak baino zehatzago aztertu denez, sarrera honetan gainerako adipokinei dagokienetan baino deskribapen zabalagoa egingo da. "Retinoic acid receptor responder protein 2" (RAR-RES2) eta "tazarotene-induced gene 2 protein" (TIG2) izenez ezagutzen da chemerina, eta, funtsean, ehun adiposo zurian, gibelean, hesteetan eta giltzurrunetan sortzen da, baina organismo osoan topa daiteke. 146 aminoazidok osatzen dute, 16kDa-ko pisu molekularrarekin, eta 1997an deskribatu zen lehen aldiz [82]. Señaleztapena CMKLR1 (chemokine receptor – Like 1) errezeptoreekin (ChemR23 eta CC-motif receptor – Like 2) lotuz neurtzen da [83-85].

Chemerinak hainbat funtzio betetzen ditu, batez ere hanturarekin, adipogenesiarekin eta glukosaren homeostasiarekin lotuak. Obesitate kasuetan, chemerina kontzentrazioak ehun adiposo, GMI, zinta aldakako indize, glukosa kontzentrazio eta HDL kontzentrazio txikiekin eta triglizerido zirkulatuarekin lotzen dira zuzenean; hau da, sindrome metabolikoarekin lotuta dago [86]. Hain zuzen ere, ikerketa batzuek chemerina alterazio horien biomarkatzaile gisa proposatzen dute [87]. Halaber, deskribatu da 2. motako diabetesa duten pazienteengan chemerina kantitatea handiagoa dela hipertentsio arteriala duten pertsona normotensioengan baino [88].

Zenbait azterlanek chemerinarekin eta glukosaren metabolismoaren arteko erlazioa aztertu dute, 1. taulan ikus daitekeenez. Ikerketa horietako gehienek chemerinarekin kontzentrazio plasmatikoen eta metabolismo gluzemikoaren kontrol txarraren arteko korrelazioa ezarri duten arren, ez dago horren gaineko adostasun orokorrik.

**1. taula.** Helduen chemerinarekin eta glukosaren metabolismoaren arteko erlazioa aztertzen duten azterlanak.

<b>Kasu-kontrol ikerketak</b>			
<b>Autorea</b>	<b>Egoera metabolikoa</b>	<b>Kohortea</b>	<b>Emaitza</b>
Bozaoglu <i>et al.</i> , 2007 [86]	Maurizio uharteetako pertsonak 2MDrekin	142 subjektu NGTarekin 114 2MDarekin	Sexuaren arabera doitu ondoren, korrelazio esanguratsua honakoekin eman zen: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Barauko glukosa</li> <li>• Barauko intsulina</li> <li>• HbA1c</li> </ul>
Stejskal <i>et al.</i> , 2008 [89]	SM izateko arrisku altua (diabetes aurrekoa, dislipemia eta obesitatea)	55 pisu normala duten subjektu 181 SM izateko arrisku handiarekin (59 SMrekin eta 122 SMrik gabe)	Chemerina kontzentrazio handiagoa SM duten subjektuetan Chemerinaren eta barauko glukosaren arteko korrelazio positiboa Ez du korrelaziorik QUICKI indizearekin
Bozaoglu <i>et al.</i> , 2009 [90]	2MT duten Latinoamerikako pertsonak	969 subjektu ez-diabetikoak (400 gizon eta 569 emakume) 173 pertsona 2MDrekin (63 gizon eta 109 emakume)	Ez zen ezberdintasunik aurkitu chemerinaren kontzentrazioan Korrelazio positiboa chemerinarekin: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Barauko glukosa plasmatikoa</li> <li>• Barauko intsulina</li> <li>• HOMA-IR</li> </ul>
El-Mesallamy <i>et al.</i> , 2011 [91]	2MT duten Egiptoko pertsonak	90 subjektu 3 taldetan banatuta: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 15 subjektu osasuntsu</li> <li>• 53 pertsona 2MDarekin</li> <li>• 22 paziente 2MDarekin eta</li> </ul>	Chemerina-kontzentrazio altuagoak 2MD eta 2MD-IHD duten pertsonetan Mayores concentraciones de chemerina en sujetos con DT2 y DT2 con IHD Korrelazio positiboa chemerinarekin: <ul style="list-style-type: none"> <li>• GMI</li> <li>• Barauko glukosa</li> <li>• Barauko intsulina</li> </ul>

## Sarrera

		IDHrekin con DT2 e IHD.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• HOMA-IR</li> <li>• HbA1c</li> </ul>
Chu <i>et al.</i> , 2012 [92]	SMko 3 irizpide edo gehiago dituzten korearrak (NCEP IIIren arabera)	59 gizon y 33 emakume gainpisuarekin  GMI: 28.15 ± 5.08 kg/m <sup>2</sup>	Korrelazio esanguratsurik gabe
Jialal <i>et al.</i> , 2013 [93]	SM hasiberria (jarduera monoizitiko handiko eta gantz-ehunaren desregulazio biologikoa duen hanturaren aldeko egoera, adipokinen, zitokinen eta kimiozinen jariaketa anormalaren bidez adierazia, 2MD edo gaixotasun cardiobaskularrekin konplikatua ez dena)	60 kontrol: 37 gizon eta 23 emakume  45 subjektu SMarekin (9 gizon eta 36 emakume)	Chemerina-konzentrazio handiagoa SM duten subjektuetan  Chemerina-espresio gehiago larruzalpeko gantz-ehunean eta muskuluan SM zuten subjektuetan  Korrelazio positiboa chemerinarekin: <ul style="list-style-type: none"> <li>• HOMA-IR</li> <li>• CRP</li> </ul>
Takahashi <i>et al.</i> , 2013 [94]	Persona japoniarrak 2MD edo SMrekin	321 subjektu heldu (213 gizon eta 108 emakume, hiru taldetan banatuta: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 88 kontrol (66 gizon eta 22 emakume)</li> <li>• 187 subjektu 2MDrekin (88 gizon eta 59 emakume)</li> <li>• 85 subjektu SMarekin (59 gizon eta 27 emakume)</li> </ul>	Chemerina-mailak txikiagoak dira DT2 duten gizonetan, kontrol eta SM duten subjektuetan baino.  Korrelazio negatiboa chemerinarekin: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Barauko glukosa</li> <li>• HbA1c</li> </ul>
Wang <i>et al.</i> 2013 [95]	Txinatarrak SMarekin (IDFren arabera 2005)	30 controles (18 hombres y 12 mujeres)  Edad 51 ± 9 años  30 pacientes con SM (16 hombres y 14 mujeres). Edad 49 ± 8 años	Chemerina kontzentrazio handiagoa SM duten subjektuetan <ul style="list-style-type: none"> <li>• Korrelazio positiboa:</li> <li>• Barauko glukosa</li> <li>• Barauko intsulina</li> </ul>

## Sarrera

			<ul style="list-style-type: none"> <li>• HbA1c</li> </ul>
Zuang <i>et al.</i> , 2014 [96]	Kontrol gluzemiko normala duten pertsonak eta 2MD (FDR) duten lehen mailako senideak dituzten pazienteak.	63 NGTrekin eta 74 FDRekin	<p>Chemerina kontzentrazio handiagoa FDR duten pazienteetan NGT duten pazienteetan baino</p> <p>Korrelazio positiboa chemerinarekin:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Glukosa plasmatikoa</li> <li>• Intsulina plasmatikoa</li> <li>• HOMA-IR</li> </ul>
Adams-Huet <i>et al.</i> , 2014 [97]	Hasierako SMA	23 kontrol (6 gizon y 17 emakume) y 19 paziente SMrekin (3 gizon eta 16 emakume)	<p>Chemerina kontzentrazio handiagoa DT2 duten subjektuetan eta adineko subjektuetan</p> <p>Chemerinaren eta gantz-ehunaren intsulinarekiko erresistentziaren arteko korrelazio positiboa</p>
Coimbra <i>et al.</i> , 2014 [98]	Persona portugaldarrak 2MDrekin	20 kontrol (8 gizon y 12 emakume) y 73 paziente 2MDarekin (36 gizon eta 37 emakume) 2 taldetan banatuta:	Chemerina kontzentrazio handiagoa 2MD duten subjektuetan eta adineko subjektuetan
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adin ertaineko taldea (38-64 urte)</li> <li>• Adin handiko taldea (65-85 urte)</li> </ul>	
Fatima <i>et al.</i> , 2015 [99]	Pertsona pakistandarrak 2MD preklinikoarekin	29 kontrol, 23 2MD preklinikoarekin eta 22 2MDarekin (35-59 urte)	Chemerina kontzentrazio handiagoa DT2 duten subjektuetan.
Andersson <i>et al.</i> , 2016 [100]	Gizonak 2MDrekin	13 kontrol y 14 subjektu 2MDarekin (51-69 urte)	Chemerina kontzentrazio handiagoa DT2 duten subjektuetan.

## Sarrera

Habib <i>et al.</i> , 2017 [101]	2MD duten emakume saudiarabiarrak	35 kontrol y 45 paziente 2MDarekin (30-65 urte)	Chemerina maila handiagoa DT2 duten subjektuetan..  Korrelazio positiboa chemerinarekin: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Insulina en ayunas</li> <li>• HOMA-IR</li> </ul>
El-Deeb <i>et al.</i> , 2018 [102]	2MDa duten pertsonak	14 kontrol (9 obesitatearekin y 5 obesitaterik gabe) y 71 pertsona prediabetesarekin (40 obesitatearekin eta 31 obesitaterik gabe)	Korrelazio positiboa chemerinarekin: <ul style="list-style-type: none"> <li>• HOMA-IR</li> <li>• HbAc1</li> <li>• CRP</li> </ul>
Gateva <i>et al.</i> , 2018 [103]	Obesitatea eta aurrediabetesa duten pertsonak	41 kontrol eta 39 subjektu obesitatea eta prediabetesarekin (50,4 ± 10,6 urte)	Aldaketa esanguratsurik gabe chemerina-kontzentrazioan  Chemerinaren eta HbA1c-ren arteko lotura ahula
Yang <i>et al.</i> (2019) [104]	2MDa duten pertsonak	20 subjektu NGTrekin (12 gizon y 8 emakume)  50 subjektu 2MDarekin (27 gizon y 23 emakume)  30 subjektu 2MD+makroangiopatia	Makroangioparia eta 2MD zuten pertsonen chemerina- kontzentrazio altuagoa zeukaten.  Korrelazio positiboa chemerinarekin: <ul style="list-style-type: none"> <li>• IMC</li> <li>• Glukosa, irentsi eta 2 ordura.</li> <li>• Barauko glukosa</li> <li>• HOMA-IR</li> <li>• HbA1c</li> <li>• Barauko intsulina</li> </ul> Korrelazio negatiboa: <ul style="list-style-type: none"> <li>• HDL</li> </ul>
Ouerghi <i>et al.</i> , 2020 [105]	SM duten tunisiar gizonak (IDFren arabera)	27 kontrol eta 11 paziente SMrekin (17-21 urte; GMI 19-37)	Korrelazio positiboboa honako hauekin: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Barauko glukosa</li> <li>• HOMA-IR</li> </ul>

## Sarrera

Sitar-Taut <i>et al.</i> , 2020 [106]	2MDa duten pertsonak	88 subjektu 4 taldetan: • Obesitatea eta 2MD • Obesitatea eta normogluzemiam  Normopisua eta 2MD Normopisua eta normogluzemiam	Chemerina-konzentrazio handiagoa intsulinarekiko erresistentzia duten subjektuetan sentsibilitatea dutenetan baino.  Korrelazio positiboa HOMA-IRrekiko, normopisua-normogluzemiam taldean.
Shafer-Eggleton <i>et al.</i> 2020 [107]	SM duten pertsona korearrak	18 kontrol eta 32 paziente SMrekin (24-62 urte)	Chemerina/HDL ratio handiagoa SM duten subjektuetan  Korrelazio positiboa chemerina/HDL honako hauekin:  • Barauko glukosa  • HOMA-IR

### Zeharkako ikerketak

Autorea	Egoera metabolikoa	Kohortea	Emaitza
Ouwens <i>et al.</i> (2012) [108]	Normogluzemiam duten gizon gazteak	20 subjektu (26-38 urte) GMI 22,9 ± 2,3	Korrelazio negatiboa barauko chemerina eta intsulinarekiko sentikortasunaren artean
Fatima <i>et al.</i> (2013) [109]	Gizon osasuntsuak	90 subjektu: 30 pisu normalarekin, 30 gainpisuarekin eta 30 obesitatearekin (15-65 urte)	Chemerina-konzentrazio handiagoa obesitatea zuten subjektuetan  Chemerina SMaren fenotipo batzuekin lotzen da
Zylla <i>et al.</i> (2017) [110]	Baraurik HbA1c eta glukosa-balio normalak dituzten pertsonak	3.986 subjektu (1.956 gizon y 2.030 emakume)	Korrelazio positiboa chemerinarekin eta:  • Glukosa plasmatikoa • HbA1c • Hanturazko zitokinak

## Sarrera

Cheon <i>et al.</i> (2017) [111]	2MDa duten pertsonak	102 pertsona 2MDrekin (53 gizon y 49 emakume)	Chemerina-kontzentrazioaren eta erraietako gantz-ehunaren lodieraren arteko korrelazio positiboa.  Korrelazio negatiboa HDLrekin.
-------------------------------------	----------------------	--	---

### Beste ikerketa batzuk

Autorea	Egoera metabolikoa	Kohortea	Emaitza
Yu <i>et al.</i> (2012) [112]	2MDa duten pertsonak	81 subjektu obesitatearekin (42 gizon eta 39 emakume) <ul style="list-style-type: none"> <li>• Metforminarekin tratatutako 41 subjektu</li> <li>• 40 subjektu, pioglitazonarekin tratatuak</li> </ul> <p>79 subjektu ez-diabetiko (44 gizon eta 39 emakume)</p>	Chemerina kontzentrazioa pioglitazonarekin murriztu zen, metforminarekin konapraturaz  Murrizketa handiagoa da hipogluzemiantea antioxidatzaileekin lotzen denean
Lee <i>et al.</i> (2013) [113]	Obesitatea duten pertsonak, dieta hipokalorikoa eta ariketa fisikoa egin ondoren.	60 subjektu (40 gizon eta 20 emakume; 22-36 urte)	Chemerinaren kontzentrazioa murriztu egin zen interbentzioaren ondoren  Chemerina serikoaren murrizketa HOMA-IRaren aldaketarekin modu positiboan lotu zen.
Kim <i>et al.</i> , (2014) [114]	2MDa eta obesitatea duten pertsonak	32 subjektu: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 16 subjektu, bizi-estiloetan esku-hartze intentsiboa dutenak</li> <li>• 16 subjektu dieta eta ariketa arruntekin</li> </ul>	Chemerina kontzentrazioa murriztu egin zen interbentzioaren ondoren  Chemerina honako hauekin korrelazio positiboa izan zuen: <ul style="list-style-type: none"> <li>• HOMA-IR</li> <li>• Barauko intsulina</li> <li>• PCR</li> </ul>

## Sarrera

			Korrelazio negatiboa intsulinarekiko sentikortasunarekin
Bobbert <i>et al.</i> (2015) [115]	Glukosaren kontrolean desoreka duten pertsona osasuntsuak	245 subjektu glukosaren metabolismo normalarekin.  baraurik, glukosan alterazioa duten 32 subjektu.  glukosaren tolerantzia alteratua duten 44 subjektu.  baraualdiko glukosa eta glukosaren tolerantzia alteratua duten 18 subjektu.  35 subjektu 2MDarekin	Erregresio linealeko ereduek erakutsi zuten barauko chemerina HbA1c eta glukosan okerrera egiteko adierazlea izan daitekeela.

---

2MD: 2, motako diabetesa; NGT:glukosarekiko tolerantzia normala; SM: sindrome metabolikoa; IDF: ; IHD: iskemia miokardikoa; HbAc1: hemoglobina glikosilatua; GMI: orputz-masaren indizea; HOMA-IR: homeostasis model assessment of insulin resistance; NCEP: National Cholesterol Education Program; QUICKI index: quantitative insulin sensitivity check index;; FDR: lehen graduko ahaidetasuna; PRC: C-proteina erreaktiboa. Léniz et al. (2021)-tik hartuta [116]

Hanturari dagokionez, chemerinarekin papera ez dago argi: artikulu batzuek proinflamatoriotzat jotzen dute; beste batzuek, ordea, anti-inflamatoriotzat [117]. Adipokina honen ekintza proinfamatorioaren aldeko apustua egiten duten ikerketei dagokienez, adierazi beharra dago bai chemerina bioaktiboa bai ChemR2 hartzailea espresatzeko gai diren zelulak areagotu egin direla, hantura kronikoa dakarten gaixotasunen kasuan [118]. Hala ere, beste ikerketa batzuen arabera, adipokina honek saguen peritoneoko makrofagoek sortzen dituzten hanturaren aldeko zitokinen ekoizpena inhibi dezake, bai eta neutrofiloen eta monozitoen atzematea ere [119]. Ildo beretik, chemerina hartu zuten Chem 23 KO saguek hanturaren aldeko zitokinen ekoizpena murriztu zutela deskribatu da (TNF, IL-1b, IL-6). Ekintza mekanismoak direla eta, ez dira erabat argitu, eta hainbat ehunetan duten eraginaren eta dagokien isoformaren arabera dira [120].



## Sarrera

Azkenik, esan beharra dago hainbat azterlanek modu positiboan lotzen dutela adipokina hau haurdunaldiko diabetesarekin (HD) [121]. DG edukitzeak hainbat alterazio eragin diezazkioke amari; horien artean, diabetes iraunkorra eta haurdunaldiko/jaiotza inguruko ondorioak nabarmentzen dira, hala nola preeklampsia izateko edo ondoren obesitatea eta haurraren intsulinarekiko erresistentzia garatzeko arrisku handiagoa [122]. HD garatzeko arrisku faktoreen artean, gehiegizko pisua, aurreko HDa, 2MDaren familia historia, obulutegi polikistikoa, mikronutrienteen urritasunak edo amatasun adin aurreratua daude. Hala ere, ekintza mekanismo zehatza ez dago erabat deskribatuta (2. taula).

**2. taula.** Haurdunaldiko diabetesa eta chemerina-kontzentrazioa lotzen dituzten azterlanak.

<b>Chemerina-maila altuak haurdunaldiko diabetesarekin lotzen dituzten azterlanak</b>			
<b>Autorea</b>	<b>Kohortea</b>	<b>Haurdunaldiaren hiru hilekoa</b>	<b>Emaitza</b>
Li <i>et al.</i> 2015 [123]	48 emakume txinatar HDarekin eta 42 emakume NGTrekin	Erditu ondoren 24-48ordu	Chemerina kontzentrazio handiagoa HDn NGT duten emakumeetan baino  Ehun adiposoan, chemerina gutxiago espresatzen da HD duten emakumeetako NGT duten emakumeetan baino  Korrelazio positiboa chemerina eta HOMA-IRrekin
Ademoglu <i>et al.</i> 2015 [124]	7 emakume HDarekin y 32 NGTrekin (23 - 35 urte)	Hirugarren hiru hilekoa	Chemerina kontzentrazio handiagoa HDn  Lotura positiboa: <ul style="list-style-type: none"><li>• GMI</li><li>• HbA1c</li><li>• TG</li><li>• Intsulina</li><li>• HOMA-IR</li></ul> Lotura negatiboa:

## Sarrera

			<ul style="list-style-type: none"><li>• HDL</li></ul>
Fatima <i>et al.</i> , 2017 [125]	208 emakumepakistandarrak HDrekin eta 300 NGTrekin (21-32 urte)	Bigarren hiruhilekoa	Chemerina kontzentrazio handiagoa HDn NGT duten emakumeetan baino  <ul style="list-style-type: none"><li>• Lotura positiboa honako hauekin:</li><li>• Barauko glukosa</li><li>• Fetuaren pisua</li><li>• HOMA-IR</li></ul>
Gashlan <i>et al.</i> , 2017 [126]	26 Greziako emakume HDarekin eta 18 NGTrekin (30-35 urte)	Hirugarren hiruhilekoa	Chemerina kontzentrazio handiagoa HDn NGT duten emakumeetan baino  Lotura positiboa honako hauekin: <ul style="list-style-type: none"><li>• Barauko glukosa</li><li>• HbA1c</li></ul>
Tsiotra <i>et al.</i> , 2018 [127]	15 Greziako emakume HDarekin eta obesitatearekin, eta 23 NGTrekin. (26-37 urte)	Erditzean	Chemerina kontzentrazio handiagoa HDan NGT duten emakumeetan baino  Erraietako gantz-ehunean chemerina- espresio handiagoa HDn NGTn baino  Lotura positiboa: <ul style="list-style-type: none"><li>• Barauko glukosa</li><li>• HbA1c</li><li>• Haurdunaldiko GMI</li><li>• HOMA-IR</li></ul>
Liang <i>et al.</i> , 2018 [128]	46 emakume txinatar con HDarekin eta 43 emakume NGTrekin (26-36 urte)	Hirugarren hiruhilekoa eta erditzean	Chemerina kontzentrazio handiagoa HDn NGT duten emakumeetan baino  Chemerina espresio handiagoa larruazalpeko ehun adiposoan eta plazentan HD duten emakumeetan NGT dutenetan baino  Lotura positiboa honako hauekin: <ul style="list-style-type: none"><li>• Intsulina</li></ul>

**Chemerina-maila baxuak haurdunaldiko diabetesarekin lotzen dituzten azterlanak**

<b>Autorea</b>	<b>Kohortea</b>	<b>Haurdunaldiaren hiruhilekoa</b>	<b>Emaitza</b>
Yang <i>et al.</i> 2017 [129]	19 emakume txinatar HDarekin eta 20 NGTrekin (24-28 urte)	Lehenengo eta hirugarren hiruhilekoa	Lehen hiruhilekoan, txemerina-maila txikiagoa da HD duten emakumeetan NGT tutenetan baino  Hirugarren hiruhilekoan, chemerina-maila handiagoa HD duten emakumeetan NGT dutenetan baino

**Ez dago ezberdintasunik chemerina-mailetan**

<b>Autorea</b>	<b>Kohortea</b>	<b>Haurdunaldiaren hiruhilekoa</b>	<b>Emaitza</b>
Görkem <i>et al.</i> 2016 [130]	Turkiako 76 emakume HDarekin eta 82 NGTrekin (18-35 urte)	Bigarren hiruhilekoa	Aldaketarik ez chemerina-mailetan
Pan eta Ma, 2016 [131]	85 emakume HDarekin eta 85 con NGTrekin		Chemerina kontzentrazio handiagoa HDan NGT duten emakumeetan baino  Ez zen korrelazio esanguratsurik ikusi kontrol gluzemikoarekin lotutako parametroekin
Baker <i>et al.</i> 2012 [132]	69 emakume HDarekin eta 62 NTGrekin	Hirugarren hiruhilekoa	Aldaketarik ez chemerinan  Korrelazio negatiboa kordoiko odolaren eta amaren intsulinarekiko sentikortasunaren artean
Hare <i>et al.</i> 2014 [133]	Danimarkako 6 emakume NGTrekin eta 9 HDarekin (27-33 urte)	Hirugarren hiruhilekoa eta 3-4 hilabete erditu ondoren	Aldaketarik ez chemerinarekin kontzentrazioan  Chemerinarekin eta HOMA-IRren arteko korrelazio positiboa

HD: haurdunaldiko diabetesa; NGT: Glukosarekiko tolerantzia normala; HOMA-IR: homeostasis model assessment of insulin resistance. Léniz et al. (2021)-tik moldatua [116].

Populazio pediatrikoan, oso azterketa gutxi egin dira. Sledziska et al.-ek(2017) egiaztatu zuten chemerina intsulina kontzentrazioekin eta HOMArekin balioekin lotuta dagoela 5 eta 17 urte bitarteko haurrengan [134]. Jaioberriei dagokienez, jaiotzako pisuarekin modu

independentean lotuta dagoela ikusi zuten, eta haurdunaldirako haur handiengan (HA) haurdunaldirako tamaina egokiko haurrengan (HE) baino gehiago espresatzen zela [135].

## **2.6. NOV/CCN3**

NOV (nephroblastoma overexpressed) CCN familiakoa da, beste 5 proteinarekin batera: ELM-1/WISP-1/CCN4 (WNT1-inducible-signaling pathway protein 1), rCop-1/WISP-2/CTGF-L/CCN5 (WNT1-inducible-signaling pathway protein 2), eta WISP-3/CCN6 (WNT1-inducible-signaling pathway protein 3), Cyr61/CCN1 (cystein rich protein 61) eta Ctgf/CCN2 (connective tissue growth factor) [136,137]. Hainbat ehun eta organotan ageri da, hala nola gantz ehunean, azal suprarrenalean, giltzurrunetan, muskuluetan, nerbio sistema zentralean, makrofagoetan, plasman eta likido zefalorrakideoan [138].

NOV/CCN3 adierazpen alteratuak hainbat egoera patologikorekin lotu dira: gaixotasun baskularrak, fibrosia, organogenesisia, hantura eta minbizia, besteak beste, animaliekin egindako azterketetan edo in vitro azterketetan [139]. Oso ikerketa gutxik lotzen dute adipokina hau gizakion sindrome metabolikoarekin. Pakradouni *et al.*-ek (2013) egindako ikerketa baten arabera, hiperlipidemia izanik farmako hipolipemiatzaileekin tratatu ez ziren pertsonen korrelazio positiboa agertu zuten NOV/CCN3ren eta ehun adiposo kantitatearen artean, baita GMIaren artean ere, eta proposatu zen proteina honek funtsezko zeregina izan dezakeela obesitatearen garapenean [140]. Halaber, egileen esanetan, emakumeek gizonek baino adipokina kontzentrazio handiagoak dituzte, gantzaren distribuzio ezberdinagatik, ziurrenik, baina glukosa kontzentrazioetan ez zen desberdintasunik aurkitu; bai, ordea, HbA1c-n.

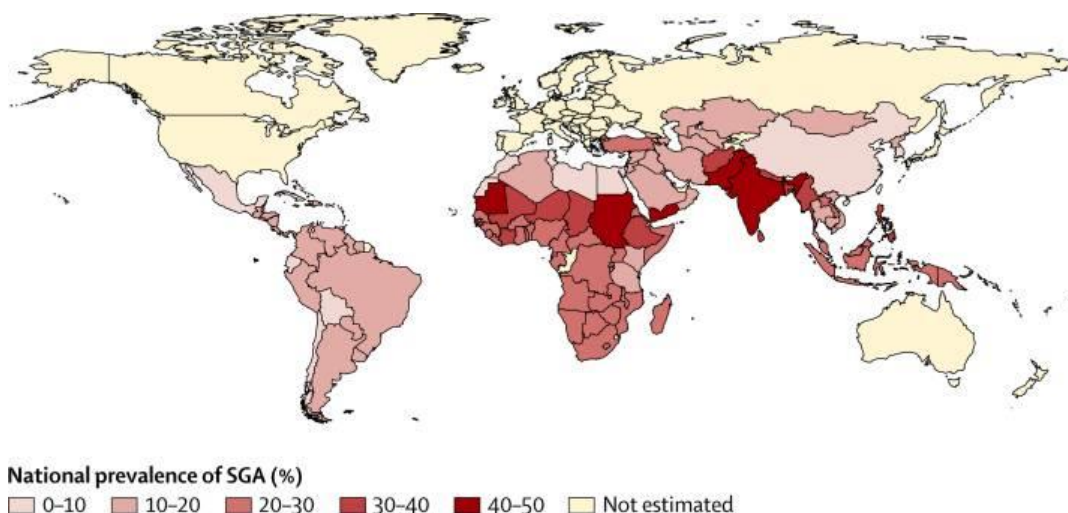
### **3. Haur txikiak haurdunaldirako**

“Haurdunaldirako txikia” (HT) esamoldea jaioberri jakin hau deskribatzeko erabiltzen da: bere pisua eta/edo luzera, bi desbideratze estandar (DE) (3ko pertzentila) edo gehiago daudenean, bere sexurako eta haurdunaldiko adinerako ezarritako batezbestekoaren azpitik dago [141]. Komenigarria da bertako tauletan oinarritzea eta taulok haurren biztanleriari egokitzea. Bi HT haur mota bereiz daitezke: asimetrikoak, jaiotzean pisu edo neurri txikia dutenak, eta simetriko/harmonikoak, luzera eta pisu txikiak dituztenak. Bata ala bestea den zehazteko formula oso erabilia tripondero masaren indizea [(pisua/luzera 3) x 100] da; beraz, haurdunaldi adinerako < P10 balioa lortu arren, haur PEG asimetrikoa dela esan daiteke.

HT haur izaerarekin lotuta, "Umetoki barneko hazkunde atzeratua" (UHA) esapidea dago, fetuaren garapen abiaduraren kontzeptu dinamikoa, haurdunaldian diagnostikatzen eta jaiotzean duen pisu edo neurriarekiko independentea dena. HT haurra izateak garrantzi berezia du, umearen hilkortasun arriskua handitzen duelako, bai eta helduaroan patologia jakin batzuk garatzeko arriskua ere.

Epidemiologikoki, ikerketa gehienek haurrak jaiotzean duen pisuari erreparatzen diote, neurri txikiko HT asimetrikoak etorkizunean ondorio metaboliko negatiboak ere izan ditzakeela alde batera utzita. Balioztapenen arabera, gure inguruan, haurren % 5-10 jaiotzen dira txiki haurdunaldirako, pisu txikia dutelako, altuera baxua dutelako edo biak dituztelako [142]. Mundu mailan, 32,4 milioi jaiotza inguru HT haurrenak dira, eta horien % 27 per capita errenta ertain-txikia edo txikia duten herrialdeetan daude (4. irudia). Ehuneko hori eskualdearen arabera aldatzen da: Asiako hegoaldean, maiztasuna % 26koa da; herrialde industrializatuetan, berriz, % 7koa [141,143]. Nahiz eta HT haurren % 90 inguruk lehen hilabeteetan berezko "catch-up"-a izan (pisua/altuera berreskuratzea, erreferentziazko batezbestekoaren azpitik < 2 DE izatera iritsi arte), gainerako % 10ek ez dute hazkundera berreskuratzen eta hazkunderaren hormonarekin (GH) tratatzen dira. Hala ere, PEG jaiotako haur guztiek pisua edota luzera ez dute modu berean berreskuratzen, eta, aipatu "catch-up" horretara iristen diren abiaduraren arabera, alterazio neurokognitiboak, metabolikoak edo kardiobaskularrak izan ditzakete, besteren artean [141,144].

## Sarrera



**4. Irudia.** HT haurren jaiotzen prebalentzia prebalentzia, errenta ertain edo baxuko herrialdeetan. SGA: txikia haurdunaldirako. Lee et al. (2013)tik hartuta [145]

Hazkundean alterazioak eragin ditzaketen faktoreak honela sailka daitezke: genetikoak, nutrizionalak, plazentarioak, amakoak eta hormonalak. Faktore genetikoak pisu desegokiarekin jaiotzen direnen heren batean ageri dira. Horien artean, kromosomopatiek haurraren hazkundera atzeratzea eragin dezakete, bai eta haurdunaldia etetea ere, haurdunaldi adin txikietan. "Short stature homeobox" (shox) izeneko gene batzuk ere umetoki barneko hazkundera murrizteko arrazoi garrantzitsua direla deskribatu da. Gene horren aldaketa bat identifikatu da altuera murrizteko HT asimetiko jaiotako haurren hainbat kasutan. Gene horrek transkripzio faktore gisa jokatzen du, eta kondrogenesia eta hezur hazkundean parte hartzen duten geneen funtzioa aldatzen, batez ere hanketako eta besoetako hezur luzeetan. Gainera, jaioberriaren luzerari eragiten dioten patologiekin erlazionatzen da, Léry-Weill diskondrosteosiarekin, kasu. HT haurren kasuan, HT asimetriko jaiotako haurren % 6ren inguruan aurkitu da [146,147].

Faktore nutrizionalei dagokienez, sortzapenaren aurretik eta haurdunaldiko lehen hilabeteetan amak elikadura txarra badu, plazenta ez da behar bezala garatuko eta fetuak ez ditu beharrezko substratuak eskuratuko zelulen ugalketarik handiena dagoen aldiaren. Haurdunaldiko azken faseetan, fetuaren garapenak lehentasuna hartzen du amaren nutrienteen erabileran, batez ere koipe erreserbetatik datorrenean, eta, ondorioz, hazkundera desegokiak desnutrizio larriak eragiten ditu. Glukogenoa hirugarren hiruhilekotik aurrera hasten da fetuaren gibelean gordetzen, eta aminoazido esentzialesk plazenta zeharkatzen dute. Burdina, azido folikoa, kaltzioa, fosforoa edo zinka,

## Sarrera

mikronutriente horiek, fetuaren hazkundera gabeziak saihesteko beharrezkoak direla frogatu da [148]. Beraz, nutrizio gomendioei haurdunaldian eta sortzapenaren aurretik jarraitu behar zaie [149].

Amaren ohitura toxikoak ere arrisku-faktorea dira fetuaren hazkunderako. Hala, heroina, kokaina edo alkoholaren kontsumoak larriki aldatzen du fetuaren hazkunde tasa, eta UHA eragiten du. Izan ere, alkohol gutxi kontsumitzea ere (egunean kopa bat edo bi) UHAekin lotuta dago, nahiz eta ez izan fetuarengan alkohol sindromea eragiteko adina kantitate [150]. Toxiko horien ondorioak zuzenean gertatzen dira, toxikoa fetura iristen da eta plazenta hesia zeharkatzen du; baita zeharka ere, plazenta infartuak edo plazentaren lotune patologikoak sortuz.

Plazenta da fetuaren oxigenoaren eta nutrienteen garraioa, eta hazkundera hormonalki erregulatzeko ardura duen organoa. Bertan, hazkunde faktore batzuk sintetizatzen dira, eta hainbat errezeptore ere baditu; beraz, organo autokrino-parakrinotzat hartzen da. Ondorioz, plazentaren funtzionamendu desegokiak haurra HT jaiotzea baldintza dezake. Gainera, haurdunaldi anizkoitzetan ere baldintza dezake umetxoaren garapen egokia, umetokian toki nahikorik ez duelako.

Sistema endokrinoak funtsezko zeregina du umetoki barneko hazkundera [150]. Estradiola esteroide gonadala da, eta fetuaren garapena murriz dezakeela egiaztatu da, batik bat haurdunaldiko lehen hiruhilekoan. IGF-I, IGF-II eta IGFBP-3 hazkunde faktoreak gutxituta daude HT haurrengan, nagusiki pisu eskaseko jaioberriengan [151]. IGF-I, IGF-II eta IGFBP-3 hazkunde-faktoreak gutxituta daude HT diren haurretan, batez ere pisu txikia duten jaioberrietan [152]. GHak eta somatotropina korionikoak ere badute nolabaiteko eragina, haurrak jaiotzean izango duen jarduera umetokian garatzen hasten baita. Era berean, hGH-V (hazkunde plazentarioko hormona), FGF (hazkunde fibroblastikoko faktorea) edo TGF- $\beta$  (beta transformadoreen hazkunde faktoreak) moduko hormona faktoreek fetuaren garapenean eta, hortaz, HT haurraz erditzeko arriskuan eragiten dutela erakutsi dute. Hala ere, azpimarratu behar da aipatu faktoreek HT umea sortzeko arriskuan pisu bera ez badute ere, etiologia faktore anitzekoa dela.

PEG sortzearen ondorioei dagokienez, gaitasun kognitibo urriagoa ekar dezakeela ikusi da, haur hauen bizitzako lehen hilabeteetako hazkunde abiadura modu independentean lotzen baita gaitasun kognitiboarekin, 7 urterekin [153]. Gainera, agerian geratu da

## Sarrera

"catch-up"-a modu espontaneoan egiten duten HT hurrek garapen neurokognitiboko balio handiagoak dituztela, pisua edota altuera berreskuratzen ez dutenen aldean, nahiz eta GHZ tratatzean desberdintasun horiek desagertu egiten diren. Ume horien aldaketa bereizgarrienen artean, hauek nabarmen ditzakegu: trebetasun motor lodiarren (2 urte arte) eta finaren (3 eta 6 urte bitartean) arteko koordinazioa, eta 7 urtetik aurrera adimen koefiziente urria, HE jaiotako hurrekin alderatuta.

Beste ondorio garrantzitsu bat da HT diren hurrek helduaroan obesitatea izateko arrisku handia dutela [154,155]. Umetoki barneko hazkundera murrizteak sistema kardiozirkulatorioa jaio aurretik egokitzea ekar dezake, baita aldaketak ere sistema horren garapenean [156]. Era berean, jaiotzean pisu txikia izateak hipertentsio arteriala eragin dezake helduaroan, baina ez dago argi patologia hori haurtzaroan ere agertzen ez denik [157,158]. Gainera, helduaroan obesitatea dutenez, pertsona horiek arteria karotideoaren lodiera handiagoa dutela deskribatu da, aterosklerosi azpiklinikoaren adierazle ezaguna dena, jaiotzean haurdunaldirako tamaina normala izandakoekin alderatuta [159,160]. HT haurren eta haur arrunten artean profil lipidikoei dagokienez desberdintasunik deskribatu ez den arren, lehenengok oso dentsitate txikiko lipoproteinen (VLDL) lipasa lipoproteinaren (LPL) bidezko lipolisian alterazioak izaten dituzte lehen hilabetera iritsi arte [161]. Era berean, ikusi da 1. motako intsulina hazkunderaren faktorea (IGF-1) areagotzeak gantz ehunaren metaketa eragin dezakeela, batik bat bizitzako lehen hilabeteetan, eta adierazi da IGF-1 jaio ondorengo hazkunderak zeregin garrantzitsua izan dezakeela haur horien larruazalpeko gantz ehuna azkar metatzeko mekanismoan [162]. Halaber, HT hurrek, GMI txikiagoa izan arren, erresistentzia handiagoa dute intsulinarekiko, bai fetuaren programazioagatik bai obesitateagatik. Intsulinarekiko erresistentzia hori bizitzako lehen urtetik handitzen da, eta "catch-up"-a azkar lortzen den kasuetan areagotu egiten da [163]. Halaber, deskribatu da 10 eta 12 urte bitartean PEG jaio diren eta gehiegizko pisua duten hurrek sindrome metabolikoa izateko arrisku handiagoa dutela, tamaina normalarekin jaiotakoek baino, eta zuzeneko lotura dagoela HT estatusaren eta HTA, hipertrigliceridemia, intsulina kontzentrazioak edo glukosa postprandiala izateko arrisku faktoreen artean [164].



#### **4. Sindrome metabolikoa**

Sindrome metabolikoa (SM) 1988an deskribatu zen lehen aldiz, eta, gaur egun erabat adostuta ez badago ere, National Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Treatment Panel III (ATP-III) delakoaren arabera faktore multzo bat gisa deskriba daiteke, gaixotasun kardiobaskularra edo 2. motako diabetes mellitusa izateko arriskua handitzen duena eta, ondorioz, heriotza eragin dezakeena: TG kontzentrazio handiak (>150 mg/dl), HDL maila txikiak (< 40mg/dL), obesitate abdominala (>94 cm gizonengan eta >80 cm andreengan), glukosa maila handia odolean (>100 mg/dL) eta hipertentsio arteriala (>130/85 mm/Hg) [165-168]. Sindrome honen prebalentzia oso handia da; Europan, % 41era irits daiteke gizonengan, eta % 38ra emakumeengan, 47-71 urteko pertsonen kasuan. Gainera, adinean aurrera egin ahala, ehuneko horiek gero eta handiagoak dira [169].

Patologia honetan gehien eragiten duten faktoreak, intrintsekoak zein estrintsekoak, honako hauek dira [170]:

- SMren familia historia
- Adina
- Menopausia
- Latinoamerikako etnia
- Obesitatea
- Sedentarismoa
- Denbora gehiegi telebista ikusten [171]
- Edari azukredunen kontsumoa [172]
- Alkohol kontsumoa [173]
- Mendebaldeko patroia dietetikoa [174]
- Erretzea
- Sasioian ez egotea [175]

- Estatus sozioekonomiko urria
- Zenbait tratamendu farmakologiko (antirretobiralak, klozapina) [176]

Obesitateari dagokionez, WHOren arabera, haren prebalentzia bikoiztu egin da azken 3 hamarkadetan, eta 20 urtetik gorako helduen herenak, gutxi gorabehera, gehiegizko pisua edo obesitatea du; gainera, SMak aldi berean gora egin duela aipatu beharra dago [177]. Horrez gain, diabetes kasuen erdiak eta gaixotasun kardiobaskularren laurdena gehiegizko pisuari edo obesitateari egozten zaizkio [178]. Horrek argi eta garbi uzten du zer-nolako lotura estua dagoen loditasunaren eta SMaren artean.

Hala ere, garrantzitsua da zehaztea ehun adiposo zuri guztiek ez dutela lotura bera SMaren etiologiarekin. Erraietako gantzak larruzalpeko gantzak ez bezalako espresio genikoko patroiak ditu, eta intsulinaren aurkako erresistentziarekin, LDL eta HDL partikula txikiagoekin, eta LDL eta VLDL kopuru handiagoarekin lotzen da.

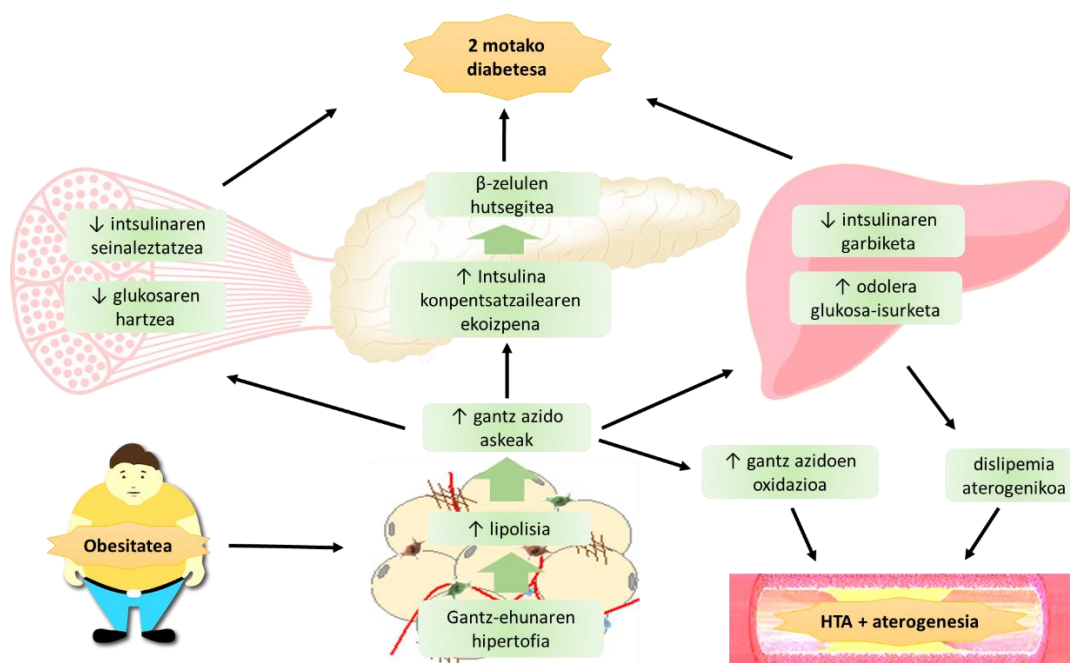
#### **4.1. Sindrome metabolikoaren etiologia eta fisiopatologia**

Ehun adiposoaren hipertrofiak gantz azido askeen askapen handiagoa eragiten du, lipolisi basal handiagoaren ondorioz, eta, beraz, gantz azido horien fluxua organismoko hainbat ehunetarantz areagotzea (5. irudia). Muskulu eskeletikoan, gantz azidoen gehiegizko fluxu horrek alterazioak eragiten ditu intsulina seinaleztatzeko bidean; ondorioz, haren funtzionaltasuna murriztu egiten da. Hori dela eta, ehun horrek glukosa gutxiago hartzen duenez, hipergluzemia sortzen da. Gibelari dagokionez, gantz azido asko iristek intsulinaren argitzea gutxitzen du, eta glukosaren sintesia eta odolerako isurketa estimulatu ditu; orduan, hipergluzemia eta hiperinsulinemia agertzen dira, intsulinarekiko erresistentziaren zantzu bereizgarriak biak [179]. Pankrearen gaineko efektuak bi etapa ditu. Lehenengoan, gantz azidoen fluxu handia iristek intsulinaren ekoizpena areagotzen du, odoleko hipergluzemia konpentsatzeko eta eugluzemiari eusten saiatzeko, hiperinsulinemia garatuz. Bigarreanean, aldiz, kontrakoa egiten du: intsulinaren ekoizpena murriztu eta 2. motako diabetes mellitusa agertzea erraztu [180,181].

Bestalde, hainbeste gantz azido gibelera iristek ez du novo-lipogenesiaren murrizketa eragiten, baina bai VLDLren ekoizpena areagotzea, eta horrek, aldi berean, lipasa hepatikoaren jardura handitzen du, LDLren partikula txiki gehiago sortuz [182]. LDL partikula mota horiek partikula handiagoak baino aterogenikoagoak dira, eta oxidatzeko

joera handiagoa dute; hala, arazo kardiobaskularren bat izateko arriskua handiagoa izaten da.

SMan gertatzen den hipertentsio arteriala dela eta, horren garapenak faktore anitzeko etiologia du. Intsulinarekiko erresistentziak nerbio sistema sinpatikoa aktibatzen du, angiotensina IIko errezeptorearen aktibitatea areagotuz eta oxido nitrikoaren sintesia murriztuz. Gainera, pertsona obesoek kasuan, birxurgatze tubularra areagotu egiten da giltzurrunetan, eta, ondorioz, sodioa atxikitzen da. Horrek hipertentsio arteriala garatzen laguntzen du [183]. Orobat, obesitatea izanik, errenina-angiotensina-aldosterona ardatzaren jardura biziagoa da [184]. Gainera, gantz-ehun hipertrofikoa adipokinak jariatzen ditu, presio arterialean eragin negatiboa dutenak. Adibidez, leptinak hipotalamo-pituitario-adrenal ardatza aktibatzen du, sistema sinpatikoa ere aktibatuz.



**5. irudia.** Syndrome metabolikoaren fisiopatologia. Susan L. Samson *et al* (2014)-tik moldatuta [178].

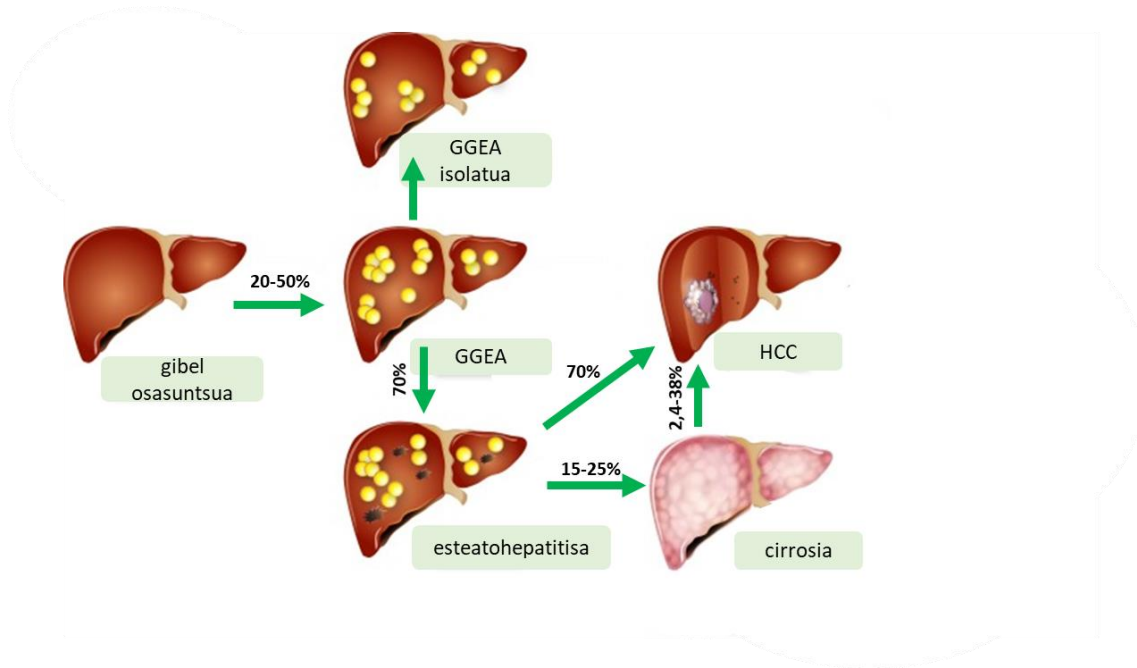
Ahalmen antioxidatzaileen eta agente oxidatzaileen arteko desorekak (estres oxidatiboa) hantura egoera sustatzen du, eta, hala, hanturaren aldeko hainbat zitokina jariatzen dira, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 eta IL-18, esaterako. Horiek birmoldaketa miokardikoa eragiten dute, hipertrofiaren bitartekoa, zeinak arazo kardiobaskularrak eragiten dituen [185]. Izan ere, gaixotasun kardiobaskularren biomarkatzailetzat joak dira peroxidazio lipidikoa, espezie erreaktiboen ekoizpenean izandako alterazioak, proteina oxidatiboen

aldaketak, LDLren eta fosfolipidoen oxidazioa, eta ROSEkiko sentikorrek diren geneen adierazpenean jazotako aldaketak.

#### **4.1.1. Gibel esteatosia**

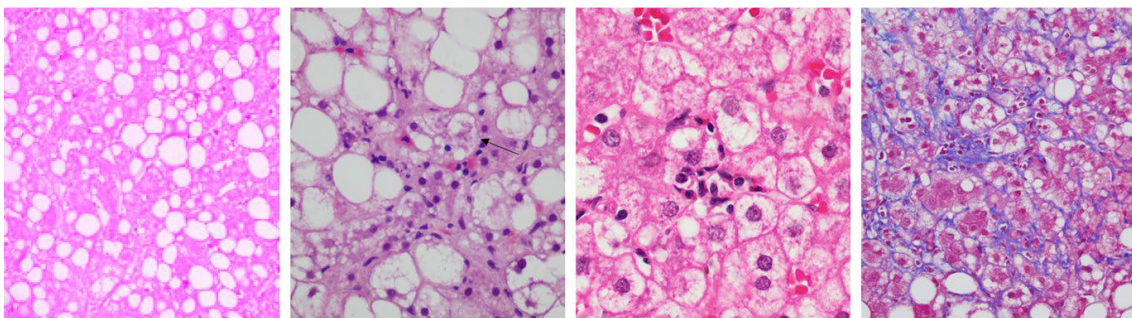
Gaur egun, gibel koipetsua SMaren adierazpenetako bat dela uste da. Mendebaldeko gizarteetan, gibel koipetsu ez-alkoholkoa (GKEA) osasun publikoko arazo argia bihurtu da, patologia hepatico ohikoena delako. Biztanleria osoaren prebalentzia % 20-30ekoa da; are handiagoa populazio obesoarengan ( % 50-70) eta diabetikoengan ( % 60-80), eta patologia biak dituztenengan % 100ekoa izan daiteke (6. irudia) [186]. Prebalentzia SMaren garapenarekin batera handitzen da, sindromearen sintomen larritasunarekiko zuzenki proportzionalki. Halaber, HTA duten pazienteen erdiek ere patologia bera dute. GKEA odol hodian elastikotasun txikiagoarekin, giltzurrunetako patologiekin eta bihotz hutsegitearekin lotu da. Bestalde, hipertentsio arteriala GKEAren pronostiko okerragoarekin eta fibrosiaren agerpenarekin ere badago lotuta [187].

Gibel koipetsu alterazioak sintomatologiarik sortzen ez badu ere, hala prebenitzea nola tratatzea beharrezkoa da, egoera are larriagoa bilaka baitaiteke. Meta-analisi batean egiaztatu dutenez, Europan GKEA duten pertsonen % 70ek esteatohepatitisa gara dezakete (6. irudia) [188]. HGNAren forma larriagoa da, hantura eta hepatozitoei kalte handiagoa eragiten dituen. Gibel koipetsu forma honek hainbat ondorio izan ditzake gibelean, fibrosia garatzea, kasurako. Gainera, gibelaekin lotzen ez diren esteatohepatitisaren garapenarekin erlazionatutako ondorio kaltegarriak deskribatu dira, hala nola gaixotasun kardiobaskularrak. GKEA duten pazienteen % 20-50ek zirrosia garatzen dute 10 urteko aldian [189]. Gainera, hepatokartzinomaren intzidentzia zirrosia duten pertsonengan % 2,4-38 bitartekoa izan daitekeela deskribatu da [190]. Azkenik, hepatokartzinoma kasuen % 35 inguru GKEAren presentziarekin lotuta daude (6. irudia) [191].



**6. irudia.** Esteatosi hepaticoaren bilakaera larritasun handiagoko egoeretarantz. Diren Beyoglu et al (2013)-tik moldatuta [192].

Diagnostikoari dagokionez, HGNAren eta esteatohepatitisaren arteko bereizketa ez da zehatza, eta biomarkatzaileen gabezia argia dago, bai gaixotasunari bai gaixotasunaren bilakaerari dagokienez. Fenomeno hau gizakiengan aztertzeko teknika ez-inbaditzaileek datu mugatuak ematen dituzte, eta animaliekin egindako azterketek ez dituzte pertsonen ezaugarri guztiak islatzen. Gainera, giza ehun hepaticoko biopsiak eta ondorengo histologia (7. irudia) aztertzeko populazio oso zabalak behar direnez, mota horretako azterlan zabalak ez dira oso egingarriak.



**7. irudia.** HGNAren bilakaera histologikoa, fibrosi hepaticoa agertu arte. Scott L. Friedman *et al.* (2018)-tik hartuta [187].

## Sarrera

Eritasun hau eragiten duten mekanismoak ez dira zehatz-mehatz ezagutzen, baina jakina da intsulinarekiko erresistentziak funtsezko zeregina duela haren jatorrian eta garapenean. Adipozitoetan, intsulinarekiko erresistentziak hormonekiko sentikorra den lipasaren (HSL) jarduera areagotzen du, triglizeridoen lipolisia handituta, eta, ondorioz, gantz azido askeen fluxua ehun horretatik gibelera areagotzen da. Gantz azido horiek mitokondrietan oxida daitezke, ATP lortzeko, VLDL partikuletan sartzeko edo gibelean triglizerido moduan biltegitratzeko. Gainera, hiperinsulinemiaren ondorioz, gibelean SREBP espresioa handitu egiten da, eta, aldi berean, hipergluzemiaren ondorioz, ChREBP espresioa areagotzen. Hori dela eta, gehiegizko glukosa hepatikoa gantz azido bihurtzen da, eta, gantz azido aske zirkulatuarekin batera, azkenean esterifikatu eta triglizerido moduan metatzen dira (orduan, gibel estatosia sortzen da) [193].

Jakina denez, esteatatosi sinplearen eta esteatohepatitisaren arteko eboluzioan estres oxidatiboaren areagotzea eta hantura zitokinen jarduera tartean dira [194]. Gibelean estatosian nagusi diren oxidazioaren aldeko faktoreak ROSak dira, gantz azido hepatikoak oxidatzen direnean sortzen direnak. ROSe kalte genikoa eragin, proteinen egonkortasuna aldatu eta peroxidazio lipidikoaren bidez zelulen mintzen egonkortasuna kaltetzen dute, horrela organuluaren funtzioa okerra bultzatuta eta TNF- $\alpha$  bezalako hantura zitokinen sekrezioa handituta [195]. Aldi berean, gaitasun oxidatibo mitokondrial murriztu egiten da, gantz azidoak zitosol zelularrean metatuz, eta orduan bide alternatiboak aktibatzen dira, hala nola  $\omega$ -oxidazioa; hala, ROS gehiago sortzen dira, eta gorpil zoroa da azkenean. Horrela, hanturazko ingurunea sustatzen da, eta esteatosiak esteatohepatitis egoera dakar.

Tratamenduari dagokionez, neurketarik eraginkorra eta lehen aukerakoa pisu galera da, dietaren eta ariketa fisikoaren bidez. Dietan, ez da argi ikusi makronutrienteen proportzioak aldatzeak HGNA hobetzen duenik; hortaz, gomendagarria da halako pazienteengan kaloriak murriztea. Era berean, fruktosa gutxitzea ere gomendagarria da, azukre sinple horrek eragin negatiboa baitu eritasunaren aurrerabidean: alde batetik, *de novo* lipogenesis estimulatzen duten transkripzio faktoreak aktibatzen ditu (SREBP1c eta ChREBP), eta, bestetik, mitokondriaren  $\beta$ -oxidazioa gutxitzen du [196]. Gainera, garrantzitsua da alkoholik ez edatea, triglizeridoen sintesi hepatikoa nabarmenki areagotu eta beren metaketa errazten duelako. Hala ere, neurri hori nahikoa ez den kasuetan, edo estrategia mota horrekiko atxikidura txikia denean, elikagaietan dauden hainbat

### **Sarrera**

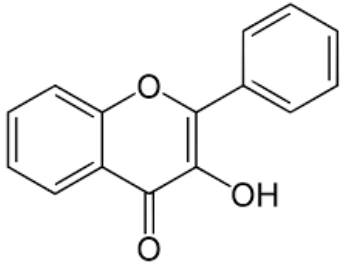
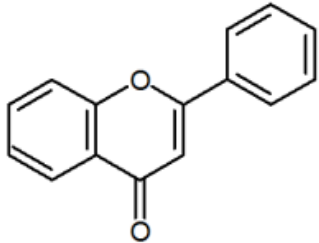
konposatu bioaktibo, horien artean konposatu fenolikoak, tresna eraginkorrak izan daitezke patologiari aurre egiteko.

## 5. Konposatu fenolikoak

Konposatu fenolikoak hainbat jatorritako milaka konposatu biltzen ditu. Landare jatorriko elikagaiek berez dituzte konposatu fenolikoak, eta egitura molekular konplexu ezberdin ugari izan ditzakete. Fenol talde bat edo gehiago duten molekulak dira, eraztun aromatikoa dena, zenbait talde hidroxilori lotuta. Molekula sinpleetatik hasi eta 30000Da-  
ra arteko molekulen polimeroetaraino izan daitezke [197]. Oinarrizko egitura kimikoaren arabera, hainbat familiatan bana daitezke, 3. taulan ikus daitekeenez.

Konposatu fenoliko batzuk ezinbestekoak dira horiek dituzten landareek beren funtzio fisiologikoak bete ahal izateko; beste batzuek, berriz, erasoetatik babesten dituzte, hala nola argi ultramoretik edo patogenoetatik, eta, aldi berean, estresa gutxitzen dute (estres hidrikoa, argitsua...) [198].

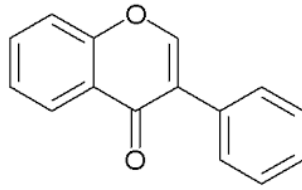
**3. taula.** Konposatu fenolikoaren sailkapena.

Mota	Egitura kimikoa	Azpimota
<b>Flavonoideak</b>		
Flavonolak		<ul style="list-style-type: none"><li>• Kaempferol</li><li>• Kerzetina</li></ul>
Flavonak		<ul style="list-style-type: none"><li>• Apigenina</li><li>• Luteolina</li></ul>



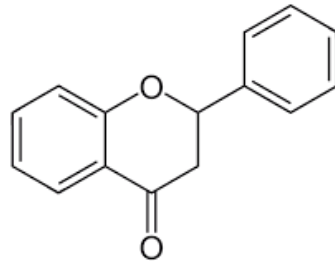
### Sarrera

Isoflavonak



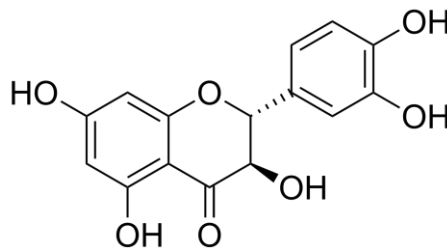
- Daidzeina
- Genisteina

Flavanonak



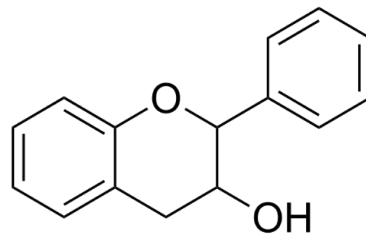
- Naringenina
- Hesperidina

Antocianidinak



- Zianidina
- Delfinidina

Flavan-3-olak

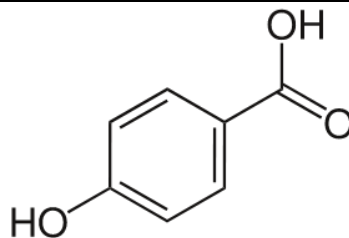


- Katekina
- Epikatekina
- Epigallocatekina
- Gallocatekina

---

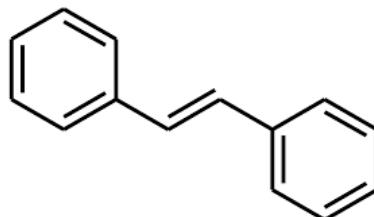
### **Ez-flavonoideak**

Azido  
hidroxybenzoikoak



- Azido galikoa
- Azido vanilikoa

Estilbenoak



- Erresberatrola
- Piceatannola
- Pterosetilbenoa

Azkenaldian, konposatu hauen ikerkuntzak garrantzi handia hartu du, besteak beste 2. motako diabetesa, osteoporosia, gaixotasun kardiobaskularrak, endekapenezko gaixotasunak edo minbizia prebenitzeko dituzten propietateak direla eta.

### **5.1. Bioerabilgarritasuna, garraioa eta iraitzea**

Bioerabilgarritasuna honela defini daiteke: ohiko asimilazio bide metabolikoen bidez digeritu, xurgatu eta metabolizatu ondoren, zirkulazio sistemikora iristen den konposatu baten kantitatea [198]. Konposatu fenoliken abiadura eta xurgapen muga egitura kimikoak zehazten ditu. Garrantzitsua da kontuan hartzea konposatu fenolikoek metabolismo handia izaten dutela hesteetan eta gibelean. Metabolitoak odolean modu askean garraiatzen dira, edo albuminaren gisako proteina plasmatikoekin batera [199]. Xurgatu gabeko konposatu fenolikoak kolonera iristen dira, non hesteetako mikrobioiek metabolizatu egin baititzakete. Era berean, konposatu fenolikoek mikrobiotaren konposizioa alda dezakete. Izan ere, konposatu fenolikoek eragiten dituzten efektu batzuk hesteetako mikrobiotaren modulazioaren bidez gertatzen dira. In vitro azterketen, azterketa aurreklinikoaren edo klinikoaren egungo ebidentziak iradokitzen du koloneko minbiziaren eta gaixotasun kardiobaskularren gaineko ondorio onuragarrien zati bat bakterioen azpitaldeetan izandako aldaketekin lotzen dela, hala nola *Bacteroides*, *Lactobacillus* edo *Bifidobacterium* [200]. Ildo horretan, nabarmentzekoa da hesteetako bakterioen kontzentrazioan eta banaketan norbanakoen arteko aldakortasunak eragina izan dezakeela konposatu fenoliken ondorioen erantzunean [201].

Xurgatutako konposatu fenolikoak edo metabolitoak behazun bidetik edo gernu bidetik iraitzen dira. Gernuko konposatu fenoliken kopurua odolean zirkulatzen duen konposatu motaren arabera da, eta zuzenki proportzionala plasman duen kontzentrazioarekiko. Adibidez, ardoa edan ondoren xurgatutako katekinen % 2 eta % 10,3 artean gernu bidez iraitzen dira. Erresberatrolaren kasu zehatzean, irentsi eta lehenengo 4 orduetan kanporatzen da, eta iraitzen den kopurua irensten den unearen, kontzentrazioaren edo elikagaiaren arabera da. Harekin batera jaten den elikagai motaren arabera ere bada. Horrela, ardo beltz gisa barik mahats ateratze formatuan edanez gero, lau alderantziz atzeratzen dela egiaztatuta da [202].

## 5.2. Mahatsaren konposatu fenolikoak

Hainbat azterlanek mahatsaren osagaiak aztertu dituzte (nagusiki zuntza eta konposatu fenolikoak [203]). Mahatsen konposatu fenolikoak larruazalean, hazietan eta adarretan daude, batez ere. Flavonoideen artean, antozianidinak, proantozianidinak eta flavanolak daude; ez-flavonoideen artean, berriz, azido hidroxiznamikoak. Mahatsaren konposatu fenolikoaren profila faktore askoren arabera da, baina garrantzitsuenetakoa mahats barietatea da. 4. taulan, gure ingurunean ohikoak diren mahats barietateen larruazalean eta hazietan (mahats estraktuen oinarritzko osagaiak) dauden konposatu fenolikoak alderatzen dira.

**4. taula.** Konposatu fenolikoak mahats-barietate desberdinetan.

	<b>Tempranillo</b>	<b>Graciano</b>	<b>Cabernet Sauvignon</b>
<b>Azala</b>			
Polifenol totalak	18,0mg/g	16,2 mg/g	11,6 mg/g
Antocianidinak	596 mg/g	565 mg/g	553 mg/g
Katekinak	8,1 mg/g	0,50 mg/g	2,05 mg/g
Proantozianidinak	27,7 mg/g	25.4 mg/g	17,3 mg/g
<b>Haziak</b>			
Polifenol totalak	22,3 mg/g	28,5 mg/g	21,8 mg/g
Katekinak	54,6 mg/g	117 mg/g	76,3 mg/g
Proantozianidinak	40,7 mg/g	57,2 mg/g	53,9 mg/g

Monagas *et al.* (2006)-tik moldatua [204].

4. eta 5. tauletan ikus daitekeen bezala, mahatsaren konposatu fenolikoaren profila ere fruitaren atalaren arabera da, larruazalaren arabera (azala, haziak edo adarra), alegia. Mahatsaren estraktuei dagokienez, erauzketa teknikak eta horiek bereizteko eta kuantifikatzeko erabilitako metodologiak ere badute eragina [205].

Landareaz kanpoko faktoreak ere badaude, konposatu fenolikoaren profilean eragina duten hazkunde-zirkunstantziei lotuta (nekazaritza-ingurumeneko faktoreak). Laborantza-baldintzei dagokienez, lurzoruan nutriente jakin batzuk egoteak edo ez egoteak eragina

## Sarrera

izan dezake fruta eta barazkien konposizio fitokimikoan, bai kualitatiboki, bai kuantitatiboki. Klima beste alderdi garrantzitsu bat da, eta, beraz, eremu desberdinetan landutako barietate bereko fruituek konposatu fenoliko desberdinen edukiak dituzte. Hazkunde-etapetako tenperatura altuek mahatsaren antozianinen sintesia gutxitu dezaketela frogatu da [206]. Bestalde, mahatsaren zikloaren loratze-etapako egoera hidrikoak eragin positiboa du konposatu fenoliken sintesian; heldutasun-etapetan, berriz, antozianinen eta konposatu fenoliken sintesia handitu egiten da defizit hidrikoekin [207]. Fruta eta barazki desberdinen heldutasun-egoerak ere eragin nabarmena du konposizio fitokimikoan. Produktu guztietarako patroi orokorrik aurkitu ez den arren, oro har, fruitu heldugabeek konposatu polifenoliken maila eta antozianina totalen eduki txikiagoa dute [208].

### 5. taula. Mahatsaren zati ezberdinetan dauden konposatu fenoliko nagusiak

Mahatsaren zatia	Fitokimiko nagusiak
<b>Azala</b> 	<ul style="list-style-type: none"><li>• Antozianidinak</li><li>• Kerzetinaren eratorriak</li><li>• Kampferolaren eratorriak</li><li>• Katekinak</li><li>• Erresberatrola</li><li>• Azido klorogenikoa</li></ul>
<b>Haziak</b> 	<ul style="list-style-type: none"><li>• Katekinak</li><li>• Azido klorogenikoa</li><li>• Kerzetinaren eratorriak</li><li>• Erresberatrola</li></ul>
<b>Adarrak</b> 	<ul style="list-style-type: none"><li>• Azido kaftariko koutarikoa</li><li>• Kerzetinaren eratorriak</li><li>• Kampferolaren eratorriak</li><li>• Miricetinaren eratorriak</li><li>• Katekinak</li><li>• Astilbina y engeleina</li></ul>

Modificado de Averilla *et al.* (2020)-tik moldatua [209].

### **5.3. Mahatsaren konposatu fenoliken ondorioak**

#### *5.3.1. Presio arteriala*

Zenbait azterlanen arabera, mahatsaren konposatuek presio arteriala murriz dezakete, hala sistolikoa nola diastolikoa. Esate baterako, Sivaprakasapillai et al.-ek (2009) dosi desberdinetako mahats estraktu baten ondorioak aztertu zituzten sindrome metabolikoa zuten pazienteengan, eta presio arterial sistoliko eta diastolikoa 11 mmHg-ra jaisten zela ikusi zuten, modu dosidependentean [211]. Hala ere, Li et al.-ek (2015) argitaratutako meta-analisi batean, hobekuntzak apalagoak izan ziren: 1,48 mmHg-ko murrizketa presio arterial sistolikoan eta garrantzi estatistikorik eza presio arterial diastolikoan [210]. Hipertentsio motari dagokionez, azterlan gutxitan ikertu dira mahats polifenolak aurrehipertentsioa edo lehen mailako hipertentsio arteriala duten subjektuengan, eta emaitzarik argienak hipertentsio handieneko pertsonengan behatu dira.

#### *5.3.2. Odoleko lipidoak*

Lehen aipatu bezala, kardiopatieta eragina duen eta sindrome metabolikoa sortzen duen faktore bat dislipemia da. Konposatu fenolikeok kolesterol kontzentrazioa alda dezakete, xurgapena eta gibelerako garraioa murriztuz, eta hori kolesterolaren kontzentrazio plasmaticoaren murrizketan islatzen da. Gainera, A eta B apolipoproteinei ere eragiten diete, arrisku kardiobaskularreko faktoreak baitira; VLDL partikulak aldatu eta triglizeridoen kontzentrazio plasmaticoak gutxitzen dituzte, horrela lipoproteina lipasaren (LPL) jarduera handituta, eta horrek, aldi berean, LDL zirkulatuzaileen kontzentrazioak murrizten ditu [211].

Gainera, mahatsetik eratorritako konposatu fenolikeok LDLren oxidazioa eta, beraz, aterosklerosiaren garapena eragozten dituztela frogatu da [212,213]. Hain zuzen ere, mahatsaren konposatu fenolikeok estres oxidatiboan eragiten dutela erakutsi dute, eta horrek hainbat mailatan eragin ditzake kalteak, honako patologia hauekin lotuta: asma, gaixotasun kardiobaskularrak, diabetesa eta gaixotasun buxatzaile kronikoa (BGBK). Mahatsaren konposatu fenolikeok estres oxidatiboaren kontrolean duten eraginaren adibide batzuk Gaztela *et al.*-ek (2008) edo Albers *et al.*-ek (2004) eginiko ikerketan ikusi ziren: mahats zukuko suplementazio baten ondoren, superoxidoa (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) murriztu egin zen; kalte genikoa ere gutxitu egin zen, estres oxidatiboaren adierazle gisa [213,214].

#### *5.3.3. Glukosaren metabolismoa eta diabetesa*

Duela gutxi, mahatsen konposatu fenolikoek diabetesaren prebentzioan eta tratamenduan dituzten ondorioak ikertu dituzten hainbat azterlan deskribatu dira. Ikerketa gehienak in vitro edo animalia ereduetan egin dira, eta gizakiengan egindako gehienek 2. motako diabetesa izan dute ardatz. Adibidez, ardoaren kontsumo neurritsuak % 30era murriz dezake 2. motako diabetesa izateko arriskua [203]. Ondorio hori justifikatzeko, bibliografia zientifikoan gehien onartutako mekanismoetako bat IRS1 fosforilatua serina aminoazidoan da, eta glukogeno sintasa zinasaren 3/glukogeno sintasaren bidea gibelean aktiba ez dadin prebenitzea. Beste jardunbide bat muskuluan FOXO1en eta PPAR $\gamma$ ren espresioa areagotzea izan liteke. Orobat, mahatsaren konposatu fenolikoek glukosaren metabolismoa zeharka aldatzen dutela frogatu da, mikrobiotaren gainean egikaritzen duten ekintzaren bidez. Horren adibide, *bifidobacterium* bakterioak, mahats estraktu bat hartzean areagotu egiten direnak [215]. Hala ere, Ramos-Romero et al.-ek (2020) ikusi zuten organismoko mikrobiota azpitalde ugarienek ez zituztela mahats estraktu batek intsulina mailan dituen ondorio onuragarriak erregulatzen [216].

#### 5.3.4. Beste batzuk

Mahatsaren konposatu fenolikoen suplementazioak eragiten dituen beste ondorio batzuk plaketen antiagregazioa, mekanismo kardiobabesletzat hartzen dena, eta fibrilazio aurikularraren prebentzioa dira, nahiz eta ebidentzia oraindik urria izan esparru horietan [217,218].

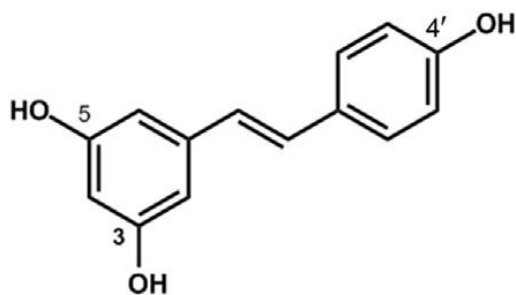
#### 5.4. Pteroestilbenoa

Estilbenoideak landareetan, olio aromatikoetan eta landare jangarrietan oparotasunez dauden konposatu fenolikoen multzoa dira. Konposatu horien artean, erresberatrola (3,5,4-trihydroxystilbene) nabarmentzen da, hainbat elikagaietan dagoen polifenola baita, hala nola mahatsean eta haren eratorrietan (ardo beltza), fruitu gorrietan, pistatxoetan edo kakahueteetan. Azken urteotan, konposatu fenoliko hau asko aztertu da, ondorio onuragarri ugari dituelako: ekintza antioxidatzailea, sirtuinaren bidearen aktibazioa, intsulinarekiko sentikortasunaren eta glukosarekiko tolerantziaren hobekuntza, lipolisia areagotzea besteak beste [219].

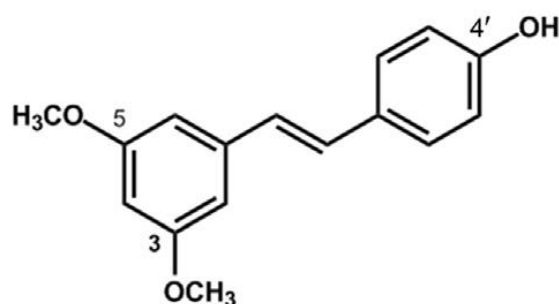
Pteroestilbenoa (3,5-dimethoxy-4-hydroxy-trans-stilbene) erresberatrolaren deribatu dimetoxilatu natural bat da (8.irudia), lehen aldiz sandalotik atera zena, eta, batez ere, mahatsean, ahabian eta egurrean dago [220-222]. Konposatu hau erresberatroletik

## Sarrera

bereizten da hidroxiki taldearen ordez metoxi taldea daukalako 3' eta 5' posizioetan. Horrek hesteetan eta gibelean duen metabolizazioa gutxitzen du, eta, horrela, haren bioerabilgarritasuna handitu egiten; gainera, zelulen barrualdera errazago garraiatzen da, egitura lipofilikoa duelako [223].



Erresberatrola



Pteroestilbenoa

8. irudia. Pteroestilbenoaren eta resveratrolaren egitura kimikoa. Imagen extraída de Tsai *et al.* (2017)-tik moldatua [224].

Pteroestilbenoaren ondorioak direla eta, hanturaren aurkako gaitasuna duela frogatu da, IL6, TNF $\alpha$  eta erretikulu endoplasmatikokoaren estresarekin lotutako proteinen ekoizpena inhibituta, bai eta hanturaren aldeko geneen (prostaglandina-endoperóxido sintasa 2 (COX-2), oxido nitrico sintasa induzigarria (iNOS), interleukina-6 (IL-6), tumoreen nekrosi-faktorea-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), monozitoen proteina kimioerakarlea 1 (MCP-1) eta 1-plasminogenoaren aktibatzailearen inhibitzailea (PAI-1)) espresioa gutxitzen duela ere [225].

Bestalde, egiaztatuta dago pteroestilbenoak estres oxidatiboa eta oxigeno espezie errektiboen ekoizpena murrizten dituela, hala nola hidrogeno peroxidoa edo superoxido anioia, zeinak zenbait patologiararen hasieran eta garapenean esku hartzen duten. Horrela, pteroestilbeno bidezko tratamenduek oxigeno-espezie errektiboekin lotutako patologietan eta zahartze prozesuaren aurrerabidean onura argiak dituztela baieztatu da [226]. *In vitro* ikerketek agerian utzi dute hainbat zelula lerrotan molekula horren eraginpean egoteak hainbat antioxidatzailearen ekoizpena areagotzen duela, katalasa, glutatioi totala, glutatioi peroxidasa, glutatioi erreduktasa eta superoxido dismutasarena, esate baterako [227].

Era berean, pteroestilbenoak diabetesaren aurka egiten duela frogatu da, pankrea zelulen ekintza zitobabeslea eta estres oxidatiboaren murrizketa direla eta, NF-E2-related factor 2 (Nrf2) tarteko [228]. 1. motako diabetesa zuten animaliekin egindako ikerketa baten arabera, pteroestilbenoa egunean 20 mg/kg-ko dosian hartzea metformina (ohiko erabilera duen antidiabetikoa) egunean 30 mg/kg-ko dosian hartzea bezala da, antzeko efektuak ditu; hala, konposatu fenolikoak hainbat ehunetan intsulinaren antzeko eragina duela ondorioztatu zen [229]. Bestalde, Sireesh *et al.*-en (2017) argitalpenaren arabera, pteroestilbenoak zelulen heriotzatik eta hanturaren aldeko zitokinek eragindako kalte pankreatikotik babesteko ere balio du [230]. Glukosaren eta intsulinaren kontzentrazio serikoak hobetzeaz gain, egunean 10 mg/kg-ko pteroestilbeno dosiarekin tratatutako animaliek interleukina 1  $\beta$ , tumore nekrosi  $\alpha$  faktorea eta interferoi  $\gamma$  (zelula pankreatikoetanondorio kaltegarriak dituzten zitokinak) kontzentrazio txikiagoak izan zituzten odolean nahiz pankrean. Alta, antzeko beste azterketa batean, 1. motako diabetesa zuten saguak glibenklamidarekin tratatu ziren (sulfonilurea bat), egunean 600 mg/kg/-ko dosia emanez, edo pteroestilbenoa egunean 10 edo 5 mg/kg-ko dosian, edo bi konposatuen konbinazioa emanez. Bada, behatu zutenez, kontrol gluzemikoa hobetu egin zen, bai antidiabetikoarekin tratatutako taldean bai bi konposatuekin tratatutako taldean, baina ez pteroestilbenoarekin tratatutako taldean.

2. motako diabetesari dagokionez, pteroestilbenoak ahozko antidiabetikoek eragindako antzeko ondorioak ere izan ditzake, hemoglobina glikosilatuaren balioak gutxituta, eta hexokinasaren eta glukosa 6P-deshidrogenasaren jarduera handituta. Hala, ondoriozta daiteke pteroestilbenoak 2. motako diabetesaren kontrol gluzemikoa hobetzen duela animalia erduetan [231]. Diabetesa garatu aurreko fasean, intsulinaren aurkako erresistentzia dagoela ikusten denean, pteroestilbenoak glukosa eta intsulina kontzentrazioak ere hobetzen ditu animalia erduetan. Adibide bat gure taldean egindako azterlanekoa: HOMA-IR-ren beherakada eta glukosarekiko tolerantzia testaren hobekuntza agerian geratu ziren pteroestilbenoarekin (egunean 15 mg/kg) tratatutako animalietan [232]. Efektu hori kardiotropina 1en eta GLUT4ren espresio proteikoa handituz, AKParen fosforilazioa, eta glukokinasaren jarduera areagotzearen ondorioz gertatu zen, besteak beste.

Ikerketa gutxik aztertu dituzte pteroestilbenoak gibleko esteatosian dituen ondorioak. Hala ere, gibleko estres oxidatiboa gibleko esteatosia garatzen laguntzen duen elementu



garrantzitsua da, eta, hortaz, aipatu bezala, pteroestilonalak zeharkako ondorio onuragarriak izan ditzake bide horretatik. Adibidez, Satheesh *et al.*-ek (2006) behatu zuten arratoi diabetikoen kasuan pteroestilonoak TBARSen eta hidroperoxido lipidikoen mailak jaisten zituela, besteak beste, eta ondorioztatu zuten konposatu fenoliko horrek gibelaren estres oxidatiboa eta, ondorioz, esteatosi hepatikoaren progresioa hobetzen dituela [233].

Dislipemia ere hobetu egiten da konposatu fenoliko honen eraginez. Animalia ereduetan egindako ikerketetan, pteroestilbenoak LDL eta VLDL mailak murriztu, eta HDL mailak handitzen dituela frogatu da, triglizeridoak, gantz azido askeak eta fosfolipidoak murrizteaz batera, arratoi diabetikoetan [234]. Rimando *et al.*-ek (2005) ikusi zuteneguz, hamsterren ohiko dieta pteroestilbenoarekin osatuz gero, kolesterol totala eta LDLren kontzentrazio plasmaticoak % 18 eta % 29 gutxitzen ziren, hurrenez hurren, eta HDLrenak % 7 hazten. Bhakkiyalakshmi *et al.*-ek (2016) frogatu zuten egunean 5 edo 10 mg/kg-ko pteroestilbeno dosia nahikoa zela kolesterol totalaren, LDLren eta triglizeridoen kontzentrazioak nabarmen murrizteko; hala ere, egunean 10 mg/kg-ko dosiak baino ez zuen areagotu HDLren kontzentrazioa [223].

Pteroestilbenoak dislipemian duen eragin mekanismoari dagokionez, uste da metoxi taldeek paper garrantzitsua dutela PPAR $\alpha$  aktibatzeke orduan, konposatu hori transkripzio faktore horren agonista gisa jarduten duelako eta, horrela, hiperlipidemia murriztu egiten delako. Nolanahi ere, kontuan izan behar da emaitza hauek ezin direla gizakiengana estrapolatu. Izan ere, Riche *et al.*-ek (2014) ez zuten aldaketarik ikusi triglizeridoen kontzentrazioan dislipemia zuten eta pteroestilbenoarekin tratatu ziren pertsonengan; are gehiago, LDLren kontzentrazioak handitu egin ziren [235].

Pteroestilbeno bidezko tratamenduaren segurtasunari dagokionez, alderdi hori gizakiengan aztertzen duen bibliografia urria den arren, frogatuta dago konposatu fenoliko honek ez duela toxikotasun arazorik sortzen. Riche *et al.*-ek (2014) egindako ikerketan, dislipemia zuten helduei egunean 250 mg pteroestilbeno eman zieten, eta ez zen kontrako ondorioirik deskribatu [235]. Hortaz, pteroestilbeno molekula segurutzat jo daiteke, etorkizunean gaiaren gaineko ikerketa gehiago egin beharko badira ere.

## **Objetivos**

# Objetivos

## Objetivos

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es analizar el papel de los microRNAs y las adipokinas como biomarcadores de pronóstico o de respuesta a tratamientos, en diferentes situaciones fisiopatológicas, así como su posible papel mediador de los efectos de moléculas bioactivas.

A continuación, se describen los diferentes objetivos específicos:

### **Implicación de los microRNAs en los efectos del pterostilbeno en la esteatosis hepática en rata (manuscrito 1)**

1. Analizar la posible mediación de los microRNAs en los efectos beneficiosos producidos por el pterostilbeno en la esteatosis hepática no alcohólica, en un modelo animal de obesidad genética.

### **Estudio del efecto de los hollejos de uva en pacientes con síndrome metabólico. Empleo de los microRNAs como biomarcadores (manuscritos 2 y 3)**

2. Analizar el papel de los microRNAs como biomarcadores de respuesta en los efectos de los hollejos de uva en el control glucémico, en personas que padecen síndrome metabólico.

3. Analizar el papel de los microRNAs en el mecanismo de acción de una suplementación con hollejos uva en el control glucémico de pacientes con síndrome metabólico.

### **Estudio de adipokinas como biomarcadores en niños con bajo peso o talla al nacer (manuscritos 4 y 5)**

4. Comparar las concentraciones de las adipokinas en niños nacidos pequeños para la edad gestacional con distintas velocidades de crecimiento.

5. Analizar la existencia de posibles diferencias en las concentraciones de adipokinas entre niños y niñas.

6. Analizar la evolución de las concentraciones de adipokinas durante los primeros 2 años de vida.

### **Objetivos**

7. Analizar la asociación de diferentes parámetros antropométricos y bioquímicos con la concentración de chemerina circulante.

# Helburuak

## Helburuak

Doktoretza tesi honen helburu nagusia da mikroRNAek eta adipokinek egoera fisiopatologikoetan tratamenduei erantzuteko edo pronostikorako biomarkatzaile gisa duten zeregina aztertzea, baita molekula bioaktiboen efektuen bitartekari izan daitekeen eginkizuna ere.

Helburu zehatzak, berriz, honako hauek dira:

### **MikroRNAen inplikazioa pteroestilbenoak arratoien esteatosi hepaticoan dituen ondorioetan (1. eskuizkribua)**

1. Pteroestilbenoak esteatosi hepatico ez-alkoholkoa duen obesitate genetikoko animalia-eredu batean sortutako efektu onuragarrietan mikroRNAek izan dezaketen bitartekotza aztertzea.

### **Sindrome metabolikoa duten pazienteengan mahats-patsaren eragina aztertzea.**

#### **MikroRNAk biomarkatzaile gisa erabiltzea (2. eta 3. eskuizkribuak)**

2. MikroRNAen zeregina aztertzea, mahats-nasaiek kontrol gluzemikoan dituzten ondorioei erantzuteko biomarkatzaile gisa, sindrome metabolikoa duten pertsonengan.

3. Sindrome metabolikoa duten pazienteen kontrol gluzemikoan mahats-patsez egindako elikadura-osagarriaren ekintza-mekanismoan mikroRNAen zeregina aztertzea.

#### **Jaiotzean pisu edo neurri txikia duten haurren adipokinak biomarkatzaile gisa aztertzea (4. eta 5. eskuizkribuak)**

4. Adipokinen kontzentrazioak konparatzea hazkunde-abiadura desberdinak dituzten haurdunaldirako txiki jaiotako haurren.

5. Bi sexuen artean adipokinen kontzentrazioetan izan daitezkeen desberdintasunak aztertzea.

6. Adipokinen kontzentrazioek bizitzako lehenengo bi urteetan duten bilakaera aztertzea.

### **Helburuak**

7. Parametro antropometriko eta biokimikoen eta chemerina zirkulatzailaren kontzentrazioaren arteko erlazioa aztertzea.



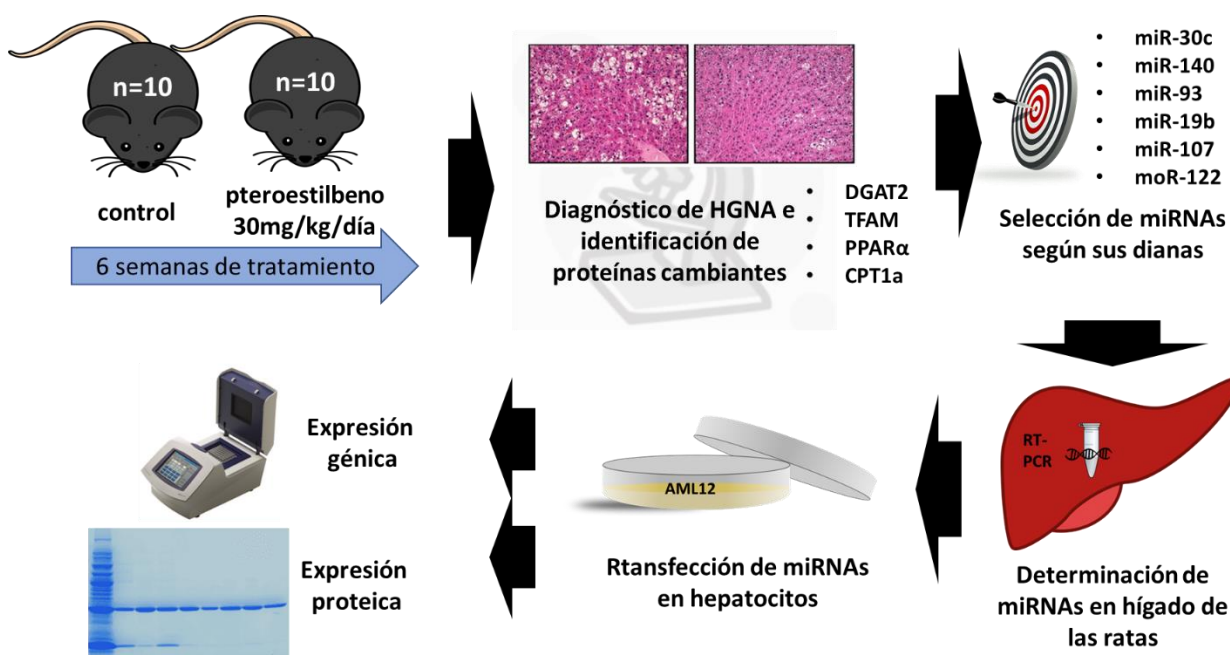
# Diseño experimental y metodología



## 1. Implicación de los microRNAs en los efectos del pteroesstilbena en la esteatosis hepática en rata

### 1.1. Animales y determinación de la esteatosis

Para llevar a cabo este estudio, se utilizaron 20 ratas Zucker (*fa/fa*) de 5 años de edad. Los animales se estabularon en jaulas metabólicas y se mantuvieron en una sala aislada a una temperatura constante de  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ , con ciclos de luz/oscuridad de 12h, tras un periodo de adaptación de 6 días. Las ratas se separaron en 2 grupos de 10 animales y se alimentaron con una dieta estándar de laboratorio con acceso libre a agua. Al grupo tratado se le administró pteroesstilbena, a una dosis de 30 mg/kg/día, mediante un catéter orogástrico, mientras que al grupo control se le administró una solución salina por la misma vía. Diariamente se midieron tanto el peso de los animales como la ingesta de comida. El estudio fue aprobado por el comité de ética de la UPV/EHU (ref. CEEA14/018).



**Figura 9.** Diseño experimental del primer proyecto.

Tras finalizar esta fase experimental, y pasar un periodo de ayuno de 8-12h, las ratas fueron sacrificadas mediante punción cardíaca, por exanguinación, bajo anestesia general.

## **Diseño experimental y metodología**

Se extrajo la sangre y se diseccionó el hígado, que fue pesado y congelado en nitrógeno líquido, y almacenado a -80 °C hasta su posterior análisis. La sangre obtenida por exanguinación fue centrifugada a 1000g durante 10 minutos a 4°C para extraer el suero.

La esteatosis fue determinada histológicamente por dos patólogos expertos tras analizar las muestras con sus identificaciones enmascaradas. Se llevó a cabo una tinción del tejido hepático con hematoxilina y eosina y se analizaron las muestras por microscopía a 40x, utilizando la escala de Brunt [239].

### ***1.2. Selección de miRNAs***

Se seleccionaron miRNAs atendiendo a tres criterios. Por un lado, miRNAs que en experimentos previos de nuestro grupo demostraron estar involucrados en los efectos positivos del resveratrol en la esteatosis hepática, por otra aquellos que habían demostrado en la bibliografía mediar los efectos de otros compuestos fenólicos y finalmente los que de acuerdo con las bases de datos consultadas (miRecords y miRbase) tenían como dianas potenciales o validadas las proteínas involucradas en el metabolismo lipídico que en esta cohorte de ratas habían sido modificadas por el tratamiento con pterostilbeno.

### ***1.3. Cultivos celulares y transfecciones***

Se llevó a cabo un cultivo celular con hepatocitos murinos AML12 en un medio de cultivo preparado con 1:1 DMEM/HAM'S F12, que contenía suero fetal bobino (FBS), dexametasona, insulina, transferrina, selenio y penicilina/estreptomicina. El medio se cambió cada 2 días y las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>.

Los hepatocitos en una confluencia del 80-90% fueron transfectados con los “mimics” de cada uno de los miRNAs o un control negativo mediante el uso de lipofectamina. Además, la efectividad de la transfección se comprobó transfectando al mismo tiempo sondas con fluorescencia. De manera adicional, se comprobó por RT-PCR la correcta transfección de cada uno de los miRNAs.

### ***1.4. Expresión de los miRNAs y las proteínas***

### **Diseño experimental y metodología**

Los miRNAs totales fueron extraídos del tejido hepático y de las células transfectadas usando un kit comercial (miRNeasy), de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Tras un proceso de retrotranscripción, se realizó la RT-PCR en un termociclador CFX96™–MyiQ™ programado con los parámetros especificados por el fabricante de las sondas de cada miRNA. Los resultados fueron normalizados utilizando como “housekeeping” el miR-191-5p. Los datos obtenidos se describieron como cambios en los umbrales de ciclo (Ct) respecto a los controles, mediante el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  [240].

En cuanto a la medición de concentraciones de proteínas, se extrajeron las proteínas totales de las células AML12 mediante un tampón de lisis según protocolos validados, cuya concentración total de proteínas se midió utilizando un kit comercial de ácido bicinconínico [241]. La concentración de cada proteína se midió mediante la técnica western blot. Para ello, primero se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida de diferentes concentraciones dependiendo el peso molecular de cada proteína, y a continuación se traspasaron por electrotransferencia a membranas PVDF. La correcta carga se confirmó mediante Azul Comomassie. Las membranas fueron bloqueadas con caseína fosfato y fueron cultivadas con el anticuerpo primario (durante toda la noche) y secundario (durante dos horas) correspondientes. Finalmente, la cuantificación se llevó a cabo mediante un sistema de imagen ChemiDoc MP. La  $\beta$ -actin fue utilizada como proteína control.

#### ***1.5. Análisis estadístico***

Para el análisis estadístico se utilizó el programa IBM SPSS Statistics v.26. La distribución de los datos se comprobó con el test de Shapiro-Wilk, y las medias se compararon mediante la  $t$  de Student o U de Mann-Whitney según su normalidad

Los detalles del protocolo están descritos en el manuscrito 1.

## **2. Estudio del efecto de los hollejos de uva en pacientes con síndrome metabólico. Empleo de los microRNAs como biomarcadores**

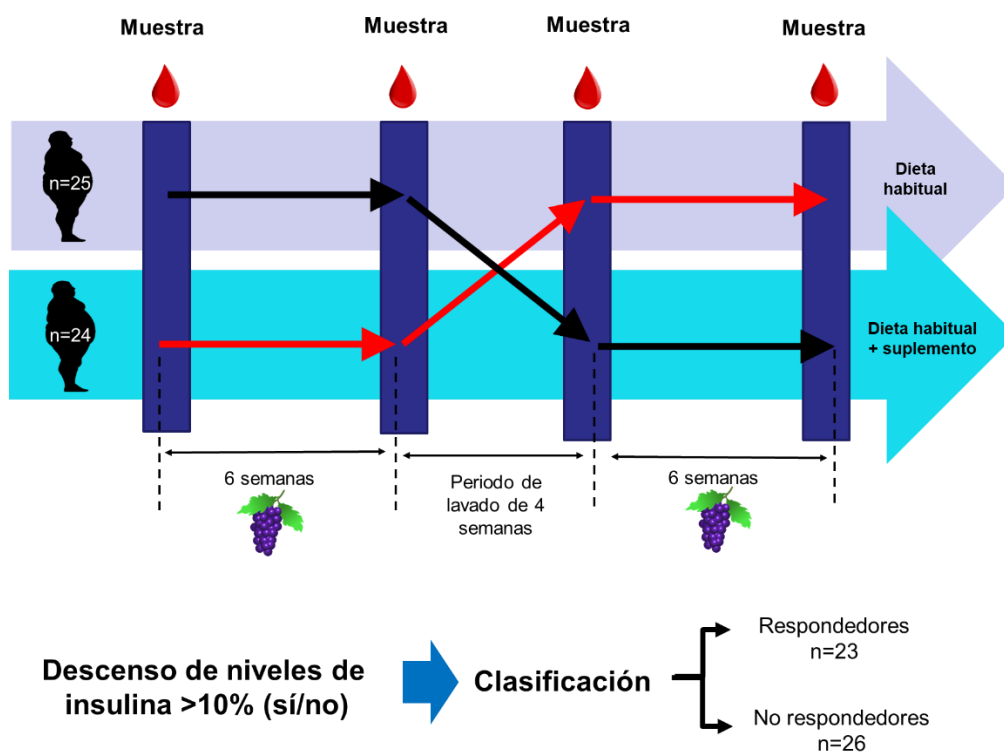
### **2.1. Orujo de uvas**

El extracto de uvas se obtuvo de uva (*Vitis Vinifera*) de la variedad Tempranillo en el momento de su recolección. Se liofilizaron y se trituró el producto, que fue dividido en dosis individuales de 8 g. Estas alícuotas se conservaron en todo momento a una temperatura de -20°. En el extracto, se describió un 6,22% de polifenoles extraíbles y un 23,44% de no extraíbles. El 68,23% era fibra insoluble.

### **2.2. Sujetos y clasificación**

En un estudio de intervención aleatorizado y cruzado, se tomó una muestra de 49 sujetos con al menos 2 factores de riesgo de síndrome metabólico [242]. Durante los dos periodos experimentales, de 6 semanas cada uno, se suplementó la dieta habitual de los participantes con 8 g del extracto de uva y entre ambos periodos, se estableció una etapa de lavado (wash-out) de 2 semanas. No se utilizó placebo para el grupo control. Se extrajeron muestras de sangre antes y después de cada uno de los dos periodos. Estas muestras se centrifugaron para obtener el plasma y a continuación se congelaron a -80°C para su posterior análisis. Tras finalizar este proceso, los participantes se clasificaron en respondedores y no-respondedores, tomando como criterio haber tenido una reducción de los niveles de insulina en ayunas mayor del 10% para clasificar a alguien como respondedor.

## Diseño experimental y metodología



**Figura 10.** Diseño experimental del segundo proyecto.

### **2.3. Secuenciación y cuantificación de miRNAs**

En una muestra representativa de 8 sujetos por cada grupo, se llevó a cabo una Secuenciación de Nueva Generación (NGS) donde se identificaron miRNAs que se expresaron de forma diferente en cada grupo. A continuación, se comprobaron las diferencias observadas en la cohorte completa, comparando tanto los grupos de respondedores y no respondedores como los cambios en la expresión producidos después del periodo experimental en comparación con su estado basal. Para ello se extrajo el RNA total (incluyendo miRNAs) mediante un kit comercial, y se retrotranscribieron los miRNAs para obtener DNA complementario (cDNA). A través de RT-PCR a tiempo real se cuantificó la expresión de los miRNAs en un termociclador CFX96–MyiQ Real-Time System. Los valores obtenidos fueron normalizados utilizando el miR-191-5p como housekeeping. Los datos obtenidos se expresaron como cambios en los umbrales de ciclo (Ct) respecto a los controles, usando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [240].

#### **2.4. Búsqueda de dianas**

Las dianas validadas y/o predichas se identificaron mediante la base de datos miRecords. Después, mediante la base de datos Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), se buscó en qué rutas metabólicas relacionadas con el control glucémico podrían estar involucrados los genes diana.

#### **2.5. Análisis estadístico**

El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa IBM SPSS Statistics v.24. La normalidad se comprobó mediante el test de Shapiro–Wilk y la homocedasticidad de los datos. Las comparaciones entre muestras independientes se hicieron con las pruebas *t* de Student o la U de Mann-Whitney, mientras que en el caso de las muestras pareadas se utilizaron las pruebas *t* de Student para muestras pareadas o el test de rangos con signo de Wilcoxon, en función de si la distribución era o no normal.

Los detalles del protocolo están descritos en los manuscritos 2 y 3.

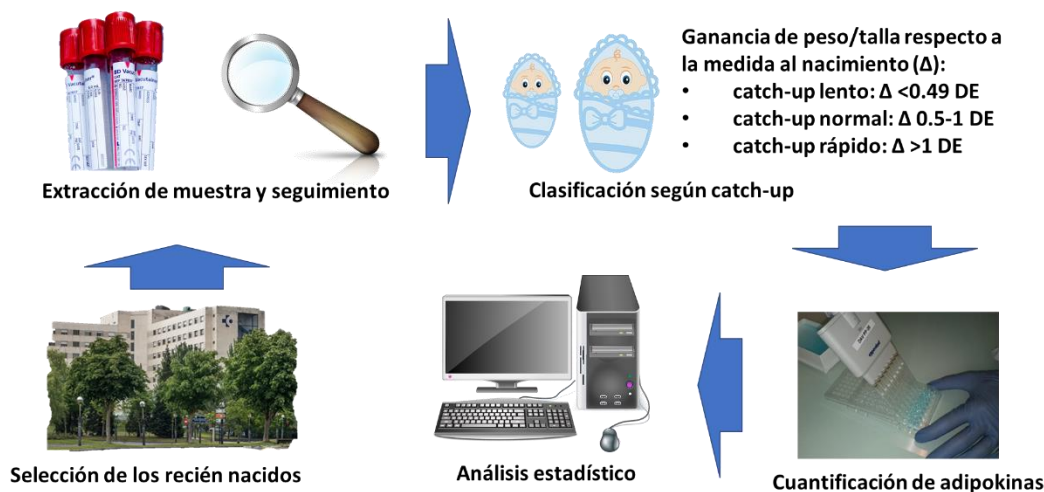
### **3. Estudio de adipokinas como biomarcadores en niños con bajo peso o talla al nacer**

#### **3.1. Selección y de participantes**

Se trabajó en una muestra representativa de 27 sujetos procedentes de la cohorte del estudio EPIPEG, con la aprobación del comité de ética del HUA-Txagorritxu (Ref. 2012-050) y tras la firma de un consentimiento informado por parte de los progenitores.

Se seleccionaron niños nacidos vivos en el hospital de Txagorritxu-HUA en el periodo comprendido entre junio de 2013 hasta marzo de 2015. Se eligieron sujetos clasificados como PEG, es decir, que presentaban un peso y/o talla al menos 2 desviaciones estándar (DE) por debajo de la media determinada por las curvas de crecimiento españolas [243]. Los criterios de exclusión fueron: niños no caucásicos, embarazos múltiples, evidencias de malformaciones genéticas y no sobrevivir a las primeras 24 horas. Todas las madres refirieron haber tenido un embarazo normal sin exposición a tóxicos o complicaciones gestacionales.





**Figura 11.** Diseño experimental del tercer proyecto.

### ***3.2. Visitas y clasificación según catch-up***

Los parámetros antropométricos fueron registrados al nacimiento, a los 3 meses, a los 12 meses, a los 18 meses, a los 24 meses y a los 4 años de vida. Durante estas visitas también se recogió información sobre parámetros como el tipo de lactancia además de los recogidos por protocolo. El tipo de catch-up se estableció comparando la talla y peso al nacer con la talla/peso en la segunda visita (12 meses):

- catch-up lento  $\Delta < 0.49$  DE
- catch-up normal  $\Delta 0.5-1$  DE
- catch-up rápido  $\Delta > 1$  SD

### ***3.3. Extracción de muestras de sangre y determinación de parámetros bioquímicos***

A los 3, 12 y 24 meses se extrajeron muestras de sangre venosa de los niños, utilizando tubos con ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), tras un periodo de ayuno de al menos 5 horas. El suero se utilizó para medir los parámetros bioquímicos habituales para este segmento poblacional en el medio hospitalario y las valoraciones adicionales requeridas por el estudio.

### ***3.4. Determinación de adipokinas***

### **Diseño experimental y metodología**

La determinación de adipokinas se llevó a cabo en las muestras de suero utilizando kits de ELISA comerciales. Las referencias de los mismos son: RD191001100 (BioVendor, Brno, Czech Republic) para leptina, (RD195023100 (BioVendor, Brno, Czech Republic) para adiponectina, (D191100200R (BioVendor, Brno, Czech Republic) para omentina, ab155430 (Abcam, Cambridge, UK) para chemerina, RD191097200R (BioVendor, Brno, Czech Republic) para vaspina, y ab193710 (Abcam, Cambridge, UK) para NOV/CCN3.

#### **3.5. Análisis estadístico**

La normalidad de los datos se determinó mediante el test de Saphiro-Wilk. Las comparaciones entre muestras pareadas se hicieron con la prueba de  $t$  de Student para muestras pareadas o el test de rangos con signo de Wilcoxon. En el caso de las muestras no relacionadas, se usó la prueba  $t$  de Student o la U de Mann-Whitney, dependiendo de la normalidad de la muestra. Para el análisis de las correlaciones bivariadas se utilizó la  $r$  de Peason o la  $\rho$  de Spearman, según la distribución de los datos. Las variables cualitativas, se compararon utilizando a prueba  $\chi^2$ . Se utilizó la versión 22 del programa IBM SPSS statistics.

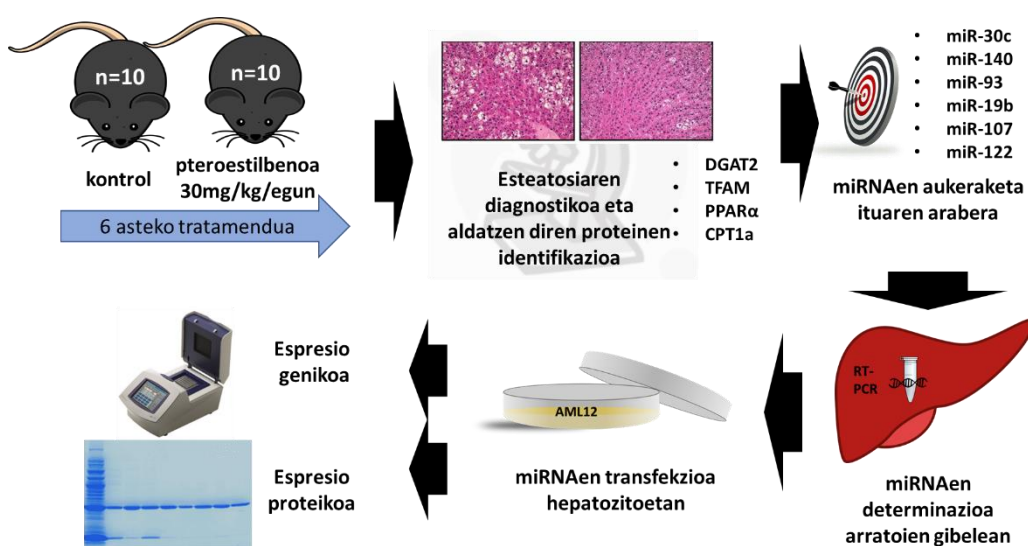
Los detalles del protocolo están descritos en los manuscritos 4 y 5.

# Diseinu experimentalala eta metodologia

## 1 MikroRNAen implikazioa pteroestilbenoak arratoien esteatosi hepaticoan dituen ondorioetan

### 1.1 Animaliak eta esteatosiaren determinazioa

Ikerkuntza egiteko, 5 urteko 20 Zucker (fa/fa) arratoi erabili ziren. Animaliak kaiola metabolikoetan ukuiluratu eta gela isolatu batean mantendu ziren,  $22 \pm 2$  °C-ko temperatura konstantean, 12 orduko argi/iluntasun zikloekin, 6 eguneko egokitzapen aldia igaro eta gero. Arratoiak 10 aleko 2 taldeetan banatu ziren, eta laborategiko dieta estandar batez elikatu, ura edateko askatasunarekin. Trataturako taldeari pteroestilbenoa eman zitzaion, egunean 30mg/kg-ko dosia, kateter orogastriko baten bidez; kontrol taldeari, ostera, gatz soluzio bat eman zitzaion, bide beretik. Egunero neurtu ziren animalien pisua eta irentsitako janari kopurua. Azterlana EHUko Etika Batzordeak onartu zuen (erref.: CEEA14/018).



### 9.irudia. Lehenengo proiektuaren diseinu experimentalak.

Fase experimentalak amaitu eta 8-12 orduko baraualdia igaro ondoren, arratoiak bihotz ziztada bidezko exanginazioaren bidez sakrifikatu ziren, anestesia orokorraren eraginpean. Odola atera, eta gibela disezionatu zen. Hura pisatu eta nitrogeno likidoan izoztuta biltegitatu zen, -80 °C-tan, ondoren analizatu arte. Odol ateratze bidez lortutako odola 1000 g-tan zentrifugatu zen, 10 minutuz 4 °C-tan, seruma ateratzeko.

## **Diseinu esperimentalak eta metodologia**

Bi patologo adituk esteatosia histologikoki zehaztu zuten, laginak beren identifikazio mozorrotuekin aztertu ondoren. Ehun hepatikoa hematoxilina eta eosinaz tindatu zen, eta laginak 40x-ko mikroskopiaz aztertu ziren, Brunten eskala erabiliz [236].

### ***1.2. miRNAen hautaketa***

Gure taldeak eginiko aurreko esperimentuetan, gibel esteatosiaren garapenean zeuden eta resveratrolaren eta proantozianidinen efektuetan bitartekariak ziren MiRNAk hautatu ziren, molekula horien tratamenduan antzemandako efektuak pteroestilbenoaren kasuan ere gertatzen ote ziren zehaztea xede. Horrez gain, datu baseetan (miRecords eta miRbase) bilaketa bat egin zen, pteroestilbeno bidez tratatutako arratoien gibelean aldatutako proteinak diana potentzial edo balidatu gisa zuten miRNAk aurkitzeko asmoz.

### ***1.3. Kultibo zelularrak eta transfekzioak***

AML12 sagu hepatozitoak zituen kultibo zelular bat egin zen 1:1 DMEM/HAM'S F12 hazkuntza medioan, zeinak behien serum fetala (FBS), dexametasona, intsulina, transferrina, selenioa eta penizilina/estreptomizina zituen. Medioa 2 egunetik behin aldatu zen, eta zelulak 37 °C-tan hazi ziren, % 5eko CO<sub>2</sub>-rekin hezetutako atmosferan.

Hepatozitoak, % 80-90eko konfluentzian, miRNA bakoitzaren «mimic»-arekin edo kontrol negatiboarekin transfektatu ziren, lipofektamina erabiliz. Gainera, transfekzioaren eraginkortasuna egiaztatu zen, aldi berean fluoreszentiadun zundak transfektatuz. RT-PCR bidez egiaztatu zen, ostera, miRNA bakoitzaren transfekzio zuzena.

### ***1.4. MiRNAen eta proteinen espresioa***

MiRNA totalak ehun hepatikotik eta zelula transfektatuetatik atera ziren (miRNeasy), kit komertziala erabiliz, fabrikatzaileak emandako jarraibideen arabera. Erretrotranskripzio prozesuaren ondoren, miRNA bakoitzaren RT-PCRa egin zen, CFX96 – MyiQ™ termozikladorean, fabrikatzaileak zehaztutako parametroekin programatuta. Emaitzak normalizatu egin ziren, miR-191-5p housekeeping moduan erabiliz. Lortutako datuak

### **Diseinu esperimental eta metodologia**

kontroleko threshold cycle (Ct) aldaketa gisa deskribatu ziren,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodoaren bidez [237].

Proteinen kontzentrazioen neurketari dagokionez, AML12 zelulen guztizko proteinak lisi tanpoiaren bidez atera ziren, baliozkotutako protokoloen arabera, eta proteina horien guztizko kontzentrazioa azido bikinkoninikoaren (BCA) kit komertziala erabiliz neurtu zen. Proteina bakoitzaren kontzentrazioa western blot teknikaren bidez neurtu zen. Horretarako, lehenik, elektroforesia egin zen poliakrilamidazko geletan, proteina banatzeko pisu molekularren arabera, eta ondoren, elektrotransferentzia bidez, PVDF mintzetara pasatu ziren. Karga egokia Comomassie-Blue bidez berretsi zen. Mintzak % 5eko kaseina edukia zuen PBS-Tween tanpoiarekin blokeatu ziren, eta antigorputz primarioarekin (gau osoan) eta sekundarioarekin (bi orduz) inkubatu. Azkenik, kuantifikazioa ChemiDoc MP irudi sistemaren bidez egin zen.  $\beta$ -aktina kontroleko proteina gisa erabili zen.

#### ***1.5. Analisi estatistikoa***

Analisi estatistikorako, IBM SPSS Statistics v.26 programa erabili zen. Datuen banaketa Shapiro-Wilk-en testarekin egiaztatu zen, eta batezbestekoak Student-en t edo Mann-Whitney-ren U-ren bidez alderatu ziren, normaltasunaren arabera.

Protokoloaren xehetasunak 1. eskuizkribuan daude deskribatuta.

## **2. Sindrome metabolikoa duten pazienteengan mahats-patsaren eragina aztertzea. MikroRNAk biomarkatzaile gisa erabiltzea**

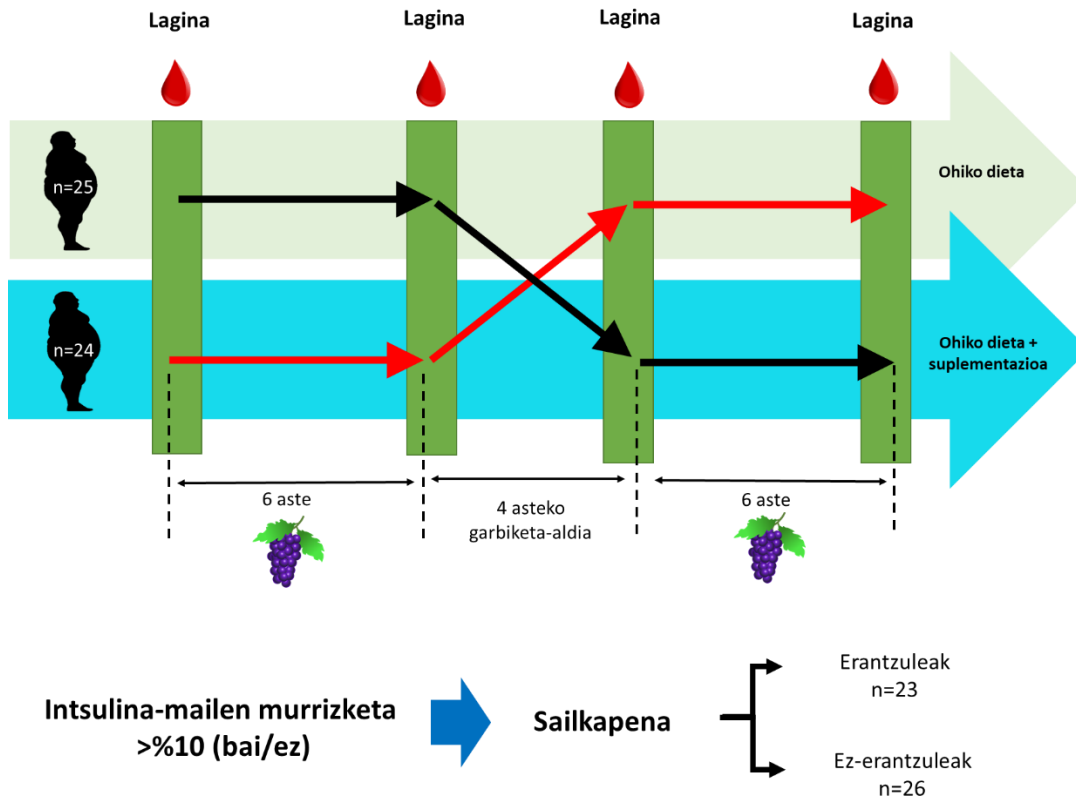
### ***2.1. Mahats-patsak***

Mahats aterakina Tempranillo barietateko mahatsetik (*Vitis Vinifera*) atera zen, hura biltzean. Produktua birrindu eta liofilizatu egin zen, eta 8 g-ko dosi indibidualetan banatu. Alikuota horiek -20 °C-ko tenperaturan gorde ziren une oro. Aterakinaren % 6,22 polifenol erauzgarriak ziren, eta % 23,44 ez-erauzgarriak. % 68,23, berriz, zuntz disolbaezina zen.

### ***2.2. Subjektuak eta sailkapena***

Ausazko azterketa gurutzatu honetan, sindrome metabolikoa izateko 2 arrisku faktore, gutxienez, zituzten 49 subjektuz osatutako lagina baliatu zen [238]. 6 asteko bi aldi esperimentaletan, parte hartzaileen ohiko dieta mahats aterakinaren 8 g-rekin osatu zen, eta bi aldien artean 2 asteko garbiketa etapa (wash-out) igaro zuten. Ez zen plazeborik erabili kontrol taldean. Aldi bakoitzaren aurretik eta ondoren, odol laginak atera ziren. Laginok plasma lortzeko zentrifugatu eta, jarraian, -80 °C-tan izoztu ziren, geroago analizatzeko. Prozesu hori amaitutakoan, parte hartzaileak erantzuletan eta ez-erantzuletan sailkatu ziren, barau egonik intsulina mailek % 10eko baino gehiagoko murrizketa izatea irizpide hartuta pertsonak erantzuntzaile gisa sailkatzeko.

## Diseinu esperimental eta metodologia



**10.irudia.** Bigarren proiektuaren diseinu esperimental.

### **2.3. MiRNAen sekuentziazioa eta kuantifikazioa**

Talde bakoitzeko 8 subjektuz osatutako lagin adierazgarrian, Belaunaldi Berriko Sekuentziazioa (NGS) egin zen, non talde bakoitzean desberdin espresatzen ziren miRNAk identifikatu ziren. Jarraian, ikusitako aldeak egiaztatu ziren, kohorte osoan, erantzuleen eta ez-erantzuleen taldeak etaaldi esperimentalaren ondoren izandako espresio aldaketak konparatuta. Horretarako, RNA totala erauzi zen (miRNAk barne), kit komertzialaren bidez, eta miRNA-en erretrotranskripzioa egin zen, DNA osagarria (cDNA) lortzeko. RT-PCR bidez, miRNAen espresioa CFX96– MyiQ Real-Time System termoziklatzailean kuantifikatu zen. Lortutako balioak normalizatzeko, miR-191-5p erabili zen housekeeping gisa. Ondoriozko datuak kontrolerikiko threshold cycle (Ct) aldaketa gisa deskribatu ziren,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodoaren bidez [237].

### **2.4. Dianen bilaketa**



### *Diseinu esperimental eta metodologia*

Baliozkotutako eta/edo aurreikusitako dianak miRecords datu basearen bidez identifikatu ziren. Ondoren, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) datu basearen bidez, identifikatutako geneak kontrol gluzemikoarekin lotutako zein ibilbide metabolikotan sartuta egon zitezkeen bilatu zen.

#### **2.5. Analisi estatistikoa**

Analisi estatistikoa IBM SPSS Statistics v.24. programarekin egin zen. Normaltasuna Shapiro-Wilk testarekin egiaztatu eta datuen homozedastikotasuna begiratu zen. Lagin independenteen arteko konparazioak Student-en t edo Mann-Whitney-ren U probekin egin ziren; lagin bikoitien kasuan, berriz, lagin parekatutako Student-en t proba edo Wilcoxon-en zeinuko tarteen testa erabili zen, datuen normaltasunaren arabera.

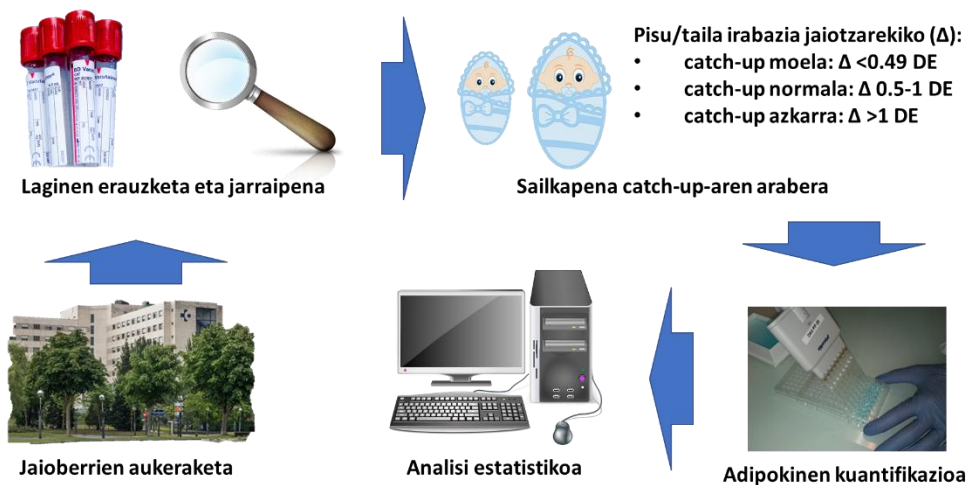
Protokoloaren xehetasunak 2. Eta 3. eskuizkribuetan daude deskribatuta.

### 3. Jaiotzean pisu edo neurri txikia duten haurren adipokinak biomarkatzaile gisa aztertzea

#### 3.1. Parte hartzaileen hautaketa

EPIPEG azterlanaren kohorteko 27 subjektuz osatutako lagin adierazgarriarekin lan egin zen, Txagorritxu Unibertsitate Ospitaleko Etika Batzordearen onespenerekin (erref.: 2012-050) eta gurasoek baimen informatua sinatu ondoren.

Txagorritxu-AUOk ospitalean 2013ko ekainetik 2015eko martxora bitartean bizirik jaiotako haurrak hautatu ziren. PEG gisa sailkatutako subjektuak aukeratu ziren, hau da, Espainiako hazkunde- kurbek zehaztutako batezbestekoaren azpitik gutxienez 2 desbiderapen estandar (DE) zituztenak. Baztertzeko irizpideak hauek izan ziren: haur ez-kaukasoarrak, haurdunaldi anizkoitzak, malformazio genetikoaren ebidentziak eta lehen 24 orduan bizirik ez irautea. Ama guztiek ez zutela konplikaziorik izan eta toxikoen eraginpean egon gabeko haurdunaldi normala izan zutela adierazi zuten.



**11.irudia.** Hirugarren proiektuaren diseinu esperimental.

#### 3.2. Bisitak eta catch-up-aren arabeko sailkapena

Parametro antropometrikoak jaiotzean, 3 hilabetera, 12 hilabetera, 18 hilabetera, 24 hilabetera eta 4 urtera erregistratu ziren. Bisita horietan, edoskitzaro motari buruzko informazioa ere jaso zen, protokolo bidez jasotako parametroez gain. "Catch-up" mota

### *Diseinu esperimental eta metodologia*

jaiotzean izandako neurria eta pisua bigarren bisitaldiko neurri eta pisuarekin alderatuz ezarri zen (12 hilabeterekin):

- “Catch-up motela”:  $\Delta < 0.49$  SD
- “Catch-up normala”:  $\Delta 0.5 - 1$  SD
- “Catch-up azkarra”:  $\Delta > 1$  SD

### ***3.3. Laginen erauzketa eta parametro biokimikoen zehaztapena***

3, 12 eta 24 hilabeterekin, subjektuen zain odolaren laginak atera ziren, gutxienez 5 orduko baraualdiaren ondoren, eta ospitale ingurunean populazio segmentu horretarako ohikoak diren parametro biokimikoak neurtu ziren. Gainerako plasma  $-70$  °C-tan izoztu zen, geroago aztertzeko.

### ***3.4. Adipokinen neurketa***

Adipokinak kuantifikatzeko, ELISA kit komertzialak erabili ziren. Horien erreferentziak honako hauek dira: RD191001100 (BioVendor, Brno, Czech Republic) leptinarako, RD195023100 (BioVendor, Brno, Czech Republic) adiponektinarako, D191100200R (Brno, Czech Republic) omentinarako, ab1557430 (Abcam, Cambridge, UK) chemerinarako, RD191097200R (BioVendor, Brno, Czech Republic) vaspinarako eta ab193710 (Abcam, Cambridge, UK) NOV/CCN3rako.

### ***3.5. Analisi estatistikoa***

Datuen normaltasuna Saphiro-Wilk testaren bidez zehaztu zen. Parez pareko laginen arteko konparazioak Student-en t probarekin edo Wilcoxon-en testarekin egin ziren. Parekatu gabeko laginen kasuan, Studenten t proba edo Mann-Whitneyren U proba erabili zen, datuen normaltasunaren arabera. Korrelazio bibariatua aztertzeko, Pearsonen r edo Spearmanen rho erabili zen, datuen banaketaren arabera. Aldagai kualitatiboak  $\chi^2$  proba erabiliz alderatu ziren. Analisi estatistikoa IBM SPSS statistics programaren 22. bertsioaz egin zen.

Protokoloaren xehetasunak 4. Eta 5. eskuizkribuetan daude deskribatuta.

# Resultados y discusión

## **Resultados y discusión**

El origen y el pronóstico de distintas patologías metabólicas, así como los mecanismos que median en su aparición o desarrollo, no siempre están enteramente descritos. A día de hoy se sabe que los micro RNAs, unos pequeños fragmentos de RNA no codificante, pueden regular una gran cantidad de reacciones metabólicas, y que además presentan un gran potencial como biomarcadores de distintas patologías. También se debe subrayar la relevancia de las adipokinas, citokinas segregadas por el tejido adiposo, que actúan de manera autocrina, paracrina y endocrina. Al igual que los microRNAs, estas pueden ser consideradas indicadores de fácil acceso de estados metabólicos alterados, al poder obtenerse a partir de sangre periférica.

La presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo en el grupo de investigación “Nutrición y Obesidad”, de la Facultad de Farmacia, de la UPV/EHU, que dispone de una amplia experiencia en el estudio de moléculas bioactivas de la dieta, así como en la identificación de biomarcadores génicos y proteicos.

La Tesis se centra en tres estudios que analizan el papel de los microRNAs y las adipokinas como biomarcadores o como mediadores de efectos metabólicos. En el primero de ellos, se estudia si los efectos beneficiosos del pterostilbeno, una molécula bioactiva de la dieta, sobre la esteatosis hepática están mediados por microRNAs. En el segundo, se analiza el papel de los microRNAs como marcadores de respuesta de individuos con síndrome metabólico a un extracto de uva, y como mediadores de sus efectos. Por último, en el tercero se aborda el papel de las adipokinas en el desarrollo de niños nacidos pequeños para la edad gestacional y la posibilidad de utilizar esas moléculas para predecir patrones de cambio metabólico a edades más avanzadas.

### **1. Implicación de los microRNAs en los efectos del pterostilbeno en la esteatosis hepática en rata**

Siguiendo la línea de investigación preclínica de nuestro grupo, centrada en el empleo de compuestos fenólicos para la prevención y el tratamiento de patologías altamente prevalentes en nuestra sociedad, inicié mi Tesis Doctoral con un estudio de microRNAs en un modelo de rata que presentaba esteatosis hepática (manuscrito 1).

## **Resultados y discusión**

En un estudio previo del grupo, se había analizado el efecto de la administración durante 6 semanas de pterostilbeno, a la dosis de 30 mg/kg/d, en la esteatosis hepática, en un modelo animal de obesidad genética, que desarrolla esta alteración hepática (rata Zucker *fa/fa*). El estudio de los cortes histológicos de hígado desveló que las ratas que recibieron el compuesto fenólico presentaban un menor grado de esteatosis [244]. Al analizar los posibles mecanismos responsables de este efecto, se observó un aumento en la expresión de las proteínas PPAR $\alpha$  y TFAM, dos factores de transcripción relacionados con la síntesis de mitocondrias, así como de la actividad de la CPT-1a, enzima que permite la entrada de los ácidos grasos de cadena larga al interior de la mitocondria para su oxidación, y una disminución de la expresión de la proteína DGAT2, implicada en el ensamblaje de triglicéridos, en las ratas tratadas con pterostilbeno. Estos resultados sugerían que este compuesto fenólico reducía la acumulación de triglicéridos en el hígado a través de un incremento en la oxidación de ácidos grasos y de una disminución de la formación de triglicéridos.

En la presente Tesis Doctoral nos interesamos en profundizar más en el mecanismo molecular de estos efectos, y más concretamente en la posible implicación de los microRNAs en los cambios observados en las proteínas anteriormente mencionadas, que juegan un papel clave en el metabolismo lipídico hepático. Para ello, en primer lugar, se buscaron, en diferentes bases de datos, qué microRNAs podían tener como dianas, validadas o predichas, las proteínas que se vieron modificadas en los animales tratados con pterostilbeno. Cabe señalar que, debido al hecho de que el número de microRNAs encontrado era muy elevado, se seleccionaron solo aquellos microRNAs que tenían dos o más dianas entre las proteínas de nuestro interés. Los microRNAs seleccionados en esa búsqueda fueron miR-93-5p, miR-19b-3p, miR-33-5p y miR-140-5p, que tienen como dianas predichas PPAR $\alpha$ , TFAM y DGAT2 para miR-93-5p y miR-19b-3p; PPAR $\alpha$  y CPT1a para miR-33-5p; y DGAT2 y CPT1a para miR-140-5p. Además, se llevó a cabo una revisión bibliográfica, en la que se encontró que el miR-122-5p tenía como dianas la CPT-1a y la DGAT2, por lo que este miRNA también se incluyó en el estudio. Finalmente, se incluyó el miR-107-3p (con CPT1a como diana predicha), que había demostrado estar involucrado en los efectos de otros compuestos fenólicos,

Dado que el miR-93-5p, cuya expresión se veía aumentada por el tratamiento con pterostilbeno, tenía como dianas predichas, pero no validadas, PPAR $\alpha$ , TFAM y

## **Resultados y discusión**

DGAT2, decidimos transfectar este microRNA en hepatocitos para analizar qué ocurría con la expresión de estas proteínas, con el fin de comprobar si se trataba o no de verdaderas dianas para este microRNA. Los resultados obtenidos indicaron que ni la expresión génica ni la proteica de estas proteínas se vieron modificadas en los hepatocitos transfectados con miR-93-5p, lo que sugiere que probablemente estas proteínas no son dianas reales de este microRNA y que los cambios observados en su expresión tras el tratamiento con pterostilbino no están relacionados con los efectos de este compuesto fenólico en la expresión de estas proteínas. No obstante, es interesante subrayar que, dado que en la literatura se ha relacionado este microRNA con genes de hepatocarcinoma, es posible pensar que pueda estar involucrado en la evolución de la estatois hepática hacia estadios más avanzados de la enfermedad.

En lo que respecta al miR-122-5p, el otro microRNA modificado por el pterostilbino, si bien las bases de datos consultadas no muestran ningún gen diana validado o predicho, en la bibliografía este microRNA se había relacionado con una disminución de CPT1a y un aumento de la DGAT2, indicando que estas dos enzimas son dianas de este microRNA [245]. Por ello, en nuestro estudio no se llevaron a cabo transfecciones de miR-122-5p. El hecho de que en nuestra cohorte de ratas el tratamiento con pterostilbino indujera una disminución de miR-122-5p, un aumento de CPT1a y una disminución de DGAT2, sugiere que este microRNA puede ser un mediador de los efectos del pterostilbino sobre la oxidación de ácidos grasos y el ensamblaje de triglicéridos.

Aunque la expresión de miR-140, miR-107-3p, miR-19b-3p y miR-33-5p no se modificó tras el tratamiento con pterostilbino, nos pareció de interés transfectar estos microRNAs con el fin de obtener más información sobre su relación con las dianas predichas en las bases de datos. La transfección del miR-140 disminuyó la expresión de la proteína CPT1a, mientras que su expresión génica no varió. Esto concuerda con la forma más habitual de ejercer su función que tienen los microRNAs, actuando pos-transcripcionalmente, uniéndose a región 3'UTR del mRNA diana e inhibiendo el proceso de traducción. Este resultado permite plantear la idea de que el gen *cpt1a* es una diana real del miR-140-5p. Sin embargo, volviendo al objetivo planteado en el presente estudio, en el hígado de las ratas tratadas con pterostilbino no se observó ningún cambio en su expresión, por lo que se puede afirmar que los efectos del pterostilbino sobre esta enzima no están mediados por miR-140-5p.

## **Resultados y discusión**

Con respecto al miR-107-3p, para el cual solo se encontró la CPT-1a como diana predicha en las bases de datos, pero que fue incluido dado que es un microRNA involucrado en el efecto del resveratrol sobre la esteatosis hepática, los experimentos de transfección no fueron realizados, ya que otros autores habían demostrado previamente una regulación a la baja de la CPT1a en hepatocitos transfectados con el miR-107-3p [246]. No obstante, su ausencia de cambio tras el tratamiento con pterostilbino indica que no media los efectos de este compuesto.

Finalmente, los resultados de transfección de miR-19b-3p y miR-33-5p mostraron que estos microRNAs no parecen regular las dianas predichas en las bases de datos. Teniendo esto en cuenta, además del hecho de que su expresión en el hígado de las ratas tratadas con pterostilbino no cambió, se puede afirmar que no están involucrados en los efectos del pterostilbino observados en el presente estudio.

Al hacer la discusión de nuestros resultados, en lo que respecta a los efectos del pterostilbino sobre los microRNAs, no nos ha sido posible compararlos con la bibliografía, ya que hasta la fecha son extremadamente escasos los estudios llevados a cabo para analizar los efectos del pterostilbino sobre la esteatosis hepática y en ninguno de ellos se han estudiado los microRNAs. Por tanto, se puede decir que en nuestro estudio se propone por primera vez al miR-122-5p como mediador de los efectos del pterostilbino sobre la esteatosis hepática, debido a su implicación en los efectos de este compuesto fenólico en la oxidación de ácidos grasos y sobre el ensamblaje de triglicéridos.

Sin embargo, sí hemos podido comparar los efectos del pterostilbino sobre los microRNAs con los de su compuesto de origen, el resveratrol. Curiosamente, los efectos no son los mismos. Así, en un estudio previo de nuestro grupo llevado a cabo en ratas que habían desarrollado esteatosis debido a una alimentación rica en grasa saturada y sacarosa, tratadas con 30 mg/kg/peso (la misma dosis que la utilizada en el presente estudio) del compuesto de resveratrol (compuesto a partir del cual deriva el pterostilbino), los efectos sobre la CPT-1a estuvieron mediados por una reducción en la expresión de miR-107-3p [247].

## **2. Estudio del efecto de los hollejos de uva en pacientes con síndrome metabólico. Empleo de los microRNAs como biomarcadores**



## **Resultados y discusión**

Gracias a una colaboración con el grupo de la Dra. Jara Pérez-Jiménez (ICTAN; CSIC), tuvimos la oportunidad de dar un paso más en el estudio de la implicación de los miRNAs en los efectos de los compuestos fenólicos, esta vez en humanos.

Así, se planteó una intervención en individuos que presentaban síndrome metabólico, según los criterios descritos en el artículo de Alberti *et al.* (2009), con hollejos de uva (secos y molidos; 8g/d), durante 6 semanas [242]. Este extracto, se caracteriza por tener un alto contenido en polifenoles (29,63%), en particular polifenoles no extraíbles o antioxidantes macromoleculares (23,44%), así como un alto contenido en fibra dietética (68,23%), sobre todo insoluble (65,65%). Tras el análisis de los parámetros bioquímicos plasmáticos se observó que el principal efecto era una mejora del control glucémico. No obstante, no todos los sujetos respondían de la misma manera a la suplementación; efectivamente había individuos respondedores, que fueron definidos como aquellos participantes en los que se producía una reducción de las concentraciones séricas de insulina en ayunas superior al 10%), y no respondedores, definidos como aquellos en los que esta reducción era menor del 10%. En definitiva, había una clara variabilidad interindividual en la respuesta a la intervención.

Sabiendo que los miRNAs han demostrado poder regular diversas reacciones metabólicas, se planteó la hipótesis de que pudieran estar involucrados, tanto en el mecanismo de acción del orujo de uva (manuscrito 3) como en variabilidad interindividual de los participantes (manuscrito 2). Para analizar la implicación en la variabilidad, se tomaron las muestras de sangre del estudio a tiempo inicial y se llevó a cabo una secuenciación de nueva generación (NGS) para valorar el patrón de microRNAs circulantes, a través de la cual se identificaron microRNAs que se expresaban de manera diferente en ambos grupos de participantes. Así, se encontraron diferencias entre los dos grupos experimentales en la expresión de miR-30c-5p, miR-23a-3p, miR-222-3p, miR-let7a-5p, miR-151a-5p, miR-181a-5p y miR-10a-5p. En concreto, estos microRNAs presentaban mayor expresión en los individuos respondedores que en los no respondedores. Dado que, debido al elevado coste económico, el estudio NGS se realizó en una submuestra de los individuos estudiados, se procedió a validar los resultados obtenidos en toda la muestra mediante RT-PCR. En este caso sólo se encontró diferencia significativa para el miR-222 y una tendencia para el miR-Let7a.

## **Resultados y discusión**

Tras consultar bases de datos, se encontró que el miR-222 tenía como diana dos proteínas involucradas en el metabolismo de la glucosa, el sustrato receptor de la insulina 4 (IRS4) y la piruvato kinasa (PKM). La IRS4 es una proteína capaz de estimular la translocación del transportador de la glucosa 4 (GLUT4) a la superficie de la célula. Aunque no se ha descrito una relación directa entre miR-222 y el gen *irs4*, sí que se ha observado una correlación negativa con GLUT4 en tejido adiposo omental de mujeres con diabetes gestacional. De esta forma, se puede especular con la idea de que los sujetos respondedores tienen una menor expresión de *irs-4* y por tanto menor capacidad de captación de glucosa y peor control glucémico.

En cuanto a la PKM, es la enzima encargada de catalizar la fase final de la glucólisis. Se ha publicado que, en los sujetos con peor control glucémico, la glucólisis está alterada en comparación con las personas con un metabolismo de la glucosa normal. De hecho, una glucólisis disminuida está relacionada directamente con el desarrollo de DM2 [248]. De acuerdo con estos datos, y teniendo en cuenta que los individuos respondedores mostraron una mayor expresión de miR-222, cabría esperar que estos presentaran una glucólisis disminuida.

Además de las dianas identificadas mediante las bases de datos, a través de la bibliografía se encontró que el receptor de la adiponectina 1 (adipoR1) es otra diana potencial del miR-222. La adiponectina reduce la resistencia a la insulina a través de la translocación de GLUT4 y del aumento de oxidación de ácidos grasos [249]. De esta forma, se plantea que los sujetos respondedores podrían presentar una menor eficacia en la acción de la adiponectina. No obstante, se ha de ser cauteloso con esta propuesta porque el estudio mencionado se realizó en células endoteliales de la vena umbilical humana.

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que los niveles basales de miR-222 podrían representar un biomarcador de respuesta a compuestos fenólicos en individuos con síndrome metabólico. No obstante, esto es algo que debe explorarse y validarse específicamente en estudios posteriores. Es importante señalar que en la presente recapitulación no se ha hecho referencia a los resultados relacionados con la microbiota intestinal incluidos en el manuscrito 2, dado que estas valoraciones fueron realizadas en otro grupo de investigación que participó en el proyecto y no forman parte de mi Tesis Doctoral.

## **Resultados y discusión**

Otro aspecto que se pretendía estudiar en esta intervención, era el posible papel de los microRNAs como mediadores de los efectos beneficiosos sobre el control glucémico producidos por el orujo de uvas, con el fin de analizar el mecanismo de acción de a nivel molecular. En este caso, se compararon los miRNAs antes y después de la intervención, observándose cambios significativos en la expresión de miR-23, miR-30c y miR-181, así como una tendencia en la expresión de miR-222 y miR-151. En las bases de datos se encontró que todos estos miRNAs tenían dianas predichas relacionadas con el control glucémico, con excepción de miR-151. De entre los miRNAs que se vieron modificados, se descartaron como mediadores aquellos que cambiaron solo en los no respondedores (miR-181) o en ambos grupos (miR-23). Por tanto, solo el miR-222 y el miR-30c fueron considerados como mediadores.

Respecto al miR-30c, otros investigadores habían observado una expresión elevada en ratones alimentados con una dieta rica en grasa, que desarrollaron tanto resistencia a la insulina como obesidad, y una sobreexpresión en personas con diabetes tipo 2 y en el cordón umbilical de mujeres con diabetes gestacional [250,251]. En vista de que el miR-30c aumenta en situaciones en las que hay un mal control glucémico, se puede proponer que ejerce una influencia negativa en la homeostasis de la glucosa. En nuestro estudio, los individuos respondedores, que eran los que presentaban un peor control glucémico, mostraron niveles de insulina en ayunas y de miR-30c circulante menores tras la suplementación que al inicio del tratamiento, lo que sugiere que este microRNA está involucrado en la mejora del control glucémico inducido por los hollejos de uva.

La búsqueda posibles dianas para este microRNA en las bases de datos reveló que la PKM, la transcetolasa (TKT), la subunidad reguladora de fosfoinositido-3-quinasa 2 (PIK3R2), la subunidad beta 2 no catalítica activada por la proteína quinasa AMP (PRKAB2), los supresores de la señalización de citocinas 1 y 3 (SOCS1 y SOCS3) y la phosphoinositide-3-kinase (PI3K) eran dianas predichas. Por tanto, cabría esperar que la reducción de miR-30c, inducida por los hollejos de uva condujera al aumento de la expresión de estas proteínas. Como ya se ha indicado, la PKM es la enzima encargada de catalizar la fase final de la glucólisis; por otro lado, la PI3K activa la AKT1 a través de la generación de 3,4,5-trisphosphate (PIP3), lo que a su vez facilita el efecto de la insulina y, por tanto, la tolerancia a la glucosa [252]. En cuanto a PRKAB2, es una subunidad encargada de regular el efecto de AMPK, enzima involucrada en la entrada de glucosa en

## **Resultados y discusión**

el tejido muscular de manera insulín-independiente. Por lo tanto, mediante la disminución de los niveles de miR-30c producidos por el extracto de uva, podría verse aumentada la captación de glucosa, tanto de manera dependiente como independiente de la insulina. Por otra parte, también se ha descrito que el miR-30c puede tener como diana predicha genes del grupo SOCS (*socs1* y *socs3*). Este grupo de proteínas participa en la inhibición de la cascada de señalización de la insulina y la acción de la proteína IRS1, por lo que su potencial incremento podría considerarse como un efecto negativo. No obstante, esta forma de actuar negativa se ve compensada con la acción del miR-222, que, al contrario de miR-30c activa la proteína IRS1.

### **3. Estudio de adipocinas como biomarcadores en niños con bajo peso o talla al nacer**

El último estudio de la Tesis Doctoral es fruto de la colaboración, en el seno del Instituto de Investigación Sanitaria Bioaraba (IIS Bioaraba), al que pertenece nuestro grupo de investigación, con el grupo del Dr. Ignacio Díez del Servicio de Pediatría del Hospital Universitario de Alava Txagorritxu. En este caso, centramos nuestro objetivo en las adipocinas como potenciales biomarcadores.

Nacer pequeño para la edad gestacional (PEG) conlleva diversas alteraciones metabólicas, tanto durante la etapa perinatal y la infancia, como en la adultez. No todos los niños PEG presentan la misma velocidad de desarrollo ("catch-up"), observándose variabilidad interindividual. El tipo de "catch-up" es importante ya que ejerce una clara influencia en las alteraciones metabólicas que van a desarrollar en la etapa adulta. Así, si el "catch-up" se produce de manera gradual, sin acumulación de grasa abdominal en los 24 primeros meses de vida, la incidencia de síndrome metabólico se reduce de manera considerable. No obstante, las variables que condicionan el hecho de que un niño PEG tenga un tipo de crecimiento u otro y los mecanismos que lo producen, no están del todo descritas. Por otra parte, las adipocinas segregadas por el tejido adiposo tienen numerosas funciones reguladoras, incluyendo la regulación del proceso de crecimiento. Teniendo en cuenta todo ello, en el presente estudio nos planteamos analizar el perfil de adipocinas y parámetros bioquímicos de niños PEG con diferentes velocidades de crecimiento, encontrar posibles diferencias entre niñas y niños y, por último, estudiar la evolución de diferentes adipocinas durante los primeros dos años de vida de estos niños (manuscritos 4 y 5).

## **Resultados y discusión**

Para ello, se reclutaron 27 bebés nacidos en el ámbito hospitalario, que fueron diagnosticados como PEG, es decir que presentaban al nacer una longitud o peso al menos 2 desviaciones estándar por debajo de las tablas de talla/peso de referencia para la población española. A continuación, estos niños fueron clasificados en 3 grupos, según su "catch-up", de acuerdo con la ganancia de peso o talla a los 12 meses del nacimiento: "catch-up" lento  $\Delta < 0.49$  SD, "catch-up" normal  $\Delta 0.5-1$  SD, y "catch-up" rápido  $\Delta > 1$  SD.

Respecto al "catch-up", lo primero que se pudo observar fue que los niños con menor peso al nacer presentaban una velocidad de crecimiento más rápida que aquellos que nacían con pesos mayores. Con el fin de obtener más información sobre los tres tipos de "catch-up", en el presente trabajo se analizaron las posibles diferencias en las concentraciones plasmáticas de adipokinas a los 3 meses. A esa edad, los participantes con un "catch-up" lento presentaron concentraciones más bajas de leptina y vaspina, y concentraciones más altas de adiponectina, chemerina y omentina, en comparación con el grupo que tenía un "catch-up" normal. Se podría pensar por tanto en un papel de las adipokinas en la velocidad de recuperación de los niños PEG. Por el contrario, no se encontraron diferencias entre los niños con "catch-up" rápido y normal. Dado que la leptina está implicada en el metabolismo y el equilibrio energético en los fetos, los recién nacidos y los adultos, y desempeña un papel importante en el crecimiento fetal, y teniendo en cuenta que esta adipokina induce la liberación de hormona de crecimiento a través de la inhibición de la somatostatina hipotalámica, se podría proponer que las bajas concentraciones de leptina en los niños con "catch-up" lento podrían estar relacionadas con su escaso desarrollo [253-255].

Para determinar si el estado metabólico de los niños podría estar relacionado con la velocidad de crecimiento, se analizaron diversos parámetros bioquímicos a los 12 meses de edad. Los niños con "catch-up" lento eran los que presentaban concentraciones más altas de insulina y HOMA-IR, y por consiguiente peor control glucémico. Dado que la vaspina es un sensibilizador de la insulina, la omentina se puede considerar como un biomarcador de resistencia a la insulina y la chemerina está relacionada con el desarrollo de resistencia a la insulina y el tipo 2 diabetes, se puede proponer que el perfil alterado de adipokinas en los niños de "catch-up lento" a los tres meses puede ser responsable, al menos en parte, de deterioro del control glucémico observado a los 12 meses [66,137,256]. Es interesante resaltar que, si bien se ha demostrado claramente que más

## **Resultados y discusión**

adelante en la vida, los bebés PEG con "catch-up" lento son menos propensos a desarrollar alteraciones metabólicas que los bebés con "catch-up" rápido, los resultados del presente estudio muestran que, durante los primeros meses de vida, este patrón de crecimiento conduce a un deterioro transitorio en el control de la glucemia [257,258]. Es decir, que en un principio un "catch-up lento" produce más alteraciones en el bebé, pero que en etapas posteriores de la vida el estado de salud es mejor.

El análisis de la evolución del patrón de adipokinas durante los dos primeros años de vida mostró una disminución de las concentraciones de leptina y NOV/CCN3 y un aumento de la concentración de omentina. En el resto de adipokinas no se observaron cambios estadísticamente significativos. No se encontraron referencias bibliográficas para comparar los resultados obtenidos en omentina o NOV/CCN3.

Otro aspecto de interés en nuestro estudio fue examinar las posibles diferencias entre ambos sexos. Las principales diferencias se encontraron a los 2 años de edad, momento en el que las niñas presentaban concentraciones más altas de leptina, adiponectina y omentina. Dado que la adiponectina es producida exclusivamente por tejido adiposo blanco, que a su vez es el principal productor de leptina y omentina, esta diferencia podría ser atribuida a las diferencias en la ganancia de masa grasa corporal entre niños y niñas [259,260]. Sin embargo, en nuestro estudio no se encontraron diferencias en los perímetros braquial y abdominal entre los dos sexos.

El presente estudio tiene algunas limitaciones. Quizás la más importante es la ausencia de un grupo de niños con peso y longitud normales para su edad gestacional, que sirva de control. Esto se debe fundamentalmente a que es difícil conseguir el consentimiento de los padres para la extracción de sangre en bebés sanos a los 3 meses de edad. Además, el tamaño de muestra es pequeño porque los bebés PEG suponen tan solo un pequeño porcentaje de recién nacidos en el Hospital Universitario de Alava-Txagorritxu, en el que el número de nacimientos anuales no es muy elevado. Por otra parte, el estudio se ha llevado a cabo en una población caucásica y, por lo tanto, los datos no pueden ser extrapolado directamente a otros grupos de población. Sin embargo, hay que resaltar como fortaleza que son muy escasos los estudios que valoran las concentraciones plasmáticas de varias adipokinas en niños PEG; normalmente se analizan en la sangre del cordón umbilical, que no es el material ideal.

## **Resultados y discusión**

El estudio de correlaciones llevado a cabo puso de manifiesto que las correlaciones más interesantes entre las adipokinas y los parámetros plasmáticos se dieron con la chemerina. Por ello, profundizamos especialmente en ellas en el manuscrito 5. Así, en esta parte del estudio, se analizó la relación entre la concentración de chemerina a los 3 y 24 meses y las concentraciones plasmáticas de glucosa, insulina, HOMA-IR, colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol, IGF-1, IGFBP3, cortisol, proteína C reactiva, TSH y T4, con el fin de analizar el papel de esta adipokina como biomarcador.

La chemerina se correlacionó positivamente, a los 3 meses de edad, con glucosa, insulina y HOMA-IR a esa misma edad, y con las concentraciones de triglicéridos, tanto a los 3 como a los 24 meses. Además, se llevó a cabo un análisis de regresión multilínea para establecer una ecuación con diferentes variables independientes, con el fin de determinar si las concentraciones de alguno de los parámetros bioquímicos observados estaban condicionadas por la expresión de la chemerina. Gracias a ello, se pudo observar que las concentraciones de insulina dependían, en parte, de la concentración de chemerina a esa misma edad, aun ajustando por parámetros que sabemos que influyen, como la edad gestacional, el peso o la longitud al nacer. Aunque no haya constancia de estudios de correlaciones con sangre venosa a esta edad, los resultados que asocian la chemerina con un desequilibrio en el control glucémico concuerdan con los observados en la bibliografía, tanto en adultos como en niños [261,262]. Este resultado, junto con las correlaciones positivas observadas entre la adipokina y concentraciones de glucosa y HOMA-IR a esa misma edad, nos han permitido confirmar que la relación entre la chemerina y un control glucémico alterado encontrada en otras cohortes, también se da en niños PEG de 3 meses de edad.

También se pudo determinar que la concentración de chemerina a los 3 meses se correlacionaba con las concentraciones de triglicéridos, medidos a los 24 meses. Además, esta asociación se mantuvo tras un ajuste por edad gestacional, el peso y la talla, tanto al nacer como a los 2 años de edad. En otros estudios, también se ha podido observar que tanto niños como adultos con niveles altos de esta especie lipídica presentan una concentración de chemerina elevada [263,264]. Gracias al presente estudio, se puede decir que esa asociación también se da en los primeros meses de vida de niños PEG.

# Emaizak eta eztabaida



Patologia metabolikoen jatorria eta pronostikoa, bai eta haiek agertzeko edo garatzeko mekanismoak ere, ez dira beti izan erabat deskribatuak. Gaur egun, jakina da mikroRNAek, kodifikatzaileak ez diren RNA zati txiki batzuk, erreakzio metaboliko ugari erregula ditzaketela eta, gainera, ahalmen handia dutela hainbat patologiaren biomarkatzaile gisa. Adipokinen garrantzia ere azpimarratu behar da, gantz ehunak jariatutako zitokinak baitira, modu autokrino, parakrino eta endokrinoan jarduten dutenak. MikroRNAk bezala, aldatutako egoera metabolikoen adierazletzat har daitezke, eskuratzeko errazak, odol periferikotik lor daitezkeelako.

Doktoretza tesi hau EHUKo Farmazia Fakultateko Nutrizioa eta Obesitatea ikerketa taldean egin da, zeinak esperientzia handia duen dietaren molekula bioaktiboen azterketan eta biomarkatzaile geniko edo proteikoen identifikazioan.

Tesiaren ardatza mikroRNAek eta adipokinek biomarkatzaile edo efektu metabolikoen bitartekari gisa duten eginkizuna aztertzeke hiru ikerketa dira. Lehenengoan, pteroestilbenoak, dietaren molekula bioaktiboa bera, esteatosi hepaticoko dituen ondorio onuragarriak mikroRNAen bitartez gertatzen diren aztertzen da. Bigarrenean, mahats estraktuak sindrome metabolikoan eragindako efektuaren erantzun markatzaile gisa eta horren efektuen bitartekari gisa mikroRNAek duten zeregina aztertzen da. Azkenik, hirugarrenean, adipokinek haurdunaldirako txiki jaiotako haurren garapenean duten zeregina aztertzen da, baita molekula horiek adin aurreratuagoetan izango dituzten aldaketa metabolikoak aurretik jakiteko erabiltzeko aukera ere.

## **1. MikroRNAen inplikazioa pteroestilbenoak arratoien esteatosi hepaticoko dituen ondorioetan**

Gure taldearen ikerketa aurreklinikoaren ildoari jarraituz, konposatu fenolikoak gure gizartean oso hedatuta dauden patologien prebentzioarako eta tratamendurako erabiltzean ardaztua, nire doktoretza tesia mikroRNAen azterlanarekin hasi nuen, esteatosi hepaticoa zuten arratoien eredu baliatuta (1. eskuizkribua).

Taldearen aurretiazko azterlan batean, pteroestilbenoak 6 astez eguneko 30 mg/kg-ko dosian gibel esteatosian daukan efektua aztertu zen, gibeledako alterazio hori garatzen duen obesitate genetikoko animalia eredu batean (Zucker fa/fa arratoia). Gibel laginen azterketa histologikoak agerian utzi zuen konposatu fenolikoa jaso zuten arratoiek

### **Emaitzak eta eztabaida**

esteatosi maila txikiagoa zutela [239]. Efektu horren mekanismoa aztertzean, PPAR $\alpha$  eta TFAM (mitokondrien sintesiarekin lotutako bi transkripzio faktore) proteinen espresioak gora egin zuela ikusi zen, baita CPT-1a entzimaren jarduerak ere, kate luzeko gantz azidoak mitokondriaren barrualdera sartzea ahalbidetzen duena; aldi berean, DGAT2 proteinen espresioa murriztu egin zen, triglizeridoen mihiztaduran inplikaturatuta dagoenarena, hain zuzen ere. Emaitza hauek guztiek iradokitzen dute konposatu fenolikoak triglizeridoen metaketa murrizten duela gibelean, hala nola gantz azidoen oxidazioa handitzen eta triglizeridoen eraketa gutxiagotzen.

Doktoretza tesi honetan, efektu horien mekanismo molekularra sakonago ezagutu nahi dugu, eta, zehatzago, mikroRNAek lehen aipatu proteinetan jazotako aldaketetan izan dezaketen inplikazioa, funtsezko zeregina baitute gibelesko metabolismo lipidikoan. Horretarako, lehenik eta behin, hainbat datu basetan, pteroestilbeno bidez tratatutako animalietan aldatutako proteinak zein mikroRNA eduki zitezakeen, diana gisa balidatuta edo iragarrita, bilatu zen. Adierazi beharra dago aurkitutako mikroRNA kopurua bereziki handia zenez bi ituko edo gehiagoko mikroRNAk bakarrik hautatu zirela gure intereseko proteinen artean. Bilaketa horretan aukeratutako mikroRNAk miR-93-5p, miR-19b-3p, miR-33-5p eta miR-140-5p izan ziren, ahalezko itu moduan badituztenak PPAR $\alpha$ , TFAM eta DGAT2 miR-93-5p eta miR-19b-3p-rako; PPAR $\alpha$  eta CPT1a mi-30-c-rako; eta DGAT2 eta CPT1a miR-140-3p-rako. Bestalde, literatura berrikusiz, miR-122-5p-k CPT-1a eta DGAT2 zituela helburu egiaztatu zen, eta, beraz, miRNA hori ere azterlanean txertatu zen. Azkenik, miR-107-3p ere aztertu zen (CPT1a dauka itu gisa), beste konposatu fenoliko batzuen efektuetan inplikaturatuta dagoela frogatu baitzen.

MiR-93-5p-ren espresioa pteroestilbeno bidezko tratamenduaren bidez areagotzen zela ikusi zen. Aipatu dianak (PPAR $\alpha$ , TFAM eta DGAT2) baliozkotu gabe zeudenez, mikroRNA hepatozitoetan transfektatzea erabaki genuen, proteina horien espresioarekin zer gertatzen zen aztertzeko, aurkitutako dianak benetakoak diren ala ez egiaztatzeko asmoz. Lortutako emaitzek adierazi zutenenez, proteina horien adierazpen genikoa eta proteikoa ez ziren aldatu miR-93-5p bidez transfektatutako hepatozitoetan, eta horrek eramaten gaitu ondorioztatzen proteina horiek ez direla mikroRNA honen benetako dianak eta pteroestilbeno bidezko tratamenduaren ondoren espresioan ikusitako aldaketak ez daudela lotuta konposatu fenoliko honek proteina horien adierazpenean dituen ondorioekin. Hala ere, interesgarria da azpimarratzea literaturan mikroRNA hau

### **Emaizak eta eztabaida**

hepatokartzinoma geneekin lotu denez gibel-esteatosiaren eboluzioan inplikaturik egon daitekeela, gaixotasunaren egoera aurreratuetan.

MiR-122-5p-ri dagokionez, pteroestilonoak aldatutako beste mikroRNA bat bera, kontsultatutako datu baseek baliozkotutako edo iragargarrirako diana generik erakusten ez badute ere, bibliografian mikroRNA hau CPT1a-ren murrizketarekin eta DGAT2ren handitzearekin lotuta dago (Iliopoulos et al., 2010), bi entzima horiek mikroRNAren dianak direla adierazita. Hori dela eta, gure azterlanean ez zen miR-122-5p transfekzioerik egin. Gure arratoien kohortean pteroestilbeno bidezko tratamenduak miR-122-5p gutxitzea, CPT1a handitzea eta DGAT2 murriztea eragin izanak iradokitzen du mikroRNA hau pteroestilonoak gantz azidoen oxidazioan eta triglizeridoen mihiztaduran dituen efektuen bitartekari izan daitekeela.

MiR-140, miR-107-3p, miR-19b-3p eta miR-33-5p-en espresioak pteroestilbeno bidezko tratamenduaren ondoren aldatu ez ziren arren, interesgarria iruditu zitzaigun mikroRNA horiek transfektatzea, datu baseetan ahalezko ituekin duten harremanari buruzko informazio gehiago lortzeko. MiR-140ren transfekzioak CPT1a proteinaren adierazpena murriztu zuen, nahiz eta ez zuen haren adierazpen genetiko aldatu. Hori bat dator mikroRNAek beren funtzioa betetzeko duten modu ohikoenarekin, hau da, postraskripzionalki, 3' UTR eskualdearekin bat eginda eta itzulpen prozesua inhibituta. Emaiz horrek aukera ematen du *cpt1a* genea miR-140-5p-ren benetako diana bat delako ideia planteatzeko. Hala ere, azterlan honen helburura itzulita, pteroestilbeno bidez tratatutako arratoien gibelean ez zen aldaketarik ikusi miR-140ren espresioan, eta, beraz, esan daiteke pteroestilonoak entzima horretan dituen ondorioak ez direla gertatzen miR-140-5p bidez.

MiR-107-3p-ri dagokionez, zeinetarako CPT-1a baino ez zen aurkitu datu baseetan ahalezko ituekin, esperimenterik txertatu zen erresberatrolak esteatosi hepatoan duen efektuan inplikaturik mikroRNA delako. mikroRNA honekin ez zen transfekzio esperimenterik egin, beste egile batzuek CPT1en beharrezko erregulazioa frogatu dutelako aldeztatik miR-107-3p-rekin transfektatutako hepatozitoetan [241]. Dena den, pteroestilbeno bidezko tratamenduaren ondoren aldaketarik ez izateak adierazten du miR-107-3p ez dela konposatu horren efektuen bitartekari.

Azkenik, miR-19b-3p eta miR-33-5p transfekzioen emaitzek erakutsi zuten mikroRNA horiek ez dituztela datubaseetan aurkitutako ahalezko ituak erregulatzen. Hori kontuan hartuta, pteroestilbenoarekin tratatutako arratoien gibleko espresioa aldatu ez izanaz gain, esan daiteke ez daudela ikerketa honetan aztertutako pteroestilbenoaren efektuekin lotuta.

Gure emaitzen eztabaidan, pteroestilonoak mikroRNAetan dituen ondorioak ezin izan ditugu bibliografiarekin alderatu, pteroestilonoak esteatosi hepaticokoan dituen ondorioak aztertzeko ikerketak oso urriak direlako gaur egun; egindakoen artean, gainera, batek ere ez ditu aztertu mikroRNAk. Beraz, gure azterlanean proposatu da lehenbizikoz miR-122-5p pteroestilonoak esteatosi hepaticokoan dituen ondorioen bitartekaria da, konposatu fenoliko honek gantz azidoen oxidazioan eta triglizeridoen mihiztaduran duen zereginean parte hartuz.

Hala ere, pteroestilonoak mikroRNAetan dituen eraginak erresberatrolaren jatorrizko konposatuan dituen eraginekin alderatu ahal izan ditugu. Bitxia bada ere, ez dira berdinak. Horrela, gure taldeak gantz ase eta sakarosa ugariko elikaduraren ondorioz esteatosia garatu zuten arratoiekin egindako aurretiazko azterlan batean, erresberatrol konposatuaren (hortik pteroestilbenoa eratortzen da) 30 mg/kg/pisuarekin (azterketa honetan erabilitako dosi bera) tratatuta, CPT-1a-ren gaineko efektuak miR-107-3p-ren murrizketa izan zuen bitartekari [247].

## **2. Mahats-patsak sindrome metabolikoa duten pazienteengan duten eragina aztertzea. MikroRNAk biomarkatzaile gisa erabiltzea**

Jara Pérez-Jiménez doktorearen taldearekin (ICTAN; CSIC) lankidetzan aritu ginenez, aukera izan genuen miRNAek konposatu fenolikoaren efektuekin zein lotura duten aztertzeko, oraingoan gizakiengan.

Horrela, Alberti *et al.* (2009)-en irizpideen arabera sindrome metabolikoa zuten pertsonengan esku hartzea planteatu zen, polifenol eta zuntz oparoko mahats-patsarekin (lehorra eta ehoa, 8 g egunean) 6 astez [238]. Parametro biokimiko plasmatikoak aztertu ondoren, efektu nagusia kontrol gluzemikoaren hobekuntza izan zela egiaztatu genuen. Hala ere, subjektu guztiek ez zioten modu berean erantzun gehigarriari; izan ere, norbanako batzuk erantzuleak ziren (barau egonik intsulinarren maila serikoan % 10etik

### **Emaitzak eta eztabaida**

gorako jaitsiera izan zuten parte hartzaileak) eta beste batzuk ez-erantzuleak (murrizketa hori % 10etik beherakoa izan zuten pertsonak). Azkenean, esku hartzearekiko erantzunean norbanakoen arteko aldakortasun argia nabarmendu zen.

MiRNAek hainbat erreakzio metaboliko erregulatzeko ahalmena erakutsi dutela jakinda, mahats-patsaren ekintza mekanismoan (3. eskuizkribua) eta parte hartzaileen arteko aldakortasunean (2. eskuizkribua) parte har dezaketelako hipotesia planteatu zen. Hori egiaztatzeko, odol laginak hartu ziren, eta belaunaldi berriko sekuentziazioa egin zen (NGS), mikroRNA zirkulatuzaileen patroia baloratzeko; horren bidez, parte hartzaileen bi taldeetan desberdin espresatzen ziren mikroRNAk identifikatu ziren. Hala, bi talde esperimentalen arteko aldeak aurkitu ziren miR-30c-5p, miR-23a-3p, miR-222-3p, miR-let7a-5p, miR-151a-5p, miR-181a-5p eta miR-10a-5p-ren espresioan. Zehazki, mikroRNA horiek gehiago espresatu ziren parte hartzaile erantzuleen taldean ez-erantzuleenean baino. Kostu ekonomiko handia zela-eta NGS azterketa aztertutako banakoen azpilagin batean egin zenez, lagin osoan lortutako emaitzak baliozkotu RT-PCR-ren bidez ziren. Kasu honetan, ezberdintasun esanguratsu bakarra aurkitu zen miR-222rako, eta joera bat miR-Let7a-rako.

Datu baseak kontsultatu ondoren, miR-222k glukosaren metabolismoan inplikaturako bi proteina zituela, itu gisa, aurkitu zen: intsulinareneko substratu hartzailea 4 (IRS4) eta kinasa pirubatoa (PKM). IRS4 proteina glukosaren garraiatzailea 4 (GLUT4) zelularen gainazalerako translokazioa estimulatzeko gai da. MiR-222ren eta *irs4* genearen arteko zuzeneko erlaziorik deskribatu ez bada ere, haurdunaldiko diabetesa duten emakumeen ehun adiposo omentalean mikroRNAren eta GLUT4ren arteko korrelazio negatiboa dagoela egiaztatu da. Hala, badago espekulatzea subjektu erantzuleek *irs* adierazpen txikiagoa eta, beraz, glukosa erakartzeko gaitasun murriztua eta kontrol gluzemiko okerragoa dutela.

PKMri dagokionez, glukolisiaren azken fasea katalizatzeaz arduratzen den entzima da. Argitaratu da gluzemiaren kontrolik okerrenea duten subjektuengan glukolisia aldatuta dagoela, glukosaren metabolismo normala duten pertsonekin alderatuta. Izan ere, glukolisi gutxituak zuzeneko lotura dauka DMT2ren garapenarekin [242]. Datu horien arabera, eta kontuan hartuta erantzun zuten pertsonen miR-222 adierazpen handiagoa adierazi zutela, parte hartzaile hauek glukolisi murriztua izatea espero daiteke.

### **Emaizak eta eztabaida**

Datu baseen bidez identifikatutako ituez gain, bibliografiaren bidez aurkitu zen adiponektinaren hartzailea 1 (adipoR1) miR-222ren beste itu potentzial bat dela. Adiponektinak intsulinarekiko erresistentzia murrizten du, GLUT4ren translokazioaren eta gantz azidoen oxidazioaren bitartez. Horrela, subjektu erantzuleek adiponektinaren ekintzan eraginkortasun txikiagoa izan lezaketela planteatu da. Hala ere, zuhurrak izan behar dugu proposamen honekin, aipatu azterlana giza zilbor zaineko zelula endotelialean egin baitzen.

Azterlan honetan lortutako emaitzen arabera, miR-222ren maila basalak sindrome metabolikoa duten gizabanakoen konposatu fenolikoekiko erantzunaren biomarkatzaile izan litezke. Hala ere, hori berariaz ikertu eta baliozkotu beharra dago. Garrantzitsua da adieraztea laburpen honetan ez direla aipatu 2. eskuizkribuan jasotako hesteetako mikrobiotarekin lotutako emaitzak; izan ere, balorazio horiek proiektuan parte hartu zuen beste ikerketa talde batean egin ziren, eta ez dira nire doktoretza tesiaren parte.

Esku hartze horretan aztertu nahi zen beste alderdi bat izan zen mikroRNAek mahatspatek eragindako kontrol gluzemikoaren gaineko ondorio onuragarrien bitartekari gisa izan dezaketen zeregina, maila molekularreko ekintza mekanismoa aztertzeko. Kasu honetan, miRNAak esku hartu aurretik eta ondoren konparatu ziren, eta aldaketa esanguratsuak ikusi genituen miR-23ren, miR-30c-ren eta miR-181en espresioan, bai eta joera bat ere miR-222n eta miR-151n. Datu baseetan aurkitu zen miRNA horiek guztiek kontrol gluzemikoarekin zerikusia zuten ahalezko ituak zituztela, miR-151k izan ezik. Aldatu ziren miRNAen artean, bitartekari gisa baztertu ziren erantzun gabekoetan (miR-181) edo bi taldeetan (miR-23) bakarrik aldatu zirenak. Beraz, miR-222 eta miR-30c baino ez ziren jo bitartekarizat.

MiR-30c-ri dagokionez, beste ikertzaile batzuek mikro RNAREN espresio handia ikusi zuten gantz oparoko dietaz elikatutako saguetan, zeinak hala intsulinarekiko nola obesitatearekiko erresistentzia garatu zuten. Horrez gain, 2. motako diabetesa zuten pertsonengan eta diabetes gestazionala zuten emakumeen zilbor-hestean gairespresioa antzeman zen. Kontrol gluzemiko txarra dagoen egoeretan miR-30c-k gora egiten duela ikusita, glukosaren homeostasian eragin negatiboa duela proposa daiteke. Gure azterlanean, tratamenduari erantzun zioten pertsonen, gluzemia kontrolik okerrean

zutenek, intsulina maila txikiagoa erakutsi zuten baraurik, eta miR-30c zirkulatuarekin gutxiago tratamenduaren hasieran osagarria hartu ostean baino. Horrek esan nahi du mikroRNA hori mahats-patsek eragindako kontrol glukemikoaren hobekuntza inplikaturik dagoela.

MikroRNA honetarako dianak datu baseetan bilatzeak agerian utzi zuen PKM, transzetolasa (TKT), fosfoinositido-3-kinasa 2 azpiunitate erregulatuarekin (PIK3R2), kinasa AMP proteinak aktibatutako beta 2 azpiunitate ez-katalitikoa (PRKAB2), zitokinen seinaleztapenaren supresoreak 1 eta 3 (SOCS1 eta SOCS3) eta fosfoinositido-3-kinase (PI3K) ahalezko dianak direla. Beraz, mahats-patsek eragindako miR-30c-ren murrizketak proteina horien espresioaren hazkuntza ekartzea espero daiteke. Esan bezala, PKM glukolisiaren azken fasea katalizatzeaz arduratzen den entzima da; bestalde, PI3K-k AKT1 aktibatzen du, 3,4,5-trisphosphate (PIP3) sortuta, eta horrek, aldi berean, intsulinarekin eragina errazten du; horrela, glukosarekiko tolerantzia hobea izango da [245]. PRKAB2ri dagokionez, AMPKren efektua erregulatzeaz arduratzen den azpiunitatea da, glukosa muskulu ehunean modu intulin-independentean sartzeko orduan inplikaturikoa entzima. Beraz, mahatsaren estraktuak eragindako miR-30c mailen murrizketari esker, glukosa gehiago har daiteke, intulinarekiko mendeko moduan edo modu independentean. Bestalde, deskribatu da miR-30c-k SOCS taldeko geneak (socs1 eta socs3) ahalezko itua gisa izan ditzakeela. Proteina talde horrek intsulina seinaleztatze bidearen inhibizioan eta IRS1 proteinaren ekintzan parte hartzen du, eta, beraz, haien hazkunde potentziala efektu negatibotzat har daiteke. Hala ere, jarduteko modu negatibo hori miR-222ren ekintzarekin konpentsatzen da, miR-30c-k ez bezala IRS1 proteina aktibatzen baitu.

### **3. Jaiotzean pisu edo neurri txikia duten haurren adipokinak biomarkatuarekin gisa aztertzea**

Doktoretza tesiko azken azterketa Bioaraba Osasun Ikerketarako Institutuaren (Bioaraba OII) eta Arabako Txagorritxu Unibertsitate Ospitaleko Pediatria Zerbitzuko Ignacio Díez doktorearen taldearen arteko lankidetzaren emaitza da. Kasu honetan, adipokinetan ardatz dugu gure helburua, biomarkatuarekin potentzial gisa.

### **Emaizak eta eztabaida**

Haurdunaldirako txiki jaiotzeak (HT) hainbat alterazio metaboliko dakartza, bai jaiotza inguruko etapan eta haurtzaroan bai helduaroan. HT jaiotako haur guztiek ez dute garapen abiadura ("catch-up") bera, eta aldeak daude norbanakoen artean. "Catch-up" mota garrantzitsua da, helduaroan garatuko dituzten alterazio metabolikoetan eragin argia duelako. Horrela, "catch-up"-a pixkanaka gertatzen bada, bizitzako lehen 24 hilabeteetan abdomeneko gantzak pilatu gabe, sindrome metabolikoaren intzidentzia nabarmen murriztuko da. Hala ere, HT haur batek hazkunde mota bat edo beste bat izatea baldintzatzen duten aldagaiak eta hori sortzen duten mekanismoak ez daude erabat deskribatuta. Bestalde, gantz ehunak jariatutako adipokinek erregulazio funtzio ugari dituzte, hazkunde prozesuaren erregulazioa barne. Hori guztia kontuan hartuta, azterlan honetan honako hau aztertu nahi dugu: hazkunde abiadura desberdinak dituzten HT haurren adipokinen eta parametro biokimikoen profila; neskatoen eta mutikoen artean egon daitezkeen aldeak; eta, azkenik, adipokinen bilakaera haur horien bizitzako lehen bi urteetan (4. eta 5. eskuizkribuak).

Horretarako, ospitalean jaiotako 27 haur errekrutatu ziren, HT gisa diagnostikatuak; hau da, jaiotzean, gutxienez 2 desbideratze estandar zituzten Espainiako biztanleriarentzako erreferentziatzko neurri/pisuko taulen azpitik. Ondoren, haurrok 3 taldetan sailkatu ziren, "catch-up"-aren arabera, jaiotzatik 12 hilabetera pisuak edo neurriak izandako irabaziaren arabera, alegia: "catch-up" motela  $\Delta < 0.49$  SD, "catch-up" normala,  $\Delta 0.5 - 1$  SD eta "catch-up" azkarra  $\Delta > 1$  SD.

"Catch-up"-ari dagokionez, egiaztatu genuen lehenengo gauza izan zen jaiotzean pisu txikiagoa zuten haurrek pisu handiagoekin jaiotakoek baino hazkunde abiadura azkarragoa zutela. Hiru "catch-up" motei buruzko informazio gehiago lortzeko asmoz, lan honetan adipokinen kontzentrazio plasmaticoetan egon daitezkeen aldeak aztertu ziren, 3 hilabetez. Adin horretan "catch-up" motela zuten parte hartzaileek leptina eta vaspina kontzentrazio txikiagoak izan zituzten, eta adiponektina, chemerina eta omentina kontzentrazio handiagoak, "catch-up" normala zuen taldearekin alderatuta. Beraz, pentsa liteke adipokinek badutela eginkizunik HT haurren berreskuratze abiaduran. "Catch-up" azkarra eta normala zuten haurren artean, aldiz, ez zen alderik topatu. Leptina umekien, jaioberrien eta helduen metabolismoan eta oreka energetikoan inplikaturik dagoenez eta fetuaren hazkundean paper garrantzitsua betetzen duenez, eta kontuan hartuta adipokina horrek hazkuntza hormona askatzea eragiten duela, somatostatina hipotalamikoaren



### **Emaitzak eta eztabaida**

inhibizioaren bidez, proposa liteke leptinaren kontzentrazio txikiak baduela lotura "catch-up" motela duten haurren garapen mugatuarekin [246-248].

Haurren egoera metabolikoa hazkunde abiadurarekin lotuta egon daitekeen zehazteko, parametro biokimiko batzuk aztertu ziren, haurrek 12 hilabete zituztela. "Catch-up" motela zuten haurrek intsulina eta HOMA-IR kontzentrazio handienak zituzten, eta, ondorioz, gluzemiaren kontrolik okerrena. Vaspina intsulinarekiko sentzibilizatzaile batenez, omentina intsulinarekiko erresistentziaren biomarkatzaile gisa har daiteke, eta chemerina, berriz, intsulinarekiko erresistentziaren garapenarekin eta 2. diabetes motarekin lotuta dagoenez, proposa daiteke hiru hilabetera "catch-up" motela duten haurren adipokinen profil eraldatua, neurri batean, behintzat, 12 hilabetera behatutako kontrol gluzemikoaren narriaduraren bitartekari izan daitekeela [66,137,249]. Interesgarria da azpimarratzea, nahiz eta argi eta garbi frogatu den bizitzan aurrerago "catch-up" motela duten HT haurrek "catch-up" azkarra dutenek baino alterazio metaboliko gutxiago garatzeko joera dutela, azterlan honen emaitzek erakutsi dutenez, hazkunde eredu horrek gluzemiaren kontrolean aldi baterako narriadura eragiten duela bizitzako lehen hilabeteetan [250,251]. Hau da, hasieran, "catch-up" motelak alterazio gehiago eragiten ditu haurtxoarengan, baina bizitzako ondorengo etapetan osasun egoera hobea izaten da.

Bizitzako lehen bi urteetan adipokinen patroiak izandako bilakaeraren analisiak erakutsi zuten leptina eta NOV/CCN3 kontzentrazioak murriztu egin zirela eta omentinaren kontzentrazioak gora egin zuela. Gainerako adipokinetan, ez zen aldaketa estatistikoki esanguratsurik antzeman. Horri buruz argitaratutako ikerlanen emaitzak nahiko desberdinak dira euren artean.

Gure azterlanaren beste alderdi interesgarri bat bi sexuen arteko desberdintasunak aztertzea izan zen. Ezberdintasun nagusiak 2 urterekin aurkitu ziren. Une horretan, neskek leptina, adiponektina eta omentina kontzentrazio handiagoak zituzten. Adiponektina ehun adiposo zuriak bakarrik ekoizten duenez, zeina, aldi berean, leptinaren eta omentinaren ekoizle nagusia baita, desberdintasuna bi sexuen gorputzeko gantz masaren irabazien artean dauden aldeei egotz dakieke [252,253]. Hala ere, gure azterlanean ez zen alderik aurkitu bi sexuen beso eta sabel perimetroen artean.

### **Emaizak eta eztabaida**

Ikerketa honek baditu zenbait muga. Beharbada, garrantzitsuena da ez egotea haurdunaldirako pisu eta luzera normaleko haur talderik, kontrol gisa balioko duenik, haur osasuntsuei 3 hilabete dituztenean odola ateratzeko gurasoen baimena lortzea zaila delako, batez ere. Gainera, laginaren tamaina txikia da, HT haurrak Arabako Txagorritxuko Unibertsitate Ospitaleko jaioberrien ehuneko txikia direlako; bertan jaiotzen diren haurren kopurua ere ez da oso handia, berez. Gainera, azterketa populazio kaukasoarrarekin egin denez, datuak ezin dira zuzenean beste biztanle talde batzuetara estrapolatu. Dena den, azpimarratu behar da oso azterlan gutxik baloratzen dituztela HT haurren adipokinen kontzentrazio plasmaticoak; normalean, zilbor hesteko odolean aztertzen dira, eta hori ez da materialik egokiena.

Egindako korrelazioen azterketak agerian utzi zuen adipokinen eta parametro plasmaticoen arteko korrelazio interesgarrienak chemerinarekin eman zirela. Horregatik, horietan sakontzen dugu bereziki 5. eskuizkribuan. Horrela, ikerketaren zati honetan, 3 eta 24 hilabete bitarteko chemerina kontzentrazioaren eta glukosa, insulina, HOMA-IR, kolesterol totala, LDL-kolesterol, HDL-kolesterol, IGF-1, IGFBP3, kortisol, C proteina erreaktiboa, TSH eta T4 kontzentrazio plasmaticoen arteko erlazioa aztertu zen, adipokina honek biomarkatzaile gisa daukan paera aztertzeko helburuarekin.

Chemerina modu positiboan korrelatu zen, 3 hilabetetan, glukosarekin, insulinarekin eta HOMA-IRrekin adin horretan bertan, eta triglizeridoen kontzentrazioekin, bai 3 hilabeterekin bai 24 hilabeterekin. Gainera, erregresio multilinealeko analisi bat egin zen, aldagai independente desberdinak dituen ekuazio bat ezartzeko, behatutako parametro biokimikoren baten kontzentrazioak chemerinaren espresioak baldintzatzen ote zituen zehazteko. Horri esker, insulina-kontzentrazioak, neurri batean, adin horretan bertan chemerina-kontzentrazioaren mende zeudela ikusi ahal izan zen, nahiz eta eragina dutela dakigun parametroen arabera doitu, hala nola, haurdunaldi-adinean, pisuan edo jaiotzeko luzeran. Adin horretan zain-odolarekin egindako azterlanarik ez badago ere, chemerina kontrol glukemikoaren desorekarekin lotzen duten emaitzak bat datoz bibliografian ikusitakoekin, bai helduetan, bai haurretan [254,255]. Emaitza hori, adipokinaren eta glukosa-kontzentrazioen eta HOMA-IREn artean adin horretan ikusitako korrelazio positiboekin batera, egiaztatu ahal izan dugu beste kohorte batzuetan aurkitutako chemerinaren eta kontrol glukemiko alteratuaren arteko erlazioa, 3 hilabeteko HT diren haurren artean ere gertatzen dela.

### **Emaidzak eta eztabaida**

Halaber, 3 hilabeterekin neurtutako chemerina-kontzentrazioa 24 hilabeterekin neurtutako triglizerido-kontzentrazioekin korrelazioan zela zehaztu ahal izan zen. Gainera, elkarre horrek eutsi egin zion haurdunaldiaren, pisuaren eta neurriaren arabera doitzeari, bai jaiotzean, bai 2 urterekin. Beste ikerketa batzuetan ikusi ahal izan denez, triglizerido-maila altua zuten haurrek zein helduek chemerina kontzentrazio handia dute [256,257]. Ikerketa honi esker, esan daiteke lotura hori HT jaiotako haurren bizitzako lehen hilabeteetan ere gertatzen dela.

# Bibliografía / Bibliografia

### **Bibliografía / Bibliografia**

- [1] Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993,75,843-854.
- [2] Wightman, B., Ha, I., Ruvkun, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993,75,855-862.
- [3] Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*. 2007,129,1401-1414.
- [4] Bentwich, I. Prediction and validation of microRNAs and their targets. *FEBS Lett*. 2005,579,5904-5910.
- [5] Mellis, D., Caporali, A. MicroRNA-based therapeutics in cardiovascular disease: screening and delivery to the target. *Biochem.Soc.Trans*. 2018,46,11-21.
- [6] Ali Syeda, Z., Langden, S.S.S., Munkhzul, C., Lee, M., Song, S.J. Regulatory Mechanism of MicroRNA Expression in Cancer. *Int.J.Mol.Sci*. 2020,21,1723. doi: 10.3390/ijms21051723.
- [7] Volker A, E., Wolfgang, P., Jan, B., ***RNA Technologies in Cardiovascular Medicine and Research***, Springer 2008.
- [8] Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., Tuschl, T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001,294,853-858.
- [9] Cai, X., Hagedorn, C.H., Cullen, B.R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*. 2004,10,1957-1966.
- [10] Wahid, F., Shehzad, A., Khan, T., Kim, Y.Y. MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim.Biophys.Acta*. 2010,1803,1231-1243.

### Bibliografía / Bibliografia

- [11] Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004,23,4051-4060.
- [12] Borchert, G.M., Lanier, W., Davidson, B.L. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 2006,13,1097-1101.
- [13] Maugeri, M., Barbagallo, D., Barbagallo, C., Banelli, B., et al. Altered expression of miRNAs and methylation of their promoters are correlated in neuroblastoma. *Oncotarget.* 2016,7,83330-83341.
- [14] Tessarz, P., Kouzarides, T. Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2014,15,703-708.
- [15] Yates, L.A., Norbury, C.J., Gilbert, R.J. The long and short of microRNA. *Cell.* 2013,153,516-519.
- [16] Guo, W.T., Wang, Y. Dgcr8 knockout approaches to understand microRNA functions in vitro and in vivo. *Cell Mol.Life Sci.* 2019,76,1697-1711.
- [17] Leisegang, M.S., Martin, R., Ramírez, A.S., Bohnsack, M.T. Exportin t and Exportin 5: tRNA and miRNA biogenesis - and beyond. *Biol.Chem.* 2012,393,599-604.
- [18] Okada, C., Yamashita, E., Lee, S.J., Shibata, S., et al. A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science.* 2009,326,1275-1279.
- [19] Lee, Y.S., Nakahara, K., Pham, J.W., Kim, K., et al. Distinct roles for Drosophila Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell.* 2004,117,69-81.
- [20] Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Bálint, E., et al. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science.* 2001,293,834-838.

**Bibliografía / Bibliografia**

- [21] Fukunaga, R., Han, B.W., Hung, J.H., Xu, J., et al. Dicer partner proteins tune the length of mature miRNAs in flies and mammals. *Cell*. 2012,151,533-546.
- [22] Hammond, S.M. An overview of microRNAs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015,87,3-14.
- [23] Khvorova, A., Reynolds, A., Jayasena, S.D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*. 2003,115,209-216.
- [24] Pasquinelli, A.E. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat. Rev. Genet.* 2012,13,271-282.
- [25] Bartel, D.P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009,136,215-233.
- [26] Ameres, S.L., Zamore, P.D. Diversifying microRNA sequence and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013,14,475-488.
- [27] Meyer, K.D., Saletore, Y., Zumbo, P., Elemento, O., et al. Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell*. 2012,149,1635-1646.
- [28] Wilczynska, A., Bushell, M. The complexity of miRNA-mediated repression. *Cell Death Differ.* 2015,22,22-33.
- [29] Yoon, J.H., Abdelmohsen, K., Gorospe, M. Functional interactions among microRNAs and long noncoding RNAs. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2014,34,9-14.
- [30] Wagner, A.E., Piegholdt, S., Ferraro, M., Pallauf, K., Rimbach, G. Food derived microRNAs. *Food Funct.* 2015,6,714-718.

### **Bibliografía / Bibliografia**

- [31] Grasedieck, S., Sorrentino, A., Langer, C., Buske, C., et al. Circulating microRNAs in hematological diseases: principles, challenges, and perspectives. *Blood*. 2013,121,4977-4984.
- [32] Chen, X., Liang, H., Zhang, J., Zen, K., Zhang, C.Y. Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol*. 2012,22,125-132.
- [33] Beermann, J., Piccoli, M.T., Viereck, J., Thum, T. Non-coding RNAs in Development and Disease: Background, Mechanisms, and Therapeutic Approaches. *Physiol.Rev*. 2016,96,1297-1325.
- [34] Zhang, J., Li, S., Li, L., Li, M., et al. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2015,13,17-24.
- [35] Sasaki, R., Kanda, T., Yokosuka, O., Kato, N., et al. Exosomes and Hepatocellular Carcinoma: From Bench to Bedside. *Int.J.Mol.Sci*. 2019,20,1406. doi: 10.3390/ijms20061406.
- [36] Backes, C., Leidinger, P., Keller, A., Hart, M., et al. Blood born miRNAs signatures that can serve as disease specific biomarkers are not significantly affected by overall fitness and exercise. *PLoS One*. 2014,9,e102183.
- [37] Meder, B., Backes, C., Haas, J., Leidinger, P., et al. Influence of the confounding factors age and sex on microRNA profiles from peripheral blood. *Clin.Chem*. 2014,60,1200-1208.
- [38] Ryu, M.S., Langkamp-Henken, B., Chang, S.M., Shankar, M.N., Cousins, R.J. Genomic analysis, cytokine expression, and microRNA profiling reveal biomarkers of human dietary zinc depletion and homeostasis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*. 2011,108,20970-20975.



### **Bibliografía / Bibliografia**

- [39] Enquobahrie, D.A., Williams, M.A., Qiu, C., Siscovick, D.S., Sorensen, T.K. Global maternal early pregnancy peripheral blood mRNA and miRNA expression profiles according to plasma 25-hydroxyvitamin D concentrations. *J.Matern.Fetal.Neonatal Med.* 2011,24,1002-1012.
- [40] Zhong, Z., Dong, Z., Yang, L., Chen, X., Gong, Z. Inhibition of proliferation of human lung cancer cells by green tea catechins is mediated by upregulation of let-7. *Exp.Ther.Med.* 2012,4,267-272.
- [41] Parasramka, M.A., Dashwood, W.M., Wang, R., Abdelli, A., et al. MicroRNA profiling of carcinogen-induced rat colon tumors and the influence of dietary spinach. *Mol.Nutr.Food Res.* 2012,56,1259-1269.
- [42] Zhang, L., Hou, D., Chen, X., Li, D., et al. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Res.* 2012,22,107-126.
- [43] Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994,372,425-432.
- [44] Mantzoros, C.S. Leptin in relation to the lipodystrophy-associated metabolic syndrome. *Diabetes Metab.J.* 2012,36,181-189.
- [45] Dalamaga, M., Chou, S.H., Shields, K., Papageorgiou, P., et al. Leptin at the intersection of neuroendocrinology and metabolism: current evidence and therapeutic perspectives. *Cell.Metab.* 2013,18,29-42.
- [46] Bornstein, S.R., Abu-Asab, M., Glasow, A., Páth, G., et al. Immunohistochemical and ultrastructural localization of leptin and leptin receptor in human white adipose tissue and differentiating human adipose cells in primary culture. *Diabetes.* 2000,49,532-538.

**Bibliografía / Bibliografia**

- [47] Kwon, O., Kim, K.W., Kim, M.S. Leptin signalling pathways in hypothalamic neurons. *Cell Mol.Life Sci.* 2016,73,1457-1477.
- [48] Wang, Y., Ali, Y., Lim, C.Y., Hong, W., et al. Insulin-stimulated leptin secretion requires calcium and PI3K/Akt activation. *Biochem.J.* 2014,458,491-498.
- [49] Farooqi, I.S., Jebb, S.A., Langmack, G., Lawrence, E., et al. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N.Engl.J.Med.* 1999,341,879-884.
- [50] Morales, A., Wasserfall, C., Brusko, T., Carter, C., et al. Adiponectin and leptin concentrations may aid in discriminating disease forms in children and adolescents with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2004,27,2010-2014.
- [51] Reinehr, T., Roth, C.L. Inflammation Markers in Type 2 Diabetes and the Metabolic Syndrome in the Pediatric Population. *Curr.Diab Rep.* 2018,18,131-018-1110-5.
- [52] Reinehr, T., Woelfle, J., Wiegand, S., Karges, B., et al. Leptin but not adiponectin is related to type 2 diabetes mellitus in obese adolescents. *Pediatr.Diabetes.* 2016,17,281-288.
- [53] Scherer, P.E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., Lodish, H.F. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J.Biol.Chem.* 1995,270,26746-26749.
- [54] Polyzos, S.A., Kountouras, J., Zavos, C., Tsiaousi, E. The role of adiponectin in the pathogenesis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Obes.Metab.* 2010,12,365-383.

### **Bibliografía / Bibliografia**

- [55] Yamauchi, T., Iwabu, M., Okada-Iwabu, M., Kadowaki, T. Adiponectin receptors: a review of their structure, function and how they work. *Best Pract.Res.Clin.Endocrinol.Metab.* 2014,28,15-23.
- [56] Nawrocki, A.R., Rajala, M.W., Tomas, E., Pajvani, U.B., et al. Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J.Biol.Chem.* 2006,281,2654-2660.
- [57] Li, S., Shin, H.J., Ding, E.L., van Dam, R.M. Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 2009,302,179-188.
- [58] Ryo, M., Nakamura, T., Kihara, S., Kumada, M., et al. Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome. *Circ.J.* 2004,68,975-981.
- [59] Heiker, J.T., Kosel, D., Beck-Sickinger, A.G. Molecular mechanisms of signal transduction via adiponectin and adiponectin receptors. *Biol.Chem.* 2010,391,1005-1018.
- [60] Polyzos, S.A., Kountouras, J., Zavos, C. Nonalcoholic fatty liver disease: the pathogenetic roles of insulin resistance and adipocytokines. *Curr.Mol.Med.* 2009,9,299-314.
- [61] Udomsinprasert, W., Honsawek, S., Poovorawan, Y. Adiponectin as a novel biomarker for liver fibrosis. *World J.Hepatol.* 2018,10,708-718.
- [62] Ye, R., Scherer, P.E. Adiponectin, driver or passenger on the road to insulin sensitivity?. *Mol.Metab.* 2013,2,133-141.

### **Bibliografía / Bibliografia**

- [63] Yamauchi, T., Kadowaki, T. Physiological and pathophysiological roles of adiponectin and adiponectin receptors in the integrated regulation of metabolic and cardiovascular diseases. *Int.J.Obes.(Lond)*. 2008,32 Suppl 7,S13-8.
- [64] Orlando, A., Nava, E., Giussani, M., Genovesi, S. Adiponectin and Cardiovascular Risk. From Pathophysiology to Clinic: Focus on Children and Adolescents. *Int.J.Mol.Sci*. 2019,20,3228. doi: 10.3390/ijms20133228.
- [65] Youn, B.S., Klötting, N., Kratzsch, J., Lee, N., et al. Serum vaspin concentrations in human obesity and type 2 diabetes. *Diabetes*. 2008,57,372-377.
- [66] Blüher, M. Vaspin in obesity and diabetes: pathophysiological and clinical significance. *Endocrine*. 2012,41,176-182.
- [67] Klötting, N., Kovacs, P., Kern, M., Heiker, J.T., et al. Central vaspin administration acutely reduces food intake and has sustained blood glucose-lowering effects. *Diabetologia*. 2011,54,1819-1823.
- [68] Goktas, Z., Owens, S., Boylan, M., Syn, D., et al. Associations between tissue visfatin/nicotinamide, phosphoribosyltransferase (Nampt), retinol binding protein-4, and vaspin concentrations and insulin resistance in morbidly obese subjects. *Mediators Inflamm*. 2013,2013,861496.
- [69] Polyzos, S.A., Kountouras, J., Mantzoros, C.S. Adipokines in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism*. 2016,65,1062-1079.
- [70] Aliasghari, F., Izadi, A., Jabbari, M., Imani, B., et al. Are Vaspin and Omentin-1 Related to Insulin Resistance, Blood Pressure and Inflammation in NAFLD Patients?. *J.Med.Biochem*. 2018,37,470-475.

### **Bibliografía / Bibliografia**

- [71] Kameshima, S., Sakamoto, Y., Okada, M., Yamawaki, H. Vaspin prevents elevation of blood pressure through inhibition of peripheral vascular remodelling in spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol.(Oxf)*. 2016,217,120-129.
- [72] Li, H.L., Peng, W.H., Cui, S.T., Lei, H., et al. Vaspin plasma concentrations and mRNA expressions in patients with stable and unstable angina pectoris. *Clin.Chem.Lab.Med.* 2011,49,1547-1554.
- [73] Körner, A., Neef, M., Friebe, D., Erbs, S., et al. Vaspin is related to gender, puberty and deteriorating insulin sensitivity in children. *Int.J.Obes.(Lond)*. 2011,35,578-586.
- [74] Hernández-Rodríguez, C.E., Estrada-Zúñiga, C.M., De la O-Cavazos, M.E., García-Rodríguez, F., et al. Differences in omentin-1 levels in term newborns according to birth weight. *Early Hum.Dev.* 2019,139,104842.
- [75] Jialal, I., Devaraj, S. Subcutaneous adipose tissue biology in metabolic syndrome. *Horm.Mol.Biol.Clin.Investig.* 2018,33,10.1515/hmbci-2017-0074.
- [76] Tan, B.K., Adya, R., Farhatullah, S., Lewandowski, K.C., et al. Omentin-1, a novel adipokine, is decreased in overweight insulin-resistant women with polycystic ovary syndrome: ex vivo and in vivo regulation of omentin-1 by insulin and glucose. *Diabetes*. 2008,57,801-808.
- [77] Catli, G., Anik, A., Abaci, A., Kume, T., Bober, E. Low omentin-1 levels are related with clinical and metabolic parameters in obese children. *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes*. 2013,121,595-600.
- [78] Prats-Puig, A., Bassols, J., Bargalló, E., Mas-Parareda, M., et al. Toward an early marker of metabolic dysfunction: omentin-1 in prepubertal children. *Obesity (Silver Spring)*. 2011,19,1905-1907.

**Bibliografía / Bibliografía**

- [79] Brunetti, L., Orlando, G., Ferrante, C., Recinella, L., et al. Orexigenic effects of omentin-1 related to decreased CART and CRH gene expression and increased norepinephrine synthesis and release in the hypothalamus. *Peptides*. 2013,44,66-74.
- [80] Hernández-Díaz, A., Arana-Martínez, J.C., Carbó, R., Espinosa-Cervantes, R., Sánchez-Muñoz, F. Omentin: Role in insulin resistance, inflammation and cardiovascular protection. *Arch.Cardiol.Mex*. 2016,86,233-243.
- [81] Yang, R.Z., Lee, M.J., Hu, H., Pray, J., et al. Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab*. 2006,290,E1253-61.
- [82] Nagpal, S., Patel, S., Jacobe, H., DiSepio, D., et al. Tazarotene-induced gene 2 (TIG2), a novel retinoid-responsive gene in skin. *J.Invest.Dermatol*. 1997,109,91-95.
- [83] Wittamer, V., Franssen, J.D., Vulcano, M., Mirjolet, J.F., et al. Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. *J.Exp.Med*. 2003,198,977-985.
- [84] Samson, M., Edinger, A.L., Stordeur, P., Rucker, J., et al. ChemR23, a putative chemoattractant receptor, is expressed in monocyte-derived dendritic cells and macrophages and is a coreceptor for SIV and some primary HIV-1 strains. *Eur.J.Immunol*. 1998,28,1689-1700.
- [85] Zabel, B.A., Ohshima, T., Zuniga, L., Kim, J.Y., et al. Chemokine-like receptor 1 expression by macrophages in vivo: regulation by TGF-beta and TLR ligands. *Exp.Hematol*. 2006,34,1106-1114.

### **Bibliografía / Bibliografia**

- [86] Bozaoglu, K., Bolton, K., McMillan, J., Zimmet, P., et al. Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. *Endocrinology*. 2007,148,4687-4694.
- [87] Lehrke, M., Becker, A., Greif, M., Stark, R., et al. Chemerin is associated with markers of inflammation and components of the metabolic syndrome but does not predict coronary atherosclerosis. *Eur.J.Endocrinol*. 2009,161,339-344.
- [88] Yang, M., Yang, G., Dong, J., Liu, Y., et al. Elevated plasma levels of chemerin in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus with hypertension. *J.Investig.Med*. 2010,58,883-886.
- [89] Stejskal, D., Karpisek, M., Hanulova, Z., Svestak, M. Chemerin is an independent marker of the metabolic syndrome in a Caucasian population--a pilot study. *Biomed.Pap.Med.Fac.Univ.Palacky Olomouc Czech.Repub*. 2008,152,217-221.
- [90] Bozaoglu, K., Segal, D., Shields, K.A., Cummings, N., et al. Chemerin is associated with metabolic syndrome phenotypes in a Mexican-American population. *J.Clin.Endocrinol.Metab*. 2009,94,3085-3088.
- [91] El-Mesallamy, H.O., El-Derany, M.O., Hamdy, N.M. Serum omentin-1 and chemerin levels are interrelated in patients with Type 2 diabetes mellitus with or without ischaemic heart disease. *Diabet.Med*. 2011,28,1194-1200.
- [92] Chu, S.H., Lee, M.K., Ahn, K.Y., Im, J.A., et al. Chemerin and adiponectin contribute reciprocally to metabolic syndrome. *PLoS One*. 2012,7,e34710.
- [93] Jialal, I., Devaraj, S., Kaur, H., Adams-Huet, B., Bremer, A.A. Increased chemerin and decreased omentin-1 in both adipose tissue and plasma in nascent metabolic syndrome. *J.Clin.Endocrinol.Metab*. 2013,98,E514-7.

**Bibliografía / Bibliografia**

- [94] Takahashi, M., Inomata, S., Okimura, Y., Iguchi, G., et al. Decreased serum chemerin levels in male Japanese patients with type 2 diabetes: sex dimorphism. *Endocr.J.* 2013,60,37-44.
- [95] Wang, D., Yuan, G.Y., Wang, X.Z., Jia, J., et al. Plasma chemerin level in metabolic syndrome. *Genet.Mol.Res.* 2013,12,5986-5991.
- [96] Zhuang, X.H., Sun, F.D., Chen, S.H., Liu, Y.T., et al. Circulating chemerin levels are increased in first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Clin.Lab.* 2014,60,983-988.
- [97] Adams-Huet, B., Devaraj, S., Siegel, D., Jialal, I. Increased adipose tissue insulin resistance in metabolic syndrome: relationship to circulating adipokines. *Metab.Syndr.Relat.Disord.* 2014,12,503-507.
- [98] Coimbra, S., Brandão Proença, J., Santos-Silva, A., Neuparth, M.J. Adiponectin, leptin, and chemerin in elderly patients with type 2 diabetes mellitus: a close linkage with obesity and length of the disease. *Biomed.Res.Int.* 2014,2014,701915.
- [99] Fatima, S.S., Butt, Z., Bader, N., Pathan, A.Z., et al. Role of multifunctional Chemerin in obesity and preclinical diabetes. *Obes.Res.Clin.Pract.* 2015,9,507-512.
- [100] Andersson, D.P., Laurencikiene, J., Acosta, J.R., Rydén, M., Arner, P. Circulating and Adipose Levels of Adipokines Associated With Insulin Sensitivity in Nonobese Subjects With Type 2 Diabetes. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 2016,101,3765-3771.
- [101] Habib, S.S., Eshki, A., AlTassan, B., Fatani, D., et al. Relationship of serum novel adipokine chemerin levels with body composition, insulin resistance, dyslipidemia and diabetes in Saudi women. *Eur.Rev.Med.Pharmacol.Sci.* 2017,21,1296-1302.



### **Bibliografía / Bibliografia**

- [102] El-Deeb, T.S., Bakkar, S.M., Eltoony, L., Zakhary, M.M., et al. The adipokine Chemerin and Fetuin-A Serum Levels in Type 2 Diabetes Mellitus: Relation to Obesity and Inflammatory Markers. *Egypt.J.Immunol.* 2018,25,191-202.
- [103] Gateva, A., Assyov, Y., Tsakova, A., Kamenov, Z. Classical (adiponectin, leptin, resistin) and new (chemerin, vaspin, omentin) adipocytokines in patients with prediabetes. *Horm.Mol.Biol.Clin.Investig.* 2018,34,10.1515/hmbci-2017-0031.
- [104] Yang, M., Zhou, X., Xu, J., Yang, B., et al. Association of serum chemerin and inflammatory factors with type 2 diabetes macroangiopathy and waist-to-stature ratio. *Bosn J.Basic Med.Sci.* 2019,19,328-335.
- [105] Ouerghi, N., Ben Fradj, M.K., Talbi, E., Bezrati, I., et al. Association of selected adipokines with metabolic syndrome and cardio-metabolic risk factors in young males. *Cytokine.* 2020,133,155170.
- [106] Sitar-Taut, A.V., Coste, S.C., Tarmure, S., Orasan, O.H., et al. Diabetes and Obesity-Cumulative or Complementary Effects On Adipokines, Inflammation, and Insulin Resistance. *J.Clin.Med.* 2020,9,2767. doi: 10.3390/jcm9092767.
- [107] Shafer-Eggleton, J., Adams-Huet, B., Jialal, I. Chemerin Ratios to HDL-cholesterol and Adiponectin as Biomarkers of Metabolic Syndrome. *Endocr.Res.* 2020,45,241-245.
- [108] Ouwens, D.M., Bekaert, M., Lapauw, B., Van Nieuwenhove, Y., et al. Chemerin as biomarker for insulin sensitivity in males without typical characteristics of metabolic syndrome. *Arch.Physiol.Biochem.* 2012,118,135-138.
- [109] Fatima, S.S., Bozaoglu, K., Rehman, R., Alam, F., Memon, A.S. Elevated chemerin levels in Pakistani men: an interrelation with metabolic syndrome phenotypes. *PLoS One.* 2013,8,e57113.

### Bibliografía / Bibliografia

- [110] Zylla, S., Pietzner, M., Kühn, J.P., Völzke, H., et al. Serum chemerin is associated with inflammatory and metabolic parameters-results of a population-based study. *Obesity (Silver Spring)*. 2017,25,468-475.
- [111] Cheon, D.Y., Kang, J.G., Lee, S.J., Ihm, S.H., et al. Serum Chemerin Levels are Associated with Visceral Adiposity, Independent of Waist Circumference, in Newly Diagnosed Type 2 Diabetic Subjects. *Yonsei Med.J.* 2017,58,319-325.
- [112] Yu, S., Zhang, Y., Li, M.Z., Xu, H., et al. Chemerin and apelin are positively correlated with inflammation in obese type 2 diabetic patients. *Chin.Med.J.(Engl)*. 2012,125,3440-3444.
- [113] Lee, M.K., Chu, S.H., Lee, D.C., An, K.Y., et al. The association between chemerin and homeostasis assessment of insulin resistance at baseline and after weight reduction via lifestyle modifications in young obese adults. *Clin.Chim.Acta.* 2013,421,109-115.
- [114] Kim, S.H., Lee, S.H., Ahn, K.Y., Lee, D.H., et al. Effect of lifestyle modification on serum chemerin concentration and its association with insulin sensitivity in overweight and obese adults with type 2 diabetes. *Clin.Endocrinol.(Oxf)*. 2014,80,825-833.
- [115] Bobbert, T., Schwarz, F., Fischer-Rosinsky, A., Maurer, L., et al. Chemerin and prediction of Diabetes mellitus type 2. *Clin.Endocrinol.(Oxf)*. 2015,82,838-843.
- [116] Léniz, A., González, M., Besné, I., Carr-Ugarte, H., et al. Role of chemerin in the control of glucose homeostasis. *Mol.Cell.Endocrinol.* 2021,541,111504.
- [117] Bondue, B., Wittamer, V., Parmentier, M. Chemerin and its receptors in leukocyte trafficking, inflammation and metabolism. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011,22,331-338.

### **Bibliografía / Bibliografia**

- [118] Weigert, J., Obermeier, F., Neumeier, M., Wanninger, J., et al. Circulating levels of chemerin and adiponectin are higher in ulcerative colitis and chemerin is elevated in Crohn's disease. *Inflamm.Bowel Dis.* 2010,16,630-637.
- [119] Cash, J.L., Christian, A.R., Greaves, D.R. Chemerin peptides promote phagocytosis in a ChemR23- and Syk-dependent manner. *J.Immunol.* 2010,184,5315-5324.
- [120] Luangsay, S., Wittamer, V., Bondue, B., De Henau, O., et al. Mouse ChemR23 is expressed in dendritic cell subsets and macrophages, and mediates an anti-inflammatory activity of chemerin in a lung disease model. *J.Immunol.* 2009,183,6489-6499.
- [121] Bellos, I., Fitrou, G., Pergialiotis, V., Perrea, D.N., Daskalakis, G. Serum levels of adipokines in gestational diabetes: a systematic review. *J.Endocrinol.Invest.* 2019,42,621-631.
- [122] Plows, J.F., Stanley, J.L., Baker, P.N., Reynolds, C.M., Vickers, M.H. The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *Int.J.Mol.Sci.* 2018,19,3342. doi: 10.3390/ijms19113342.
- [123] Li, X.M., Ji, H., Li, C.J., Wang, P.H., et al. Chemerin expression in Chinese pregnant women with and without gestational diabetes mellitus. *Ann.Endocrinol.(Paris).* 2015,76,19-24.
- [124] Ademoglu, e.n., Berberoglu, Z., Dellal, F., M, K., et al. Higher Levels of Circulating Chemerin in Obese Women with Gestational Diabetes Mellitus. *Acta Endo (Buc).* 2015,11,32-38.
- [125] Fatima, S.S., Alam, F., Chaudhry, B., Khan, T.A. Elevated levels of chemerin, leptin, and interleukin-18 in gestational diabetes mellitus. *J.Matern.Fetal.Neonatal Med.* 2017,30,1023-1028.

**Bibliografía / Bibliografia**

- [126] Gashlan, M.H. Relationship between Levels of Retinol Binding Protein 4, Vaspin and Chemerin and Insulin Resistance in Gestational Diabetes Mellitus. *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences*. 2017,6,236-250.
- [127] Tsiotra, P.C., Halvatsiotis, P., Patsouras, K., Maratou, E., et al. Circulating adipokines and mRNA expression in adipose tissue and the placenta in women with gestational diabetes mellitus. *Peptides*. 2018,101,157-166.
- [128] Liang, Z., Zhou, M., Xu, X.K., Qu, F., Chen, D. Is Chemerin associated with gestational diabetes mellitus? An evidence-based clinical research from Chinese women. *J.Obstet.Gynaecol*. 2018,38,482-487.
- [129] Yang, X., Quan, X., Lan, Y., Ye, J., et al. Serum chemerin level during the first trimester of pregnancy and the risk of gestational diabetes mellitus. *Gynecol.Endocrinol*. 2017,33,770-773.
- [130] Görkem, Ü, Küçükler, F.K., Toğrul, C., Güngör, T. Are adipokines associated with gestational diabetes mellitus?. *J.Turk.Ger.Gynecol.Assoc*. 2016,17,186-190.
- [131] Pan, B., Ma, R. [Correlation of serum omentin-1 and chemerin with gestational diabetes mellitus]. *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University*. 2016,36,1231-1236.
- [132] Barker, G., Lim, R., Rice, G.E., Lappas, M. Increased chemerin concentrations in fetuses of obese mothers and correlation with maternal insulin sensitivity. *J.Matern.Fetal.Neonatal Med*. 2012,25,2274-2280.
- [133] Hare, K.J., Bonde, L., Svare, J.A., Randeve, H.S., et al. Decreased plasma chemerin levels in women with gestational diabetes mellitus. *Diabet.Med*. 2014,31,936-940.

### **Bibliografía / Bibliografia**

- [134] Sledzińska, M., Szlagatys-Sidorkiewicz, A., Brzezinski, M., Kaźmierska, K., et al. Serum chemerin in children with excess body weight may be associated with ongoing metabolic complications - A pilot study. *Adv.Med.Sci.* 2017,62,383-386.
- [135] Mazaki-Tovi, S., Kasher-Meron, M., Hemi, R., Haas, J., et al. Chemerin is present in human cord blood and is positively correlated with birthweight. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 2012,207,412.e1-412.10.
- [136] Perbal, B. The CCN3 (NOV) cell growth regulator: a new tool for molecular medicine. *Expert Rev.Mol.Diagn.* 2003,3,597-604.
- [137] Escoté, X., Gómez-Zorita, S., López-Yoldi, M., Milton-Laskibar, I., et al. Role of Omentin, Vaspin, Cardiotrophin-1, TWEAK and NOV/CCN3 in Obesity and Diabetes Development. *Int.J.Mol.Sci.* 2017,18,1770. doi: 10.3390/ijms18081770.
- [138] Thibout, H., Martinerie, C., Créminon, C., Godeau, F., et al. Characterization of human NOV in biological fluids: an enzyme immunoassay for the quantification of human NOV in sera from patients with diseases of the adrenal gland and of the nervous system. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 2003,88,327-336.
- [139] Chen, C.C., Lau, L.F. Functions and mechanisms of action of CCN matricellular proteins. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 2009,41,771-783.
- [140] Pakradouni, J., Le Goff, W., Calmel, C., Antoine, B., et al. Plasma NOV/CCN3 levels are closely associated with obesity in patients with metabolic disorders. *PLoS One.* 2013,8,e66788.
- [141] Chatelain, P. Children born with intra-uterine growth retardation (IUGR) or small for gestational age (SGA): long term growth and metabolic consequences. *Endocr.Regul.* 2000,34,33-36.

**Bibliografía / Bibliografia**

- [142] Black, R.E. Global Prevalence of Small for Gestational Age Births. *Nestle Nutr.Inst.Workshop Ser.* 2015,81,1-7.
- [143] López, I.D., Muñoz Ade, A., Muñoz, J.B., Rodríguez, P.C., et al. Follow-up of the small-for-gestational-age child: clinical guidelines. *An Pediatr.(Barc).* 2012,76,104.e1-104.e7.
- [144] Castanys-Muñoz, E., Kennedy, K., Castañeda-Gutiérrez, E., Forsyth, S., et al. Systematic review indicates postnatal growth in term infants born small-for-gestational-age being associated with later neurocognitive and metabolic outcomes. *Acta Paediatr.* 2017,106,1230-1238.
- [145] Lee, A.C., Katz, J., Blencowe, H., Cousens, S., et al. National and regional estimates of term and preterm babies born small for gestational age in 138 low-income and middle-income countries in 2010. *Lancet Glob.Health.* 2013,1,e26-36.
- [146] Caliebe, J., Broekman, S., Boogaard, M., Bosch, C.A., et al. IGF1, IGF1R and SHOX mutation analysis in short children born small for gestational age and short children with normal birth size (idiopathic short stature). *Horm.Res.Paediatr.* 2012,77,250-260.
- [147] Freire, B.L., Homma, T.K., Funari, M.F.A., Lerario, A.M., et al. Multigene Sequencing Analysis of Children Born Small for Gestational Age With Isolated Short Stature. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 2019,104,2023-2030.
- [148] Gernand, A.D., Schulze, K.J., Nanayakkara-Bind, A., Arguello, M., et al. Effects of Prenatal Multiple Micronutrient Supplementation on Fetal Growth Factors: A Cluster-Randomized, Controlled Trial in Rural Bangladesh. *PLoS One.* 2015,10,e0137269.

### **Bibliografía / Bibliografía**

- [149] Milton-Laskibar, I., Léniz, A., Kajarabille, N., Fernández-Quintela, A., Portillo, M.P., *Guía práctica de nutrición en el embarazo*, Servicio Editorial de la Universidad del País Vasco Bilbao 2019.
- [150] Okah, F.A., Cai, J., Hoff, G.L. Term-gestation low birth weight and health-compromising behaviors during pregnancy. *Obstet.Gynecol.* 2005,105,543-550.
- [151] Allvin, K., Ankarberg-Lindgren, C., Niklasson, A., Jacobsson, B., Dahlgren, J. Altered umbilical sex steroids in preterm infants born small for gestational age. *J.Matern.Fetal.Neonatal Med.* 2020,33,4164-4170.
- [152] Hu, X.L., Feng, C., Lin, X.H., Zhong, Z.X., et al. High maternal serum estradiol environment in the first trimester is associated with the increased risk of small-for-gestational-age birth. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 2014,99,2217-2224.
- [153] Randhawa, R.S. The insulin-like growth factor system and fetal growth restriction. *Pediatr.Endocrinol.Rev.* 2008,6,235-240.
- [154] Pylipow, M., Spector, L.G., Puumala, S.E., Boys, C., et al. Early postnatal weight gain, intellectual performance, and body mass index at 7 years of age in term infants with intrauterine growth restriction. *J.Pediatr.* 2009,154,201-206.
- [155] Kramer, M.S., Martin, R.M., Bogdanovich, N., Vilchuk, K., et al. Is restricted fetal growth associated with later adiposity? Observational analysis of a randomized trial. *Am.J.Clin.Nutr.* 2014,100,176-181.
- [156] Nam, H.K., Lee, K.H. Small for gestational age and obesity: epidemiology and general risks. *Ann.Pediatr.Endocrinol.Metab.* 2018,23,9-13.

**Bibliografía / Bibliografia**

- [157] Cohen, E., Wong, F.Y., Horne, R.S., Yiallourou, S.R. Intrauterine growth restriction: impact on cardiovascular development and function throughout infancy. *Pediatr.Res.* 2016,79,821-830.
- [158] Chen, W., Srinivasan, S.R., Berenson, G.S. Amplification of the association between birthweight and blood pressure with age: the Bogalusa Heart Study. *J.Hypertens.* 2010,28,2046-2052.
- [159] Kuhle, S., Maguire, B., Ata, N., MacInnis, N., Dodds, L. Birth Weight for Gestational Age, Anthropometric Measures, and Cardiovascular Disease Markers in Children. *J.Pediatr.* 2017,182,99-106.
- [160] Hong, Y.H., Chung, S. Small for gestational age and obesity related comorbidities. *Ann.Pediatr.Endocrinol.Metab.* 2018,23,4-8.
- [161] Stroescu, R., Micle, I., Marginean, O., Bizerea, T., et al. Is small for gestational age status associated with an increased risk of atherogenesis?. *Maedica (Bucur).* 2013,8,315-320.
- [162] Yoshikawa, K., Okada, T., Munakata, S., Okahashi, A., et al. Association between serum lipoprotein lipase mass concentration and subcutaneous fat accumulation during neonatal period. *Eur.J.Clin.Nutr.* 2010,64,447-453.
- [163] Okada, T., Takahashi, S., Nagano, N., Yoshikawa, K., et al. Early postnatal alteration of body composition in preterm and small-for-gestational-age infants: implications of catch-up fat. *Pediatr.Res.* 2015,77,136-142.
- [164] Soto, N., Bazaes, R.A., Peña, V., Salazar, T., et al. Insulin sensitivity and secretion are related to catch-up growth in small-for-gestational-age infants at age 1 year: results from a prospective cohort. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 2003,88,3645-3650.



**Bibliografía / Bibliografia**

[165] Reinehr, T., Kleber, M., Toschke, A.M. Small for gestational age status is associated with metabolic syndrome in overweight children. *Eur.J.Endocrinol.* 2009,160,579-584.

[166] Reaven, G.M. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.* 1988,37,1595-1607.

[167] Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA.* 2001,285,2486-2497.

[168] Sherling, D.H., Perumareddi, P., Hennekens, C.H. Metabolic Syndrome. *J.Cardiovasc.Pharmacol.Ther.* 2017,22,365-367.

[169] From the American Association of Neurological Surgeons (AANS), American Society of Neuroradiology (ASNR), Cardiovascular and Interventional Radiology Society of Europe (CIRSE), Canadian Interventional Radiology Association (CIRA), Congress of Neurological Surgeons (CNS), European Society of Minimally Invasive Neurological Therapy (ESMINT), European Society of Neuroradiology (ESNR), European Stroke Organization (ESO), Society for Cardiovascular Angiography and Interventions (SCAI), Society of Interventional Radiology (SIR), Society of NeuroInterventional Surgery (SNIS), and World Stroke Organization (WSO), Sacks, D., Baxter, B., Campbell, B.C.V., et al. Multisociety Consensus Quality Improvement Revised Consensus Statement for Endovascular Therapy of Acute Ischemic Stroke. *Int.J.Stroke.* 2018,13,612-632.

**Bibliografía / Bibliografia**

- [170] Gao, W., DECODE Study Group. Does the constellation of risk factors with and without abdominal adiposity associate with different cardiovascular mortality risk?. *Int.J.Obes.(Lond)*. 2008,32,757-762.
- [171] McCracken, E., Monaghan, M., Sreenivasan, S. Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clin.Dermatol*. 2018,36,14-20.
- [172] Chang, P.C., Li, T.C., Wu, M.T., Liu, C.S., et al. Association between television viewing and the risk of metabolic syndrome in a community-based population. *BMC Public Health*. 2008,8,193-2458-8-193.
- [173] Green, A.K., Jacques, P.F., Rogers, G., Fox, C.S., et al. Sugar-sweetened beverages and prevalence of the metabolically abnormal phenotype in the Framingham Heart Study. *Obesity (Silver Spring)*. 2014,22,E157-63.
- [174] Fan, A.Z., Russell, M., Naimi, T., Li, Y., et al. Patterns of alcohol consumption and the metabolic syndrome. *J.Clin.Endocrinol.Metab*. 2008,93,3833-3838.
- [175] Lutsey, P.L., Steffen, L.M., Stevens, J. Dietary intake and the development of the metabolic syndrome: the Atherosclerosis Risk in Communities study. *Circulation*. 2008,117,754-761.
- [176] LaMonte, M.J., Barlow, C.E., Jurca, R., Kampert, J.B., et al. Cardiorespiratory fitness is inversely associated with the incidence of metabolic syndrome: a prospective study of men and women. *Circulation*. 2005,112,505-512.
- [177] Lamberti, J.S., Olson, D., Crilly, J.F., Olivares, T., et al. Prevalence of the metabolic syndrome among patients receiving clozapine. *Am.J.Psychiatry*. 2006,163,1273-1276.

### **Bibliografía / Bibliografia**

- [178] World Health Organization, UNICEF. WHO obesity and overweight fact sheet no. 311. 9 June 2021, *16/10/2021*.
- [179] Samson, S.L., Garber, A.J. Metabolic syndrome. *Endocrinol.Metab.Clin.North Am.* 2014, *43*,1-23.
- [180] Verma, S., Hussain, M.E. Obesity and diabetes: An update. *Diabetes Metab.Syindr.* 2017, *11*,73-79.
- [181] Hall, J.E., Guyton, A.C., *Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica*, Elsevier 2016.
- [182] Taylor, R., Al-Mrabeh, A., Sattar, N. Understanding the mechanisms of reversal of type 2 diabetes. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2019, *7*,726-736.
- [183] Lewis, G.F., Uffelman, K.D., Szeto, L.W., Weller, B., Steiner, G. Interaction between free fatty acids and insulin in the acute control of very low density lipoprotein production in humans. *J.Clin.Invest.* 1995, *95*,158-166.
- [184] Katsimardou, A., Imprialos, K., Stavropoulos, K., Sachinidis, A., et al. Hypertension in Metabolic Syndrome: Novel Insights. *Curr.Hypertens.Rev.* 2020, *16*,12-18.
- [185] Landsberg, L., Aronne, L.J., Beilin, L.J., Burke, V., et al. Obesity-related hypertension: pathogenesis, cardiovascular risk, and treatment--a position paper of the The Obesity Society and The American Society of Hypertension. *Obesity (Silver Spring).* 2013, *21*,8-24.
- [186] Rani, V., Deep, G., Singh, R.K., Palle, K., Yadav, U.C. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sci.* 2016, *148*,183-193.

### **Bibliografía / Bibliografia**

- [187] Cotter, T.G., Rinella, M. Nonalcoholic Fatty Liver Disease 2020: The State of the Disease. *Gastroenterology*. 2020,158,1851-1864.
- [188] Friedman, S.L., Neuschwander-Tetri, B.A., Rinella, M., Sanyal, A.J. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat.Med.* 2018,24,908-922.
- [189] Younossi, Z.M., Koenig, A.B., Abdelatif, D., Fazel, Y., et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016,64,73-84.
- [190] Zhai, M., Liu, Z., Long, J., Zhou, Q., et al. The incidence trends of liver cirrhosis caused by nonalcoholic steatohepatitis via the GBD study 2017. *Sci.Rep.* 2021,11,5195-021-84577-z.
- [191] White, D.L., Kanwal, F., El-Serag, H.B. Association between nonalcoholic fatty liver disease and risk for hepatocellular cancer, based on systematic review. *Clin.Gastroenterol.Hepatol.* 2012,10,1342-1359.e2.
- [192] Younossi, Z., Anstee, Q.M., Marietti, M., Hardy, T., et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat.Rev.Gastroenterol.Hepatol.* 2018,15,11-20.
- [193] Beyoğlu, D., Idle, J.R. The metabolomic window into hepatobiliary disease. *J.Hepatol.* 2013,59,842-858.
- [194] Browning, J.D., Horton, J.D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J.Clin.Invest.* 2004,114,147-152.

**Bibliografía / Bibliografia**

- [195] Robertson, G., Leclercq, I., Farrell, G.C. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.* 2001,281,G1135-9.
- [196] Seki, S., Kitada, T., Yamada, T., Sakaguchi, H., et al. In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases. *J.Hepatol.* 2002,37,56-62.
- [197] Abdelmalek, M.F., Suzuki, A., Guy, C., Unalp-Arida, A., et al. Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2010,51,1961-1971.
- [198] Bravo, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr.Rev.* 1998,56,317-333.
- [199] Quiñones, M., Miguel, M., Aleixandre, A. The polyphenols, naturally occurring compounds with beneficial effects on cardiovascular disease. *Nutr.Hosp.* 2012,27,76-89.
- [200] Aljabali, A.A.A., Bakshi, H.A., Hakkim, F.L., Haggag, Y.A., et al. Albumin Nano-Encapsulation of Piceatannol Enhances Its Anticancer Potential in Colon Cancer Via Downregulation of Nuclear p65 and HIF-1 $\alpha$ . *Cancers (Basel).* 2020,12,113. doi: 10.3390/cancers12010113.
- [201] Moorthy, M., Sundralingam, U., Palanisamy, U.D. Polyphenols as Prebiotics in the Management of High-Fat Diet-Induced Obesity: A Systematic Review of Animal Studies. *Foods.* 2021,10,299. doi: 10.3390/foods10020299.
- [202] Ramos-Romero, S., Léniz, A., Martínez-Maqueda, D., Amézqueta, S., et al. Inter-Individual Variability in Insulin Response after Grape Pomace Supplementation in

**Bibliografía / Bibliografia**

Subjects at High Cardiometabolic Risk: Role of Microbiota and miRNA. *Mol.Nutr.Food Res.* 2021,65,e2000113.

[203] Ramírez-Garza, S.L., Laveriano-Santos, E.P., Marhuenda-Muñoz, M., Storniolo, C.E., et al. Health Effects of Resveratrol: Results from Human Intervention Trials. *Nutrients.* 2018,10,1892. doi: 10.3390/nu10121892.

[204] Rasines-Perea, Z., Teissedre, P.L. Grape Polyphenols' Effects in Human Cardiovascular Diseases and Diabetes. *Molecules.* 2017,22,68. doi: 10.3390/molecules22010068.

[205] Monagas, M., Núñez, V., Bartolomé, B., Gómez-Cordovés, C. Phenolic Content of Blends of Tempranillo with Graciano or Cabernet Sauvignon Wines Produced in Spain. *Food Technology and Biotechnology.* 2006,44.

[206] Delgado, A.M., Issaoui, M., Chammem, N. Analysis of Main and Healthy Phenolic Compounds in Foods. *J.AOAC Int.* 2019,102,1356-1364.

[207] Martínez de Toda and Pedro Balda,F. Quantifying the effect of temperature on decoupling anthocyanins and sugars of the grape (*Vitis vinifera* L. 'Maturana Tinta de Navarrete'). 2015.

[208] Roby, G., Harbertson, J., ADAMS, D., Matthews, M. Berry size and vine water deficits as factors in winegrape composition: Anthocyanins and tannins. *Australian Journal of Grape and Wine Research.* 2008,10,100-107.

[209] Oszmiański, J., Lachowicz, S., Gorzelany, J., Matłok, N. The effect of different maturity stages on phytochemical composition and antioxidant capacity of cranberry cultivars. *European Food Research and Technology.* 2018,244,705-719.

**Bibliografía / Bibliografia**

- [210] Averilla, J.N., Oh, J., Kim, H.J., Kim, J.S., Kim, J.S. Potential health benefits of phenolic compounds in grape processing by-products. *Food Sci.Biotechnol.* 2019,28,1607-1615.
- [211] Sivaprakasapillai, B., Edirisinghe, I., Randolph, J., Steinberg, F., Kappagoda, T. Effect of grape seed extract on blood pressure in subjects with the metabolic syndrome. *Metabolism.* 2009,58,1743-1746.
- [212] Li, S.H., Zhao, P., Tian, H.B., Chen, L.H., Cui, L.Q. Effect of Grape Polyphenols on Blood Pressure: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *PLoS One.* 2015,10,e0137665.
- [213] Zern, T.L., Fernandez, M.L. Cardioprotective effects of dietary polyphenols. *J.Nutr.* 2005,135,2291-2294.
- [214] O'Byrne, D.J., Devaraj, S., Grundy, S.M., Jialal, I. Comparison of the antioxidant effects of Concord grape juice flavonoids alpha-tocopherol on markers of oxidative stress in healthy adults. *Am.J.Clin.Nutr.* 2002,76,1367-1374.
- [215] Albers, A.R., Varghese, S., Vitseva, O., Vita, J.A., Freedman, J.E. The antiinflammatory effects of purple grape juice consumption in subjects with stable coronary artery disease. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2004,24,e179-80.
- [216] Castilla, P., Dávalos, A., Teruel, J.L., Cerrato, F., et al. Comparative effects of dietary supplementation with red grape juice and vitamin E on production of superoxide by circulating neutrophil NADPH oxidase in hemodialysis patients. *Am.J.Clin.Nutr.* 2008,87,1053-1061.

### **Bibliografía / Bibliografia**

- [217] Queipo-Ortuño, M.I., Boto-Ordóñez, M., Murri, M., Gomez-Zumaquero, J.M., et al. Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers. *Am.J.Clin.Nutr.* 2012,95,1323-1334.
- [218] Ramos-Romero, S., Martínez-Maqueda, D., Hereu, M., Amézqueta, S., et al. Modifications of Gut Microbiota after Grape Pomace Supplementation in Subjects at Cardiometabolic Risk: A Randomized Cross-Over Controlled Clinical Trial. *Foods.* 2020,9,1279. doi: 10.3390/foods9091279.
- [219] Freedman, J.E., Parker, C.,3rd, Li, L., Perlman, J.A., et al. Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. *Circulation.* 2001,103,2792-2798.
- [220] Baczkó, I., Light, P.E. Resveratrol and derivatives for the treatment of atrial fibrillation. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2015,1348,68-74.
- [221] Méndez-del Villar, M., González-Ortiz, M., Martínez-Abundis, E., Pérez-Rubio, K.G., Lizárraga-Valdez, R. Effect of resveratrol administration on metabolic syndrome, insulin sensitivity, and insulin secretion. *Metab.Syndr.Relat.Disord.* 2014,12,497-501.
- [222] Lee, P.S., Chiou, Y.S., Ho, C.T., Pan, M.H. Chemoprevention by resveratrol and pterostilbene: Targeting on epigenetic regulation. *Biofactors.* 2018,44,26-35.
- [223] Dellinger, R.W., Garcia, A.M., Meyskens, F.L.,Jr. Differences in the glucuronidation of resveratrol and pterostilbene: altered enzyme specificity and potential gender differences. *Drug Metab.Pharmacokinet.* 2014,29,112-119.
- [224] Schmidlin, L., Poutaraud, A., Claudel, P., Mestre, P., et al. A stress-inducible resveratrol O-methyltransferase involved in the biosynthesis of pterostilbene in grapevine. *Plant Physiol.* 2008,148,1630-1639.



**Bibliografía / Bibliografia**

- [225] Rimando, A.M., Nagmani, R., Feller, D.R., Yokoyama, W. Pterostilbene, a new agonist for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha-isoform, lowers plasma lipoproteins and cholesterol in hypercholesterolemic hamsters. *J.Agric.Food Chem.* 2005,53,3403-3407.
- [226] Tsai, H.Y., Ho, C.T., Chen, Y.K. Biological actions and molecular effects of resveratrol, pterostilbene, and 3'-hydroxypterostilbene. *J.Food Drug Anal.* 2017,25,134-147.
- [227] Hsu, C.L., Lin, Y.J., Ho, C.T., Yen, G.C. The inhibitory effect of pterostilbene on inflammatory responses during the interaction of 3T3-L1 adipocytes and RAW 264.7 macrophages. *J.Agric.Food Chem.* 2013,61,602-610.
- [228] Liu, J., Fan, C., Yu, L., Yang, Y., et al. Pterostilbene exerts an anti-inflammatory effect via regulating endoplasmic reticulum stress in endothelial cells. *Cytokine.* 2016,77,88-97.
- [229] Rimando, A.M., Cuendet, M., Desmarchelier, C., Mehta, R.G., et al. Cancer chemopreventive and antioxidant activities of pterostilbene, a naturally occurring analogue of resveratrol. *J.Agric.Food Chem.* 2002,50,3453-3457.
- [230] McCormack, D., McFadden, D. A review of pterostilbene antioxidant activity and disease modification. *Oxid Med.Cell.Longev.* 2013,2013,575482.
- [231] Bhakkiyalakshmi, E., Shalini, D., Sekar, T.V., Rajaguru, P., et al. Therapeutic potential of pterostilbene against pancreatic beta-cell apoptosis mediated through Nrf2. *Br.J.Pharmacol.* 2014,171,1747-1757.

**Bibliografía / Bibliografia**

- [232] Manickam, M., Ramanathan, M., Jahromi, M.A., Chansouria, J.P., Ray, A.B. Antihyperglycemic activity of phenolics from *Pterocarpus marsupium*. *J.Nat.Prod.* 1997,60,609-610.
- [233] Sireesh, D., Ganesh, M.R., Dhamodharan, U., Sakthivadivel, M., et al. Role of pterostilbene in attenuating immune mediated devastation of pancreatic beta cells via Nrf2 signaling cascade. *J.Nutr.Biochem.* 2017,44,11-21.
- [234] Pari, L., Satheesh, M.A. Effect of pterostilbene on hepatic key enzymes of glucose metabolism in streptozotocin- and nicotinamide-induced diabetic rats. *Life Sci.* 2006,79,641-645.
- [235] Gómez-Zorita, S., Fernández-Quintela, A., Aguirre, L., Macarulla, M.T., et al. Pterostilbene improves glycaemic control in rats fed an obesogenic diet: involvement of skeletal muscle and liver. *Food Funct.* 2015,6,1968-1976.
- [236] Amarnath Satheesh, M., Pari, L. The antioxidant role of pterostilbene in streptozotocin-nicotinamide-induced type 2 diabetes mellitus in Wistar rats. *J.Pharm.Pharmacol.* 2006,58,1483-1490.
- [237] Satheesh, A.M., Pari, L. Effect of pterostilbene on lipids and lipid profiles in streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetes mellitus. *Journal of Applied Biomedicine.* 2008,6,31-37.
- [238] Riche, D.M., Riche, K.D., Blackshear, C.T., McEwen, C.L., et al. Pterostilbene on metabolic parameters: a randomized, double-blind, and placebo-controlled trial. *Evid Based.Complement.Alternat Med.* 2014,2014,459165.

**Bibliografía / Bibliografia**

- [239] Brunt, E.M., Janney, C.G., Di Bisceglie, A.M., Neuschwander-Tetri, B.A., Bacon, B.R. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am.J.Gastroenterol.* 1999,94,2467-2474.
- [240] Livak, K.J., Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods.* 2001,25,402-408.
- [241] Shibata, C., Kishikawa, T., Otsuka, M., Ohno, M., et al. Inhibition of microRNA122 decreases SREBP1 expression by modulating suppressor of cytokine signaling 3 expression. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2013,438,230-235.
- [242] Alberti, K.G., Eckel, R.H., Grundy, S.M., Zimmet, P.Z., et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation.* 2009,120,1640-1645.
- [243] Carrascosa, A., Fernández, J., Ferrández, A., López-Siguero, J., et al. Estudios españoles de crecimiento. 2010,2019.
- [244] Aguirre, L., Palacios-Ortega, S., Fernandez-Quintela, A., Hijona, E., et al. Pterostilbene Reduces Liver Steatosis and Modifies Hepatic Fatty Acid Profile in Obese Rats. *Nutrients.* 2019,11,10.3390/nu11050961.
- [245] Iliopoulos, D., Drosatos, K., Hiyama, Y., Goldberg, I.J., Zannis, V.I. MicroRNA-370 controls the expression of microRNA-122 and Cpt1alpha and affects lipid metabolism. *J.Lipid Res.* 2010,51,1513-1523.

**Bibliografía / Bibliografia**

- [246] Bandiera, S., Pfeffer, S., Baumert, T.F., Zeisel, M.B. miR-122--a key factor and therapeutic target in liver disease. *J.Hepatol.* 2015,62,448-457.
- [247] Gracia, A., Fernández-Quintela, A., Miranda, J., Eseberri, I., et al. Are miRNA-103, miRNA-107 and miRNA-122 Involved in the Prevention of Liver Steatosis Induced by Resveratrol?. *Nutrients.* 2017,9,360. doi: 10.3390/nu9040360.
- [248] Henquin, J.C. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes.* 2000,49,1751-1760.
- [249] Buechler, C., Wanninger, J., Neumeier, M. Adiponectin receptor binding proteins--recent advances in elucidating adiponectin signalling pathways. *FEBS Lett.* 2010,584,4280-4286.
- [250] Miranda, K., Yang, X., Bam, M., Murphy, E.A., et al. MicroRNA-30 modulates metabolic inflammation by regulating Notch signaling in adipose tissue macrophages. *Int.J.Obes.(Lond).* 2018,42,1140-1150.
- [251] Tryggestad, J.B., Vishwanath, A., Jiang, S., Mallappa, A., et al. Influence of gestational diabetes mellitus on human umbilical vein endothelial cell miRNA. *Clin.Sci.(Lond).* 2016,130,1955-1967.
- [252] Cui, L., Yu, M., Cui, X. MiR-30c-5p/ROCK2 axis regulates cell proliferation, apoptosis and EMT via the PI3K/AKT signaling pathway in HG-induced HK-2 cells. *Open Life Sciences.* 2020,15,959-970.
- [253] Briffa, J.F., McAinch, A.J., Romano, T., Wlodek, M.E., Hryciw, D.H. Leptin in pregnancy and development: a contributor to adulthood disease?. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism.* 2015,308,E335-E350.

**Bibliografía / Bibliografia**

- [254] Dos, S.E., Fabien, D., Vialard François, Dieudonné Marie-Noëlle. The roles of leptin and adiponectin at the fetal-maternal interface in humans. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*. 2015,24,47.
- [255] Tannenbaum, G.S., Gurd, W., Lapointe, M. Leptin Is a Potent Stimulator of Spontaneous Pulsatile Growth Hormone (GH) Secretion and the GH Response to GH-Releasing Hormone. *Endocrinology*. 1998,139,3871-3875.
- [256] Helfer, G., Wu, Q.F. Chemerin: a multifaceted adipokine involved in metabolic disorders. *J.Endocrinol*. 2018,238,R79-R94.
- [257] Giapros, V., Vavva, E., Siomou, E., Kolios, G., et al. Low-birth-weight, but not catch-up growth, correlates with insulin resistance and resistin level in SGA infants at 12 months. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2017,30,1771-1776.
- [258] Ong, K.K.L., Ahmed, M.L., Emmett, P.M., Preece, M.A., Dunger, D.B. Association between postnatal catch-up growth and obesity in childhood: prospective cohort study. *BMJ*. 2000,320,967.
- [259] Cheng, G., Bolzenius, K., Joslowski, G., Günther, A.L.B., et al. Velocities of weight, height and fat mass gain during potentially critical periods of growth are decisive for adult body composition. *Eur.J.Clin.Nutr*. 2014,69,262.
- [260] Cho, W.K., Suh, B.K. Catch-up growth and catch-up fat in children born small for gestational age. *Korean J.Pediatr*. 2016,59,1-7.
- [261] Bozaoglu, K., Bolton, K., McMillan, J., Zimmet, P., et al. Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. *Endocrinology*. 2007,148,4687-4694.

**Bibliografía / Bibliografia**

[262] Dominguez Hernandez, C., Klunder Klunder, M., Huang, F., Flores Armas, E.M., et al. Association between abdominal fat distribution, adipocytokines and metabolic alterations in obese low-birth-weight children. *Pediatr.Obes.* 2016,*11*,285-291.

[263] Cheon, D.Y., Kang, J.G., Lee, S.J., Ihm, S.H., et al. Serum Chemerin Levels are Associated with Visceral Adiposity, Independent of Waist Circumference, in Newly Diagnosed Type 2 Diabetic Subjects. *Yonsei Med.J.* 2017,*58*,319-325.

[264] Ba, H.J., Xu, L.L., Qin, Y.Z., Chen, H.S. Serum Chemerin Levels Correlate With Determinants of Metabolic Syndrome in Obese Children and Adolescents. *Clin.Med.Insights Pediatr.* 2019,*13*,1179556519853780.

# Conclusiones

## Conclusiones

### **Implicación de los microRNAs en los efectos del pterostilbeno en la esteatosis hepática en rata (manuscrito 1)**

*1. Analizar la posible mediación de los microRNAs en los efectos beneficiosos producidos por el pterostilbeno en la esteatosis hepática no alcohólica, en un modelo animal de obesidad genética.*

- El miR-122 puede considerarse un mediador de los efectos positivos del pterostilbeno sobre la esteatosis hepática de las ratas, actuando a través de CPT1a y DGAT2, dos enzimas involucradas en la oxidación de ácidos grasos ensamblaje de triglicéridos, respectivamente.
- Aunque el pterostilbeno modifica la expresión de miR-93-5p, este miRNA no media en los efectos sobre la esteatosis hepática.

### **Estudio del efecto de los hollejos de uva en pacientes con síndrome metabólico. Empleo de los microRNAs como biomarcadores (manuscritos 2 y 3)**

*2. Analizar el papel de los microRNAs como biomarcadores de respuesta en los efectos de los hollejos de uva en el control glucémico, en personas que padecen síndrome metabólico.*

- Los individuos que mejor respondieron al tratamiento con hollejos de uvas en lo que respecta al control glucémico fueron aquellos que presentaban un control más deteriorado.
- El nivel de expresión de miR-222 circulante en personas con síndrome metabólico puede ser considerado un biomarcador de respuesta a este tratamiento.

*3. Analizar el papel de los microRNAs en el mecanismo de acción de una suplementación con hollejos uva en el control glucémico de pacientes con síndrome metabólico.*

- Los efectos beneficiosos sobre el control glucémico producido por los hollejos de uva en sujetos con síndrome metabólico están mediados por miR-222 y miR-30c, dos microRNAs asociados a la resistencia a la insulina y la diabetes



## Conclusiones

### **Estudio de adipokinas como biomarcadores en niños con bajo peso o talla al nacer (manuscritos 4 y 5)**

4. *Comparar las concentraciones de las adipokinas en niños nacidos pequeños para la edad gestacional con distintas velocidades de crecimiento.*

- El perfil de adipokinas circulantes durante los primeros meses de vida puede tener influencia en el tipo de catch-up del niño PEG.

5. *Analizar la existencia de posibles diferencias en las concentraciones de adipokinas entre niños y niñas.*

- A los 2 años de edad, existe un dimorfismo sexual en el perfil de adipokinas de los bebés PEG, ya que las niñas presentan mayores concentraciones plasmáticas de leptina, adiponectina y omentina que los niños.

6. *Analizar la evolución de las concentraciones de adipokinas durante los primeros 2 años de vida.*

- Las adipokinas presentan una evolución diferente durante los primeros dos años de vida dependiendo del tipo de adipokina.

7. *Analizar la asociación de diferentes parámetros antropométricos y bioquímicos con la concentración de chemerina circulante.*

- La concentración de chemerina plasmática medida en los primeros meses de vida puede considerarse un biomarcador del desarrollo de futuras alteraciones metabólicas en niños nacidos PEG.

8. *Conclusiones no asociadas directamente a los objetivos propuestos*

- En un niño nacido PEG, presentar un peso bajo está asociado a el desarrollo de un catch-up rápido.
- El pronóstico que presentan los niños con diferentes tipos de catch-up es diferente entre los primeros meses de vida y etapas posteriores

# Ondorioak

**MikroRNAen implikazioa pteroestilbenoak arratoien esteatosi hepaticoan dituen ondorioetan (1. eskuizkribua)**

*1. Pteroestilbenoak esteatosi hepatico ez-alkoholkoa duen obesitate genetikoko animalia-eredu batean sortutako efektu onuragarrietan mikroRNAek izan dezaketen bitartekotza aztertzea.*

- MiR-122 pteroestilbenoak arratoien esteatosi hepaticoan dituen eragin positiboen bitartekaritzat har daiteke, CPT1a-ren eta DGAT2ren bidez jardunez, alegia, gantz azidoen oxidazioan eta triglizeridoen mihiztaduran, hurrenez hurren, implikatutako bi entzima horien bitartez.
- Pteroestilbenoak miR-93-5p-ren espresioa aldatzen badu ere, miRNA horrek ez du eraginik gibel esteatosian.

**Sindrome metabolikoa duten pazienteengan mahats-patsaren eragina aztertzea. MikroRNAk biomarkatzaile gisa erabiltzea (2. eta 3. eskuizkribuak)**

*2. MikroRNAen zeregina aztertzea, mahats-nasaiek kontrol gluzemikoan dituzten ondorioei erantzuteko biomarkatzaile gisa, sindrome metabolikoa duten pertsonengan.*

- Kontrol gluzemikoari dagokionez, mahats-patsarekin egindako tratamenduari kontrolik txarrena zuen banakoek erantzun zioten ongien.
- Sindrome metabolikoa duten pertsonengan, miR-222 zirkulatzailaren espresio maila tratamenduari erantzuteko biomarkatzailetzat har daiteke.

*3. Sindrome metabolikoa duten pazienteen kontrol gluzemikoan mahats-patsez egindako elikadura-osagarriaren ekintza-mekanismoan mikroRNAen zeregina aztertzea.*

- Sindrome metabolikoa duten pertsonengan mahats-patsek eragindako kontrol gluzemikoaren gaineko ondorio onuragarrietan bitartekari diren mikroRNAk miR-222 eta miR-30c dira, insulinarekiko eta diabetesarekiko erresistentziarekin lotutako bi mikroRNA.

## Ondorioak

### **Jaiotzean pisu edo neurri txikia duten haurretan adipokinak biomarkatzaile bezala aztertzea (4 eta 5. eskuizkribuak)**

4. *Adipokinen kontzentrazioak konparatzea hazkunde-abiadura desberdinak dituzten haurdunaldirako txiki jaiotako haurrengan.*

- Bizitzako lehen hilabeteetan, adipokina zirkulatzailen profilak eragina izan dezake haurdunaldirako txikiak diren haurren "catch-up" motan.

5. *Bi sexuen artean adipokinen kontzentrazioetan izan daitezkeen desberdintasunak aztertzea.*

- 2 urterekin, haurdunaldirako txikiak diren haurren adipokinetan dimorfismo sexuala dago; izan ere, neskek mutilek baino leptina, adiponektina eta omentinaren kontzentrazio plasmatico handiagoak dituzte.

6. *Adipokinen kontzentrazioek bizitzako lehenengo bi urteetan duten bilakaera aztertzea.*

- Adipokinek bilakaera desberdina dute bizitzako lehen bi urteetan, adipokina motaren arabera.

7. *Parametro antropometriko eta biokimikoen eta chemerina zirkulatzailaren kontzentrazioaren arteko erlazioa aztertzea.*

- Bizitzako lehen hilabeteetan neurtutako chemerina plasmaticoaren kontzentrazioa HT jaiotako haurrek etorkizunean gara ditzaketen alterazio metabolikoen biomarkatzailetzat jo daiteke.

8. *Proposatutako helburuekin zuzenean lotuta ez dauden ondorioak*

- HT jaiotako haurrengan, pisu txikia izatea "catch-up" azkarraren garapenarekin lotuta dago.
- "Catch-up" mota ezberdinak dituzten haurren pronostikoa desberdina da bizitzako lehen hilabeteetan eta ondorengo etapetan.

# Anexo / Eranskina

**Lista de manuscritos / Eskuizkribuen zerrenda**

- 1) Asier Léniz, Alfredo Fernández-Quintela, Leixuri Aguirrea, Elizabeth Hijona, Luis Bujanda, María P. Portillo. miR-122, a potential mediator of the effects of pterostilbene on carnitine palmitoyltransferase 1a and diacylglyceride transferase 2 in rats showing liver steatosis. (under review).
- 2) Ramos-Romero S, Léniz A, Martínez-Maqueda D, Amézqueta S, Fernández-Quintela A, Hereu M, Torres JL, Portillo MP, Pérez-Jiménez J. Inter-Individual Variability in Insulin Response after Grape Pomace Supplementation in Subjects at High Cardiometabolic Risk: Role of Microbiota and miRNA. *Mol Nutr Food Res.* 2021 Jan;65(2):e2000113
- 3) Léniz A, Martínez-Maqueda D, Fernández-Quintela A, Pérez-Jiménez J, Portillo MP. Potential Relationship between the Changes in Circulating microRNAs and the Improvement in Glycaemic Control Induced by Grape Pomace Supplementation. *Foods.* 2021 Sep 1;10(9):2059.
- 4) Léniz A, Portillo MP, Fernández-Quintela A, Macarulla MT, Sarasua-Miranda A, Del Hoyo M, Díez-López I. Has the adipokine profile an influence on the catch-up growth type in small for gestational age infants? *J Physiol Biochem.* 2019 Aug;75(3):311-319.
- 5) Léniz A, Fernández-Quintela A, Del Hoyo M, Díez-López I, Portillo MP. Chemerin concentrations in infants born small for gestational age: correlations with triglycerides and parameters related to glucose homeostasis. *J Physiol Biochem.* 2021 Feb;77(1):133-140.

**Manuscrito 1 / 1. Eskuizkribua**

**Asier Léniz<sup>a, b, c, d</sup>, Alfredo Fernández-Quintela<sup>a, b, c\*</sup>, Leixuri Aguirre<sup>a, b, c</sup>,  
Elizabeth Hijona<sup>e, f, g</sup>, Luis Bujanda<sup>e, f, g</sup>, María P. Portillo<sup>a, b, c</sup>**

a Nutrition and Obesity Group, Department of Pharmacy and Food Sciences, Faculty of Pharmacy and Lucio Lascaray Research Center, University of the Basque Country (UPV/EHU), 01008, Vitoria-Gasteiz, Spain. asier.leniz@gmail.com (A.L.); leixuri.aguirre@ehu.eus (L.A.); mariapuy.portillo@ehu.eus (M.P.P.)

b Bioaraba Health Research Institute, 01006 Vitoria-Gasteiz, Spain

c CIBER Physiopathology of Obesity and Nutrition (CIBERObn), Institute of Health Carlos III, 01006 Vitoria, Spain

d Vitoria-Gasteiz Nursing School, Osakidetza-Basque Health Service, 01009, Vitoria-Gasteiz, Spain

e Department of Gastroenterology, University of the Basque Country (UPV/EHU), Donostia Hospital, 20014 San Sebastián, Spain. elizabeth.hijona@biodonostia.org (E.H.); luis.bujanda@osakidetza.eus (L.B.)

f Biodonostia Institute, 20014 San Sebastián, Spain

g CIBER Hepatic and Digestive Pathologies (CIBERehd), Institute of Health Carlos III, 20014 San Sebastián, Spain

**miR-122, a potential mediator of the effects of pterostilbene on carnitine  
palmitoyltransferase 1a and diacylglyceride transferase 2 in rats showing liver  
steatosis**

Phytomedicine (under review)

## **Abstract**

Fatty liver disease is characterized by an excessive accumulation of fat in hepatocytes. Pterostilbene, a resveratrol-derivative phenolic compound, has demonstrated to have positive effects on steatosis management. The aim of this study is to identify the microRNAs involved in these responses in the liver from Zucker (fa/fa) rats treated with this compound (30 mg/kg/day) for six weeks. For that purpose, we selected miR-19b-3p, miR-33-5p, miR-93-5p, miR-140-5p, miR-103-3p, miR-122-5p, and miR-107-3p, which have carnitine palmitoyltransferase 1a (CPT1a), transcription factor A mitochondrial (TFAM), peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ ) or diacylglycerol O-acyltransferase 2 (DGAT2) proteins as predicted targets. Transfections of some mRNAs were carried out in AML12 hepatocytes. Among all the analysed miRNAs, miR-122-5p was identified as a mediator in the beneficial effects of pterostilbene on liver steatosis, by acting on CPT1a and DGAT2, two enzymes involved in fatty acid oxidation and triglyceride assembly, respectively.

**Keywords:** liver steatosis, pterostilbene, rat, miR-122, carnitine palmitoyltransferase 1a, diacylglycerol O-acyltransferase 2

## **1. Introduction**

The term non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) includes several disturbances, such as steatosis, steatohepatitis and cirrhosis. Liver steatosis is the most common chronic liver pathological condition in the world, and it is characterised by an excessive triglyceride accumulation (more than 5% of the hepatic cells contain fatty deposits) (Byrne and Targher, 2015; Whalley *et al.*, 2007). It is usually associated with obesity, hypertension,



insulin resistance, hypertriglyceridemia and low HDL-cholesterol among others (Yki-Jarvinen, 2014). Triglyceride accumulation in liver triggers mitochondrial dysfunction, which involves lipid peroxidation and hepatocyte inflammation, and fibrosis (Than and Newsome, 2015; Day and James, 1998).

Although the usual treatments for liver steatosis consist of exercise programs and dietary modifications, great attention is currently being paid to the use of bioactive molecules present in foodstuffs, mainly phenolic compounds (Ahmed *et al.*, 2015; Salomone *et al.*, 2016). In this context, several phenolic compounds such as proanthocyanidins and resveratrol have been reported to be effective in reducing liver steatosis (Vergani *et al.*, 2018; Faghihzadeh *et al.*, 2015; Aguirre, Portillo *et al.*, 2014). With regard to resveratrol, in spite of its positive effects, the low bioavailability that results from the strong metabolism that it suffers in gut and liver is a matter of concern (Walle, 2011; Intagliata *et al.*, 2019). In this scenario, pterostilbene (3,5-dimethoxy-4-hydroxystilbene), which is a natural dimethylated analog of resveratrol, has attracted the attention of the scientific community (Estrela *et al.*, 2013). The substitution of hydroxy groups with methoxy ones increases the molecule transport into cells, and reduces its metabolization in gut and liver (Rimando *et al.*, 2005).

In a previous study from our group, carried out in the same cohort of rats used in the present research, the administration of pterostilbene at a dose of 30 mg/kg/d induced a significant reduction in liver triglycerides in Zucker (*fa/fa*) rats, a model of genetic obesity that exhibits fatty liver. This effect was mediated in part by an increase in the activity of carnitine palmitoyltransferase 1a (CPT1a), a marker of mitochondrial fatty acid oxidation, as well as in the protein expression of peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ ) and transcription factor A mitochondrial (TFAM), two markers of

mitochondrial genesis, suggesting increased fatty acid oxidation. Moreover, rats treated with pterostilbene showed a decrease in the protein expression of diacylglycerol O-acyltransferase 2 (DGAT2), the enzyme that catalyses the formation of triglycerides from diacylglycerol and acyl-CoA. Consequently, a reduced fatty acid availability for triglyceride synthesis and a decreased triglyceride assembly explained the delipidating effect of pterostilbene (Aguirre *et al.*, 2019).

MicroRNAs (miRNA) represent a class of small, 18-24 nucleotide-long, non-coding RNA molecules that control post-transcriptional gene expression by interacting with the 3' untranslated region (UTR) of the mRNA (Lee *et al.*, 1993). It has been shown that one miRNA can regulate several genes and that in turn, a single gene can be modulated by different miRNAs (Ambros, 2004; Hammond, 2015). Usually, miRNAs reduce target mRNA translation. However, some cases have described the opposite effect (Lin *et al.*, 2013). Regarding the influence of the miRNAs in liver, it has been reported that they play a key role in triglyceride and glucose metabolism, inflammation, apoptosis and cell proliferation, among others (Szabo and Bala, 2013).

Additionally, some studies have demonstrated the involvement of miRNAs in the positive effect of phenolic compounds on liver steatosis. In this line, Baselga-Escudero *et al.* (Baselga-Escudero *et al.*, 2014; Baselga-Escudero *et al.*, 2015), showed that, in the case of proanthocyanidins, the effect was mediated by the reduced expression of mir-33-5p and mir-122-5p, the most abundant miRNA in liver. An earlier study from our group revealed that mir-107-5p was involved in the delipidating effect of resveratrol in liver (Gracia *et al.*, 2017). Moreover, Joven *et al.*, (2012) reported that polyphenols derived from *Hibiscus sabdariffa* regulated the expression of miR paralogs miR-103/107 and miR-122, and that they prevented diet-induced fatty liver disease in hyperlipidemic mice

(Joven *et al.*, 2012). In this context, the aim of the present study is to analyse the involvement of some selected miRNAs in the positive effect induced by pterostilbene on liver steatosis, in a model of genetic obesity.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1 Animals, diet and experimental design*

The experiment was conducted using twenty five-week-old male Zucker (*fa/fa*) rats, purchased from Charles Rivers Laboratories (Barcelona, Spain) in accordance with the institution's guide for the care and use of laboratory animals (approval document reference CEEA14/018). Rats were single-housed in polypropylene cages and kept in an isolated room in constant temperature ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) under a 12-hour light/dark cycle (light on at 21:00), with a six-day adaptation period. The rats were randomly distributed in two experimental groups (n=10 per group), and fed with a standard laboratory diet (Harlan Laboratories, Barcelona, Spain), with free access to water. Pterostilbene, or a saline solution was supplied to the control group, and was orally administered by using an orogastric catheter, at a dose of 30 mg/kg body weight/d, for six weeks. For this purpose, the phenolic compound was diluted in 1 mL of ethanolic solution (20%). Food intake and body weight were measured on a daily basis. The synthesis of the pterostilbene (99.9% purity) was performed according to published procedures (Joseph *et al.*, 2008).

At the end of the experimental stage, and after an 8 to 12-hour fasting period, rats were euthanised under isoflurane anaesthesia, by cardiac exsanguination. Serum was obtained from blood samples after centrifugation at 1,000 g for 10 min, at 4°C. Liver was dissected, weighed and immediately frozen in liquid nitrogen. All samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further analysis.

## *2.2 Steatosis assessment*

For the histological study, a piece of liver was placed in 10% buffered formalin and subsequently embedded in paraffin. Liver sections were stained with haematoxylin and eosin using standard techniques. Two sections per sample (with two images per section) were viewed without knowing the experimental group to which each animal belonged. Biopsies were classified into four grades depending on fat accumulation using Brunt *et al.* classification, assigning grade 0 when no fat was found in the liver, grade 1 when fat vacuoles were seen in less than 33% of hepatocytes, grade 2 when 33–66% of hepatocytes were affected by fat vacuoles and grade 3 when fat vacuoles were found in more than 66% of hepatocytes (Brunt *et al.*, 1999). Two experienced pathologists who were masked to the experiment evaluated all samples, reached an agreement.

## *2.3 Selection of miRNAs*

For miRNA selection, several approaches were contemplated. First, the miRNAs modified by proanthocyanidins and resveratrol, that were involved in their effects on liver steatosis: miR-122-5p, miR-33-5p and miR-107-3p (Baselga-Escudero *et al.*, 2014; Gracia *et al.*, 2017), were selected in order to determine whether they were also implicated in the effect of pterostilbene. To widen the scope of our study, miRNAs related to those hepatic proteins whose expression was previously found to be modified by the treatment with pterostilbene in this cohort of rats: CPT1a, TFAM, PPAR $\alpha$  and DGAT2 (Aguirre *et al.*, 2019). were selected both from the literature and from the following databases: miRecords (<http://c1.accurascience.com/miRecords/index.php>), and mirBase (<http://www.mirbase.org>). These databases store predicted miRNA targets produced by

several established miRNA target prediction algorithms, as well as validated target genes (Xiao *et al.*, 2009).

#### *2.4 Cell culture and miRNA transfection*

AML12 hepatocytes, supplied by ATCC (ATCC CRL-2254), were cultured in 1:1 DMEM/HAM'S F12 glutamax medium containing 10% foetal bovine serum (FBS), 40 ng/mL dexamethasone, 0.005 mg/mL insulin, 0.005 mg/mL transferrin, 5 ng/mL selenium and 1% Penicillin/Streptomycin (10,000 U/mL). This medium was changed every two days, and cells were cultured at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

Hepatocytes in a confluence status of approximately 90% were transfected with Lipofectamine RNAiMAX (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), which was prepared following the manufacturer's protocol, with mirVana miRNA mimic of mmu-miRNA-93-5p (homologous to rno-miRNA-93-5p) or mmu-miRNA-140-5p, (homologous to rno-miRNA-140-5p) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). MiRNA mimic was transfected for 48 hours at a final concentration of 25 nM per well. The transfection conditions were optimised in previous experiments (Gracia *et al.*, 2017). Transfection efficiency was assessed using miRNA probes and fluorescent transfection controls. Additionally, overexpression of each transfected miRNA in the transfected group was checked by RT-PCR. To rule out unspecific effects, control cells were transfected with negative controls.

#### *2.5 MicroRNA expression analysis*

Total miRNAs were extracted from livers and cultured hepatocytes by using a miRNeasy kit, (Qiagen, Venlo, Limburg, The Netherlands) according to the manufacturer's instructions. 10 ng of total RNA was reverse-transcribed using the TaqMan® Advanced

miRNA cDNA Synthesis kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to manufacturer`s instructions. The sequences of the studies miRNAs and the housekeeping (miRNA-191-5p) were as follows (source miRBase) (Kozomara *et al.*, 2019):

- rno-miR-93-5p 5´- CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG -3´

- rno-miR-19b-3p 5´- UGUGCAAUCCAUGCAAACUGA -3´

- rno-miR-33-5p 5´- GUGCAUUGUAGUUGCAUUGCA -3´

- rno-miR-140-5p 5´- CAGUGGUUUUACCCUAUGGUAG -3´

- rno-miR-107-3p 5´AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUCA-3´

- rno-miR-122-5p 5´- UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG-3´

- rno-miR-191-5p 5´- CAACGGAAUCCCAAAGCAGCUG -3´

PCR was carried out in a CFX96™–MyiQ™ Real-Time System (BioRad, Hercules, CA, USA). Amplification was performed at 95°C for 20 seconds, followed by 40 cycles of 95 °C for three seconds and 60 °C for 30 seconds. All mRNA levels were normalised to the values of the housekeeping miRNA-191-5p (Peltier and Latham, 2008). The results were expressed as fold changes of threshold cycle (Ct) value relative to controls, using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method (Livak and Schmittgen, 2001).

## *2.6 Protein expression analysis*

In the case of AML12 cells, total protein was extracted with 200 µL of lysis buffer as previously reported (Shibata *et al.*, 2013). Protein concentration was measured by a bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

For protein measurements, 30 µg of cell protein extract were used to perform the immunoblotting. Protein separation was performed by electrophoresis in a 7.5% or 10% SDS-polyacrylamide gel, depending on their molecular weight, and transferred to PVDF membranes. The membranes were blocked with casein phosphate buffered saline (PBS)-Tween buffer for two hours. These membranes were incubated overnight at 4 °C with mouse origin CPT1a IgG (1:1000) (Abcam, Cambridge, MA, USA), goat origin TFAM and rabbit origin DGAT2 and PPAR $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Next, new incubation with goat- anti-mouse IgG-HRP antibody (1:5000) for CPT1a (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), mouse-anti-goat (1:5000) for TFAM (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and goat-anti-rabbit (1:5000) for DGAT2 and PPAR $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) was performed for two hours at room temperature. The visualization of antibodies was carried out using a chemiluminescent substrate (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) and were quantified by means of a ChemiDoc MP imaging system (BioRad, Hercules, CA, USA). Coomassie Blue staining of membranes was employed as protein loading control. All mRNA levels were normalised to the values of  $\beta$ -actin.

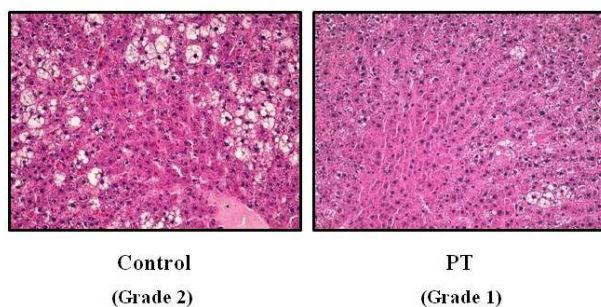
### *2.7 Statistical analysis*

Results are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics 26.0. All of the parameters were normally distributed according to the Shapiro-Wilk's test. Data was analysed by means of Student's *t* test. Significance was set-up at the *P* value < 0.05.

## **3. Results**

### *3.1 Liver steatosis*

When steatosis was evaluated by microscopy, the fat infiltration that reached grade 2 among the control rats was reduced to grade 1 in the pterostilbene-treated group (Figure 1).



**Figure 1.** Histological study in liver from *fa/fa* Zucker rats either treated or not with pterostilbene (30 mg/kg body weight/d) for six weeks. Hematoxylin and eosin staining of liver tissue x 40. PT: pterostilbene.

### 3.2 Search in database

We searched in the databases whether the miRNAs found to be modified by other isolated phenolic compounds in reported papers cited in the introduction section (miR-122-5p, miR-33-5p and miR-107-3p) contained, as validated or predicted targets genes, those that were significantly modified by pterostilbene in this cohort of rats (PPAR $\alpha$ , TFAM, CPT-1 and DGAT2). As shown in Table 1, two predicted targets were found for miR-33-5p and just a single target gene for miR-107-3p. For other miRNAs found in the databases, PPAR $\alpha$ , TFAM, CPT-1 or DGAT2 also appeared as predicted target genes. Due to the fact that the number was particularly high, we selected those miRNAs which had two or more of these proteins as targets: miR-93-5p, 19b-3p and 140-5p (Table 1). Finally, we found in the literature that Iliopoulos *et al.* (2010) demonstrated that the miR-122-5p regulates



CPT1a and DGAT2, meaning that these enzymes are real targets for this miRNA (Iliopoulos *et al.*, 2010).

**Table 1.** Predicted and validated target genes for micro RNAs found in miRecords or mirBase databases, and target genes reported in the literature.

<b>MiRNA</b>	<b>Gene (databases)</b>	<b>Data from literature</b>
miR-93-5p	PPAR $\alpha$	
	TFAM	
	DGAT2	
miR-19b-3p	PPAR $\alpha$	
	TFAM	
	DGAT2	
miR-33-5p	PPAR $\alpha$	
	CPT1a	
miR-140-5p	CPT1a	
	DGAT2	
miR-107-3p	CPT1a	
miR-122-5p		CPT1a (Iliopoulos <i>et al.</i> , 2010)

---

DGAT2 (Iliopoulos *et al.*, 2010)

---

CPT1a: carnitine palmitoyltransferase 1a; DGAT2: diacylglycerol acyltransferase 2; PPAR $\alpha$ : peroxisome proliferator activated receptor alpha; TFAM: transcription factor A mitochondrial.

### *3.3 MiRNA expression in liver*

Table 2 summarises the expression of the selected miRNAs in liver. Rats treated with pterostilbene showed higher expression of miR-93-5p and lower expression of miR-122 than the control rats. The rest of the analysed miRNAs remained unchanged.

**Table 2.** MicroRNA expression in liver of rats from the experimental groups.

<b>miRNA</b>	<b>Control</b>	<b>PT-treated</b>
miR-93-5p	1.00 $\pm$ 0.18	2.06 $\pm$ 0.28 **
miR-19b-3p	1.00 $\pm$ 0.23	1.37 $\pm$ 0.36
miR-33-5p	1.00 $\pm$ 0.29	1.73 $\pm$ 0.12
miR-140-5p	1.00 $\pm$ 0.19	0.95 $\pm$ 0.26
miR-107-5p	1.00 $\pm$ 0.24	1.31 $\pm$ 0.07
miR-122-5p	1.00 $\pm$ 0.48	0.45 $\pm$ 0.21 *

---

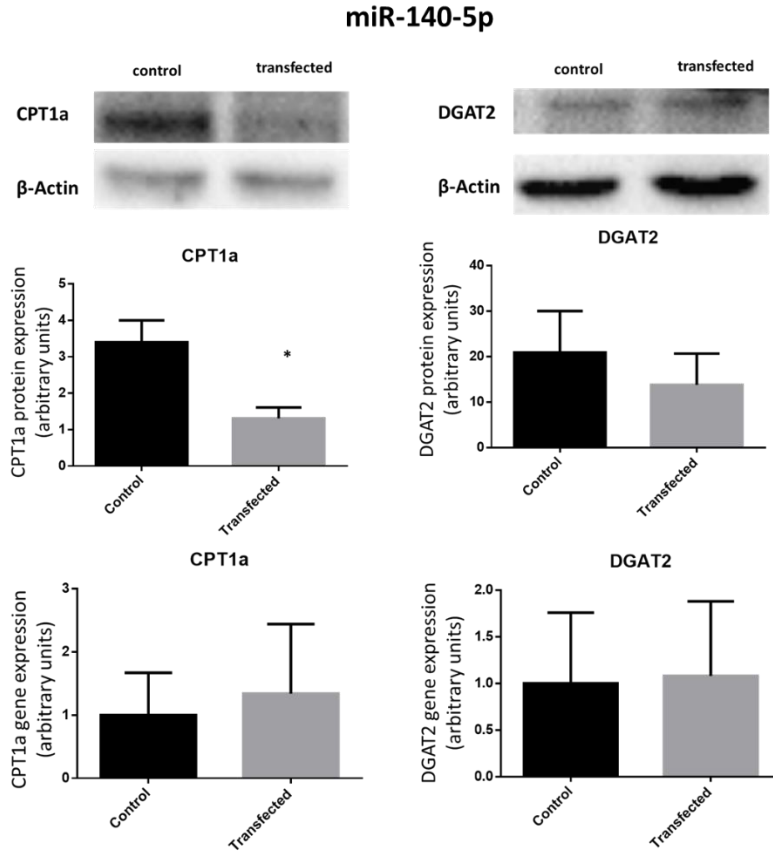
Values are mean  $\pm$  SEM. Significance was assessed at the *P* value < 0.05. \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01. PT: pterostilbene.

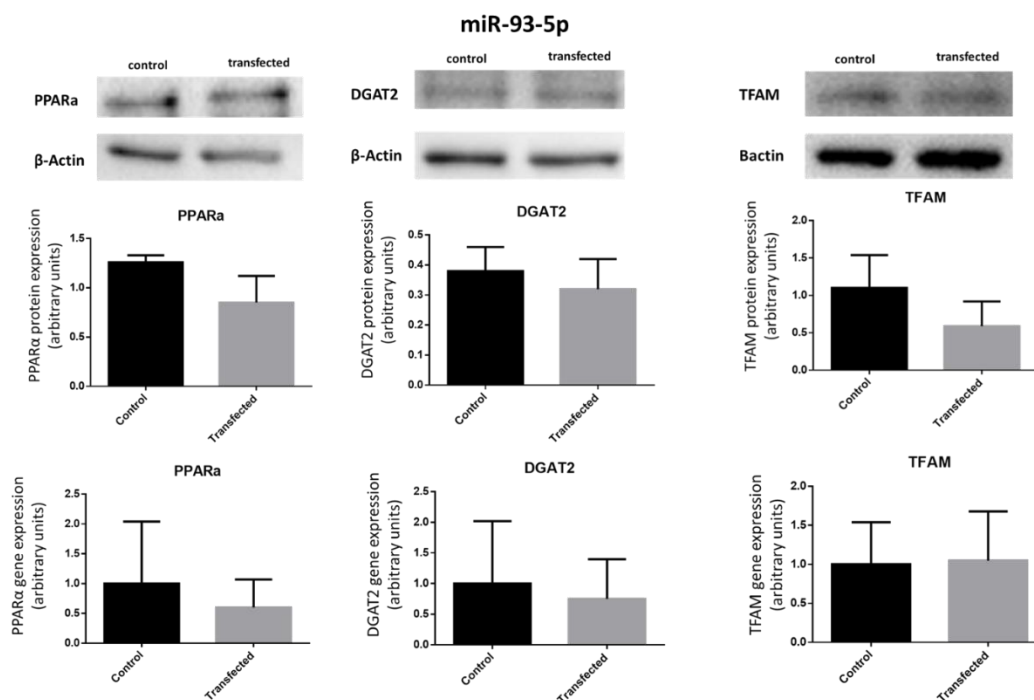
### *3.4 Gene expression and protein expression in transfected hepatocytes*

Taking into account that miR-93-5-p expression was modified by pterostilbene and that, according to the database, this microRNA had three predicted targets of interest (PPAR $\alpha$ , TFAM and DGAT2), a transfection experiment was carried out in order to determine if these were actual targets and thus, whether they could represent potential mechanisms of action of this phenolic compound in the prevention of liver steatosis. Unfortunately, no significant changes in gene and protein expressions of TFAM, PPAR $\alpha$  and DGAT2 were observed in hepatocytes transfected with miR-93-5-p, when compared with the control hepatocytes. With regard to miR-122-5-p, which was also modified by pterostilbene, no transfection experiments were addressed because, as explained in the Material and Methods section, Iliopoulos *et al.* (2010) demonstrated that miR-122 possesses DGAT2 and CPT1a as actual target genes (Iliopoulos *et al.*, 2010).

Although it was not the main objective of the present study, and in order to provide more information concerning their regulation by miRNAs, transfection studies were also carried out for the miRNAs that remained unchanged after pterostilbene treatment, for which the database shows TFAM, PPAR $\alpha$ , CPT1a and DGAT2 as predicted, but not as validated targets. When AML12 cells were transfected with miR-140, a decreased protein expression of CPT1a was observed that bore no changes in gene expression (Figure 2). Furthermore, protein and gene expressions of DGAT2, the other putative target of miR-140, remained unchanged. Gene and protein expressions of cells transfected with miR-33 and miR-19b were not statistically different when compared with the control cells. With regard to miR-107-3p, we showed in a previous study that the hepatocytes over-expressing miRNA-107-3p exhibited down-regulated CPT1a protein expression,

suggesting that in fact *cpt1a* is a real target gene. Consequently, transfection studies were not addressed for this miRNA in the present study.





**Figure 2.** Protein and mRNA expressions of targets for miR-140-5p (upper panel) and miR-93-5p (bottom panel) in AML12 hepatocytes transfected with miR-140-5p mimic or miR-93-5p mimic. CPT1a: carnitine palmitoyltransferase 1a; DGAT2: diacylglycerol O-acyltransferase 2; PPAR $\alpha$ : peroxisome proliferator-activated receptor alpha; TFAM: transcription factor A mitochondrial. Differences between groups were assessed by the Student's *t* test. \* $P < 0.05$ .

#### 4. Discussion

Resveratrol, the parent compound of pterostilbene, has been reported to induce beneficial effects on hepatic steatosis (Milton-Laskibar *et al.*, 2017; Aguirre, Fernandez-Quintela *et al.*, 2014; Alberdi *et al.*, 2014). The reduction in liver fat accumulation is mainly due to the activation of oxidative metabolic pathways and the inhibition of the lipogenic ones. These metabolic effects have been shown to be mediated by several miRNAs. In an earlier experiment from our group, the effects of resveratrol on SREBP1a and CPT1a were

mediated by a decrease in the expression of miR-107-3p and miR-122-5p (Gracia *et al.*, 2017). Although resveratrol has beneficial effects, its bioavailability has proved to be low. On the contrary, pterostilbene, a dimethoxy resveratrol-derivative that shows greater bioavailability, might be considered as an interesting alternative (Kapetanovic *et al.*, 2011). In this context, the present study analysed the effects of this bioactive molecule on liver steatosis, using a model of genetic obesity (Zucker fa/fa rat).

The results showed that this phenolic compound was effective in reducing the degree of liver steatosis. With regard to the mechanisms underlying this effect, in a previous study carried out in this cohort of rats, significant increases in PPAR $\alpha$  and TFAM protein expressions, as well as in CPT1a activity, and a significant decrease in DGAT2 protein expression were observed in the rats treated with pterostilbene (Aguirre *et al.*, 2019). In view of this results, and aimed at gaining a greater insight into the effect of pterostilbene on the aforementioned proteins, the present study was designed to assess the potential implication of miRNAs.

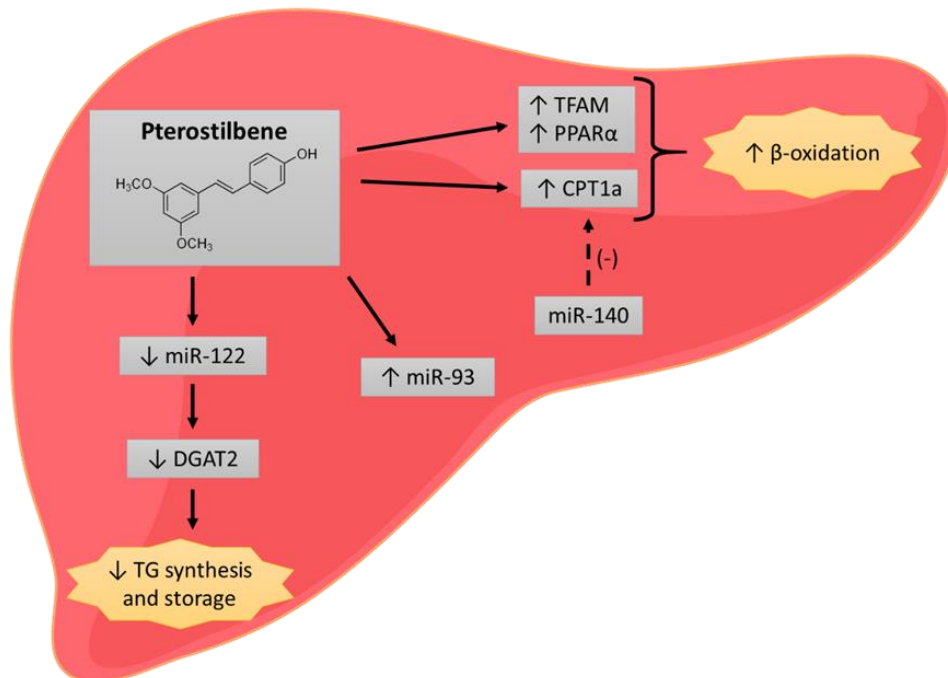
When the expression of those miRNAs selected according to the criteria described in the Material and Methods section (miR-33-5p, miR-140-5p, miR-93-5p, MiR-19-3p, miR-122p and miR107-3p) was measured in liver from rats treated with pterostilbene, only miR-93-5p and miR-122-5p were significantly decreased by this phenolic compound. Regarding miR-93-5p, the transfection study showed no changes in gene or protein expressions of its predicted targets (PPAR $\alpha$ , TFAM and DGAT2). This suggests that in fact, miR-93-5p does not regulate these proteins and consequently, the increase induced by pterostilbene in this miRNA cannot be associated with metabolic changes resulting from pterostilbene treatment. Nevertheless, this miRNA has been associated with several pathogenic processes such as hepatic cancer. Thus, De Conti *et al.* analysed the effects of

miR-93-5p on the development of NAFLD-associated hepatocarcinoma (HCC), which is the last step in the progression of NAFLD (de Conti *et al.*, 2017). The authors showed that subjects with NAFLD-derived HCC presented a higher expression of this miRNA. In addition, the overexpression of the miRNA described in their experiment resulted in the activation of major hepatocarcinogenesis-related pathways. In the same line, Liu et al demonstrated that the overexpression of miR-93-5p accelerated tumour growth in the HCC xenograft mouse model, and suggested that the miR-93-5p overexpression contributes to hepatoma development by inhibiting PPARGC1A (Shi *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2018). Bearing all these results in mind, it might be hypothesised that, via the reduction in miR-93-5p, pterostilbene could be considered as an interesting tool against liver steatosis progression. Nevertheless, specific studies to validate this fact are warranted.

MiR-122-5p is the most abundant microRNA in liver (Bandiera *et al.*, 2015). Although bioinformatic tools did not provide any relationship between this miRNA and the proteins of interest for the present research, as predicted or validated targets, Iliopoulos et al., (2010) demonstrated that miR-122-5p controls the expression of CPT1a (decrease) and DGAT2 (increase) in transfected hepatocytes (Iliopoulos *et al.*, 2010), meaning that these enzymes are real targets for miR-122-5p. Therefore, no transfections were carried out in the present study. As previously mentioned in the present manuscript, CPT1a activity was increased and protein expression of DGAT2 was decreased in rats treated with 30 mg/kg/day of pterostilbene. Moreover, in the present experiment, miR-122-5p was significantly decreased in the experimental group. Therefore, it can be proposed that this microRNA can be a mediator of the effects induced by pterostilbene in CPT1a and DGAT2. Very little information related to the role of miRNAs on the effects of

pterostilbene on liver steatosis has been reported to date. The only study found in the literature provides experimental evidence supporting the anti-lipogenic effect of pterostilbene against fructose-induced hepatic lipid accumulation by modulating the miR-34a/Sirt1/SREBP-1 pathway in rats (Wu *et al.*, 2020). To our knowledge, the present study is the first one that shows the involvement of miR-122-5p in the anti-steatotic effect of pterostilbene.

With regard to miR-140-5p, its overexpression in transfected hepatocytes down-regulates the protein expression of CPT1a, thus suggesting that this predicted target, and according to the databases, might be in fact, a real target of this miRNA. However, when this miRNA was measured in liver from rats treated with pterostilbene, no changes were observed, suggesting that this miRNA does not mediate the observed effects of this phenolic compound (Figure 3).





**Figure 3.** Pterostilbene effects in hepatic lipid and miRNAs expression. CPT1a: carnitine palmitoyltransferase 1a; TFAM: transcription factor A, mitochondrial; DGAT2: diacylglycerol O-acyltransferase 2; PPAR $\alpha$ : peroxisome proliferator activated receptor alpha; TG: triglyceride.

With regard to miR-107-3p, among the reported targets included in the bioinformatic databases, only CPT1a was of interest for our study. Transfection experiments were not performed since we showed in a previous study that this protein was down-regulated by the transfection of miR-107 in hepatocytes (Bandiera *et al.*, 2015). By measuring this miRNA in the present cohort of rats, we found no changes in its hepatic expression after pterostilbene treatment. Finally, regarding miR-19b-3p and miR-33-5p, no changes were observed in neither the *in vivo* nor the *in vitro* transfection experiments. These results suggest that miR-107-3p, miR-19b-3p and miR-33-5p do not mediate the observed effects of pterostilbene.

Interestingly, according to the results obtained both in the present study and in an earlier piece of research, miRNAs involved in the beneficial effects of pterostilbene and resveratrol (its parent compound) on liver steatosis seem not to be the same. In the previous study from our group, resveratrol (30 mg/kg body weight/d) partially prevented the liver steatosis induced by high-fat high-sucrose feeding, by increasing the activity of CPT1a, and thus fatty acid oxidation, and by decreasing protein expression of SREBP1a, the transcription factor which controls *de novo* lipogenesis. These effects were mediated by a reduction in the expression of miR-107-3p and miR-122-5p (Gracia *et al.*, 2017).

In summary, among all the analysed miRNAs in the present study, miR-122-5p has been identified as a mediator in the beneficial effects of pterostilbene on liver steatosis, by acting on CPT1a and DGAT2, two enzymes involved in fatty acid oxidation and triglyceride assembly respectively.

**Acknowledgments:** Pterostilbene was a generous gift from Agnes M. Rimando (University of Mississippi, MS 38677, USA).

Aguirre L, Fernandez-Quintela A, Arias N, Portillo MP. (2014). Resveratrol: anti-obesity mechanisms of action. *Molecules*, 19, 18632-18655.

Aguirre L, Palacios-Ortega S, Fernandez-Quintela A, Hijona E, Bujanda L, Portillo MP. (2019). Pterostilbene Reduces Liver Steatosis and Modifies Hepatic Fatty Acid Profile in Obese Rats. *Nutrients*, 11, 10.3390/nu11050961.

Aguirre L, Portillo MP, Hijona E, Bujanda L. (2014). Effects of resveratrol and other polyphenols in hepatic steatosis. *World J Gastroenterol*, 20, 7366-7380.

Ahmed A, Wong RJ, Harrison SA. (2015). Nonalcoholic Fatty Liver Disease Review: Diagnosis, Treatment, and Outcomes. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 13, 2062-2070.

Alberdi G, Macarulla MT, Portillo MP, Rodriguez VM. (2014). Resveratrol does not increase body fat loss induced by energy restriction. *J Physiol Biochem*, 70, 639-646.

Ambros V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431, 350-355.

Bandiera S, Pfeffer S, Baumert TF, Zeisel MB. (2015). miR-122--a key factor and therapeutic target in liver disease. *J Hepatol*, 62, 448-457.

Baselga-Escudero L, Blade C, Ribas-Latre A *et al.* (2014). Resveratrol and EGCG bind directly and distinctively to miR-33a and miR-122 and modulate divergently their levels in hepatic cells. *Nucleic Acids Res*, 42, 882-892.

Baselga-Escudero L, Pascual-Serrano A, Ribas-Latre A *et al.* (2015). Long-term supplementation with a low dose of proanthocyanidins normalized liver miR-33a and miR-122 levels in high-fat diet-induced obese rats. *Nutr Res*, 35, 337-345.

Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. (1999). Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol*, 94, 2467-2474.

Byrne CD, Targher G. (2015). NAFLD: a multisystem disease. *J Hepatol*, 62, S47-64.

Day CP, James OF. (1998). Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*, 114, 842-845.

de Conti A, Ortega JF, Tryndyak V *et al.* (2017). MicroRNA deregulation in nonalcoholic steatohepatitis-associated liver carcinogenesis. *Oncotarget*, 8, 88517-88528.

Estrela JM, Ortega A, Mena S, Rodriguez ML, Asensi M. (2013). Pterostilbene: Biomedical applications. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 50, 65-78.

Faghihzadeh F, Hekmatdoost A, Adibi P. (2015). Resveratrol and liver: A systematic review. *J Res Med Sci*, 20, 797-810.

Gracia A, Fernández-Quintela A, Miranda J, Eseberri I, González M, Portillo MP. (2017). Are miRNA-103, miRNA-107 and miRNA-122 Involved in the Prevention of Liver Steatosis Induced by Resveratrol? *Nutrients*, 9, 360.

Hammond SM. (2015). An overview of microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev*, 87, 3-14.

Iliopoulos D, Drosatos K, Hiyama Y, Goldberg IJ, Zannis VI. (2010). MicroRNA-370 controls the expression of microRNA-122 and Cpt1alpha and affects lipid metabolism. *J Lipid Res*, 51, 1513-1523.

Intagliata S, Modica MN, Santagati LM, Montenegro L. (2019). Strategies to Improve Resveratrol Systemic and Topical Bioavailability: An Update. *Antioxidants (Basel)*, 8, 244. doi: 10.3390/antiox8080244.

Joseph JA, Fisher DR, Cheng V, Rimando AM, Shukitt-Hale B. (2008). Cellular and behavioral effects of stilbene resveratrol analogues: implications for reducing the deleterious effects of aging. *J Agric Food Chem*, 56, 10544-10551.

Joven J, Espinel E, Rull A *et al.* (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. *Biochim Biophys Acta*, 1820, 894-899.

Kapetanovic IM, Muzzio M, Huang Z, Thompson TN, McCormick DL. (2011). Pharmacokinetics, oral bioavailability, and metabolic profile of resveratrol and its dimethylether analog, pterostilbene, in rats. *Cancer Chemother Pharmacol*, 68, 593-601.

Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. (2019). miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res*, 47, D155-D162.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75, 843-854.

Lin X, Luo J, Zhang L, Zhu J. (2013). MicroRNAs synergistically regulate milk fat synthesis in mammary gland epithelial cells of dairy goats. *Gene Expr*, 16, 1-13.

Livak KJ, Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>( $\Delta\Delta C_T$ ) Method. *Methods*, 25, 402-408.

Milton-Laskibar I, Gomez-Zorita S, Aguirre L, Fernandez-Quintela A, Gonzalez M, Portillo MP. (2017). Resveratrol-Induced Effects on Body Fat Differ Depending on Feeding Conditions. *Molecules*, 22, 10.3390/molecules22122091.

Peltier HJ, Latham GJ. (2008). Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA*, 14, 844-852.

Rimando AM, Nagmani R, Feller DR, Yokoyama W. (2005). Pterostilbene, a new agonist for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha-isoform, lowers plasma lipoproteins and cholesterol in hypercholesterolemic hamsters. *J Agric Food Chem*, 53, 3403-3407.

Salomone F, Godos J, Zelber-Sagi S. (2016). Natural antioxidants for non-alcoholic fatty liver disease: molecular targets and clinical perspectives. *Liver Int*, 36, 5-20.

Shi X, Liu TT, Yu XN *et al.* (2020). microRNA-93-5p promotes hepatocellular carcinoma progression via a microRNA-93-5p/MAP3K2/c-Jun positive feedback circuit. *Oncogene*, 39, 5768-5781.

Shibata C, Kishikawa T, Otsuka M *et al.* (2013). Inhibition of microRNA122 decreases SREBP1 expression by modulating suppressor of cytokine signaling 3 expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 438, 230-235.

Szabo G, Bala S. (2013). MicroRNAs in liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 10, 542-552.

Than NN, Newsome PN. (2015). A concise review of non-alcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis*, 239, 192-202.

Vergani L, Vecchione G, Baldini F *et al.* (2018). Polyphenolic extract attenuates fatty acid-induced steatosis and oxidative stress in hepatic and endothelial cells. *Eur J Nutr*, 57, 1793-1805.

Walle T. (2011). Bioavailability of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci*, 1215, 9-15.

Wang X, Liao Z, Bai Z, He Y, Duan J, Wei L. (2018). MiR-93-5p Promotes Cell Proliferation through Down-Regulating PPARGC1A in Hepatocellular Carcinoma Cells by Bioinformatics Analysis and Experimental Verification. *Genes (Basel)*, 9, 51. doi: 10.3390/genes9010051.

Whalley S, Puvanachandra P, Desai A, Kennedy H. (2007). Hepatology outpatient service provision in secondary care: a study of liver disease incidence and resource costs. *Clin Med (Lond)*, 7, 119-124.

Wu WY, Ding XQ, Gu TT *et al.* (2020). Pterostilbene Improves Hepatic Lipid Accumulation via the MiR-34a/Sirt1/SREBP-1 Pathway in Fructose-Fed Rats. *J Agric Food Chem*, 68, 1436-1446.

Xiao F, Zuo Z, Cai G, Kang S, Gao X, Li T. (2009). miRecords: an integrated resource for microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res*, 37, D105-10.

Yki-Jarvinen H. (2014). Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2, 901-910.

**Manuscrito 2 / 2. Eskuizkribua**

Sara Ramos-Romero<sup>1,2#</sup>, Asier Léniz<sup>3,4#</sup>, Daniel Martínez-Maqueda<sup>5</sup>, Susana Amézqueta<sup>6</sup>, Alfredo Fernández-Quintela<sup>4,7</sup>, Mercè Hereu<sup>1</sup>, Josep Luís Torres<sup>1</sup>, María P. Portillo<sup>4,7</sup>, Jara Pérez-Jiménez<sup>5</sup>

1 Institute of Advanced Chemistry of Catalonia (IQAC-CSIC), Barcelona, Spain

2 Department of Cell Biology, Physiology & Immunology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

3 Araba Integrated Health Care Organization, Basque Health Service (Osakidetza), Vitoria, Spain

4 Nutrition and Obesity Group, Department of Nutrition and Food Science, Faculty of Pharmacy and Lucio Lascaray Research Center, University of the Basque Country (UPV/EHU), Vitoria, Spain

5 Department of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), José Antonio Novais 10, 28040, Madrid, Spain.

6 Departament d'Enginyeria Química i Química Analítica and Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

7 CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain.

# These authors equally contributed to the manuscript

**Inter-Individual Variability in Insulin Response after Grape Pomace  
Supplementation in Subjects at High Cardiometabolic Risk: Role of Microbiota  
and miRNA.**

Mol Nutr Food Res. 2021 Jan;65(2):e2000113

doi: 10.1002/mnfr.202000113

## **Abstract**

Dietary polyphenols have shown promising effects in mechanistic and preclinical studies on the regulation of cardiometabolic alterations. Nevertheless, clinical trials have provided contradictory results, with a high inter-individual variability. This study explored the role of gut microbiota and microRNAs (miRNAs) as factors contributing to the inter-individual variability in polyphenol response. For this, 49 subjects with at least two factors of metabolic syndrome were divided between responders (n= 23) or non-responders (n= 26), depending on the variation rate in fasting insulin after supplementation with grape pomace for 6 weeks. The populations of selected fecal bacteria were estimated from fecal DNA by quantitative real-time PCR (qRT-PCR), while the microbial-derived short chain fatty acids (SCFAs) were measured in fecal samples by gas chromatography. MicroRNAs were analyzed by Next-Gen Sequencing (NGS) on a representative sample, followed by targeted miRNA analysis by qRT-PCR. Responder subjects showed significantly lower ( $p<0.05$ ) *Prevotella* and Firmicutes levels, as well as increased ( $p<0.05$ ) miR-222 levels. After evaluating the selected substrates for *Prevotella* and target genes of miR-222, these variations suggested that responders were those subjects who exhibited impaired glycaemic control. This study shows that fecal microbiota and miRNA expression may be related to inter-individual variability in clinical trials with polyphenols.

## **1. Introduction**

Metabolic Syndrome (MetS) is a cluster of risk factors, predisposing to further appearance of cardiovascular diseases or type 2 diabetes.[1] Currently, MetS is a relevant public health problem, with a prevalence about 30% of the population in Western countries.[2] MetS is a complex metabolic process, where several physiological responses are altered, and mutual enhancements take place between them; thus, insulin resistance, subclinical chronic inflammation and oxidative stress may be considered as core biochemical processes underlying MetS.[3-5] In particular, insulin resistance contributes to other metabolic alterations, such as increased glucose output or impaired appetite regulation, as well as to clinical features, such as microvascular complications.[6] For this reason, there is an interest in the search of strategies for improving insulin sensitivity.

Polyphenols -a wide class of phytochemicals- have been suggested as potential modulators of insulin resistance. In particular, grape polyphenols have shown to be able to improve insulin response in several pre-clinical studies, either alone or in combination with other bioactive compounds.[7-9] Several mechanisms of action -in some cases independent of a delipidating effect - have been suggested for this, such as activation of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) secretion,[10,11] activation of phosphatidylinositol 3-kinase PI3K pathway or direct modification of insulin synthesis, secretion and degradation.[12,13]

Clinical trials on the effects of grape polyphenols on markers of MetS have provided contradictory results.[14,15] This may be due to several reasons, such as the different composition of the grape-derived products used in these studies.[16] A key aspect is the high inter-individual variability that is observed in most clinical trials focused on dietary



bioactive compounds with subjects divided between “responders” and “non-responders”];[17] this limits the clinical applications of these studies. An important contributor to inter-individual variability is the subject’s ability to absorb, transform or excrete the ingested compounds, thus giving place to different profiles of circulating metabolites, i.e., the stratification of subjects into metabotypes that may be associated with specific physiological situations such as obesity or with health outcomes such as cardiometabolic markers.[18,19] Metabolite profile depends in part on microbiota composition, that shows inter-individual variability;[20] indeed, intestinal dysbiosis is a process involved in several pathologies.[21] Inter-individual variability can also be explained by epigenetic mechanisms, such as micro RNAs (miRNAs), with increasing evidence of the association between the circulation levels of certain miRNAs and several cardiometabolic alterations.[22,23] The potential role of these two aspects as factors involved in inter-individual variability in clinical trials with polyphenols has hardly been explored.

In a clinical trial where obese subjects at high cardiometabolic risk were supplemented with grape pomace, we reported a significant improvement in fasting insulineamia and a tendency towards improvement in postprandial insulinaemia.[24] As the response was not homogenous in all the subjects, in this study we evaluated pre-supplementation fecal microbiota and circulating miRNA expression with the aim of identifying potential factors which may explain inter-individual variability, thus contributing to understand the different responsiveness to polyphenol supplementation.

## **2. Experimental Section**

### *2.1 Study subjects*

The study protocol was approved by the Ethics Subcommittee of the Spanish National Research Council (CSIC), Madrid, Spain (2016/12/13) and the Ethics Committee for Clinical Research of the University Hospital Puerta de Hierro-Majadahonda, Majadahonda, Spain (2016/12/02). It was registered in Clinical Trials (NCT NCT03076463). Written informed consent was obtained from all subjects before their enrollment in the study. Study details have been provided elsewhere.[24] Briefly, the participants exhibited at least two factors for Metabolic Syndrome diagnosis and a total of 49 subjects completed the study.

### *2.2 Study design*

The participants completed a randomized crossover controlled clinical trial. The two experimental periods lasted 6 weeks, separated by a 2-weeks wash-out. One of the periods corresponded to daily supplementation with 8 g of dried grape pomace, while the other was a control period (no placebo was found). At the beginning and at the end of each period, biological samples were collected and anthropometric measurements were performed; before each visit, subjects were asked to follow a polyphenol-low diet. The volunteers (n=49) were classified as responders (n=23) or non-responders (n=26) to grape pomace supplementation depending on whether they experienced a reduction in fasting insulin of at least 10% (responders) or lower (non-responders).

### *2.3 Sample collection*

Fasting blood samples were collected at the beginning of each period after overnight fasting; plasma was obtained after centrifugation at 1000g for 15 min. Fecal samples from the previous 24 h at the beginning of the supplementation period were provided by the participants. All biological samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### *2.4 Materials*

Acetic acid, butyric acid, 2-ethylbutyric acid, isobutyric acid, isovaleric acid, oxalic acid, propionic acid and valeric acid were purchased from Sigma-Aldrich (San Luis, MI, USA), while acetonitrile was from Fisher Scientific (Hampton, NH, USA).

#### *2.5 Cardiometabolic markers*

Serum total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol and triglycerides were measured with an automatic analyzer (Siemens Healthcare, Tarrytown, NY, USA). Plasma insulin was evaluated using a commercial ELISA kit (Merck-Millipore, Burlington, MS, USA). Fasting blood glucose was determined by applying the enzyme electrode method using a Free Style Optimum Neo blood glucose meter from Abbott (Chicago, IL, USA).

Blood pressure was measured in a quiet temperature-controlled room using an automated digital oscillometric device (Omron model M6 Comfort, Omron Corporation, Tokyo, Japan). Height, body weight and abdominal and hip perimeter were also registered.

#### *2.6 Fecal microbiota*

The levels of bacterial subgroups were estimated from basal fecal DNA by qRT-PCR at the beginning of the study. DNA was extracted from the feces using QIAamp DNA StoolMini Kit from Qiagen (Hilden, Germany) and its concentration was quantified using a Nanodrop 8000 Spectrophotometer (Thermo Scientific; Waltham, MA, USA). The

qRT-PCR experiments were carried out using a LightCycler 480 II (Roche; Basel, Switzerland). The qRT-PCR cycling conditions were: 10 s at 95 °C, then 45 cycles of 5 s at 95 °C, 30 s at primer-specific annealing temperature (52-65°C), and 30 s at 72 °C (extension). The targeted miRNA assay sequences were as follows:[25-29]

Total Bacteria F: ACT CCT ACG GGA GGC AGC AGT'

R: ATT ACC GCG GCT GCT GGC

Bacteroidetes F: ACG CTA GCT ACA GGC TTA A

R: ACG CTA CTT GGC TGG TTC A

Firmicutes F: CTG ATG GAG CAA CGC CGC GT

R: ACA CYT AGY ACT CAT CGT TT

Lactobacillales F: AGC AGT AGG GAA TCT TCC A

R: CAC CGC TAC ACA TGG AG

*Bacteroides* F: GGT TCT GAG AGG AGG TCC C

R: GCT GCC TCC CGT AGG AGT

*Prevotella* F: CAG CAG CCG CGG TAA TA

R: GGC ATC CAT CGT TTA CCG T

Positive controls were *Bacteroides fragilis* for Bacteroidetes and *Bacteroides*, *Ruminococcus productus* for Firmicutes, *Lactobacillus acidophilus* for Lactobacillales and *Prevotella copri* for *Prevotella*.

Following amplification, to determine the specificity of the qRT-PCR, melting curve analysis was carried out by treatment for 2 s at 95 °C, 15 s at 65 °C, followed by a temperature gradient up to 95 °C at 0.11 °C/s, with five fluorescence recordings per degree Celsius. The relative DNA abundances for the different genes were calculated from the second derivative maximum of their respective amplification curves ( $C_p$ ), according to the equation:  $[DNAa]/[DNAb] = 2^{C_{pb}-C_{pa}}$ . [30] Total bacteria were normalized as 16S rRNA gene copies per mg of wet feces (copies per mg).

### *2.7 Fecal short-chain fatty acids (SCFAs)*

SCFAs were analyzed in fecal samples corresponding to the beginning of the study by gas chromatography using a previously described method with some modifications as described elsewhere. [31,32] Briefly, the freeze-dried feces were weighed (~50 mg dry matter) and a solution (1.5 mL) containing the internal standard 2-ethylbutiric acid (6.67 mg/L) and oxalic acid (2.97 g/L) in acetonitrile/water 3:7 was added. Then, SCFAs were extracted for 10 min using a rotating mixer. The suspension was centrifuged (5 min, 12,880 g) in a 5810R centrifuge (Eppendorf, Hamburg, Germany) and the supernatant filtered through a 0.45 µm nylon filter. An aliquot of the supernatant (0.7 mL) was diluted with acetonitrile/water 3:7 to a final volume of 1 mL. SCFAs were analyzed using a Trace2000 gas chromatograph coupled to a flame ionization detector (ThermoFinnigan, Waltham, MA, USA) equipped with an Innowax 30 m × 530 µm × 1 µm capillary column (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Chrom-Card software was used for data processing.

### *2.8 miRNA profiling by next generation sequencing*

Next Generation Sequencing (NGS) analysis of miRNA was performed in a representative sample (n=8 per group) of the whole cohort at the beginning of each period.

Linear model fitting and differential miRNA expression analysis were performed using the eBayes moderated t-statistic by limma package for the R statistical software.[33] Raw *p* values were adjusted using the Benjamini-Hochberg procedure and a False Discovery Rate (FDR) cut-off of 0.05 in the analysis was used as statistically significant threshold. The gene ontology (GO) and pathways enrichment analyses were performed using mirPath v.3 using miRNA differentially expressed raw *p*-value <0.05 and >2-fold change in expression level.[34]

### *2.9 Isolation of miRNAs, reverse transcription to cDNA and quantitative real-time PCR*

The miRNAs significantly modified in the NGS analysis were analyzed in 15 responders and 16 non-responders (after exclusion of those selected for NGS) by qRT-PCR. Total miRNAs were extracted by using miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit, (Qiagen, Venlo, Limburg, The Netherlands). Total RNA containing miRNAs was diluted up to 20  $\mu$ L with RNase-free water. miRNAs (2  $\mu$ L of the RNA solution) reverse-transcribed and pre-amplified using the TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

CFX96™–MyiQ™ Real-Time System (BioRad, Hercules, CA, USA) was used to detect and quantify individual miRNAs by RT-PCR. The reactions were carried out with a 20 s incubation at 95°C followed by 40 cycles of 95°C for 3 s and 60°C for 30 s. All reactions were run in duplicate. The mRNA levels were normalized to the values of miRNA-191 (sequence miR-191-5p 5'- CAACGGAAUCCCAAAGCAGCUG-3'), and the results expressed as fold changes of threshold cycle (Ct) value relative to controls using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method.[35]

The targeted miRNA assay sequences were as follows (source miRbase.org):

hsa-miR-30c-1-5p: 3'-UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC-5'

hsa-miR-23a-3p: 3'-AUCACAUUGCCAGGGAAUUUCC-5'

hsa-miR-222-3p: 3'-AGCUACAUCUGGCUCACUGGGU-5'

hsa-miR-let7a-1: 3'-UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU-5'

hsa-miR-151a-5p: 3'-UCGAGGAGCUCACAGUCUAGU-5'

hsa-miR-181a-1-5p: 3'-AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU-5'

hsa-miR-10a-5p: 3'-UACCCUGUAGAUCGAAUUUGUG-5'

### *2.10 Search of miRNAs regulating target genes*

Predicted and validated target genes were identified using miRecords Database. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database was used to identify the involvement of the predicted or validated target genes in metabolic pathways related to glycaemic control. In addition, a revision of the literature was carried out.

### *2.11 Statistical analysis*

Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics 24.0. Normality of the data was tested using the Shapiro-Wilk test and homoscedasticity of variance with Levene's test. Comparisons between two paired samples were conducted with a paired Student's *t* test, and comparisons between unrelated variables were calculated with a Student's *t* test or a Mann-Whitney's U test, as appropriate. Results are presented as mean values with their standard errors. Significance was set-up at *p* value < 0.05.

### 3. Results

#### 3.1 Subject characteristics

Basal values for several cardiometabolic markers of all subjects as well as for the non-responders and responders groups are shown in **Table 1**. In all the cases, subjects showed a mean BMI corresponding to obesity ( $> 30 \text{ kg/m}^2$ ). All subjects also exhibited at least an additional MetS factor, i.e., some cardiometabolic parameters above the recommended values; nevertheless, the mean values of all these parameters were within the recommended ranges. Significant differences ( $p < 0.05$ ) were only found for the waist-to-height ratio, with a value slightly higher in responder subjects. No differences were found for the other anthropometric measurements (BMI, abdominal perimeter, waist-to-height ratio). In the same way, both responder and non-responder groups showed similar basal values for age, blood pressure, blood glucose and lipid profile. Fasting insulin values were significantly ( $p < 0.05$ ) higher in responders (**Table 1**). No significant differences were found in HOMA-IR values because fasting glucose levels were unaltered. These results are suggesting that responders were in a preliminary stage in the development of insulin alterations associated with obesity.[36]

#### TABLES

**Table 1.** Pre-supplementation cardiometabolic risk markers in responders and non-responder subjects regarding grape pomace supplementation

Parameter	Whole sample ( $n= 49$ )		Non-responders ( $n=26$ )		Responders ( $n=23$ )	
	Mean	S.E.M.	Mean	S.E.M.	Mean	S.E.M.



Males (%)	55	n.a.	45	n.a.	65	n.a.
Age (years)	43	2	43	2	42	3
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	31	1	30	1	32	1
Abdominal perimeter (cm)	103	2	100	2	105	3
Waist-to-height ratio	0.94	0.01	0.92	0.02	0.96	0.01
Waist-to-hip ratio	0.62	0.01	0.60	0.01	0.62	0.02
Systolic blood pressure (mm Hg)	120	17	116	3	119	3
Diastolic blood pressure (mm Hg)	84	12	82	2	82	2
Glucose (mg/dL)	98	2	97	2	98	2
Insulin (μU/mL)	8.9	1.9	4.7	0.6	13.7	3.8
HOMA-IR	2.2	0.5	1.1	0.2	3.3	0.9
Triglycerides (mg/dL)	147	21	135	14	160	17
Total cholesterol (mg/dL)	201	29	200	10	203	7
HDL cholesterol (mg/dL)	47	7	47	2	47	2
LDL cholesterol (mg/dL)	121	17	120	6	123	7

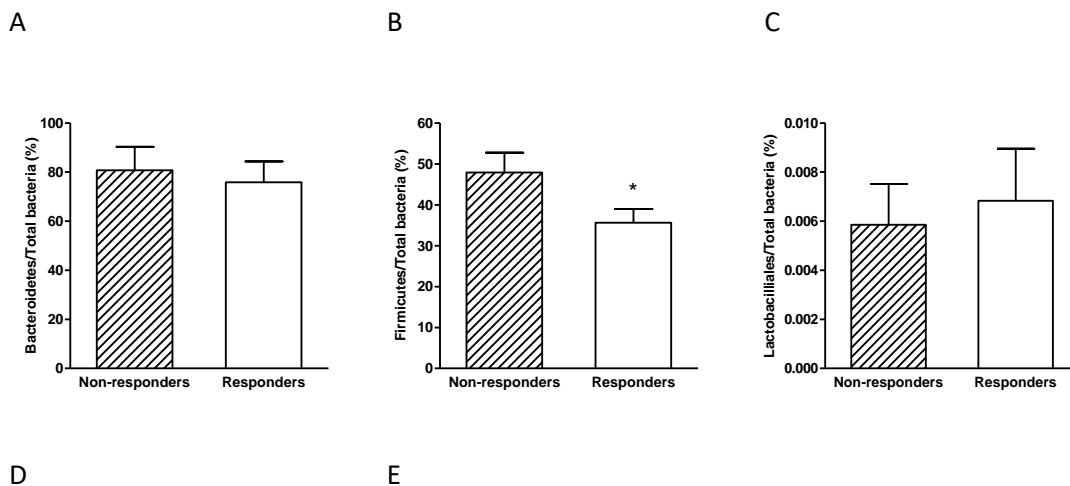
n.a., non-applicable. HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein.

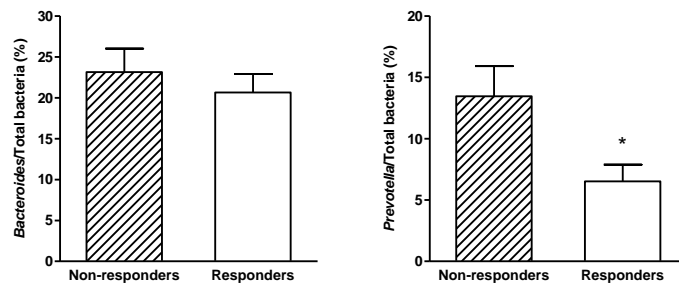
\* Comparison between responders and non-responders. Mann-Whitney's U test for anthropometric measurements due to lack of normal distribution; two independent samples *t* test for the other variables

### 3.2 Subpopulations of excreted microbiota and microbial products

The relative proportions of several bacterial groups of the gut microbiota and some of its metabolic products (short-chain fatty acids) were evaluated in fecal samples (**Figure 1** and **Table 2**).

While the Bacteroidetes proportion (**Figure 1A**) was similar between groups, the Firmicutes phylum was significantly ( $p < 0.05$ ) lower in responder subjects *vs* non-responders before supplementation. The proportion of Lactobacilliales order (**Figure 1C**) did not present any difference between participants. The relative populations of *Prevotella* genus (**Figure 1E**) were significantly ( $p < 0.05$ ) lower in responder subjects, and the *Bacteroides* genus was not different between them.





**Figure 1.** Pre-supplementation excreted intestinal bacteria measured by qRT-PCR. Data are expressed as percentages of total bacteria in basal fecal samples from non-responder and responder subjects regarding grape pomace supplementation. A, Bacteroidetes; B, Firmicutes; C, Lactobacilliales; D, *Bacteroides*; E, *Prevotella*. Values are means with their standard errors. Comparisons were performed using Student’s *t* test. \* $p < 0.05$ .

The levels of acetic, propionic, isobutyric, butyric, isovaleric and valeric acids, and total SCFAs were determined in the feces of all participants (**Table 2**). In both responders and non-responders, the highest concentration was found for acetic acid, followed by propionic acid and butyric acid; isobutyric, valeric and isovaleric acids were in all cases below 5% of total SCFA. The responder participants showed a tendency ( $p < 0.1$ ) to present less butyric and valeric acids in their feces than the non-responder ones. There were no differences in the rest of studied SCFAs.

**Table 2.** Pre-supplementation short-chain fatty acid levels in basal fecal samples from responder and non-responder subjects regarding grape pomace supplementation

	Non-responders		Responders		<i>p</i> -value
	Mean	S.E.M.	Mean	S.E.M.	
Acetic acid	125.6	21.7	125.4	17.7	0.995
Propionic acid	63.3	12.3	43.7	7.7	0.185

Isobutyric acid	7.8	1.0	6.8	0.5	0.352
Butyric acid	43.3	7.2	27.6	3.7	0.064
Isovaleric acid	7.1	0.9	7.3	0.6	0.860
Valeric acid	8.7	1.5	5.5	0.7	0.064
Total SCFA	209.8	35.1	205.9	25.0	0.929

Short-chain fatty acids (SCFAs) amounts are given in millimoles per kilogram feces.

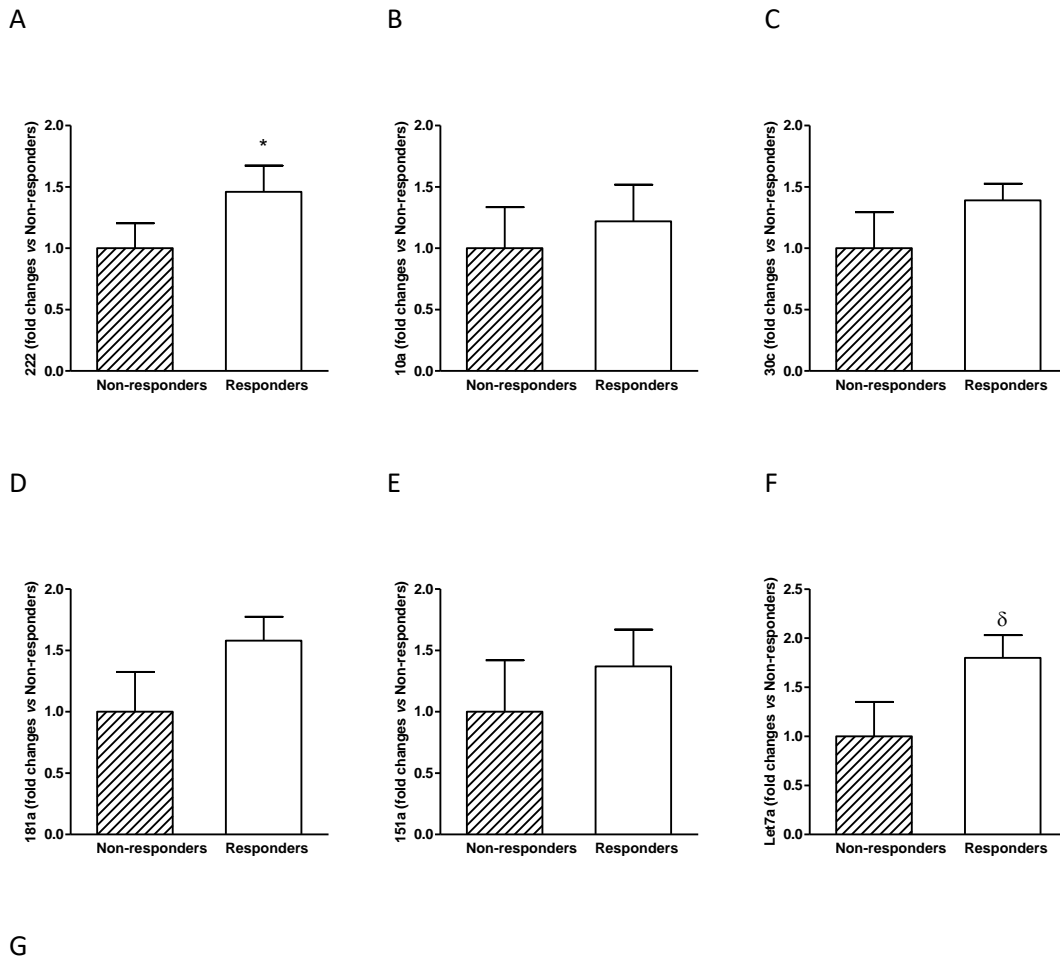
Values are means with their standard errors (S.E.M.). Comparisons were performed using Student's *t* test

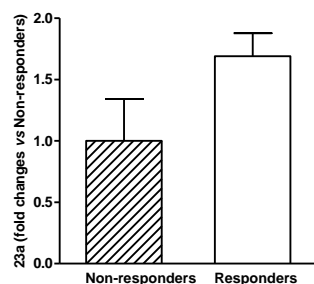
### 3.3 miRNA expression

A representative sample of the cohort was chosen to carry out NGS analysis. Among all the 2588 available miRNAs in the NGS, only 41 miRNAs met the filtering criteria described in the Materials and Methods section (supplementary Table 1). Statistical differences were found between responder and non-responder subjects only in seven miRNAs (miR-30c-5p, miR-23a-3p, miR-222-3p, miR-let7a-5p, miR-151a-5p, miR-181a-5p and miR-10a-5p). More precisely, these miRNAs showed increased expression in responders when compared to non-responders.

In order to confirm these results, the expression of these seven miRNAs was analyzed in every subject of this cohort by qRT-PCR. In this case a statistically significant difference was observed only in miR-222 ( $p=0.042$ ). Moreover, a tendency towards increased value for miR-Let7a ( $p=0.060$ ) was found in the responder group. No differences were observed among the other measured miRNAs (miR-30c-5p  $p=0.16$ ; miR-23a-3p  $p=0.17$ ; miR-151a-5p  $p=0.98$ ; miR-181a-5p  $p=0.11$ ; miR-10a-5p  $p=0.52$ ) (**Figure 2**). According to these results the study focused on miR-222. Thus, bioinformatic analysis was performed

to found validated or predicted target genes for this miRNA. Considering that grape pomace supplementation reduced insulin resistance, our search focused on genes involved in glycaemic control. Insulin receptor-4 (IRS4) and pyruvate kinase (PKM) appeared as predicted genes, while no validated genes were found.





**Figure 2.** Pre-supplementation relative miRNAs expression in basal serum samples from non-responder and responder subjects regarding grape pomace supplementation. Fold changes were calculated using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method and are relative to the mean expression in the non-responder group. Values are means with their standard errors. Comparisons were performed using Student's *t* test. \* $p < 0.05$ ,  $\delta p = 0.06$ .

#### 4. Discussion

High inter-individual variations in the biological responses to dietary polyphenols in clinical trials have been commonly reported.[17] This fact hampers the translation of current knowledge on these compounds on dietary advice, requesting more research on the underlying reasons for these differences. The present study aimed to contribute to this topic, focusing on the potential role of basal microbiota and miRNA expression for explaining the differences in insulin response after supplementing grape pomace to subjects at high cardiometabolic risk. This kind of approach may be particularly relevant when dealing with complex mixture such as grape pomace -rich in both polyphenols and dietary fiber, and specifically in non-extractable polyphenols linked to dietary fiber- where a variety of bioactive compounds is present.[16]

It has been previously suggested that inter-individual variability in polyphenol response may be derived from differences in cardiometabolic markers.[37] In this study, basal common cardiometabolic markers of the subjects did not show statistical differences that may allow to foresee the observed differential response to the supplementation; although basal insulin was significantly higher in responders, this is not a parameter included in the common evaluation of cardiometabolic risk).

The results presented here suggest that the relative populations of selected gut microbiota subgroups may be indicators of responsiveness to grape pomace supplementation. In particular, the populations of the phyla Firmicutes and the genus *Prevotella* were significantly lower in the responders group than in the non-responders group. Additionally, the levels of the SCFA butyrate were also lower ( $p = 0.064$ ) in the responders group; since butyrate is a product of dietary fiber fermentation by some

bacterial subgroups of Firmicutes, this agrees with the observed decrease in these phyla. A high proportion of Firmicutes in gut microbiota has been mainly associated with obesity;[38] nevertheless, participants in this study exhibited either overweight or obesity, so a similar proportion of Firmicutes might have been expected in non-responders and responders.

In the case of *Prevotella*, dominance of this genus as well as the *Prevotella/Bacteroides* ratio have been shown to vary between human populations in relation with their dietary habits.[39,40] Thus, human groups consuming diets high in complex carbohydrates and dietary fiber present dominance of *Prevotella* whereas high fat/protein diets have been related to higher levels of the genus *Bacteroides*. [39,41] In our case, the subjects with lower *Prevotella* populations were those who responded to the supplementation with grape pomace, but dietary recalls showed that the responsiveness to grape pomace was independent of the amount of dietary fiber usually consumed by the subjects (data not shown). A cause and effect relationship between *Prevotella* and glucose metabolism efficiency, with improved glucose tolerance associated with increased populations of *Prevotella* has been described in a preclinical study.[42] The non-responder subjects may be those with no room for improvement as the fasting insulin levels were already low while the populations of *Prevotella* were high. The same line of reasoning may apply to both the populations of Firmicutes and the levels of butyrate in feces. Therefore, supplementation might be recommended only based on the proposed indicators (insulin, butyrate, Firmicutes, *Prevotella*) irrespective of dietary habits.

The other variable explored was miRNA profile. Their potential use has been suggested in order to overcome the weaknesses of classic blood parameters,[43] what may be especially relevant in the study of dietary bioactive compounds.[44] Moreover, it has been



proposed that circulating miRNAs could act as a new mode of communication between insulin sensitive tissues,[45] a relevant aspect in the context of this study.

MiRNA profiling revealed higher expression of miR-222, belonging to a gene cluster highly conserved in vertebrates (miR-221 and miR-222), in the responder group. From the search in specific databases (MiRecords and KEGG) two genes involved in glucose metabolism -insulin receptor substrate 4 (*irs4*) and pyruvate kinase (*pkm*)- emerged as predicted target genes for miR-222. IRS4 is a protein, expressed in skeletal muscle that can stimulate glucose transporter 4 (GLUT4) translocation under insulin stimulation.[46] Moreover, an increase in GLUT4 protein in rat adipose cells over-expressing *irs4* has been reported.[47] Although no direct relationship between miR-222 and the predicted target gene *irs4* has been reported in the literature, a negative correlation between miR-222 and GLUT4 has been described in omental adipose tissue from gestational diabetes mellitus women.[48] Additionally, taking into account that increased miR-222 expression and decreased IRS1 protein in the liver from mice fed a high-fat high-sucrose diet (a dietary pattern that leads to insulin resistance development), and according to transfection studies with rodent and human cells, it has been suggested that *irs-1* is a target gene for miR-222.[49] Considering that the main regulatory mechanism of miRNAs is the inhibition of gene translation into proteins, data from our study suggest that responders could show lower expression of *irs* genes in tissues, due to their higher expression of miR-222, and thus more impaired glycaemic control. This proposal is supported by previous results showing that IRS4 protein was down-regulated in muscles from rats showing MetS.[46]

The other proposed target gene for miR-222 is *Pkm*. PKM protein is the enzyme that catalyzes the final step of glycolysis. It has been reported that in subjects with disturbed

glucose metabolism, glycolysis is significantly impaired when compared with normal glucose metabolism; indeed, diminished glycolysis has been directly implicated in specific cases of type 2 diabetes.[50] According to these data, diminished glycolysis could be expected in responder subjects from our study.

It has been reported that adiponectin receptor 1 (adipoR1) is another potential target of miR-222.[51] Adiponectin is an adipokine that reduces insulin resistance by stimulating fatty acid oxidation and GLUT4 membrane translocation.[52] Thus, responders could show reduced amount of adipoR1 and thus reduced adiponectin action. Nevertheless, we should be cautious with this proposal because the mentioned study was carried out in human umbilical vein endothelial cells.

Overall, the results obtained here, together with the reduction observed by several authors in miR-222 when diabetic subjects are treated with metformin,[53] show the potential of basal miR-222 levels as a biomarker of response to active biomolecules. This aspect should be specifically explored and validated in further studies.

Integrating data from microbiota and miRNA profiling, a common picture emerges: responder subjects were those where there was space for an improvement in insulin homeostasis, as shown by low *Prevotella* and Firmicutes levels or by high miR-222 expression, implying a worse basal glycaemic control. The fact that results for both parameters were in the same direction connects with the existing associations between them. Thus, both effects of microbiota on miRNA expression as well as of miRNA expression on microbiota growth (after entering some bacteria),[54,55] have been reported. Moreover, the present results agree with previous observations in clinical trials with polyphenols, where they were more effective in subjects showing higher basal alterations.[16]

The main limitations of the present study are the relatively small size of the group, which calls for further validations in bigger samples, as well as the lack of determination of individual phenolic metabolites as another key factor previously related to insulin variations after polyphenol supplementation.[56] Preliminary observations (data not shown) show that total urine polyphenols are similar in both responders and non-responders. Finally, measurements of the selected parameters after supplementation leading to similar values between responders and non-responders would strength the hypothesis stated here.

In conclusion, the present study shows that both gut microbiota and miRNAs may be indicators of insulin responsiveness to grape pomace among obese subjects at high cardiometabolic risk. The individuals with higher levels of plasma insulin concentration were sensitive to grape pomace (responders) while showing reduced levels of Firmicutes and *Prevotella*, together with increased expression of miR-222. The variations in miR-222 as well as in *Prevotella* are suggesting that responders were those subjects who exhibited impaired glycaemic control. The role of microbiota and miRNA in the inter-individual variability observed in clinical trials with polyphenols deserves further exploration.

### **Acknowledgements**

This study was funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINNECO-FEDER, grants AGL2014-55102-JIN and AGL2017-83599-R, and graduate fellowship to M. Hereu: BES2014-068592) University of the Basque Country, grant: GIU18-173 and Carlos III Research Institute (CIBERObn). Roquesan Wineries is thanked for providing the raw materials of the dietary supplements. Prof. Fulgencio Saura-Calixto is acknowledged for his advice in the design of the dietary supplement

References

- [1] K.G. Alberti, R.H. Eckel, S.M. Grundy, P.Z. Zimmet, J.I. Cleeman, K.A. Donato, J.C. Fruchart, W.P. James, C.M. Loria, S.C. Smith Jr, *Circulation*. **2009**,120,1640.
- [2] D. Shin, K. Kongpakpaisarn, C. Bohra, *Int.J.Cardiol*. **2018**,259,216.
- [3] F. Bonomini, L.F. Rodella, R. Rezzani, *Aging Dis*. **2015**,6,109.
- [4] N. Esser, S. Legrand-Poels, J. Piette, A.J. Scheen, N. Paquot, *Diabetes Res.Clin.Pract*. **2014**,105,141.
- [5] G.R. Romeo, J. Lee, S.E. Shoelson, *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol*. **2012**,32,1771.
- [6] C. Rask-Madsen, C.R. Kahn, *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol*. **2012**,32,2052.
- [7] A. Meeprom, W. Sompong, W. Suwannaphet, S. Yibchok-anun, S. Adisakwattana, *Br.J.Nutr*. **2011**,106,1173.
- [8] C. Rodriguez Lanzi, D.J. Perdicaro, A. Antonioli, A.R. Fontana, R.M. Miatello, R. Bottini, M.A. Vazquez Prieto, *Food Funct*. **2016**,7,1544.
- [9] S. Ramos-Romero, E. Molinar-Toribio, J. Perez-Jimenez, N. Taltavull, G. Dasilva, M. Romeu, I. Medina, J.L. Torres, *Food Funct*. **2016**,7,3516.
- [10] N. Arias, M.T. Macarulla, L. Aguirre, J. Miranda, M.P. Portillo, *J.Physiol.Biochem*. **2015**,71,569.
- [11] N. Gonzalez-Abuin, N. Martinez-Micaelo, M. Margalef, M. Blay, A. Arola-Arnal, B. Muguerza, A. Ardevol, M. Pinent, *Food Funct*. **2014**,5,2357.
- [12] B. Yogalakshmi, S. Bhuvaneshwari, S. Sreeja, C.V. Anuradha, *J.Cell.Commun.Signal*. **2014**,8,13.

- [13] A. Castell-Auvi, L. Cedo, V. Pallares, M.T. Blay, M. Pinent, M.J. Motilva, S. Garcia-Vallve, G. Pujadas, P. Maechler, A. Ardevol, *J.Nutr.Biochem.* **2012**,23,1565.
- [14] J. Woerdeman, E. van Poelgeest, J.C.F. Ket, E.C. Eringa, E.H. Serne, Y.M. Smulders, *Eur.J.Clin.Nutr.* **2017**,71,1381.
- [15] M. Akaberi, H. Hosseinzadeh, *Phytother.Res.* **2016**,30,540.
- [16] J. Perez-Jimenez, F. Saura-Calixto, *Nutr.Res.Rev.* **2008**,21,158.
- [17] C. Manach, D. Milenkovic, T. Van de Wiele, A. Rodriguez-Mateos, B. de Roos, M.T. Garcia-Conesa, R. Landberg, E.R. Gibney, M. Heinonen, F. Tomas-Barberan, C. Morand, *Mol.Nutr.Food Res.* **2017**,61,10.1002/mnfr.201600557. Epub 2016 Nov 15.
- [18] R. Calvani, A. Miccheli, G. Capuani, A. Tomassini Miccheli, C. Puccetti, M. Delfini, A. Iaconelli, G. Nanni, G. Mingrone, *Int.J.Obes.(Lond).* **2010**,34,1095.
- [19] A. Gonzalez-Sarrias, R. Garcia-Villalba, M. Romo-Vaquero, C. Alasalvar, A. Orem, P. Zafrilla, F.A. Tomas-Barberan, M.V. Selma, J.C. Espin, *Mol.Nutr.Food Res.* **2017**,61,10.1002/mnfr.201600830.
- [20] B. Bayram, A. Gonzalez-Sarrias, G. Istas, M. Garcia-Aloy, C. Morand, K. Tuohy, R. Garcia-Villalba, P. Mena, *J.Agric.Food Chem.* **2018**,66,10686.
- [21] G.A. Weiss, T. Hennet. *Cell Mol.Life Sci.* **2017**,74,2959.
- [22] G. Reid, M.B. Kirschner, N. van Zandwijk, *Crit.Rev.Oncol.Hematol.* **2011**,80,193.
- [23] N. Arias, L. Aguirre, A. Fernandez-Quintela, M. Gonzalez, A. Lasa, J. Miranda, M.T. Macarulla, M.P. Portillo, *J.Physiol.Biochem.* **2016**,72,509.

- [24] D. Martinez-Maqueda, B. Zapatera, A. Gallego-Narbon, M.P. Vaquero, F. Saura-Calixto, J. Perez-Jimenez, *Food Funct.* **2018**,9,6010.
- [25] A. Schwiertz, D. Taras, K. Schafer, S. Beijer, N.A. Bos, C. Donus, P.D. Hardt, *Obesity (Silver Spring)*. **2010**,18,190.
- [26] A.L. Hartman, D.M. Lough, D.K. Barupal, O. Fiehn, T. Fishbein, M. Zasloff, J.A. Eisen, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **2009**,106,17187.
- [27] N. Abdallah Ismail, S.H. Ragab, A. Abd Elbaky, A.R. Shoeib, Y. Alhosary, D. Fekry. *Arch.Med.Sci.* **2011**,7,501.
- [28] M. Haakensen, C.M. Dobson, H. Deneer, B. Ziola, *Int.J.Food Microbiol.* **2008**,125,236.
- [29] J. Walter, C. Hertel, G.W. Tannock, C.M. Lis, K. Munro, W.P. Hammes, *Appl.Environ.Microbiol.* **2001**,67,2578.
- [30] M.W. Pfaffl, *Nucleic Acids Res.* **2001**,29,e45.
- [31] A. Schwiertz, D. Taras, K. Schafer, S. Beijer, N.A. Bos, C. Donus, P.D. Hardt, *Obesity (Silver Spring)*. **2010**,18,190.
- [32] M. Hereu, S. Ramos-Romero, N. García-González, S. Amézqueta, J.L. Torres, *Journal of Functional Foods.* **2018**,50,120.
- [33] M.E. Ritchie, B. Phipson, D. Wu, Y. Hu, C.W. Law, W. Shi, G.K. Smyth, *Nucleic Acids Res.* **2015**,43,e47.
- [34] I.S. Vlachos, K. Zagganas, M.D. Paraskevopoulou, G. Georgakilas, D. Karagkouni, T. Vergoulis, T. Dalamagas, A.G. Hatzigeorgiou, *Nucleic Acids Res.* **2015**,43,W460.

- [35] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, *Methods*. **2001**,25,402.
- [36] G.C. Weir, S. Bonner-Weir, *Diabetes*. **2004**,53 Suppl 3,S16.
- [37] J. d'El-Rei, A.R. Cunha, A. Burla, M. Burla, W. Oigman, M.F. Neves, A. Viridis, F. Medeiros, *Int.J.Hypertens*. **2013**,2013,985087.
- [38] R.E. Ley, P.J. Turnbaugh, S. Klein, J.I. Gordon, *Nature*. **2006**,444,1022.
- [39] C. De Filippo, D. Cavalieri, M. Di Paola, M. Ramazzotti, J.B. Poullet, S. Massart, S. Collini, G. Pieraccini, P. Lionetti, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*. **2010**,107,14691.
- [40] A.R. Jha, E.R. Davenport, Y. Gautam, D. Bhandari, S. Tandukar, K.M. Ng, G.K. Fragiadakis, S. Holmes, G.P. Gautam, J. Leach, J.B. Sherchand, C.D. Bustamante, J.L. Sonnenburg, *PLoS Biol*. **2018**,16,e2005396.
- [41] G.D. Wu, J. Chen, C. Hoffmann, K. Bittinger, Y.Y. Chen, S.A. Keilbaugh, M. Bewtra, D. Knights, W.A. Walters, R. Knight, R. Sinha, E. Gilroy, K. Gupta, R. Baldassano, L. Nessel, H. Li, F.D. Bushman, J.D. Lewis, *Science*. **2011**,334,105.
- [42] P. Kovatcheva-Datchary, A. Nilsson, R. Akrami, Y.S. Lee, F. De Vadder, T. Arora, A. Hallen, E. Martens, I. Bjorck, F. Backhed, *Cell.Metab*. **2015**,22,971.
- [43] C. Guay, R. Regazzi, *Nat.Rev.Endocrinol*. **2013**,9,513.
- [44] B. Bayram, A. Gonzalez-Sarrias, G. Istas, M. Garcia-Aloy, C. Morand, K. Tuohy, R. Garcia-Villalba, P. Mena, *J.Agric.Food Chem*. **2018**,66,10686.
- [45] S. Rome, *Clin.Biochem*. **2013**,46,937.
- [46] S. Schreyer, D. Ledwig, I. Rakatzi, I. Kloting, J. Eckel, *Endocrinology*. **2003**,144,1211.

- [47] L. Zhou, H. Chen, P. Xu, L.N. Cong, S. Sciacchitano, Y. Li, D. Graham, A.R. Jacobs, S.I. Taylor, M.J. Quon, *Mol.Endocrinol.* **1999**,13,505.
- [48] Z. Shi, C. Zhao, X. Guo, H. Ding, Y. Cui, R. Shen, J. Liu, *Endocrinology.* **2014**,155,1982.
- [49] K. Ono, M. Igata, T. Kondo, S. Kitano, Y. Takaki, S. Hanatani, M. Sakaguchi, R. Goto, T. Senokuchi, J. Kawashima, N. Furukawa, H. Motoshima, E. Araki, *PLoS One.* **2018**,13,e0191553.
- [50] J.C. Henquin, *Diabetes.* **2000**,49,1751.
- [51] J. Song, Y. Ouyang, J. Che, X. Li, Y. Zhao, K. Yang, X. Zhao, Y. Chen, C. Fan, W. Yuan, *Front.Immunol.* **2017**,8,56.
- [52] C. Buechler, J. Wanninger, M. Neumeier, *FEBS Lett.* **2010**,584,4280.
- [53] F.J. Ortega, J.M. Mercader, J.M. Moreno-Navarrete, O. Rovira, E. Guerra, E. Esteve, G. Xifra, C. Martinez, W. Ricart, J. Rieusset, S. Rome, M. Karczewska-Kupczewska, M. Strackowski, J.M. Fernandez-Real, *Diabetes Care.* **2014**,37,1375.
- [54] V. Blasco-Baque, B. Coupe, A. Fabre, S. Handgraaf, P. Gourdy, J.F. Arnal, M. Courtney, C. Schuster-Klein, B. Guardiola, F. Terce, R. Burcelin, M. Serino, *Diabetologia.* **2017**,60,690.
- [55] S. Liu, A.P. da Cunha, R.M. Rezende, R. Cialic, Z. Wei, L. Bry, L.E. Comstock, R. Gandhi, H.L. Weiner, *Cell.Host Microbe.* **2016**,19,32.
- [56] G. Costabile, M. Vitale, D. Luongo, D. Naviglio, C. Vetrani, P. Ciciola, A. Tura, F. Castello, P. Mena, D. Del Rio, B. Capaldo, A.A. Rivellese, G. Riccardi, R. Giacco, *Clin.Nutr.* **2019**,38,2727.





**Manuscrito 3 / 3. Eskuizkribua**

**Asier Léniz<sup>1,2,3,4</sup>; Daniel Martínez-Maqueda<sup>5,6</sup>; Alfredo Fernández-Quintela<sup>2,3,4</sup>;  
Jara Pérez-Jiménez<sup>5</sup>; María P. Portillo<sup>2,3,4</sup>**

1 Araba Integrated Health Care Organization, Basque Health Service (Osakidetza), 01006 Vitoria-Gasteiz, Spain; asier.leniz@gmail.com

2 Bioaraba Health Research Institute, 01006 Vitoria-Gasteiz, Spain; mariapuy.portillo@ehu.eus

3 CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), 28222 Madrid, Spain

4 Nutrition and Obesity Group, Department of Pharmacy and Food Sciences, Faculty of Pharmacy and Lucio Lascaray Research Center, University of the Basque Country (UPV/EHU), 01008 Vitoria-Gasteiz, Spain

5 Department of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), José Antonio Novais 10, 28040 Madrid, Spain; d.martinez@outlook.es (D.M.-M.); jara.perez@ictan.csic.es (J.P.-J.)

6 Department of Agrifood Research, Madrid Institute for Rural, Agricultural and Food Research and Development (IMIDRA), A-2 Km. 38.2, 28805 Alcalá de Henares, Spain

**Potential Relationship between the Changes in Circulating microRNAs and the Improvement in Glycaemic Control Induced by Grape Pomace Supplementation**

Foods. 2021 Sep 1;10(9):2059

doi: 10.3390/foods10092059

**Abstract:** In a previous study we identified, through Next Generation Sequencing, several mi-croRNAs as potential biomarkers of response to grape pomace administration. We observed that subjects experiencing a beneficial effect on glycaemic control showed an increased expression of seven microRNAs compared to those who did not respond to grape pomace administration. In the present study we analyse the effects of the intervention on the expression of these miRNAs and their potential relationship with the observed positive effect on glycaemic control. For this purpose, 49 subjects with at least two factors of metabolic syndrome were divided into responders (n= 23) and non-responders (n= 26), depending on the variation rate in fasting insulin after supplementation with grape pomace for 6 weeks. MiRNAs expression at baseline and at the end of the treatment was analysed by RT-PCR and MiRecords Database was used to find potential target genes for the studied miRNAs. The increase observed in miR-23a in the whole cohort was present in both subgroups of participants. The increase in miR-181a was significant amongst non-responders but not within responders. The decrease in miR-30c and miR-222 was found in the responders, but not in the non-responders. No changes were observed in miR-10a, miR-151a, miR-181a and miR-let 7a. These results enable us to propose a potential involvement of the reduced expression of miR-30c and miR-222, two microRNAs associated with insulin resistance and diabetes, in the improvement of glycaemic control produced by grape pomace administration.

**Keywords:** grape pomace; insulin response; microbiota; miR-30c; miR-122

## **1. Introduction**

It has been estimated that almost 30% of our gene set is regulated by microRNAs (miRNAs), which are 18-22 nucleotides long non-coding RNAs [1]. They act post-transcriptionally, binding complementary sequences within mRNA in the 3' UTR region and altering protein expression. More than 1900 precursors and 2600 mature miRNAs have been identified in humans [2]. The miRNAs regulation network is rather complex because one miRNA can control the expression of various mRNA targets whereas a single mRNA can be regulated by several miRNAs [2].

MiRNAs present a tissue-specific distribution, reporting different miRNA expressions depending on the analysed organ [3]. However, obtaining tissue biopsies in humans aimed at studying the miRNA profile could be a difficult, often traumatic and non-practical process. Nan Hee Kim et al. compared the expression of several miRNAs with a divergence in their expression in visceral adipose tissue and blood from obese and non-obese subjects [4]. They observed that the existing differences in visceral fat between obese and non-obese subjects were also present in their blood. MiRNAs are considerably stable and can display a degree of resistance to RNase activity as well as to unfavourable physiological conditions such as high pH or temperature, exhibiting a higher stability compared to mRNA [5].

MiRNAs have been widely described as diagnostic and prognostic biomarkers for several pathologies. For example, circulating miR-208a could be a useful biomarker for the detection of an early myocardial injury in acute myocardial infarction in humans [6]. In like manner, circulating miR-122 might be regarded as a potential biomarker in monitoring the progression of histological changes in liver, for instance in the evolution of liver steatosis to steatohepatitis [7]. MiRNAs have also been identified as mediators in the reaction of a variety of drugs and compounds found in diets, such as polyphenols [8].

Taking all this into account, the aim of the present study was to analyse the effects of the intervention on the expression of these miRNAs and their relationship with the observed positive effect on glycaemic control.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1 Study subjects and experimental design*

This study is a randomized cross-over controlled clinical trial, carried out with permissions obtained from the Ethics Subcommittee of the Spanish National Research Council (CSIC), Madrid, Spain (2016/12/13), and the Ethics Committee for Clinical Research of the University Hospital Puerta de Hierro-Majadahonda, Majadahonda, Spain (2016/12/02). Written informed consent was obtained from all subjects before their enrolment in the study, which was registered in the Clinical Trials database (NCT03076463).

The study had a cross-over design, where 49 subjects were randomly assigned either to supplementation with grape pomace (GP) (suspended in water) or to the control (C) arm (since no valid placebo was found for this period, they followed their usual diet and had the same control as in the GP period). Each experimental period had a duration of 6 weeks, separated by a 4-week wash-out. At the beginning of the GP-treatment period, subjects received the doses for the six-week trial and were instructed to keep them frozen, as well as not to modify their dietary habits. Three days before each visit (at the beginning and at the end of each period) they had to follow a low polyphenol diet, for which specific instructions were provided. More details of the experimental design are described in a previous articles [9].

Grape pomace (GP) was obtained from *Vitis vinifera* L., cv Tempranillo freshly collected at the moment of wine devatting from Roquesan Wineries (Quemada, Burgos, Spain) It was then transported at  $-20^{\circ}\text{C}$ , freeze-dried, grounded to a particle size of 0.5 mm and sealed in monodoses (8 g), which were kept at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The product contained 6.2% of extractable polyphenols and a 23.4% of non-extractable polyphenols, mostly as high molecular weight proanthocyanidins and a very high content of insoluble dietary fibre (68.2%).

## *2.2 Sample collection and serum parameters*

Blood samples were collected at the beginning of each period following overnight fasting. Plasma was obtained after centrifugation at 1000g for 15 minutes. Plasma in-sulin was measured by using a commercial ELISA kit (Merck-Millipore, Burlington, MS, USA) and blood glucose was determined by applying the enzyme electrode method using a Free Style Optimum Neo blood glucose meter from Abbott (Chicago, IL, USA). HOMA-IR was calculated using the following formula:

$$\text{HOMA-IR} = \text{Fasting plasma insulin } (\mu\text{U/mL}) \times \text{fasting glycaemia (mg/d } \mu\text{U L})/405$$

At the end of the treatment, we observed that among participants, 23 were responder subjects and 26 were non-responders, based on a reduction in fasting insulin of at least 10% (responders) or lower (non-responders) [10]. This cut-off was established on the fact that fasting insulin has been defined as a predictor of type 2 diabetes independently of insulin resistance, so treatments allowing to cause its decrease at a level proven to be

statistically significant for subjects at high cardiometabolic risk, deserve detailed analysis [11,12].

### *2.3 Isolation of miRNAs, reverse transcription to cDNA and quantitative real-time PCR*

The present study focuses on the miRNAs that were differentially expressed in responders and non-responders in this cohort of subjects carried out in a previous NGS analysis: miR-30c, miR-23a, miR-222; miR-let7a; miR-151a and miR-181a, and miR-10a [10]. In the present study, the expression of these circulating mRNAs was measured both at the beginning and at the end of the experimental period.

Total miRNAs were extracted by using miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit, (Qiagen, Venlo, Limburg, The Netherlands). Total RNA containing miRNAs was diluted up to 20 µL with RNase-free water. MiRNAs (2 µL of the RNA solution) were re-verse-transcribed and pre-amplified using the TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

CFX96™–MyiQ™ Real-Time System (BioRad, Hercules, CA, USA) was used to detect and quantify individual miRNAs by RT-PCR. The reactions were carried out by means of a 20 second- incubation at 95°C followed by 40 cycles at 95°C for 3 seconds and 60°C for 30 seconds. All reactions were run in duplicate. The mRNA levels were normalized to the values of miRNA-191 (sequence miR-191-5p 5'- CAACGGAAUCCCAAAA-GCAGCUG-3'), and the results were expressed as fold changes of threshold cycle (Ct) value relative to controls using the 2-DDCt method [13].

The targeted miRNA assay sequences were as follows (source miRbase.org):

hsa-miR-30c-1-5p: 3'-UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC-5'

hsa-miR-23a-3p: 3'-AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC-5'

hsa-miR-222-3p: 3'-AGCUACAUCUGGCUACUGGGU-5'

hsa-miR-let7a-1: 3'-UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU-5'

hsa-miR-151a-5p: 3'-UCGAGGAGCUCACAGUCUAGU-5'

hsa-miR-181a-1-5p: 3'-AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU-5'

hsa-miR-10a-5p: 3'-UACCCUGUAGAUCCGAAUUUGUG-5'

#### *2.4 Search for miRNAs regulating target genes*

Predicted and validated target genes were identified using miRecords database. Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes (KEGG) database was utilised in order to identify the involvement of the predicted or validated target genes in metabolic pathways related to glycaemic control. In addition, a revision of the literature was carried out.

#### *2.5 Statistical analysis*

Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics 24.0. Normality of the data was tested using the Shapiro-Wilk test and homoscedasticity of variance with Levene's test. Comparisons between two paired samples were drawn using a paired Student's t test or Wilcoxon's signed rank test, as appropriate. Results are presented as mean values with their standard errors. The Pearson's or Spearman rho correlation co-efficients were used to assess correlations between miRNAs and relevant metabolic variables. In all cases, significance was set-up at P value < 0.05.

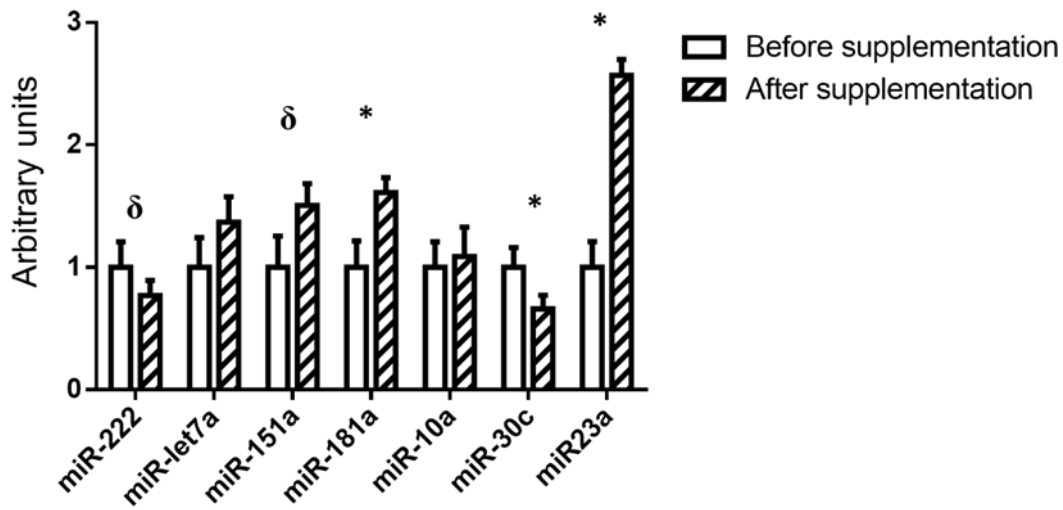
### **3. Results**

#### *3.1 Serum parameters*

As we previously reported in paper devoted to analysing the effects of grape pomace on gut microbiota in this precise cohort of volunteers, although the level of glucose remained unchanged, a strong reduction in insulin level was found in responder subjects (-40%), and as a consequence, HOMA-IR was also significantly reduced [14].

#### *3.2 miRNA expression*

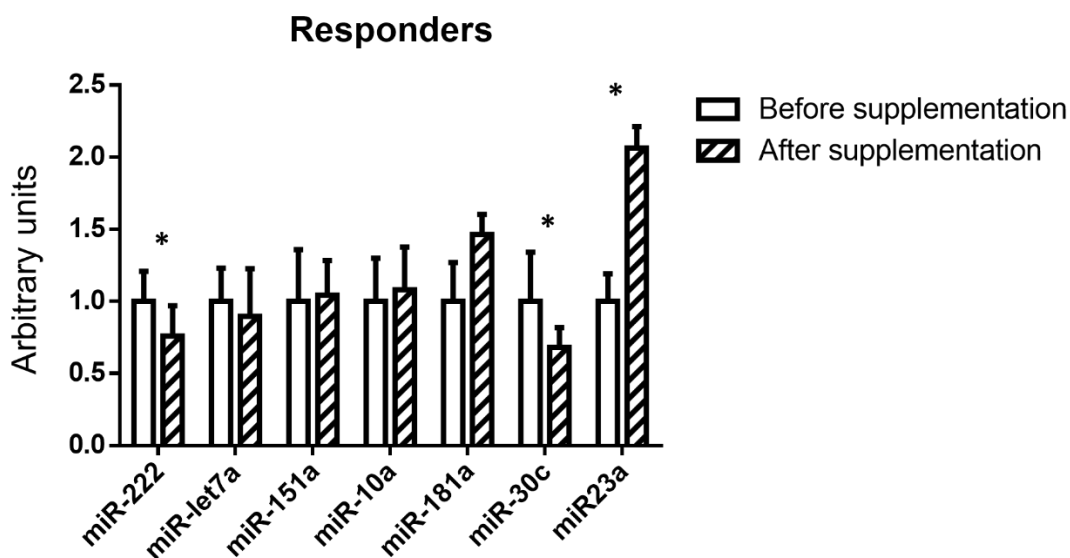
The expression of the 7 miRNAs selected, according to the results previously observed in this precise cohort (see Material and Methods section) are shown in Figure 1. Indeed, a significant increase was observed in miR-181 and miR-23a, and a significant decrease in miR-30c was revealed after grape pomace treatment in the whole cohort. Moreover, a tendency towards a lower value emerged in the expression of miR-222 and approaching a higher value in miR-151a.



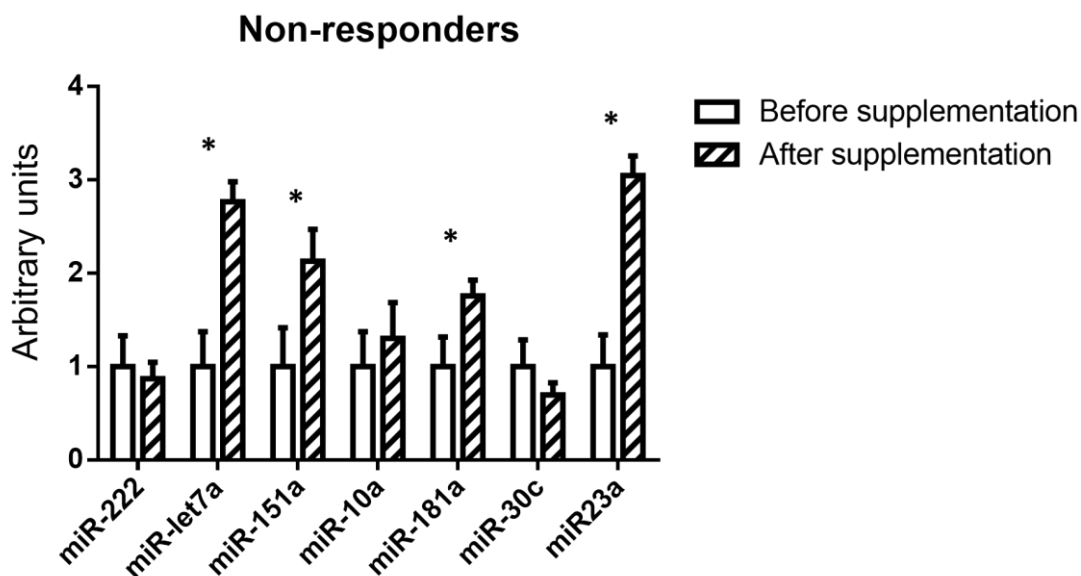
**Figure 1.** Relative miRNA expression before and after the supplementation with grape pomace. 2-DDCt method was used to calculate fold changes, relative to the expression before supplementation. Values are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean. Comparisons were carried out using paired Student's t test or Wilcoxon's signed rank test when required. \*P<0.05,  $\delta$  P<0.1.

Significant differences were described when comparing responders and non-responders. Thus, lower expression of miR-222 and miR-30c and higher expression of miR-23a were observed after the treatment in the responder subjects (Figure 2a). Regarding non-responders, miR-23a, miR-let7a, miR-181a and miR-151a displayed higher values after the supplementation with the grape pomace (Figure 2b).





2 (a)



2 (b)

**Figure 2:** Relative miRNA expression before and after supplementation stratified in responders (a) and non-responders (b), based on fasting insulin reduction after treatment.  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  method was used to calculate fold changes relative to the expression before supplementation. Values are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean.

miRNA	MiRecords Data Base	Validated target genes in the literature
hsa-mir-222	PKM,	IRS-1 [15]
hsa-let-7a	IGF2BP1, IGF2BP3, ADCY9, IRS2,	
hsa-mir-10a	-	GLUT1 [16]
hsa-mir-151a	-	
hsa-mir-181a-5p	IRS2, SIRT1, ACOT12;	
hsa-mir-23a-3p	PKM, PPARGC1A	
hsa-mir-30c-5p	PKM, TKT; PIK3R2, PRKAB2, SOCS1; SOCS3	

Comparisons were carried out using paired Student's t test or Wilcoxon's signed rank test when required. \*P<0.05,  $\delta$  P<0.1.

### 3.3 Target genes search

Search for target genes related to glycaemic control in miRecords database did not yield any validated target gene. The predicted target genes are shown in Table 1. In addition, we searched for target genes in the literature and we found that IRS-1 and GLUT1 were direct targets for miR-122 and miR-10a respectively.

**Table 1.** Predicted target genes according to MiRecords database and validated target genes found in the literature for the microRNAs analysed in the present study, which are related to glycaemic control.

PKM: pyruvate kinase, IRS-1 and IRS-2: insulin receptor substrate 1 and 2, IGF2BP1 and IGF2BP3: Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1 and 3, ADCY9: adenylate cyclase 9, GLUT1: glucose transporter 1, SIRT1: NAD-dependent deacetylase sirtuin-1, ACOT12: Acyl-CoA thioesterase 12, PKM: pyruvate kinase, PPARGC1A: peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha, TKT: transketolase, PIK3R2: phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 2, PRKAB2: protein kinase AMP-activated non-catalytic subunit beta 2, SOCS1 and SOCS3: suppressor of cytokine signalling 1 and 3.

### 3.2 Correlation analysis

Although, in the present paper the data concerning serum glucose and insulin are not presented because they were previously reported in other Journal, by using those data we have carried out a correlation analysis that revealed a negative correlation between miR-222 and glucose ( $r = -0.335$ ;  $P = 0.038$ ) and insulin ( $r = -0.310$ ;  $P = 0.050$ ) and between miR-30a and insulin ( $r = -0.35$ ;  $P = 0.044$ ) [9].

## 4. Discussion

Circulating miRNAs have been widely studied as potential biomarkers in diverse pathologies, including those related to glucose homeostasis due to their abundance and stability in several body fluids, including blood. In a previous study addressed in this cohort, we performed a Next Generation Sequencing (NGS) analysis of miRNA in order to find biomarkers of response to this dietary treatment [17,18]. We observed that subjects exhibiting a beneficial effect on glycaemic control (responders) after grape pomace administration displayed an increased expression of seven microRNAs compared with those who did not respond [10]. In the present study, we were interested in analysing the effect of grape pomace treatment on the expression of these miRNAs and the potential relationship with the beneficial effects on glycaemic control.

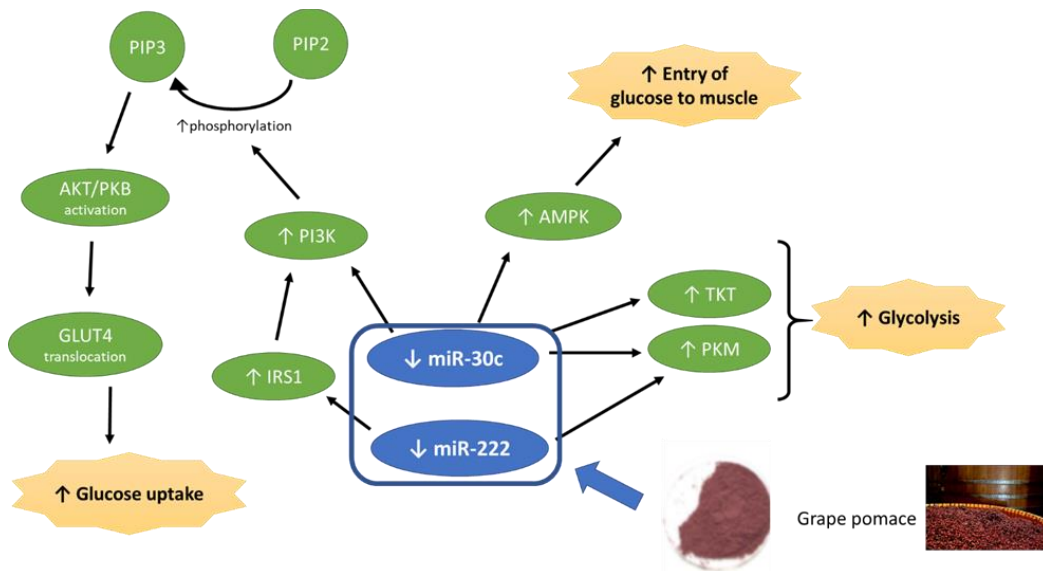
When we compared the expression of the selected miRNAs before and after grape pomace treatment in the whole cohort, among the seven miRNAs analysed, we observed significant changes in miR-23a, miR-30c and 181a, but not in miR-let-7a and miR-10a, as well as a trend to change in miR-222 and miR-151a. In consonance with the search for target genes in MiRecords database, no validated target genes were described for these miRNAs. In fact, as predicted, all of them had target genes involved in glycaemic control, with the exception of miR-151a (Table 1). By analysing the expression of these miRNAs in responders and non-responders individually, we found that the increase observed in miR-23a in the whole cohort was present in both subgroups of participants. The increase in miR-181a was significant amongst non-responders (76%) but not within responders (46%). The decrease in miR-30c and miR-222 was found in the responders, but not in the non-responders. The microRNA miR-23a was discarded as a mediator of the beneficial effects of grape pomace on the grounds that the effect of this dietary treatment on their expression was the same in both responders and non-responders. Moreover, miR-10a was

rejected by virtue of a lack of changes in the entire cohort. Lastly, miR-151a, miR-181a and miR-let 7a were discarded because the changes induced by grape pomace were only observed in non-responders. Based on these results, we decided to focus our discussion on miR-30a and miR-222.

Regarding miR-30c, increased expression has been reported in mice fed with a high-fat diet, which developed insulin resistance and obesity, two metabolic syndrome risk factors. In humans, miR-30c was up-regulated in ectosomes-enriched plasma of patients who suffered from type 2 diabetes [19,20]. Moreover, in women with gestational diabetes mellitus, miR-30c was significantly increased in cord blood, compared with the controls [21]. These results suggest that miR-30c is negatively related to glycaemic control since, in situations where glucose homeostasis is impaired, this miRNA increases. In our previous study, which employed the present cohort, it was established that responder subjects were those who showed a more altered glycaemic control. These subjects displayed a higher expression of miRNA 30c than non-responders. Consequently, this data is in good accordance with the reported literature. The treatment with grape pomace improved glycaemic control in these subjects and this effect was paralleled by a significant decrease in the expression of miR-30c, a change that was not observed in the subjects who did not respond to this treatment positively. These results support the negative role of miR-30c in glycaemic control, and show the potential role of this miRNA in the anti-diabetic effects of grape pomace. In order to gain more insight into this issue, we searched for the predicted target genes of this miRNA: PKM (pyruvate kinase), TKT, (transketolase), PIK3R2 (phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 2), PRKAB2 (protein kinase AMP-activated non-catalytic subunit beta 2), SOCS1 and SOCS3 (suppressor of cytokine signaling 1 and 3).

Pyruvate kinase protein is the enzyme that catalyzes the final step of glycolysis. It has been reported that, in subjects with disturbed glucose metabolism, glycolysis is significantly impaired when compared with subjects showing normal glucose metabolism. Indeed, diminished glycolysis has been directly implicated in specific cases of type 2 diabetes [22,23]. Moreover, it has been reported that transketolase deficiency decreases glycolysis [23]. Based on these facts, and considering that these two enzymes are miR-30c targets, it can be proposed that the improvement in insulin action induced by

grape pomace in responder subjects could be mediated by the aforementioned miRNA. Thus, the reduction in its expression induced by grape pomace treatment would lead to an increased expression of these proteins and consequently to increased glycolysis (Figure 3).



**Figure 3.** Effects of grape pomace on miR-30c and miR-222 and potential consequences in metabolic pathways involved in glycaemic control.

Another target of miR-30c is the regulatory subunit of phosphoinositide-3-kinase (PI3K), which phosphorylates phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate to generate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP3), which in turn, allows the recruitment of AKT1 to the membrane [24]. This enzyme plays a key role in glucose tolerance improvement by facilitating the effect of insulin. Protein kinase AMP-activated non-catalytic subunit beta 2 is a regulatory subunit of the AMP-activated protein kinase (AMPK), an enzyme which enables the entry of glucose into the muscle through an insulin-independent way [25]. In view of these facts, it can be proposed that, by means of the decrease in miR-30c, grape pomace could increment the expression of these two proteins, leading to increased glucose uptake through both insulin dependent and independent pathways (Figure 3).

With regard to mRNA expression of SOCS 1 and SOCS3, almost all insulin-sensitive tissues showed a strong up-regulation in rodent models of insulin resistance, revealing a robust and direct relationship between insulin resistance and SOCS [26-28]. Indeed, SOCS3 over-expression decreases the levels of IRS1 tyrosine phosphorylation and inhibits the phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) activity, a downstream signaling element of IRS1 [28,29]. Thus, SOCS3 is critical for the inhibition of the insulin-signaling pathway. These results suggest that the suppression of SOCS3 is beneficial for the activation of insulin signaling.

It has been established in the present study that the reduction in mir-30c may lead to an increase in SOCS3, an effect that can be considered as negative. In spite of this potential effect, glycaemic control was improved in responder subjects. Based on this assumption, two hypotheses can be proposed. On the one hand, the potential activation of IRS-1 via miR-222 could be higher than the probable inhibition induced by SOCS3 via miR-30a. On the other hand, it has been reported that resveratrol, a polyphenol present in grapes, reduces SOCS3 protein expression [30,31]. Hence, it could be hypothesised that this effect may counteract the potential increment induced by decreased miR-30c expression in responders.

The relationship between miR-222 and glycaemic control has been well documented in the literature. Its over-expression can produce glucose intolerance in animal models, due to an impaired insulin production and secretion from pancreatic  $\beta$ -cells [32]. In a study carried out by Li et al (2020), it was stated that miR-122 expression was significantly elevated in serum, serum exosomes and gonadal white adipose tissue of mice fed with a high-fat diet. Accordingly, there was a corresponding down-regulation of IRS1 and phospho-AKT levels in their liver and skeletal muscle tissues, which correlated with impaired insulin sensitivity and glucose intolerance [33]. In like manner, miR-222 has been shown to be up-regulated in type 2 diabetic subjects as well as in pre-diabetic ones [34,35]. In 2017, Vivacqua et al. published a review where the up-regulation of miR-122 in insulin resistance was highlighted [36]. In the present study, the expression of this miRNA was reduced in responder subjects after treatment with grape pomace, which is rich in proanthocyanidins. This result is in good accordance with that reported by Castell-Auví et al., (2013) who showed the down-regulation of miR-222 in rats treated for 45

days with 25 mg of procyanidins per kg of body weight per day [37]. According to the search in miRecords Data Base, miR-222 and miR-30c share PKM as potential target gene and thus it may play a role in a possible increase in glycolysis induced by grape pomace (Figure 3).

As described in the Material and Methods section, in addition to the search in MiRecords data Base, we searched for target genes in the literature and we found that Ono et al. demonstrated that both mouse and human IRS-1 mRNAs are indeed direct targets of miR-222 [15]. Based on this result, an increase in IRS-1 protein expression leading to improved insulin action may be proposed as one of the mechanisms of action to explain the beneficial effect of grape pomace.

The present shows some limitations. The size of the group is relatively small, which calls for further validation in larger samples. Moreover, the actual effects of the changes observed in miRNAs expression on genes could not be experimentally analysed on the grounds that we had no tissue biopsies for this cohort, so we utilised samples of plasma, which were better accessible. For the same reason, miRNAs were measured in plasma instead of in tissues. Nevertheless, a positive correlation between miRNAs in plasma and other biological fluids, such as urine and bile, and tissue miRNAs has been demonstrated in healthy humans [38].

In conclusion, the present study shows that miR-30c and miR-222, two microRNAs associated with insulin resistance and diabetes, may have a pivotal role in the improvement of glycaemic control induced by grape pomace supplementation, and thus could be suggested as potential biomarkers of its efficacy. In order to check this proposal, further studies in animal models and cell cultures are needed.

**Acknowledgments:** Roquesan Wineries is acknowledged for providing the raw materials for the dietary supplements. Prof. Fulgencio Saura-Calixto is acknowledged for his advice in the design of the dietary supplement and the clinical trial. The authors are grateful to all volunteers for their participation in the study

**References**

1. Lewis, B.P.; Burge, C.B.; Bartel, D.P. Conserved Seed Pairing, often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are microRNA Targets. *Cell* **2005**, *120*, 15-20. doi: 10.1016/j.cell.2004.12.035
2. Alles, J.; Fehlmann, T.; Fischer, U.; Backes, C.; Galata, V.; Minet, M.; Hart, M.; Abu-Halima, M.; Grässer, F.A.; Lenhof, H.P. *et al.* An Estimate of the Total Number of True Human miRNAs. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, 3353-3364. doi: 10.1093/nar/gkz097
3. Ludwig, N.; Leidinger, P.; Becker, K.; Backes, C.; Fehlmann, T.; Pallasch, C.; Rheinheimer, S.; Meder, B.; Stähler, C.; Meese, E. *et al.* Distribution of miRNA Expression Across Human Tissues. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 3865-3877. doi: 10.1093/nar/gkw116
4. Kim, N.H.; Ahn, J.; Choi, Y.M.; Son, H.J.; Choi, W.H.; Cho, H.J.; Yu, J.H.; Seo, J.A.; Jang, Y.J.; Jung, C.H. *et al.* Differential Circulating and Visceral Fat microRNA Expression of Non-Obese and Obese Subjects. *Clin. Nutr.* **2020**, *39*, 910-916. doi: 10.1016/j.clnu.2019.03.033
5. Chen, X.; Ba, Y.; Ma, L.; Cai, X.; Yin, Y.; Wang, K.; Guo, J.; Zhang, Y.; Chen, J.; Guo, X. *et al.* Characterization of microRNAs in Serum: A Novel Class of Biomarkers for Diagnosis of Cancer and Other Diseases. *Cell Res.* **2008**, *18*, 997-1006. doi: 10.1038/cr.2008.282
6. Wang, G.K.; Zhu, J.Q.; Zhang, J.T.; Li, Q.; Li, Y.; He, J.; Qin, Y.W.; Jing, Q. Circulating microRNA: A Novel Potential Biomarker for Early Diagnosis of Acute Myocardial Infarction in Humans. *Eur. Heart J.* **2010**, *31*, 659-666. doi: 10.1093/eurheartj/ehq013
7. Pirola, C.J.; Fernández Gianotti, T.; Castaño, G.O.; Mallardi, P.; San Martino, J.; Mora Gonzalez Lopez Ledesma, M.; Flichman, D.; Mirshahi, F.; Sanyal, A.J.; Sookoian, S. Circulating microRNA Signature in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: From Serum Non-Coding RNAs to Liver Histology and Disease Pathogenesis. *Gut* **2015**, *64*, 800-812. doi: 10.1136/gutjnl-2014-306996
8. Cione, E.; La Torre, C.; Cannataro, R.; Caroleo, M.C.; Plastina, P.; Gallelli, L. Quercetin, Epigallocatechin Gallate, Curcumin, and Resveratrol: From Dietary



- Sources to Human MicroRNA Modulation. *Molecules* **2019**, *25*, 63. doi: 10.3390/molecules25010063. doi: 10.3390/molecules25010063
9. Martinez-Maqueda, D.; Zapatera, B.; Gallego-Narbon, A.; Vaquero, M.P.; Saura-Calixto, F.; Perez-Jimenez, J. A 6-Week Supplementation with Grape Pomace to Subjects at Cardiometabolic Risk Ameliorates Insulin Sensitivity, without Affecting Other Metabolic Syndrome Markers. *Food Funct.* **2018**, *9*, 6010-6019. doi: 10.1039/c8fo01323c
  10. Ramos-Romero, S.; Léniz, A.; Martínez-Maqueda, D.; Amézqueta, S.; Fernández-Quintela, A.; Hereu, M.; Torres, J.L.; Portillo, M.P.; Pérez-Jiménez, J. Inter-Individual Variability in Insulin Response After Grape Pomace Supplementation in Subjects at High Cardiometabolic Risk: Role of Microbiota and miRNA. *Mol. Nutr. Food Res.* **2021**, *65*, e2000113. doi: 10.1002/mnfr.202000113
  11. Weyer, C.; Hanson, R.L.; Tataranni, P.A.; Bogardus, C.; Pratley, R.E. A High Fasting Plasma Insulin Concentration Predicts Type 2 Diabetes Independent of Insulin Resistance: Evidence for a Pathogenic Role of Relative Hyperinsulinemia. *Diabetes* **2000**, *49*, 2094-2101. doi: 10.2337/diabetes.49.12.2094
  12. Bogdanski, P.; Suliburska, J.; Szulinska, M.; Stepień, M.; Pupek-Musialik, D.; Jablecka, A. Green Tea Extract Reduces Blood Pressure, Inflammatory Biomarkers, and Oxidative Stress and Improves Parameters Associated with Insulin Resistance in Obese, Hypertensive Patients. *Nutr. Res.* **2012**, *32*, 421-427. doi: 10.1016/j.nutres.2012.05.007
  13. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data using Real-Time Quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* **2001**, *25*, 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
  14. Ramos-Romero, S.; Martínez-Maqueda, D.; Hereu, M.; Amézqueta, S.; Torres, J.L.; Pérez-Jiménez, J. Modifications of Gut Microbiota After Grape Pomace Supplementation in Subjects at Cardiometabolic Risk: A Randomized Cross-Over Controlled Clinical Trial. *Foods* **2020**, *9*, 1279. doi: 10.3390/foods9091279.
  15. Ono, K.; Igata, M.; Kondo, T.; Kitano, S.; Takaki, Y.; Hanatani, S.; Sakaguchi, M.; Goto, R.; Senokuchi, T.; Kawashima, J. *et al.* Identification of microRNA that Represses IRS-1 Expression in Liver. *PLoS One* **2018**, *13*, e0191553. doi: 10.1371/journal.pone.0191553

16. Chen, Y.H.; Song, Y.; Yu, Y.L.; Cheng, W.; Tong, X. miRNA-10a Promotes Cancer Cell Proliferation in Oral Squamous Cell Carcinoma by Upregulating GLUT1 and Promoting Glucose Metabolism. *Oncol. Lett.* **2019**, *17*, 5441-5446. doi: 10.3892/ol.2019.10257
17. Weber, J.A.; Baxter, D.H.; Zhang, S.; Huang, D.Y.; Huang, K.H.; Lee, M.J.; Galas, D.J.; Wang, K. The microRNA Spectrum in 12 Body Fluids. *Clin. Chem.* **2010**, *56*, 1733-1741. doi: 10.1373/clinchem.2010.147405
18. Pordzik, J.; Jakubik, D.; Jarosz-Popek, J.; Wicik, Z.; Eyileten, C.; De Rosa, S.; Indolfi, C.; Siller-Matula, J.M.; Czajka, P.; Postula, M. Significance of Circulating microRNAs in Diabetes Mellitus Type 2 and Platelet Reactivity: Bioinformatic Analysis and Review. *Cardiovasc. Diabetol.* **2019**, *18*, 113-019-0918-x. doi: 10.1186/s12933-019-0918-x
19. Miranda, K.; Yang, X.; Bam, M.; Murphy, E.A.; Nagarkatti, P.S.; Nagarkatti, M. MicroRNA-30 Modulates Metabolic Inflammation by Regulating Notch Signaling in Adipose Tissue Macrophages. *Int. J. Obes. (Lond)* **2018**, *42*, 1140-1150. doi: 10.1038/s41366-018-0114-1
20. Stępień, E.Ł.; Durak-Kozica, M.; Kamińska, A.; Targosz-Korecka, M.; Libera, M.; Tylko, G.; Opalińska, A.; Kapusta, M.; Solnica, B.; Georgescu, A. *et al.* Circulating Ectosomes: Determination of Angiogenic microRNAs in Type 2 Diabetes. *Theranostics* **2018**, *8*, 3874-3890. doi: 10.7150/thno.23334
21. Tryggestad, J.B.; Vishwanath, A.; Jiang, S.; Mallappa, A.; Teague, A.M.; Takahashi, Y.; Thompson, D.M.; Chernausk, S.D. Influence of Gestational Diabetes Mellitus on Human Umbilical Vein Endothelial Cell miRNA. *Clin. Sci. (Lond)* **2016**, *130*, 1955-1967.
22. Henquin, J.C. Triggering and Amplifying Pathways of Regulation of Insulin Secretion by Glucose. *Diabetes* **2000**, *49*, 1751-1760. doi: 10.2337/diabetes.49.11.1751
23. Tian, N.; Liu, Q.; Li, Y.; Tong, L.; Lu, Y.; Zhu, Y.; Zhang, P.; Chen, H.; Hu, L.; Meng, J. *et al.* Transketolase Deficiency in Adipose Tissues Protects Mice from Diet-Induced Obesity by Promoting Lipolysis. *Diabetes* **2020**, *69*, 1355-1367. doi: 10.2337/db19-1087

24. Cui, L.; Yu, M.; Cui, X. MiR-30c-5p/ROCK2 Axis Regulates Cell Proliferation, Apoptosis and EMT Via the PI3K/AKT Signaling Pathway in HG-Induced HK-2 Cells. *Open Life Sciences* **2020**, *15*, 959-970. doi: 10.1515/biol-2020-0089
25. Dasgupta, B.; Ju, J.S.; Sasaki, Y.; Liu, X.; Jung, S.R.; Higashida, K.; Lindquist, D.; Milbrandt, J. The AMPK B2 Subunit is Required for Energy Homeostasis during Metabolic Stress. *Mol. Cell. Biol.* **2012**, *32*, 2837-2848. doi: 10.1128/MCB.05853-11
26. Emanuelli, B.; Peraldi, P.; Filloux, C.; Chavey, C.; Freidinger, K.; Hilton, D.J.; Hotamisligil, G.S.; Van Obberghen, E. SOCS-3 Inhibits Insulin Signaling and is Up-Regulated in Response to Tumor Necrosis Factor-Alpha in the Adipose Tissue of Obese Mice. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 47944-47949. 10.1074/jbc.M104602200
27. Ueki, K.; Kondo, T.; Tseng, Y.H.; Kahn, C.R. Central Role of Suppressors of Cytokine Signaling Proteins in Hepatic Steatosis, Insulin Resistance, and the Metabolic Syndrome in the Mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 10422-10427. doi: 10.1073/pnas.0402511101
28. Ueki, K.; Kondo, T.; Kahn, C.R. Suppressor of Cytokine Signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 Cause Insulin Resistance through Inhibition of Tyrosine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate Proteins by Discrete Mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 5434-5446. doi: 10.1128/MCB.24.12.5434-5446.2004
29. Yang, Z.; Hulver, M.; McMillan, R.P.; Cai, L.; Kershaw, E.E.; Yu, L.; Xue, B.; Shi, H. Regulation of Insulin and Leptin Signaling by Muscle Suppressor of Cytokine Signaling 3 (SOCS3). *PLoS One* **2012**, *7*, e47493. doi: 10.1371/journal.pone.0047493
30. Ghanim, H.; Sia, C.L.; Korzeniewski, K.; Lohano, T.; Abuaysheh, S.; Marumganti, A.; Chaudhuri, A.; Dandona, P. A Resveratrol and Polyphenol Preparation Suppresses Oxidative and Inflammatory Stress Response to a High-Fat, High-Carbohydrate Meal. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2011**, *96*, 1409-1414. doi: 10.1210/jc.2010-1812
31. Abd El-Haleim, E.A.; Bahgat, A.K.; Saleh, S. Resveratrol and Fenofibrate Ameliorate Fructose-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis by Modulation of Genes Expression. *World J. Gastroenterol.* **2016**, *22*, 2931-2948. doi: 10.3748/wjg.v22.i10.2931

32. Fan, L.; Shan, A.; Su, Y.; Cheng, Y.; Ji, H.; Yang, Q.; Lei, Y.; Liu, B.; Wang, W.; Ning, G. *et al.* MiR-221/222 Inhibit Insulin Production of Pancreatic B-Cells in Mice. *Endocrinology* **2020**, *161*, bqz027. doi: 10.1210/endo/bqz027.
33. Li, D.; Song, H.; Shuo, L.; Wang, L.; Xie, P.; Li, W.; Liu, J.; Tong, Y.; Zhang, C.Y.; Jiang, X. *et al.* Gonadal White Adipose Tissue-Derived Exosomal MiR-222 Promotes Obesity-Associated Insulin Resistance. *Aging (Albany NY)* **2020**, *12*, 22719-22743. doi: 10.18632/aging.103891
34. Sadeghzadeh, S.; Dehghani Ashkezari, M.; Seifati, S.M.; Vahidi Mehrjardi, M.Y.; Dehghan Tezerjani, M.; Sadeghzadeh, S.; Ladan, S.A.B. Circulating miR-15a and miR-222 as Potential Biomarkers of Type 2 Diabetes. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* **2020**, *13*, 3461-3469. doi: 10.2147/DMSO.S263883
35. Ortega, F.J.; Mercader, J.M.; Moreno-Navarrete, J.M.; Rovira, O.; Guerra, E.; Esteve, E.; Xifra, G.; Martinez, C.; Ricart, W.; Rieusset, J. *et al.* Profiling of Circulating microRNAs Reveals Common microRNAs Linked to Type 2 Diabetes that Change with Insulin Sensitization. *Diabetes Care* **2014**, *37*, 1375-1383. doi: 10.2337/dc13-1847
36. Vivacqua, A.; De Marco, P.; Belfiore, A.; Maggiolini, M. Recent Advances on the Role of microRNAs in both Insulin Resistance and Cancer. *Curr. Pharm. Des.* **2017**, *23*, 3658-3666. doi: 10.2174/1381612823666170622105123
37. Castell-Auví, A.; Cedó, L.; Movassat, J.; Portha, B.; Sánchez-Cabo, F.; Pallarès, V.; Blay, M.; Pinent, M.; Ardévol, A. Procyanidins Modulate microRNA Expression in Pancreatic Islets. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 355-363. doi: 10.1021/jf303972f
38. Cui, C.; Cui, Q. The Relationship of Human Tissue microRNAs with those from Body Fluids. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 5644-020-62534-6. doi: 10.1038/s41598-020-62534-6

**Manuscrito 4 / 4. Eskuizkribua**

**A. Léniz<sup>1,2</sup>; M. P. Portillo<sup>1,3,4</sup>; Alfredo Fernández-Quintela<sup>1,3,4</sup>; M. T. Macarulla<sup>1,3,4</sup>; A. Sarasua-Miranda<sup>5</sup>; M. del Hoyo<sup>5</sup>; I. Díez-López<sup>5</sup>**

1 Nutrition and Obesity Group, University of the Basque Country (UPV/EHU) and Lucio Lascaray Research Institute, Vitoria, Spain

2 Araba Integrated Health Care Organization, Basque Health Service (Osakidetza), Vitoria, Spain

3 CIBERObn Physiopathology of Obesity and Nutrition, Institute of Health Carlos III, Vitoria, Spain

4 Department Nutrition and Food Sciences, University of the Basque Country, Paseo de la Universidad, 7, 01006, Vitoria, Spain

5 Pediatric Endocrinology Unit, HU Araba Vitoria. Department of Pediatric, University of the Basque Country (UPV/EHU), Leioa, Spain

**Has the adipokine profile an influence on the catch-up growth type in small for gestational age infants?**

J Physiol Biochem. 2019 Aug;75(3):311-319

doi: 10.1007/s13105-019-00684-6

**Abstract:**

Infants born small for gestational age (SGA) are at increased risk of perinatal morbidity, persistent short stature, and metabolic alterations in later life. Moreover, the post-natal growth pattern of SGA infants may be an important contributor to health outcomes later in life, which can be influenced by adipokines. The aims of this study were to compare plasma adipokine profiles (leptin, adiponectin, vaspin, chemerin, and nephroblastoma overexpressed (NOV)) among SGA newborns aged 3 months, with low, normal or high catch-up, to search for potential differences between males and females and to analyze the evolution of several adipokines in plasma from SGA newborns between 3 and 24 months. This prospective, longitudinal study was addressed in SGA Caucasian subjects at Hospital Universitario de Álava-Txagorritxu. We observed that infants with fast catch-up showed significantly lower birth weight than the other two groups. As far as adipokines are concerned, they could have an influence on catch-up type because differences among the three experimental groups were found. It may be proposed that health prognoses in infants with slow and fast catch-up are opposite, not only in adulthood but also during their first months. Finally, adipokine evolution patterns during the first 24 months of age differ, depending on the adipokine, and 24 month-old males show lower levels of leptin, adiponectin and omentin than females.

**Keywords:** SGA; catch-up; leptin; adiponectin; omentin; chemerin; vaspin; NOV

## **Introduction**

Small for gestational age (SGA) status is characterized by a small birth length and/or birth weight with respect to reference curves, and can be induced by a wide variety of factors, such as poor nutrition, chronic disease and infections, as well as potential environmental toxins (e.g., smoking and alcohol consumption) in the mother [1-3]. SGA infants are at increased risk of perinatal morbidity, persistent short stature, and metabolic alterations, such as dyslipidemia, type 2 diabetes, insulin-resistance, obesity or arterial hypertension, in adulthood. Usually, from 6 months to 24 months after birth, catch-up growth occurs in a spontaneous way and 85% of SGA children have reached normal weight by the age of 24 months [4]. Although metabolic syndrome could be developed even with catch-up growth, improvements in the immune system and neurodevelopment, as well as normal adult height, have been demonstrated in this situation [5].

A key factor that has been shown to have a direct relationship with catch-up growth in SGA children is the level of circulating adipokines. These molecules are defined as cell signaling proteins secreted by adipose tissue, which nowadays are known to have a clear endocrine function [6]. They act on several regulation processes, such as bone formation, immune system or overall metabolism. Interestingly, some adipokines act like a signal to the central nervous system, contributing to subject adaptation in the first years of life through modification of energy resource management. All these changes are shown to be strongly associated with the length and weight, thus acting on the catch up of the newborn [7].

One of the most frequently studied adipokines is leptin, which is associated with hepatic insulin sensitivity, through its role in energy homeostasis, as well as acting in tissues such as liver or pancreatic cells [8]. Another well-known adipokine is adiponectin, which is down-regulated in obese subjects, being inversely correlated with body mass index (BMI) [9]. It plays an important role in glucose homeostasis[10]. Regarding the SGA population, studies in pre-pubertal children have shown that low adiponectin serum levels can interfere with insulin sensitivity and can also promote a pathogenic lipid profile [11].

In addition, there are more recently discovered adipokines that have not been studied in depth to date, especially in terms of their relationship with the SGA children`s growth.

One example is chemerin, whose circulating concentration has been related to higher BMI values and development of metabolic syndrome [12, 13]. In cord blood, this adipokine is associated with birth weight and fetal growth, underlining its importance in processes like myogenesis, adipogenesis or energy balance [14]. Another relevant molecule is vaspin, which has beneficial effects on obesity and the low-grade inflammation associated. In addition, it could protect against the development of insulin resistance and metabolic syndrome and is also able to reduce food intake [15, 16]. An experiment with cord blood did not find an association between vaspin and birth weight in SGA children [17]. Omentin is mainly expressed in visceral adipose tissue and it mediates glucose uptake by adipocytes, being inversely proportional to insulin resistance and other risk factors associated with obesity [18]. Taking into account that SGA patients can develop metabolic syndrome, another relevant newly discovered adipokine is nephroblastoma overexpressed (NOV-CCN3). Plasma concentrations of this molecule are associated with fat mass and BMI. Influence of this adipokine on obesity-mediated inflammation has been suggested [19].

The first aim of this study was to compare plasma adipokine profiles (leptin, adiponectin, vaspin, chemerin, and NOV) at 3 months old among SGA newborns with slow, normal or fast catch-up. Another aim was to look for potential differences between males and females. Finally, the evolution of several adipokines in plasma from SGA newborns from 3 months to 24 months was analyzed.

## **Materials and Methods**

### ***Subjects***

This prospective, longitudinal study addressed 27 SGA caucasian subjects with gestational ages ranging from 33 to 41 weeks, birth weights ranging from 1100 to 2660 grams and birth lengths ranging from 37 to 53 centimeters. All births took place at Hospital Universitario de Álava-Txagorritxu (HUA) in the period June 2013-March 2015. The selected subjects were infants defined as SGA at birth, that is having birth weight or birth length below 2 standard deviations (SD) of the Spanish standard birth weight/length curves [20]. Exclusion criteria were non-caucasian children, children from multiple pregnancies, evidence of malformations or children with severe genetic malformations or children who had died during the first 24 hours of life. The mothers of the infants enrolled



confirmed the normal course of the pregnancy, without any drug administration or pregnancy complications.

Gestational age was measured by dating the last menstrual period at the time of registration. Birth weight and birth length were obtained immediately after delivery using a standard electrical scale and an infantometer. Visits at 3, 12 and 24 months were scheduled. Information concerning breast feeding or formula feeding was recorded. The protocol was approved by the Maternal Hospital Universitario de Álava (HUA) Ethical Committee (Ref. 2012-050) and all parents were provided with a written informed consent.

The distribution of children in the three types of catch-up was made according to the weight or length increase at visit 2 (12 months) compared with delivery: slow catch-up  $\Delta < 0.49$  SD, normal catch-up  $\Delta 0.5-1$  SD, and fast catch-up  $\Delta > 1$  SD.

#### ***Blood sample collection and adipokine assays***

Newborn blood was obtained at three months of age by using EDTA tubes, plasma was obtained by centrifugation of blood at 1250 g for 20 minutes and was immediately frozen and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until further analysis.

The levels of glucose, insulin, total cholesterol, low density lipoprotein cholesterol (LDL-c), high density lipoprotein cholesterol (HDL-c), triglycerides (TG), insulin-like growth factor 1 (IGF-1), insulin-like growth factor-binding protein 3 (IGF-BP3), cortisol, C reactive protein (CRP), thyroid-stimulating hormone (TSH) and thyroxine (T4) in plasma were measured using an automated Roche Autoanalyser system (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) in routine chemistry workflow of the diagnostics. Insulin resistance was estimated from fasting values as homeostatic model assessment (HOMA-IR) using the approximated equation of Matthews *et al.* [21].

Adipokine concentrations were measured by using the following commercial human ELISA kits: RD191001100 (BioVendor, Brno, Czech Republic) for leptin, RD195023100 (BioVendor, Brno, Czech Republic) for adiponectin, RD191100200R (BioVendor, Brno, Czech Republic) for omentin, (Abcam, Cambridge, UK) for chemerin ab155430, RD191097200R (BioVendor, Brno, Czech Republic) for vaspin, and ab193710 (Abcam, Cambridge, UK) for NOV.

### *Statistical analysis*

Normality of the data was tested using the Shapiro-Wilk test. Data are presented as mean  $\pm$  SD. Comparison between 2 paired samples was conducted with a paired Student *t* test or a Wilcoxon signed ranks test, and comparison between unrelated variables was conducted with a Student's *t* test or a Mann-Whitney's U test, as appropriate. Qualitative variables, such as breastfeeding and catch-up growth type, were compared using Pearson's  $\chi^2$  test. Statistical significance was set-up at two-tailed  $P < 0.05$ . Statistical analysis was performed using IBM SPSS statistics v22.

### **Results**

#### *Study population profile*

The three experimental groups did not show significant differences in maternal age, mother's BMI, gestational age, parity and feeding method. With regard to newborns, those with fast catch-up showed significantly lower birth weights than the other two groups. No differences were observed in birth length. Moreover, head circumference was higher in the normal catch-up group than in the other two experimental groups (Table 1).

**Table 1.** Demographic data and baseline anthropometric parameters of the subjects involved in the study, distributed according to their catch-up type.

	Slow catch-up (n = 11)	Normal catch-up (n = 9)	Fast catch-up (n = 7)
Gender (male/female)	5/6	6/3	3/4
Gestational age (weeks)	36 (3)	38 (1)	35 (3)
Birth weight (g)	1903 (485)	2300 (297) <sup>++</sup>	1606 (463)
Birth length (cm)	43.3 (3.8)	46.8 (3.5)	42.1 (3.7)
Weight at 3 months (g)	4482 (610)	5234 (507) <sup>§§</sup>	4761 (588)
Length at 3 months (cm)	55.2 (3.2)	57.3 (1.6)	55.5 (1.7)
Weight at 12 months (kg)	7.69 (0.50)	8.54 (0.45) <sup>§§</sup>	8.63 (1.21)
Length at 12 months (cm)	70.5 (1.8)	72.5 (2.0) <sup>§-***</sup>	73.4 (2.2)
Weight at 18 months (kg)	9.15 (0.83)	9.91 (0.42) <sup>§</sup>	9.91 (0.42)
Length at 18 months (cm)	77.5 (1.7)	79.5 (1.6) <sup>§-*</sup>	80.1 (2.6)
Weight at 24 months (kg)	10.24 (0.86)	10.94 (0.45) <sup>§</sup>	10.45 (0.44)
Length at 24 months (cm)	83.8 (2.3)	85.1 (1.9)	85.1 (3.0)
Weight at 4 years (kg)	14.51 (2.17)	14.87 (0.93)	15.59 (2.13)
Length at 4 years (cm)	98.6 (4.3)	100.1 (3.8)	102.0 (4.2)
ΔBMI	- 0.50 (0.70)	- 0.69 (0.25)	- 0.61 (0.45)
Head circumference (cm)	30.6 (2.2)	32.8 (1.0) <sup>§§-***</sup>	29.2 (1.2)
Brachial perimeter (cm)	11.2 (0.9)	10.6 (0.9)	10.3 (0.9)
Abdominal perimeter (cm)	34.1 (2.0)	34.1 (2.0)	33.5 (3.1)
Maternal age (years)	35.6 (3.1)	35.7 (3.3)	31.3 (4.1)
Mother's BMI	25.5 (6.0)	21.8 (2.3)	26.9 (7.5)
Breastfeeding (yes/no)	5/6	5/4	3/4

Mann-Whitney`s U/ Student`s t test used according to the distribution

§: Slow vs normal. §§ P <0.01

\*: Normal vs fast. \*\* P <0.01

***Adipokine profile in the three catch-up groups at 3 months***

As shown in Table 2, infants from slow catch-up group, at 3 months, showed lower concentrations of circulating leptin and vaspin and higher levels of adiponectin, chemerin and omentin, when compared with normal catch-up group. By contrast, no significant differences were observed between normal and fast catch-up groups.

**Table 2.** Plasma adipokine concentrations in SGA infants with slow, normal and fast catch-up growth at 3 months of age.

	Slow catch-up (n=11)	Normal catch-up (n=9)	Fast catch-up (n=7)
Leptin (ng/mL)	3.41 (1.15) <sup>§§</sup>	5.77 (2.69)	4.52 (3.19)
Adiponectin (µg/mL)	81.96 (42.27)*	56.61 (36.78)	31.51 (13.62)

Omentin (ng/mL)	434.98 (117.37) <sup>§§,**</sup>	312.80 (113.81)	305.95 (81.77)
Chemerin (ng/mL)	207.78 (35.46) <sup>§§</sup>	191.00 (19.68)	201.03 (22.06)
Vaspin (ng/mL)	0.14 (0.07) <sup>§</sup>	0.20 (0.10)	0.17 (0.07)
NOV (ng/mL)	141.77 (45.70) <sup>*</sup>	114.93 (18.54)	91.11 (20.06)

Mann-Whitney`s U/ Student`s t test were used according to the distribution.

§: Slow vs normal. §  $P < 0.05$ ; §§  $P < 0.01$

\*: Slow vs fast. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$

***Plasma biochemical parameters in the three catch-up groups at 12 months***

Table 3 summarizes plasma biochemical parameters of the three catch-up groups at 12 months. Infants in the slow catch-up group presented higher concentrations of insulin than infants with normal catch-up, without changes in glucose concentrations. Consequently, HOMA-IR values were also higher. No differences were found in the rest of the biochemical parameters measured. Similarly, no differences were found between infants with normal and fast catch-up.

**Table 3.** Plasma biochemical parameters at 12 months.

	Slow catch-up (n=11)	Normal catch-up (n=9)	Fast catch-up (n=7)
Glucose (mg/dL)	78 (7)	80(9)	82(9)
Insulin ( $\mu$ U/mL)	3.5(1.3) <sup>§</sup>	1.6(0.8)	1.8(1.3)
HOMA-IR	0.69(0.31) <sup>§</sup>	0.33(0.21)	0.39(0.32)
Cholesterol (mg/dL)	164(35)	158(28)	151(38)
LDL-c (mg/dL)	89 (49)	103(22)	83(41)
HDL-c (mg/dL)	51(13)	40(14)	46(20)
TG (mg/dL)	104 (28)	89(36)	109(52)
IGF-1 (ng/mL)	34(6)	43(19)	51(27)
IGF-BP <sub>3</sub> ( $\mu$ g/mL)	2.3(0.4)	2.8(0.8)	2.6(0.7)

Cortisol (µg/dL)	13.94(3.37)	12.50(3.56)	10.55(5.24)
CRP (mg/L)	7.72(10.66)	1.38(1.13)	1.86(2.10)
TSH (µU/mL)	1.90(1.19)	2.74(0.69)	3.17(2.17)
T <sub>4</sub> (ng/dL)	1.07(0.07)	1.13(0.10)	1.11(0.19)

§: Slow vs normal. § P <0.05; §§ P <0.01

LDL-c: low density lipoprotein cholesterol, HDL-c: high density lipoprotein cholesterol  
 TG: triglycerides; IGF-1: insulin-like growth factor 1; IGF-BP<sub>3</sub>: insulin-like growth factor-binding protein 3; CRP: C reactive protein; TSH: thyroid-stimulating hormone; T<sub>4</sub>: thyroxine.

***Evolution of adipokine concentrations during the 24 first months of life***

Plasma concentrations of the measured adipokines at 3, 12 and 24 months of age are summarized in Table 4. Leptin and NOV were decreased during the two first years of life, and the opposite pattern was observed in omentin, with increasing concentrations during the 2-year period. Finally, adiponectin, chemerin and vaspin remained unchanged during the two first years of life.

**Table 4.** Evolution of plasma adipokine concentrations during the 24 first months of life.

	Visit 1 3 months (n=27)	Visit 2 12 months (n=21)	Visit 3 24 months (n=18)
Leptin (ng/mL)	4.47 (2.40)##; α	3.39 (1.60)	3.09 (1.87)
Adiponectin (µg/mL)	61.12 (39.21)	54.65 (28.10)	75.00 (57.87)
Omentin (ng/mL)	363.13 (119.94)#; α	394.77 (102.43)	423.51(116.01)
Chemerin (ng/mL)	205.38 (29.20)	201.95 (19.33)	192.58 (24.72)
Vaspin (ng/mL)	0.17 (0.08)	0.16 (0.07)	0.19 (0.08)
NOV (ng/mL)	120.17 (37.39)##; αα	88.03 (24.56)	73.15 (17.74)

Mann-Whitney`s U/ Student's *t* test used according to the distribution.

#: visit 1 (3 months) vs visit 2 (12 months). # *P*<0.05; ## *P* <0.01

⌘: visit 1 (3 months) vs visit 3 (24 months). ⌘ *P* <0.05; ⌘⌘ *P* <0.01

**Gender differences**

When the gender factor was examined in each visit, statistical differences were observed between males and females, showing females higher levels of leptin, adiponectin and omentin at 24 months, but not before this age. Also, in the case of NOV sexual dimorphism was observed, with higher concentration in males only in the first visit, that is at 3 months. By contrast, vaspin and chemerin were similar in both genders in the three visits (Table 5).

**Table 5.** Differences in plasma adipokine concentrations between male and female SGA infants at each visit.

	Visit 1 (3 months)		Visit 2 (12 months)		Visit 3 (24 months)	
	Males (n=14)	Females (n=13)	Males (n=9)	Females (n=12)	Males (n=9)	Females (n=9)
Leptin (ng/mL)	4.32 (2.41)	4.64 (2.48)	4.17 (2.00)	2.81 (0.94)	2.24 (0.77)	3.95(2.28)*
Adiponectin (µg/mL)	61.53 (44.70)	60.67 (34.14)	49.26 (21.96)	58.69 (32.31)	50.79 (41.51)	106.12(63.67)*
Omentin (ng/mL)	364.29 (136.79)	361.88 (104.39)	353.77 (77.94)	425.52 (110.68)	344.54 (52.48)	502.48 (108.68)**
Chemerin (ng/mL)	207.78 (30.91)	202.80 (28.26)	197.27 (17.25)	205.45 (20.78)	188.88 (19.59)	196.27 (29.74)
Vaspin (ng/mL)	0.16 (0.05)	0.19 (0.10)	0.15 (0.05)	0.17 (0.09)	0.19 (0.08)	0.19 (0.09)
NOV (ng/mL)	136.32 (40.96)	102.79 (24.08)*	93.93 (25.88)	83.60 (23.67)	67.08 (20.47)	79.21 (12.92)

Mann-Whitney`s U/ Student`s *t* test used according to the distribution \* *P*<0.05; \*\* *P*<0.01

**Discussion**

In SGA infants, catch-up growth is defined as the acceleration in growth soon after birth [22]. Maximum catch-up growth usually occurs in the first 6 months of life but may continue up to 24 months [23]. It is well known that catch-up type has a clear influence on the metabolic features of infants later in their life. In fact, it has been proposed that the post-natal growth pattern of SGA infants, rather than SGA status itself, may be a more important contributor to health outcomes later in life [24]. If catch-up growth is achieved

gradually without accumulation of abdominal fat in the first 24 months, the incidence of the associated metabolic syndrome is not significant. With regard to fast catch-up, there is a concern because, although it can benefit infants by improving their nutritional status, resistance to infection and survival, it can also contribute to the development of obesity, impaired glucose tolerance and increased mortality from coronary heart disease later in life.

The reasons that determine catch-up type in SGA infants are not clear. It has been suggested that sensitivity to growth factors like insulin, insulin-like growth factors or growth hormone (GH) may be involved [1, 25, 26]. Moreover, it has been reported that exclusive breastfeeding during the first months of life, instead of artificial and/or fortifying formulas in these low-weight infant, is essential to avoid excessive weight gain during the first months and years of life, which is associated with an increased cardiovascular risk in the adult stage [27, 28]. In our cohort of SGA infants, differences in catch-up type do not seem to be due to different feeding types after birth.

When we looked at body weight at birth, it was realized that those infants with fast catch-up showed significantly lower birth weight than the other two groups. Thus, it seems that this parameter plays a role in the type of catch-up showed by infants during the first 24 months of age [29-31]. In order to gain more insight into catch-up type, in the present work we analyzed potential differences in adipokine plasma concentrations at 3 months of age. We observed that infants with slow catch-up showed different adipokine profile to normal catch-up infants. By contrast, no differences were observed between normal and fast catch-up. Thus, it can be suggested that adipokines, at very early life, could have an influence on catch-up type.

Among all the adipokines analyzed in the present study, leptin and adiponectin are implicated in metabolism and energy balance of fetuses, newborns and adults, and have been suggested to play a role in fetal growth [10, 32]. Infants with slow catch-up showed lower concentrations of leptin and similar levels of adiponectin than infants with normal catch-up. Thus, the low concentration of leptin may be involved in the slow growth of these infants. This fact could be related to the well-known effect of leptin on growth hormone production. It has been demonstrated that leptin induces GH release due to the inhibition of hypothalamic somatostatin [26]. In addition, infants with slow catch-up

showed lower concentrations of vaspin, and higher levels of chemerin and omentin at 3 months, when compared with normal catch-up group. Among these alterations, only that concerning chemerin was maintained at 12 months. Furthermore, they showed insulin resistance according to insulin and HOMA values. Taking into account that vaspin concentrations are related to insulin sensitivity, omentin can be taken as a biomarker of insulin resistance, and chemerin is related to insulin resistance and type 2 diabetes, altogether our results suggest that the altered adipokine profile can be responsible, at least in part, for the impaired glycaemic control [16, 19, 33].

As indicated before in this Discussion section, postnatal growth pattern of SGA infants may be an important contributor to health outcomes later in life [23]. Bearing this in mind, we decided to analyze whether catch-up type influenced metabolic status of infants early in life. For this purpose, we measured several biochemical serum parameters at 12 months of age. The results obtained show that infants with slow catch-up showed significantly higher values of insulin and, therefore, HOMA-IR than infants in the other two groups, meaning that, at this age, they have worse glucose homeostasis control. In the case of infants with fast catch-up, no significant differences were found when compared with infants with normal catch-up. Whereas it has been clearly demonstrated that later in life, SGA infants with slow catch-up are less prone to develop metabolic alterations than SGA infants with fast catch-up [34, 35], the present results show that, during the first months of life, this growth pattern leads to a transitory impairment in glycaemic control.

We also analyzed the evolution of adipokine profile during the first 24 months of age in the whole cohort of infants, because reported data are scarce and somehow controversial. The results show that the evolution pattern is different, depending on the adipokine. Thus, whereas leptin and NOV decreased during the 24 first months of life, omentin increased in the same period of time, and chemerin and vaspin remained unchanged. With regard to leptin, our results are in good accordance with those reported by Bozzola *et al.* (2010) in adequate for gestational age (AGA) and SGA infants [7]. In this study, leptin showed a significant increase in the first month of life and then decreased until 12 months of life. Our study provides additional data, demonstrating that values remained unchanged at least until 24 months of age. However, other studies have shown



higher levels of leptin at 12 months of age probably due to different environmental factors derived from the origin of children [36].

With regard to adiponectin, in our study the evolution of this adipokine is similar to that showed by Bozzola *et al.* (2010) [7], but when analyzing data at 12 and 24 months, our study did not show the significant reduction observed by Iñiguez *et al.* (2004) in AGA and SGA infants [37].

When the gender factor was examined, statistical differences were observed between males and females, mainly at 24 months of age. Males showed lower levels of leptin, adiponectin and omentin. Taking into account that adiponectin is exclusively produced by white adipose tissue, which is the main producer of leptin and omentin, this difference may be due to the differences in body fat mass gain between males and females during the first years of life [38]. However, in this cohort of infants, no significant differences in brachial and abdominal perimeters were found.

Our study has strengths and limitations. One limitation is the small sample size. The reason is that SGA represent a small percentage of newborns in Hospital Universitario de Alava-Txagorritxu and also that it is difficult to obtain parent consent for blood collection in infants at 3 months of age. Consequently, power limitations and type II errors should therefore be taken into account when interpreting the results. Another limitation is that our study was carried out in a Caucasian population and thus data cannot be directly extrapolated to other population groups. A strength is that a wide panel of adipokines was measured, some of them (omentin, vaspin and NOV) very little studied in infants and children. Moreover, to the best of our knowledge, adipokine studies in SGA infants commonly focus on cord blood, which is not considered the ideal material because it may present contradictory factors. In our study we worked with plasma samples, not at birth, but at a very early age (3 months).

Taken together our results show that a) the lowest weight in SGA infants is related to a fast catch-up growth, b) adipokines, very early in life, can have an influence on catch-up type, c) health prognoses for infants with slow and fast catch-up are opposite, between the first months of life and later in life, d) adipokine evolution pattern during the first 24 months of age is different, depending on the adipokine and e) males show lower levels of leptin, adiponectin and omentin than females at 24 months old.

## **Acknowledgements**

This study was supported by grants from Pfizer International, Government of the Basque Country (IT-572-13) and Instituto de Salud Carlos III (CIBERObn).

## **References**

1. Saenger P, Czernichow P, Hughes I, Reiter EO. Small for gestational age: Short stature and beyond. *Endocr Rev.* 2007 04/01;28(2):219-51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1210/er.2006-0039>.
2. Britt C, Sven C, Ove A. Preterm and term births of small for gestational age infants: A population-based study of risk factors among nulliparous women. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology.* 2005 08/19; 2018/03;105(9):1011-7. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.1998.tb10266.x>.
3. Lee PA, Chernausek SD, Hokken-Koelega A, Czernichow P. International small for gestational age advisory board consensus development conference statement: Management of short children born small for gestational age, april 24-October 1, 2001. *Pediatrics.* 2003 06/01;111(6):1253. Available from: <http://pediatrics.aappublications.org/content/111/6/1253.abstract>.
4. Levy-Marchal C, Jaquet D. Long-term metabolic consequences of being born small for gestational age. *Pediatric Diabetes.* 2004;5(3):147-53.
5. Hokken-Koelega A, De Ridder, M.A.J., Lemmen RJ, Hartog HD, De Muinck Keizer-Schrama, S.M.P.F., Drop SLS. Children born small for gestational age: Do they catch up?

Pediatric Research. 1995 08/01;38:267. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1203/00006450-199508000-00022>.

6. Kistner A, Vanpée M, Hall K. Leptin may enhance hepatic insulin sensitivity in children and women born small for gestational age. *Endocrine Connections*. 2012 12/12;2(1):38-49. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3680956/>.

7. Bozzola E, Meazza C, Arvigo M, Travaglino P, Pagani S, Stronati M, et al. Role of adiponectin and leptin on body development in infants during the first year of life. *Italian Journal of Pediatrics*. 2010 03/18;36(1):26. Available from: <https://doi.org/10.1186/1824-7288-36-26>.

8. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2000 1 October 2000;11(8):327-32.

9. Ahima RS, Qi Y, Singhal NS, Jackson MB, Scherer PE. Brain adipocytokine action and metabolic regulation. *Diabetes*. 2006 12/01;55:S145. Available from:  
[http://diabetes.diabetesjournals.org/content/55/Supplement\\_2/S145.abstract](http://diabetes.diabetesjournals.org/content/55/Supplement_2/S145.abstract).

10. Raucci R, Rusolo F, Sharma A, Colonna G, Castello G, Costantini S. Functional and structural features of adipokine family. *Cytokine*. 2013 January 2013;61(1):1-14.

11. Escoté X, Gómez-Zorita S, López-Yoldi M, Milton-Laskibar I, Fernández-Quintela A, Martínez AJ, et al. Role of omentin, vaspin, cardiotrophin-1, TWEAK and NOV/CCN3 in obesity and diabetes development. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(8).

12. Mazaki-Tovi S, Kasher-Meron M, Hemi R, Haas J, Gat I, Lantsberg D, et al. Chemerin is present in human cord blood and is positively correlated with birthweight.

American Journal of Obstetrics and Gynecology. 2012 November 2012;207(5):412.e1,412.e10.

13. Giapros V, Vavva E, Siomou E, Kolios G, Tsabouri S, Cholevas V, et al. Low-birth-weight, but not catch-up growth, correlates with insulin resistance and resistin level in SGA infants at 12 months. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2017 08/03;30(15):1771-6. Available from: <https://doi.org/10.1080/14767058.2016.1224838>.

14. Bozaoglu K, Bolton K, McMillan J, Zimmet P, Jowett J, Collier G, et al. Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. *Endocrinology*. 2007 10/01;148(10):4687-94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1210/en.2007-0175>.

15. Bozaoglu K, Segal D, Shields KA, Cummings N, Curran JE, Comuzzie AG, et al. Chemerin is associated with metabolic syndrome phenotypes in a mexican-american population. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 05/20;94(8):3085-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2730868/>.

16. El-Mesallamy HO, Kassem DH, El-Demerdash E, Amin AI. Vaspin and visfatin/nampt are interesting interrelated adipokines playing a role in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*. 2011 January 2011;60(1):63-70.

17. Blüher M. Vaspin in obesity and diabetes: Pathophysiological and clinical significance. *Endocrine*. 2012 04/01;41(2):176-82. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12020-011-9572-0>.

18. Huang Y, Li Y, Chen Q, Chen H, Ma H, Su Z, et al. Low serum adiponectin levels are associated with reduced insulin sensitivity and lipid disturbances in short children born small for gestational age. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2015;83(1):78-84.

19. Ahmet A, Melek A, Gamze D, Canpolat FE, Omer E, Ugur D. Umbilical cord and fifth-day serum vaspin concentrations in small-, appropriate-, and large-for-gestational

age neonates. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*. 2012 2018-02-07T13:08:20.24+01:00;26:635.

20. Rong-Ze Yang, Mi-Jeong Lee, Hu H, Pray J, Hai-Bin Wu, Hansen BC, et al. Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: Possible role in modulating insulin action. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2006 06/01; 2018/02;290(6):E1253-61. Available from: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00572.2004>.

21. Estudios españoles de crecimiento 2010 Available from: [http://www.seep.es/privado/documentos/Publicaciones/Estudios\\_Espa%C3%B1oles\\_de\\_Crecimiento\\_2010.pdf](http://www.seep.es/privado/documentos/Publicaciones/Estudios_Espa%C3%B1oles_de_Crecimiento_2010.pdf). 2010.

22. FAU MD, FAU HJ, FAU RA, FAU NB, FAU TD, Turner RC. Homeostasis model assessment: Insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* JID - 0006777. (0012-186; 0012-186).

23. Albertsson-Wikland K, Boguszewski M, Karlberg J. Children born small-for-gestational age: Postnatal growth and hormonal status. *Horm Res Paediatr*. 1998;49(suppl 2):7-13. Available from: <https://www.karger.com/DOI/10.1159/000053080>.

24. Boersma B, Wit JM. Catch-up growth. *Endocr Rev*. 1997 10/01;18(5):646-61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1210/edrv.18.5.0313>.

25. Lei X, Chen Y, Ye J, Ouyang F, Jiang F, Zhang J. The optimal postnatal growth trajectory for term small for gestational age babies: A prospective cohort study. *J Pediatr*. 2015 2018/04;166(1):54,58.e3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2014.09.025>.

26. Karlberg JP, Albertsson-Wikland K FAU - Kwan,,E.Y., FAU KE, FAU LB, Low LC. The timing of early postnatal catch-up growth in normal, full-term infants born short for gestational age. *Hormone research JID* - 0366126.
27. Carling SJ, Demment MM, Kjolhede CL, Olson CM. Breastfeeding duration and weight gain trajectory in infancy. *Pediatrics*. 2015 01/01;135(1):111. Available from: <http://pediatrics.aappublications.org/content/135/1/111.abstract>.
28. Parikh NI, Hwang S, Ingelsson E, Benjamin EJ, Fox CS, Vasani RS, et al. Breastfeeding in infancy and adult cardiovascular disease risk factors. *Am J Med*. 2009 07;122(7):656,63.e1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2704490/>.
29. Jornayvaz FR, Vollenweider P, Bochud M, Mooser V, Waeber G, Marques-Vidal P. Low birth weight leads to obesity, diabetes and increased leptin levels in adults: The CoLaus study. *Cardiovascular Diabetology*. 2016 05/03;15(1):73. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12933-016-0389-2>.
30. Xiao X, Zhang Z, Li W, Feng K, Sun Q, Cohen HJ, et al. Low birth weight is associated with components of the metabolic syndrome. *Metabolism - Clinical and Experimental* 2018/02;59(9):1282-6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2009.12.001>.
31. Hovi P, Andersson S, Eriksson JG, Järvenpää A, Strang-Karlsson S, Mäkitie O, et al. Glucose regulation in young adults with very low birth weight. *N Engl J Med*. 2007 05/17; 2018/02;356(20):2053-63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa067187>.
32. Briffa JF, McAinch AJ, Romano T, Wlodek ME, Hryciw DH. Leptin in pregnancy and development: A contributor to adulthood disease? *American Journal of Physiology-*

Endocrinology and Metabolism. 2015 03/01; 2018/02;308(5):E335-50. Available from: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00312.2014>.

33. Dos SE, Fabien D, Vialard François, Dieudonné MN. The roles of leptin and adiponectin at the fetal-maternal interface in humans. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*. 2015 2018-02-12T10:54:36.788+01:00;24:47.

34. Poekes L, Lanthier N, Leclercq I. Brown adipose tissue: A potential target in the fight against obesity and the metabolic syndrome. *Clin Sci*. 2015 12/01;129(11):933. Available from: <http://www.clinsci.org/content/129/11/933.abstract>.

35. Symonds ME. Brown adipose tissue growth and development. *Scientifica*. 2013 02/28;2013:305763. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3820149/>.

36. Amador-Licona N., Martinez-Cordero C., Guizar-Mendoza J.M., Malacara J.M., Hernandez J., Alcala J.F. Catch-up growth in infants born small for gestational age - A longitudinal study. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*. 2011 2018-02-06T12:40:27.343+01:00;20:379.

37. Ñíguez G, Soto N, Avila A, Salazar T, Ong K, Dunger D, et al. Adiponectin levels in the first two years of life in a prospective cohort: Relations with weight gain, leptin levels and insulin sensitivity.

38. Cheng G, Bolzenius K, Joslowski G, Günther A.L.B., Kroke A, Heinrich J, et al. Velocities of weight, height and fat mass gain during potentially critical periods of growth are decisive for adult body composition. *Eur J Clin Nutr*. 2014 07/09;69:262. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ejcn.2014.131>.

**Manuscrito 5 / 5. Eskuizkribua**

**Asier Léniz<sup>1,2,3</sup>; Alfredo Fernández-Quintela<sup>1,3,4</sup>; Marta del Hoyo<sup>3,5</sup>; Ignacio Díez-López<sup>3,5</sup>; María P. Portillo<sup>1,3,4</sup>**

1 Nutrition and Obesity Group, Department of Nutrition and Food Science, University of the Basque Country (UPV/EHU) and Lucio Lascaray Research Institute, 01006 Vitoria, Spain

2 Araba Integrated Health Care Organization, Basque Health Service (Osakidetza), 01004 Vitoria, Spain

3 Bioaraba Health Research Institute, 01009 Vitoria, España

4 CIBERObn Physiopathology of Obesity and Nutrition, Institute of Health Carlos III, 01006 Vitoria, Spain

5 Pediatric Endocrinology Unit, HU Araba Vitoria. Department of Pediatric, University of the Basque Country (UPV/EHU), 01009 Vitoria, Spain

**Chemerin concentrations in SGA infants: correlations with triglycerides and parameters related to glucose homeostasis**

J Physiol Biochem. 2021 Feb;77(1):133-140.

doi: 10.1007/s13105-020-00750-4



**Abstract:**

Infants born small for gestational age (SGA) are known to have increased risk of developing several pathologies, including the metabolic syndrome, when they grow up. It has been described that both the growth pattern of these children as well as the risk of their presenting future metabolic disorders can be influenced by the expression of adipokines. Among them, chemerin has demonstrated to be implicated in lipid and glucose metabolism, presenting higher circulating concentration in diabetic and obese subjects. Thus, the aim of this study was to analyze the association of anthropometric parameters and plasmatic biochemical parameters with circulating chemerin concentration in SGA children. This prospective, longitudinal study was carried out in plasma samples of Caucasian children born SGA at Hospital Universitario de Álava-Txagorritxu. Significant positive correlations were observed between chemerin concentrations at 3 months and insulin values at 3 months and also with triglyceride levels at 24 months. These associations were maintained after adjustment by auxological parameters. Therefore, we suggest that circulating chemerin concentration, measured at an early age, might be an indicator of future metabolic alterations in SGA children.

**Key points**

- Serum chemerin and triglycerides are correlated at 3 and 24 months of life
- Chemerin could be proposed as a biomarker of prognosis for serum triglycerides
- Serum chemerin is positively associated with glycemic control parameters

**Keywords:** SGA; chemerin; glucose homeostasis; triglycerides, biochemical parameters

## **Introduction**

Being born small for gestational age (SGA) can be due to several maternal, fetal and environmental factors like chronic diseases, exposition to environmental toxics (e.g., smoking and alcohol consumption), infections or an inadequate mother nutrition [7, 22, 30]. Usually, the catch-up occurs between 6 and 24 months, and about 85% of SGA children reach normal weight at 24 months [20]. It is well known that SGA infants can develop persistent short stature, perinatal morbidity, and metabolic alterations, such as type 2 diabetes, dyslipidemia, insulin-resistance, obesity or arterial hypertension, in adulthood [30, 31].

The level of circulating cytokines has been shown to be a key factor related to the prognosis of catch-up growth consequences [1]. These proteins, produced by several tissues and organs (adipokines secreted by white adipose tissue, mainly by visceral depots, myokines secreted by skeletal muscle and hepatokines secreted by liver) play important roles in metabolism. In addition, several cytokines act over the central nervous system, influencing subject adaptation and modifying energy resource management during the first years of life.

Chemerin, initially discovered in 2003, and also known as retinoic acid receptor responder protein 2, tazarotene-induced gene 2 protein, or RAR-responsive protein, is produced by white adipose tissue, liver, kidney, skin and intestine [17]. It acts through the binding receptors chemerin chemokine-like receptor 1, the chemerin receptor 23 (chem23) and CC-motif receptor-like 2 [32, 37, 39]. This protein plays a clear role in adipocyte metabolic pathways, such as adipogenesis, adipocyte differentiation triglyceride synthesis and lipolysis [25]. Moreover, it is involved in glucose homeostasis by acting on glucose transporter 4 (GLUT4) and adiponectin and leptin production [16,

19]. In humans chemerin has been associated with several components of metabolic syndrome, such as serum triglycerides, total cholesterol and insulin resistance [5, 6, 33]. Moreover, several studies have shown higher chemerin concentrations in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) [35, 38] and in obese subjects [11, 29].

Due to the fact that studies devoted to analyzing chemerin in children are scarce in the literature, the aim of the present study was to analyze for the first time the association in SGA infants between chemerin circulating concentration and plasma biochemical parameters on one hand and anthropometric parameters on the other hand.

## **Materials and Methods**

### ***Subjects***

This prospective longitudinal study was conducted with twenty-seven SGA Caucasian children born in Hospital Universitario de Álava-Txagorritxu (HUA), over the period of June 2013 to March 2015. SGA condition was assessed as infants with birth and/or length below 2 standard deviations (SD) of the Spanish standard birth weight/length curves [9]. Births from multiple pregnancies, non-Caucasian children and subjects with evidence of malformations or endocrine malfunction were excluded from the study. A normal course of the pregnancy was confirmed by the enrolled mothers, as well as by the absence of drug administration or complications during pregnancy.

Newborn length ranged from 37 to 53 cm, weight from 1100 to 2660 grams and gestational age, established by dating the last menstrual period at the time of registration, from 33 to 41 weeks. All parents signed a written informed consent, and the protocol was approved by the Hospital Universitario de Álava (HUA) Ethical Committee (Ref. 2012-050).

### ***Anthropometric parameters***

Body weight was measured using an electronic scale at birth, 3 months and 24 months. The crown-to-heel length was determined with an infantometer or a stadiometer. Head circumference was assessed at the temporal level, waist circumference mid-way between the lower side of the last rib and the upper side of the pelvis, and arm circumference at the middle of the upper arm. All circumferences were measured to the closest millimeter and over bare skin.

### ***Blood collection and chemerin assay***

Blood samples were obtained using EDTA tubes at 3 and 24 months of age after 5h fasting. Blood was centrifuged at 1250 g for 20 minutes, and the plasma obtained was stored at -70°C until analysis. The levels of glucose, insulin, total cholesterol, LDL-c, high density lipoprotein cholesterol (HDL-c), triglycerides (TG), insulin-like growth factor 1 (IGF-1), insulin-like growth factor-binding protein 3 (IGF-BP3), cortisol, C reactive protein (CRP), thyroid-stimulating hormone (TSH) and thyroxine (T4) in plasma were measured using an automated Roche Autoanalyser system (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Sensitive and specific enzyme-linked immunoassay was used to determine chemerin concentration in plasma samples. The ELISA kit was obtained from Abcam (ab155430; Cambridge, UK) and the measurements performed with a Labsystems iEMS Reader MF analyzer plate photometer (Labsystems Diagnostics Oy, Helsinki, Finland).

The Homeostasis model assessment (HOMA-IR) was used to evaluate insulin sensitivity. Calculations of insulin sensitivity by the HOMA-IR technique were performed by the approximated equation of Mathews *et al.* (1985) based on fasting glucose and insulin levels [18].

### ***Statistical analysis***

Data are presented as mean values (SD). The statistical analyses were performed using IBM SPSS statistics v25 (SPSS, Chicago, IL, USA). Normality of the data was tested using Saphiro-Wilks W test, and logarithmical transformation was performed in non-normally distributed parameters for multivariate analysis. Differences in two paired samples were elucidated with a paired Student's *t* test or a Wilcoxon signed ranks test, and comparisons between unrelated variables were conducted with a Student's *t* test or a Mann-Whitney U test, where appropriate. Correlation between variables was assessed using either Pearson or Spearman`s rank tests as appropriate. Multivariate linear regression analyses were used to adjust the effects of covariates and to identify independent relationships. Statistical significance was set-up at *P* value of <0.05.

### **Results**

#### ***Study population profile***

Table 1 shows demographic and anthropometric parameters of mothers and infants at birth.

**Table 1.** Anthropometric parameters and demographic data of study population

	<b>Mean</b>	<b>Standard Deviation</b>
Gender (male/female)	14/13	
Gestational age (weeks)	36.75	2.75
Birth weight (g)	1958.00	492.20
Birth length (cm)	44.04	3.99
Weight at 3 months (kg)	4.81	0.64
Length at 3 months (cm)	55.95	2.56
Weight at 24 months (kg)	10.54	0.72
Length at 24 months (cm)	84.56	2.39
$\Delta$ BMI	-0.59	0.51
Head circumference (cm)	31.06	2.15
Brachial perimeter (cm)	34.00	3.10
Abdominal perimeter (cm)	10.85	1.13
Maternal age (years)	34.48	3.82
Mother's BMI	24.59	5.63
Breastfeeding (yes/no)	13/14	

BMI, body mass index

***Anthropometric and plasma biochemical parameters***

Infants' weight and length data, as well as plasma biochemical parameters at 3 and 24 months are shown in Table 2. At 3 months, children presented higher values of glucose, TG, TSH, T4 and CRP, and lower values of low density lipoprotein cholesterol (LDL-c), IGF-1 and IGF-BP3 than those observed at 24 months. No significant differences were observed in the remaining parameters. Circulating chemerin concentrations were not significantly different at 3 and 24 months. These latter data were

reported in a previous study from our group [23], but they have been included again in this study as considered necessary.

**Table 2.** Differences in plasma biochemical parameters between 3 and 24 months

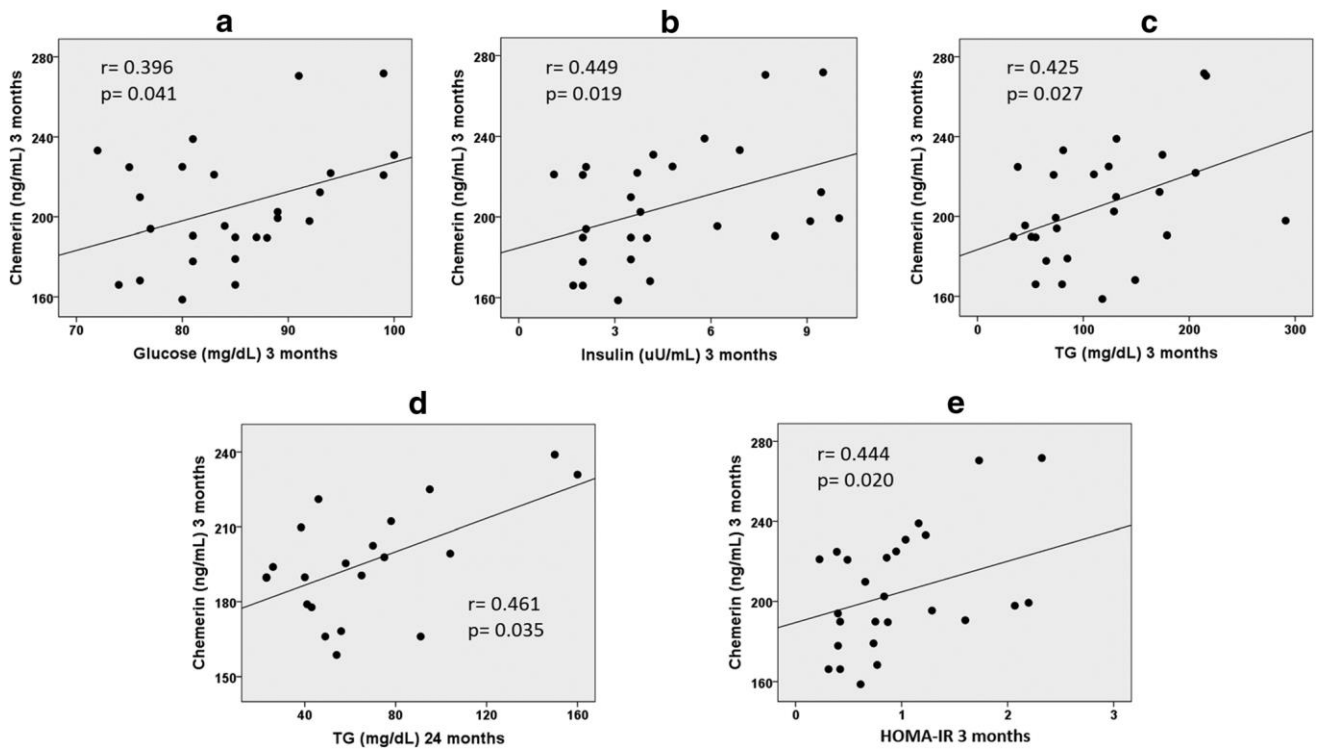
	<b>3 months</b> (n=27)	<b>24 months</b> (n=18)
Glucose (mg/dL)	85.04(7.87) **	79.70(6.99)
Insulin ( $\mu$ U/mL)	4.66(2.74)	6.28(7.98)
HOMA-IR	1.04(0.75)	1.23(1.52)
Cholesterol (mg/dL)	147.07(37.37)	157.83(39.24)
LDL-c (mg/dL)	73.64(26.67) **	103.95(29.33)
HDL-c (mg/dL)	50.06(20.51)	46.11(12.59)
TG (mg/dL)	116.86(65.53) *	58.31(23.46)
IGF-1 (ng/mL)	42.22(15.20) *	67.94(39.16)
IGF-BP <sub>3</sub> ( $\mu$ g/dL)	2.06(0.42) **	2.77(0.70)
Cortisol ( $\mu$ g/dL)	9.59(5.65)	12.22(2.74)
CRP (mg/dL)	1.52(3.14) *	1.29(1.96)
TSH ( $\mu$ U/mL)	3.44(1.68) **	2.47(1.03)
T <sub>4</sub> (ng/dL)	1.20(0.21) *	1.03(0.10)

Mann-Whitney`s U/ Student's *t* test used according to the distribution.

\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$

**Correlations**

Correlations between chemerin concentration and biochemical parameters are shown in Figure 1. Positive significant correlations were found between chemerin, measured at 3 months, and TG ( $r=0.43$ ), insulin ( $r=0.45$ ), glucose ( $r=0.40$ ), and consequently HOMA-IR values ( $r=0.44$ ) at 3 months. Also, chemerin at 3 months was positively correlated to TG at 24 months ( $r=0.48$ ). No significant correlations were observed between chemerin and other biochemical parameters or anthropometric parameters.



**Fig. 1** Correlations between chemerin concentration at 3 months of life and biochemical parameters in small for gestational age infants. Chemerin concentrations vs: A) plasma glucose at 3 months; B) insulin at 3 months; C) triglycerides (TG) at 3 months; D) triglycerides at 24 months; E) homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) index at 3 months



### ***Multiple linear regression analysis***

Multiple linear regression analysis between chemerin at 3 months and biochemical parameters at the same age, as dependent variables, showed that the association between chemerin and insulin was maintained after adjustment for weight and length at birth and gestational age (R-square=0.08; P= 0.046) (Table 3). By contrast, the associations with glucose, HOMA-IR and TG were lost. In the case of TG at 24 months, the association persisted after adjustment for weight and length at birth and 24 months and gestational age (P=0.031), and the coefficient of determination (R-square) values was 0.28 (Table 4).

### **Discussion**

As indicated in the Introduction section, it has been widely described that SGA infants can develop alterations involved in the development of metabolic syndrome, such as visceral obesity, insulin-resistance, high concentrations of LDL-cholesterol and TG or arterial hypertension, in adulthood. This fact was first described by Barker *et al.* (1992) and further confirmed by other studies [21, 31, 36]. By contrast, data concerning the potential metabolic alterations, and the evolution of biochemical parameters involved in metabolic syndrome, during the catch-up period are scarcer. Moreover, in some cases controversial results have been reported.

A meta-analysis published by Owen *et al.*, (2003) showed a significant inverse association between total cholesterol and birth weight [27]. De Jong *et al.* (2015) observed high prevalence of high TG levels at 1 year of age in SGA and very-low-birth-weight (VLBW) infants, compared to appropriate for gestational age (AGA) children [14]. Moreover, at 2 years of age VLBW children showed higher glucose levels than AGA children. However, no significant differences in insulin levels and HOMA-IR values were

observed among groups. In other studies, Dominguez-Hernández *et al.*, (2016) found that total cholesterol and LDL-cholesterol levels were not significantly different between obese SGA and obese non-SGA children and Castanis-Muñoz *et al.*, (2017) reported no association between postnatal growth and lipid levels [10, 15].

In the present study, we evaluated biochemical parameters very soon after birth (3 months) and at the end of the catch-up period (24 months). By comparing data at these two ages, it can be observed that whereas some parameters remained unchanged, others were modified. Focusing on lipids and parameters related to glucose homeostasis, we observed that insulin, HOMA-IR, total cholesterol and HDL-cholesterol remained unchanged, glucose and TG were significantly reduced, and LDL-cholesterol was significantly increased at 24 months of age.

This study was limited by the absence of a control group (AGA infants) and consequently, the cut-off values were based on studies in other populations and on reference values for Spanish children [13, 28]. According to these data, all values in the present study, either at 3 or at 24 months, were in the range of physiological values for healthy children. This means that the significant differences observed between these two ages do not imply pathological consequences. Importantly however, this fact demonstrates that SGA children showed a healthy biochemical profile in spite of the alterations in weight and/or length during the catch-up period (24 months).

In a previous study carried out in this precise cohort of SGA children, we measured serum concentrations of several adipokines [23]. In the present study we aimed to gain more insight concerning chemerin because it has been reported that this protein plays an important role in TG metabolism and glucose homeostasis, which in turn are closely

related to metabolic syndrome. For this purpose we analyzed correlations between chemerin and biochemical parameters.

Several studies have reported significant correlations between chemerin and parameters related to glycemic control, such as serum glucose, HbA1c and insulin concentrations, and HOMA-IR values in different cohorts. Bobbert *et al.* (2015) carried out a study in 440 adult subjects of both sexes with no baseline diabetes and a mean age of 60 years, devoted to analyzing whether chemerin predicted type 2 diabetes mellitus (T2DM) in adult population. They observed that peripheral chemerin was significantly correlated to fasting glucose and HbA1c [3]. In view of these results, the authors proposed chemerin as a potential indicator of T2DM. In the same way, Bozaoglu *et al.* (2009) showed a positive correlation between this adipokine and fasting glucose, insulin and HOMA-IR in non-diabetic adult subjects, in a sample of 969 subjects with a mean age of 36 years [6]. Similarly, in a pediatric population Sledzińska *et al.* (2017) found that chemerin was associated with circulating insulin and HOMA-IR values in 5-17-year-old children with normal or excess body weight [34].

The results obtained in the present study are in good accordance with those reported in adults and children, because we observed a positive correlation between chemerin and serum glucose and insulin concentrations, as well as HOMA-IR values, at 3 months of age. As far as we know, this is the first time that this correlation has been evidenced in SGA infants at that early age. The studies reported addressing SGA infants have only analyzed these parameters in cord blood. Our study demonstrates that the relationship between chemerin and parameters related to glucose homeostasis observed in adults and children also exist in SGA infants. Nevertheless, it should be emphasized that, in the case of glucose and HOMA-IR, the significance of these correlations disappears when

adjustments are made for height, length and gestational age in the multiple regression analysis.

Regarding TG concentrations, as in the case of glucose homeostasis-related parameters, several studies have reported significant correlations with chemerin in different cohorts. Cheon *et al.* (2017) observed a strong correlation between circulating chemerin and TG in obese adults showing T2DM [12]. This correlation was also present in adult population with other diseases, such as atrial fibrillation, chronic obstructive pulmonary disease or non-alcoholic fatty liver disease among others [4, 26, 40]. In children and adolescents, the correlation was also found in obese and non-obese subjects, confirming the relation of the chemerin with lipid metabolism in different cohorts [2, 24].

In the present study, a positive correlation was found between serum chemerin and TG at 3 months. These results show that the association between these two parameters observed in adult population and children also is present in SGA infants at an early age. It is important to point out that in the above mentioned reported studies, correlations between chemerin and biochemical parameters were carried out by using data obtained at the same time, as is the case in the present study when we analyzed correlations between chemerin and biochemical parameters obtained at 3 months of age. But, in addition to that, we analyzed the correlations between chemerin at 3 months and biochemical parameters at 24 months. In this case, we found that chemerin was significantly correlated to TG, and this correlation was maintained after adjustments in multiple regression analysis. This is an important result because it means that this adipokine could be proposed as a biomarker of prognosis for serum TG. Nevertheless, further studies are needed to give support and stronger scientific evidence to this hypothesis based on limited results.

In order to better assess the conclusions of the present study, its strengths and limitations should be declared. One strength is that the study has been performed in infant peripheral blood, extracted by venopuncture at 3 months, while the vast majority of the studies carried out in SGA children used cord blood. Among the limitations, the small sample size should be mentioned. This is due to the small percentage of infants born SGA at HUA Hospital, where the study was conducted, and the difficulty in obtaining their progenitors' informed consent to extract blood samples at 3 months of age for no other reason than research. The same reason, no permission for blood extraction in healthy infants at 3 months, explains the lack of an AGA group. Finally, we analyzed total chemerin, but it has been described that isoforms of this adipokine have different activities as well as different distribution and concentration in tissues [8].

## **References**

1. Ahima RS, Flier JS (2000) Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *Trends Endocrin Met* 11(8):327-332. [https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(00\)00301-5](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(00)00301-5)
2. Ba HJ, Xu LL, Qin YZ, Chen HS (2019) Serum chemerin levels correlate with determinants of metabolic syndrome in obese children and adolescents. *Clin Med Insights Pediatr* 13:1179556519853780
3. Bobbert T, Schwarz F, Fischer-Rosinsky A, Maurer L, Mohlig M, Pfeiffer AF, Mai K, Spranger J (2016) Chemerin and prediction of diabetes mellitus type 2. *Clin Endocrinol (Oxf)* 82(6):838-843

4. Boyuk B, Guzel EC, Atalay H, Guzel S, Mutlu LC, Kucukyalcin V (2015) Relationship between plasma chemerin levels and disease severity in COPD patients. *Clin Respir J* 9(4):468-474
5. Bozaoglu K, Bolton K, McMillan J, Zimmet P, Jowett J, Collier G, Walder K, Segal D (2007) Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. *Endocrinology* 148(10):4687-4694. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2007-0175>
6. Bozaoglu K, Segal D, Shields KA, Cummings N, Curran JE, Comuzzie AG, Mahaney MC, Rainwater DL, VandeBerg JL, MacCluer JW, Collier G, Blangero J, Walder K, Jowett JBM (2009) Chemerin is associated with metabolic syndrome phenotypes in a mexican-american population. *J Clin Endocrinol Metab* 94(8):3085-3098
7. Britt C, Sven C, Ove A (2005) Preterm and term births of small for gestational age infants: A population-based study of risk factors among nulliparous women. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 105(9):1011-1017. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.1998.tb10266.x>
8. Buechler C, Feder S, Haberl EM, Aslanidis C (2019) Chemerin isoforms and activity in obesity. *Int J Mol Sci* 20(5):1128. <https://doi.org/10.3390/ijms20051128>
9. Carrascosa A, Fernández JM, Ferrández A, López-Siguero JP, López D, Sánchez E (2010) Estudios españoles de crecimiento. Available from: <http://www.aeped.es/noticias/estudios-espanolescrecimiento-2010>. Last Accessed April 2019
10. Castanys-Munoz E, Kennedy K, Castaneda-Gutierrez E, Forsyth S, Godfrey KM, Koletzko B, Ozanne SE, Rueda R, Schoemaker M, van der Beek EM, van Buuren S, Ong KK (2017) Systematic review indicates postnatal growth in term infants born small-for-

gestational-age being associated with later neurocognitive and metabolic outcomes. *Acta Paediatr* 106(8):1230-1238

11. Chakaroun R, Raschpichler M, Kloting N, Oberbach A, Flehmig G, Kern M, Schon MR, Shang E, Lohmann T, Dressler M, Fasshauer M, Stumvoll M, Bluher M (2012) Effects of weight loss and exercise on chemerin serum concentrations and adipose tissue expression in human obesity. *Metabolism* 61(5):706-714

12. Cheon DY, Kang JG, Lee SJ, Ihm SH, Lee EJ, Choi MG, Yoo HJ, Kim CS (2017) Serum chemerin levels are associated with visceral adiposity, independent of waist circumference, in newly diagnosed type 2 diabetic subjects. *Yonsei Med J* 58(2):319-325.

13. De Henauw S, Michels N, Vyncke K, Hebestreit A, Russo P, Intemann T, Peplies J, Fraterman A, Eiben G, de Lorgeril M, Tornaritis M, Molnar D, Veidebaum T, Ahrens W, Moreno LA, IDEFICS consortium (2014) Blood lipids among young children in europe: Results from the european IDEFICS study. *Int J Obes (Lond)* 38(2):S67-75

14. de Jong M, Cranendonk A, van Weissenbruch MM (2015) Components of the metabolic syndrome in early childhood in very-low-birth-weight infants and term small and appropriate for gestational age infants. *Pediatr Res* 78(4):457-461

15. Dominguez Hernandez C, Klunder Klunder M, Huang F, Flores Armas EM, Velazquez-Lopez L, Medina-Bravo P (2016) Association between abdominal fat distribution, adipocytokines and metabolic alterations in obese low-birth-weight children. *Pediatr Obes* 11(4):285-91

16. Ernst MC, Haidl ID, Zuniga LA, Dranse HJ, Rourke JL, Zabel BA, Butcher EC, Sinal CJ (2012) Disruption of the chemokine-like receptor-1 (CMKLR1) gene is associated with reduced adiposity and glucose intolerance. *Endocrinology* 153(2):672-682

17. Fatima SS, Rehman R, Baig M, Khan TA (2014) New roles of the multidimensional adipokine: Chemerin. *Peptides* 62:15-20
18. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC (1985) Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28:412–419
19. Goralski KB, McCarthy TC, Hanniman EA, Zabel BA, Butcher EC, Parlee SD, Muruganandan S, Sinal CJ (2007) Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. *J Biol Chem* 282(38):28175-28188
20. Hokken-Koelega AC, De Ridder MA, Lemmen RJ, Den Hartog H, De Muinck Keizer-Schrama SM, Drop SL (1995) Children born small for gestational age: do they catch up? *Pediatr Res* 38:267–271. <http://dx.doi.org/10.1203/00006450-199508000-00022>
21. Kajantie E, Barker DJ, Osmond C, Forsen T, Eriksson JG (2008) Growth before 2 years of age and serum lipids 60 years later: The helsinki birth cohort study. *Int J Epidemiol* 37(2):280-289
22. Lee PA, Chernausek SD, Hokken-Koelega A, Czernichow P (2003) International small for gestational age advisory board consensus development conference statement: management of short children born small for gestational age, April 24-October 1, 2001. *Pediatrics* 111:1253–1261
23. Léniz A, Portillo MP, Fernandez-Quintela A, Macarulla MT, Sarasua-Miranda A, Del Hoyo M, Diez-Lopez I (2019) Has the adipokine profile an influence on the catch-up growth type in small for gestational age infants?. *J Physiol Biochem* 75:311–319. <https://doi.org/10.1007/s13105-019-00684-6>



24. Maghsoudi Z, Kelishadi R, Hosseinzadeh-Attar MJ (2016) The comparison of chemerin, adiponectin and lipid profile indices in obese and non-obese adolescents. *Diabetes Metab Syndr* 10(1):S43-S46
25. Mattern A, Zellmann T, Beck-Sickinger AG (2014) Processing, signaling, and physiological function of chemerin. *IUBMB Life* 66(1):19-26
26. Mohamed AA, Sabry S, Abdallah AM, Elazeem NAA, Refaey D, Algebaly HAF, Fath GAE, Omar H (2017) Circulating adipokines in children with nonalcoholic fatty liver disease: Possible noninvasive diagnostic markers. *Ann Gastroenterol* 30(4):457-463.
27. Owen CG, Whincup PH, Odoki K, Gilg JA, Cook DG (2003) Birth weight and blood cholesterol level: A study in adolescents and systematic review. *Pediatrics* 111(5 Pt 1):1081-1089
28. Prieto Albino L, Mateos Montero C, Galan Rebollo A, Arroyo Diez J, Vadillo Machota JM (1999) The lipid profile in the children and adolescents of caceres province. *Aten Primaria* 23(7):404-410
29. Röss C, Tschoner A, Engl J, Klaus A, Tilg H, Ebenbichler CF, Patsch JR, Kaser S (2010) Effect of bariatric surgery on circulating chemerin levels. *Eur J Clin Invest* 40(3):277-80
30. Saenger P, Czernichow P, Hughes I, Reiter EO (2007) Small for gestational age: Short stature and beyond. *Endocr Rev* 28(2):219-51. <http://dx.doi.org/10.1210/er.2006-0039>
31. Saggese G, Fanos M, Simi F (2013). SGA children: Auxological and metabolic outcomes - the role of GH treatment. *J Matern Fetal Neonatal Med* 26(2):64-7

32. Samson M, Edinger AL, Stordeur P, Rucker J, Verhasselt V, Sharron M, Govaerts C, Mollereau C, Vassart G, Doms RW, Parmentier M (1998) ChemR23, a putative chemoattractant receptor, is expressed in monocyte-derived dendritic cells and macrophages and is a coreceptor for SIV and some primary HIV-1 strains. *Eur J Immunol* 28(5):1689-1700
33. Shin HY, Lee DC, Chu SH, Jeon JY, Lee MK, Im JA, Lee JW (2012) Chemerin levels are positively correlated with abdominal visceral fat accumulation. *Clin Endocrinol (Oxf)* 77(1):47-50
34. Sledzinska M, Szlagatys-Sidorkiewicz A, Brzezinski M, Kazmierska K, Sledzinski T, Kaminska B (2017) Serum chemerin in children with excess body weight may be associated with ongoing metabolic complications - A pilot study. *Adv Med Sci* 62(2):383-386
35. Tonjes A, Fasshauer M, Kratzsch J, Stumvoll M, Bluher M (2010) Adipokine pattern in subjects with impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance in comparison to normal glucose tolerance and diabetes. *PLoS One* 5(11):e13911
36. Varvarigou AA (2010) Intrauterine growth restriction as a potential risk factor for disease onset in adulthood. *J Pediatr Endocrinol Metab* (3):215-24
37. Wittamer V, Franssen JD, Vulcano M, Mirjolet JF, Le Poul E, Migeotte I, Brezillon S, Tyldesley R, Blanpain C, Detheux M, Mantovani A, Sozzani S, Vassart G, Parmentier M, Communi D (2003) Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. *J Exp Med* 198(7):977-85

38. Yang M, Yang G, Dong J, Liu Y, Zong H, Liu H, Boden G, Li L (2010) Elevated plasma levels of chemerin in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus with hypertension. *J Investig Med* 58(7):883-6
39. Zabel BA, Nakae S, Zuniga L, Kim JY, Ohshima T, Alt C, Pan J, Suto H, Soler D, Allen SJ, Handel TM, Song CH, Galli SJ, Butcher EC (2008) Mast cell-expressed orphan receptor CCRL2 binds chemerin and is required for optimal induction of IgE-mediated passive cutaneous anaphylaxis. *J Exp Med* 205(10):2207-20
40. Zhang G, Xiao M, Zhang L, Zhao Y, Yang Q (2017) Association of serum chemerin concentrations with the presence of atrial fibrillation. *Ann Clin Biochem* 54(3):342-7