

**MICRORNAS CIRCULANTES Y RIESGO CARDIOVASCULAR: UNA
ALTERNATIVA PARA EL ESTUDIO DE ALTERACIONES
METABÓLICAS EN NIÑOS DE 6 A 10 AÑOS**

DANIEL SOLÍS TORO



**UNIVERSIDAD DEL VALLE
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
SANTIAGO DE CALI
ENERO 2022**

**MICRORNAS CIRCULANTES Y RIESGO CARDIOVASCULAR: UNA
ALTERNATIVA PARA EL ESTUDIO DE ALTERACIONES
METABÓLICAS EN NIÑOS DE 6 A 10 AÑOS**

DANIEL SOLÍS TORO

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
MAGISTER EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**DIRECTORA:
MILDREY MOSQUERA ESCUDERO
Bact MSc PhD**



**UNIVERSIDAD DEL VALLE
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
SANTIAGO DE CALI
ENERO 2022**

NOTA DE ACEPTACIÓN

El trabajo de investigación titulado “**microRNAs circulantes y riesgo cardiovascular: una alternativa para el estudio de alteraciones metabólicas en niños de 6 a 10 años**”, presentado por el estudiante DANIEL SOLIS TORO, para optar al título de Magister en Ciencias Biomédicas, fue revisado por el jurado y calificado como: MERITORIO.

Firma: _____

MILDREY MOSQUERA ESCUDERO

Directora

Firma: _____

Nombre:

Jurado 1

Firma: _____

Nombre:

Jurado 2

Firma: _____

Nombre:

Jurado 3

TABLA DE CONTENIDO

2.1 Enfermedades crónicas no transmisibles	17
2.2 Factores de riesgo	17
Resistencia a la insulina	18
Dislipidemia	19
2.3 Evaluación del riesgo de padecer enfermedad cardiovascular	19
2.3.1 Escalas de riesgo de Framingham	20
2.4 Evaluación del riesgo cardiovascular en infantes	27
2.5 Biomarcadores de riesgo	28
2.6 Condición Física Relacionada con la Salud.....	29
2.7 RNAs no codificantes	30
2.8 MicroRNAs	31
Síntesis de miRNAs y regulación de expresión de genes	32
2.9 miRNAs asociados con metabolismo energético y enfermedades crónicas .	35
3.1 Objetivo general	37
3.2 Objetivos específicos	37
4.1 Diseño.....	38
4.2 Población	38
4.3 Muestra	39
4.4 Cuantificación de microRNAs	42
4.5 Análisis informático.....	44
4.6 Análisis estadístico	44
5.1 Características de la población evaluada	45
5.2 MicroRNAs y Riesgo Cardiovascular.....	46
5.3 MicroRNAs y Diabetes.....	48

5.4 Análisis informático de interacciones miRNAs-genes	49
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AGL	Ácidos Grasos Libres
CC	Circunferencia de cintura
CFRS	Condición Física Relacionada con la Salud
CT	Colesterol total
CV	Cardiovascular
DGCR8	Región Crítica 8 del síndrome de DiGeorge
DM1	Diabetes Mellitus tipo I
DM2	Diabetes Mellitus tipo II
ECNT	Enfermedades Crónicas No Transmisibles
ECV	Enfermedad Cardiovascular
ENSIN	Encuesta Nacional de Situación Nutricional
FC	Fold Change
GDP	Guanosín Difosfato
GTP	Guanosín Trifosfato
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HOMA	Modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina
HPT	Hipertensión
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice De Masa Corporal
IR	Resistencia a la insulina
LDL	Lipoproteína de baja densidad
miRNAs	microRNAs
miRTC	Controles transcripción reversa
mRNA	RNA mensajero
ncRNA	RNA pequeños no codificantes
NHLBI	National Heart, Lung, and Blood Institute

OB	Obesidad
OMS	Organización Mundial de la Salud
PA	Presión Arterial
PAD	Presión arterial diastólica
PAS	Presión arterial sistólica
PC	Controles positivos de PCR
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
piRNA	RNA que interactúan con Piwi
Pol II	RNA polimerasa II
pre-miRNA	miRNA precursor
RISC	Complejo de Silenciamiento inducido por RNA
RNA	Ácido ribunucleico
RNAi	Proceso de interferencia del mRNA
RNAsas	Ribunucleasas
siRNA	Pequeños RNA de interferencia
TG	Triglicéridos
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
UTR	Regiones 3' no traducidas
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
VO ₂	Consumo de oxígeno

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Puntaje para riesgo cardiovascular en mujeres	21
Tabla 2.2 Puntaje para riesgo cardiovascular en hombres.....	22
Tabla 2.3 Riesgo cardiovascular total en mujeres	23
Tabla 2.4 Riesgo cardiovascular total en mujeres	24
Tabla 2.5 Puntaje para riesgo de diabetes en población adulta	25
Tabla 2.6 Porcentaje de riesgo de diabetes en población adulta.....	26
Tabla 2.7 Variables de riesgo cardiovascular infantil	27
Tabla 2.8 miRNAs asociados con síndrome metabólico en adultos	36
Tabla 4.1 puntuación de riesgo de padecer diabetes en población infantil.....	40
Tabla 4.2 puntuación de riesgo cardiovascular en población infantil.....	41
Tabla 5.1 Principales características de la población estudio.....	45
Tabla 5.2 distribución de los diferentes sujetos de acuerdo con las clasificaciones de riesgo.....	46
Tabla 5.3 Vías metabólicas relacionadas con el perfil de expresión de miRNAs detectado.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Batería Alpha-Fitness versión extendida (47).....	30
Figura 2.2 Síntesis y maduración de los microRNAs.....	33
Figura 2.3 Producción de los microRNAs y regulación de la expresión de genes.....	34
Figura 4.1 Arreglo de miRNAs asociados a diabetes.....	43
Figura 4.2 Arreglo de miRNAs asociados a enfermedad Cardiovascular	43
Figura 5.1 Perfil de expresión del arreglo de microRNAs asociados con enfermedad cardiovascular.	47
Figura 5.2 Perfil de expresión del arreglo de microRNAs asociados con diabetes....	48
Figura 5.3 Mapa de calor vías metabólicas relacionadas con el perfil de expresión de miRNAs detectado.....	51
Figura 6.1 Resumen vías metabólicas reguladas por perfil de expresión de microRNAs encontrado.....	55

RESUMEN

Introducción: las Enfermedades Crónicas No Transmisibles (ECNT) son la principal causa de muerte en el mundo y en la mayoría de los países de las Américas donde se estima que causan 1,9 millones de muertes al año. La población infantil colombiana está empezando a presentar un aumento en la prevalencia en factores de riesgo de ECNT como sobrepeso y sedentarismo. Los microRNAs (miRNAs) podrían ser biomarcadores más sensibles y de fácil acceso que puedan ayudar a diagnosticar el riesgo de padecer ECNT como diabetes o enfermedad cardiovascular en estadios tempranos como la infancia y estudiar a su vez los mecanismos bioquímicos involucrados en estas etapas del desarrollo.

Objetivo: determinar el perfil de expresión de microRNAs circulantes asociados con diabetes y enfermedad cardiovascular en niños de 6 a 10 años.

Metodología: se seleccionaron 32 niños con bajo y alto riesgo cardiovascular y de diabetes utilizando escalas de riesgo modificadas de Framingham. Se midieron los miRNAs circulantes en plasma usando los arreglos pathway-focused miScript miRNA PCR array (Quiagen®) diseñados para enfermedades cardiovasculares y diabetes. Se realizó un análisis informático para analizar las interacciones miRNA-gen con la herramienta DIANA-miRPath v3.0 para determinar las vías metabólicas asociadas con el perfil de miRNAs con diferencias significativas en su expresión.

Resultados: en el arreglo de enfermedad cardiovascular se encontró que en el grupo de riesgo respecto al grupo control: los microRNAs hsa-miR-181a-5p (FC=2,55) y hsa-miR-7-5p (FC=10,31) presentaron alzas en su expresión y los miRNAs hsa-miR-210-3p (FC=-2,32) y hsa-miR-378a-3p (FC=-3.39) presentaron una expresión regulada a la baja. En cuanto al arreglo de riesgo de diabetes, solo el hsa-miR-365b-3p presentó un aumento significativo de expresión (FC=5,24). Se encontraron asociaciones significativas ($P<0.05$) con genes relacionados con las vías de síntesis de ácidos grasos, y metabolismo de biotina, además de las vías de señalización de estrógenos, PI3K-Akt, Prolactina, VEGF y adrenérgicas en cardiomiocitos.

Conclusión: encontramos 5 miRNAs (miR-7-5p, miR-181^a-5p, miR-365b-3p, 378^a-3p y 210-3p) diferenciados en población infantil con riesgo cardiovascular y de diabetes, que podrían servir como biomarcadores no invasivos en un futuro y dar un indicio de los orígenes de las patologías estudiadas y los mecanismos bioquímicos asociados.

Palabras clave: microRNA, Riesgo Cardiovascular, Diabetes, Infantes.

ABSTRACT

Introduction: Chronic non-communicable diseases (NCD) are the main cause of death in the world and in most of the countries of Latin America, where it is estimated that they cause 1.9 million deaths per year. The Colombian child population is beginning to present an increase in the prevalence of risk factors for NCD such as overweight and sedentary lifestyle. MicroRNAs (miRNAs) could be more sensitive and easily accessible biomarkers that could help diagnose the risk of suffering from NCD such as diabetes or cardiovascular disease in childhood, and to understand the biochemical mechanisms involved in these stages of development.

Outcome: to determine the expression profile of circulating microRNAs associated with diabetes and cardiovascular disease in children aged 6 to 10 years.

Methods: 32 children with low and high cardiovascular and diabetes risk were selected using modified Framingham risk scales. Plasma circulating miRNAs were measured using the pathway-focused miScript miRNA PCR array (Quiagen®) designed for cardiovascular disease and diabetes. Computer analysis was performed to analyze miRNA-gene interactions with the DIANA-miRPath v3.0 tool to determine the metabolic pathways associated with the profile of miRNAs with significant differences in their expression.

Results: in the cardiovascular disease array, the risk group compared to the control group presented: hsa-miR-181a-5p (FC=2.55) and hsa-miR-7-5p (FC=10, 31) increases in their expression and hsa-miR-210-3p (FC=-2.32) and hsa-miR-378a-3p (FC=-3.39) showed a down-regulated expression. Regarding the diabetes risk arrangement, only hsa-miR-365b-3p showed a significant increase in expression (FC=5.24). Significant associations ($P<0.05$) were found with genes related to fatty acid synthesis pathways and biotin metabolism, in addition to estrogen, PI3K-Akt, Prolactin, VEGF and adrenergic signaling pathways.

Conclusion: we found 5 miRNAs (miR-7-5p, miR-181a-5p, miR-365b-3p, 378a-3p and 210-3p) differentiated in children with cardiovascular and diabetes risk, which could serve as non-invasive biomarkers in a future and give an indication of the origins of the pathologies studied and their associated biochemical mechanisms.

Keywords: microRNA, Cardiovascular Risk, Diabetes, Infants.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo y en la mayoría de los países de Latinoamérica, se estima que causan 1,9 millones de muertes al año y que tres de cada cuatro personas adultas padecen una enfermedad crónica no transmisible (1). También la OMS refiere que en 2019 la diabetes fue la causa directa de 1,5 millones de defunciones (2)

Las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) tienen un origen multifactorial, e incluyen factores de riesgo no modificables como la edad y el sexo, y factores de riesgo modificables como sedentarismo, tabaquismo, obesidad, hipertensión arterial, hipercolesterolemia, hiperglucemia e hipertrigliceridemia (3). Estos factores de riesgo pueden presentarse desde edades tempranas, de tal forma que a nivel mundial se estima que cerca de 340 millones de niños y adolescentes entre 5 y 19 años sufrían de sobrepeso u obesidad en 2016 (4).

En Colombia, para el 2015 según la Encuesta Nacional de Situación Nutricional la media nacional de escolares con exceso de peso fue de 24,4% y en la región pacífica el porcentaje fue más alto con un 26,7% de población escolar encuestada con exceso de peso (5). También se encontraron niveles altos de sedentarismo, con solo un 31,1% de niños de 6 a 12 años realizando juego activo adecuado para su edad y un 67,6% de esta población con un tiempo excesivo frente a pantallas (5).

La población infantil en Colombia se convierte entonces en un foco de interés para la detección temprana de factores de riesgo asociados al desarrollo de ECNT, sin embargo, actualmente, la identificación del riesgo de padecer una enfermedad metabólica se realiza a través de variables antropométricas como índice de masa corporal (IMC), porcentaje de grasa corporal y otras bioquímicas como niveles plasmáticos de glucosa, lípidos o citosinas proinflamatorias (6). Lastimosamente, estos marcadores probablemente no se vean alterados en estadios iniciales del desarrollo de la ECNT debido a que su variación significaría un acumulado de exposición considerable (7).

Una potencial alternativa son moléculas como los microRNAs (miRNAs), los cuales son RNAs cortos que participan en diversos procesos fisiológicos y patológicos, como la

muerte celular, la respuesta al estrés, el metabolismo, la diferenciación y la proliferación celular (8). Siendo biomarcadores que pueden ser identificados fácilmente a partir de fuentes de fácil acceso como la sangre, y que pueden relacionarse con la etiología de la enfermedad de manera muy sensible (9).

En este sentido los miRNAs son biomoléculas prometedoras para el estudio de los orígenes de la enfermedad cardiovascular y la diabetes, sin embargo, hasta el momento, su estudio ha sido realizado principalmente en población adulta, por lo cual, la evaluación en niños representa una oportunidad interesante para identificar biomarcadores de alteraciones metabólicas en etapas tempranas de la vida. Por todo lo anterior, esta investigación busca identificar los miRNAs asociados a riesgo cardiovascular y diabetes que se expresan en plasma de escolares de 6 a 10 años.

1.0 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT), en el 2012, fueron la principal causa de muerte en el mundo entero, causando el 68% (38 millones) de las muertes (10). Las enfermedades cardiovasculares constituyen la mayoría de las muertes por ECNT (17,9 millones cada año), seguidas del cáncer (9,0 millones), las enfermedades respiratorias (3,9 millones) y la diabetes (1,6 millones) (10).

Los datos del Centro para el Control de Enfermedades de EE UU muestran que casi se ha cuadruplicado la diabetes diagnosticada, de 5,5 millones de personas en 1980 a 21,1 millones en 2010. A nivel mundial, se prevé un aumento en la prevalencia de diabetes de 382 millones (8.3%) en 2013 a 592 millones (10.1%) en 2035 (11). En Colombia de acuerdo con datos de la Encuesta Nacional de Salud Pública de 2007, se estima la prevalencia de diabetes mellitus tipo 2 aproximadamente en 7,4% en hombres y 8,7% en mujeres mayores de 30 años (12).

Los factores de riesgo relacionados con las ECNT pueden comenzar desde la infancia, y dicho inicio temprano aumenta la probabilidad padecer ECNT en la adultez (13-15). A nivel mundial se estima que cerca de 340 millones de niños y adolescentes entre 5 y 19 años estaban en sobrepeso u obesidad en 2016 (4). En Colombia, para el 2015 según la Encuesta Nacional de Situación Nutricional (ENSIN) la media nacional de escolares (6 a 12 años) con exceso de peso fue de 24,4% y en la región pacífica de 26,7% (5). También se encontraron niveles altos de sedentarismo, con solo un 31,1% de niños de 6 a 12 años realizando juego activo adecuado para su edad (considerado como 60 minutos o más de actividad física de intensidad moderada o vigorosa) y un 67,6% de esta población permanecía tiempo excesivo frente a pantallas (2 horas o más) (5).

Teniendo en cuenta el incremento de morbilidad y mortalidad asociadas a ECNT, las políticas públicas gubernamentales, orientadas por los entes internacionales, se han encaminado a la prevención y detección oportuna de alteraciones metabólicas (16). La OMS ha determinado la necesidad de los países de establecer políticas públicas como parte de los planes nacionales de desarrollo, encaminadas a la prevención primaria y el control de las enfermedades no transmisibles (17).

El gobierno colombiano a partir del plan decenal en Salud pública 2012-2021(18), se plantean un conjunto de respuestas integrales en el sector salud y de coordinación intersectorial, orientadas a promover el acceso y abordaje efectivo de las ECNT incluyendo los factores de riesgo, para disminuir la carga de enfermedad evitable de los individuos, familias y comunidades. En la resolución 3280 de 2018, se describen los propósitos de la Ruta Integral de Atención para la promoción y mantenimiento de la salud, donde se enmarca la importancia del sector educativo y su participación en las políticas de prevención de la enfermedad, mediante la aplicación de pruebas o instrumentos que permitan la identificación del riesgo de eventos de interés en salud pública en la infancia (19).

Uno de los factores que complejiza el estudio preventivo de las ECNT es su actual diagnóstico mediante marcadores fenotípicos como el índice de masa corporal (IMC), el porcentaje de grasa corporal y los niveles plasmáticos de glucosa, lípidos y citosinas proinflamatorias (6), sin embargo, éstas técnicas no ofrecen ninguna pista sobre la etiología o progresión de la enfermedad, ni la probabilidad de desarrollar complicaciones asociadas (20). Además, casi la mitad de los casos permanecen sin diagnosticar, o su diagnóstico ocurre de manera tardía, aumentando el riesgo de daño orgánico (7). Por lo tanto, el manejo del paciente podría mejorarse sustancialmente mediante la adquisición de nuevos biomarcadores capaces de identificar las primeras etapas de la enfermedad (20), logrando enfocar de una manera preventiva las intervenciones para reducir el impacto de las ECNT (21).

Los miRNAs circulantes comprenden una de las clases más abundantes de moléculas reguladoras de genes en organismos multicelulares y probablemente influyen en la producción de muchos genes codificadores de proteínas (7). Se ha demostrado que los miRNAs participan en diversos procesos fisiológicos y patológicos, como la muerte celular, la respuesta al estrés, el metabolismo, la diferenciación celular y la proliferación. Además, son moléculas estables en el líquido extracelular por lo cual son recomendados como biomarcadores para diversas enfermedades (8).

Hasta el momento, los estudios en miRNAs y su asociación a alteraciones metabólicas se han realizado principalmente en adultos, su estudio en niños representa una

oportunidad interesante para identificar biomarcadores de alteraciones metabólicas en etapas tempranas de la vida (22). Siendo los niños una población vulnerable tanto a factores de riesgo como a factores protectivos, se convierten en una población ideal para intervención y abordaje frente a la prevención de ECNT. Por lo cual esta investigación busca establecer el perfil de microRNAs asociados con riesgo de enfermedad cardiovascular y diabetes que se encuentran en plasma en niños de 6 a 10 años.

Surgiendo de esto la pregunta problema de esta investigación:

¿Cuáles microRNAs circulantes asociados a riesgo cardiovascular o riesgo de diabetes se expresan en plasma de niños escolares de 6-10 años con factores de riesgo cardiovascular?

2.0 MARCO CONCEPTUAL

2.1 Enfermedades crónicas no transmisibles

Las enfermedades crónicas, se definen como aquellas que presentan un proceso de evolución prolongado, además de que rara vez alcanzan una cura completa, debido a esto generan una carga económica elevada dado que requieren regímenes de tratamiento costosos y atención individualizada extensa por parte de servicios médicos especializados. Las ECNT generan dependencia social debido a pérdidas de productividad, discapacidad prolongada y aumentos en el gasto en salud y asistencia social, ocasionando un impacto perjudicial en el ingreso nacional, el desarrollo socioeconómico y el crecimiento económico (23, 24).

Los problemas principales en las ECNT (cardiopatía, episodios cerebrovasculares, cáncer, diabetes y enfermedades respiratorias crónicas) son causados por factores de riesgo como la hipertensión, glucosa sanguínea elevada, hiperlipidemia, y sobrepeso u obesidad, siendo esto resultado de hábitos alimenticios no saludables, sedentarismo, consumo de tabaco y alcohol (23).

2.2 Factores de riesgo

Existen factores de riesgo, considerados en algunos casos precursores, o estadios iniciales de las ECNT. En este grupo se encuentran la hipertensión arterial sistémica, hipercolesterolemia, tabaquismo, hiperglucemia y obesidad (25). Algunos estudios prospectivos con análisis multivariado han demostrado que la obesidad aumenta el riesgo de padecer enfermedad cardiovascular, enfermedad coronaria y accidente vascular encefálico. Por otro lado, la obesidad también predispone a factores de riesgo como resistencia a la insulina, hipertensión arterial y dislipidemia (26).

Resistencia a la insulina

La resistencia a la insulina se define como una condición clínica en la que la insulina realiza su función biológica de manera deficiente debido a defectos en la captación de glucosa, particularmente en la síntesis de glucógeno y, en menor medida, a la oxidación deficiente de la glucosa (27). Adicional a esto, causa un deterioro en el catabolismo de ácidos grasos en los músculos esqueléticos, inhibiendo la actividad de la lipoproteína lipasa de los adipocitos, generando liberación de ácidos grasos libres (AGL) y citoquinas inflamatorias como la IL-6, el TNF α y la leptina (27).

La resistencia a la insulina genera disfunción de las células endoteliales disminuyendo la producción de óxido nítrico y aumentando la liberación de factores que conducen a la agregación plaquetaria desencadenando aterosclerosis (28). En relación con los factores externos, un aumento de ácidos grasos libres producido por la obesidad podría desencadenar resistencia a la insulina a través de la acumulación de lípidos, activando una Protein Kinasa C (PKC) atípica que inhibe la señalización de la insulina y la captación de glucosa estimulada por ésta (28).

Hipertensión arterial

La hipertensión suele definirse por la presencia de una elevación crónica de la presión arterial sistémica por encima de un determinado valor umbral. Sin embargo, cada vez más evidencia indica que el riesgo cardiovascular (CV) asociado con la elevación de la presión arterial (PA) por encima de aproximadamente 115/75 mmHg aumenta de forma lineal (29). Actualmente la hipertensión se considera un síndrome CV progresivo cuya progresión está fuertemente asociada con anomalías cardíacas, vasculares y estructurales que generan daños en el corazón, los riñones, el cerebro, la red vascular y otros órganos, conduciendo a morbilidad y muerte prematuras (29).

Si bien se han resaltado otros factores de riesgo para padecer enfermedad cardiovascular (ECV), incluidas las anomalías de los lípidos, el tabaquismo, y la inactividad física, revisiones de estudios prospectivos encontraron que la tensión arterial elevada tiene el mayor efecto sobre la salud de la población y la prevención de su aumento reduciría

sustancialmente las consecuencias vasculares que normalmente se atribuyen al envejecimiento (30).

Dislipidemia

La dislipidemia es una patología de origen multifactorial que es comúnmente asociada con sobrepeso y obesidad, consiste en un aumento de los triglicéridos (TG) y AGL, una disminución de niveles de lipoproteína de alta densidad (HDL-C) y un nivel de lipoproteína de baja densidad (LDL-C) normal o ligeramente mayor (31).

El tratamiento inicial debe estar dirigido a la disminución de peso corporal mediante el aumento del ejercicio y la mejora de los hábitos alimentarios, mediante una reducción de la ingesta calórica total y una menor ingesta de ácidos grasos saturados. El tratamiento farmacológico puede iniciarse si los cambios en el estilo de vida son insuficientes (31).

Los datos clínicos y científicos de las últimas décadas respaldan una asociación entre la dislipidemia pediátrica y otros factores de riesgo de ECV y las lesiones tempranas de aterosclerosis en la adolescencia y la edad adulta (32). En infantes la dislipidemia representa un desafío particular, debido a los efectos del tratamiento farmacológico sobre el desarrollo sexual y otras afecciones médicas. Sin embargo, si se inicia el tratamiento en una edad temprana se pueden disminuir el riesgo de ECV en edad adulta (32).

2.3 Evaluación del riesgo de padecer enfermedad cardiovascular

El riesgo cardiovascular es definido como la probabilidad de padecer un evento cardiovascular en un determinado período de 5 o 10 años (33). Esto incluye enfermedad cerebrovascular y arterial periférica. Generalmente se estratifica y cuantifica por el médico familiar, en prevención primaria, con el objetivo de establecer el tipo de intervención y el seguimiento para cada paciente (33).

Existen dos clases de metodologías para evaluar el riesgo cardiovascular: Los métodos cualitativos se basan en sumar los niveles de factores de riesgo y clasificar al individuo en: riesgo leve, moderado, alto y muy alto (33). Los cuantitativos, por su parte, están basados en ecuaciones de predicción de riesgo mediante la utilización de la regresión logística, en la que, conociendo los valores de diferentes factores de riesgo, nos sugiere la probabilidad de presentar un evento cardiovascular en un tiempo

determinado, y la forma de calcularlo es a través de programas informáticos específicos (33).

La hipertensión arterial (HTA) se ha identificado como el principal factor de riesgo global para mortalidad, a su vez es el factor de riesgo modificable más importante para las enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares y renales, siendo un desafío importante para la salud pública en todo el mundo debido a su alta prevalencia (34). Incluir un párrafo con enfoque hacia población infantil.

En la infancia se desencadenan los diferentes procesos de la enfermedad cardiovascular y están influenciados durante todo el curso de la vida por factores genéticos, sexo, etnia, así como por otros factores de riesgo potencialmente modificables, como la exposición ambiental, que incluye alimentación, actividad física, sobrepeso y obesidad (33). La obesidad en la niñez es el predictor más consistente de enfermedad cardíaca en adultos, se presentan cambios en el nivel de riesgo cardiovascular alrededor del percentil 85 del peso corporal en niños, por encima del cual se observan niveles anormales de lípidos sanguíneos (35).

2.3.1 Escalas de riesgo de Framingham

El estudio del corazón Framingham bajo la dirección del National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI), fue un estudio de tipo longitudinal que recogió datos de tres generaciones de participantes desde 1948 a partir de una cohorte de 5209 participantes en la ciudad de Framingham, Massachusetts, recogiendo datos de los principales factores de riesgo de Enfermedad Cardiovascular (ECV), como presión arterial, niveles de lípidos sanguíneos, edad, sexo y factores psicosociales (36).

A partir de este seguimiento y el análisis estadístico de todos los datos recolectados se establecieron escalas de riesgo para diversas enfermedades metabólicas, a continuación, se describen algunas de ellas.

Escala de riesgo de enfermedad cardiovascular

La escala de riesgo cardiovascular a 10 años de Framingham está basada en el estudio del 2008 de D'agostino RB y colaboradores (37), esta escala tiene como resultado

el nivel de riesgo de padecer enfermedad cardiovascular aterosclerótica (muerte coronaria, infarto de miocardio, insuficiencia coronaria, angina, infarto isquémico, infarto hemorrágico, ataque isquémico transitorio, enfermedad arterial periférica, falla cardíaca) en los siguientes 10 años.

Los autores plantean que este instrumento tendría utilidad de predicción para un seguimiento máximo 12 años, en una población entre 30 a 74 años, sin antecedentes de enfermedad cardiovascular. En las tablas 2.1 y 2.2 se muestra los puntajes establecidos para cada sexo y cada factor de riesgo. La sumatoria de estos puntajes individuales generan un valor que estima el porcentaje de aumento de riesgo de padecer ECV, estos valores están descritos en las tablas 2.3 y 2.4.

Tabla 2.1 Puntaje para riesgo cardiovascular en mujeres

Puntos	Edad, años	HDL	Colesterol total	HTA No tratada	HTA Tratada	Fumador	Diabético
-3				<120			
-2		60+					
-1		50-59			<120		
0	30-34	45-49	<160	120-129		No	No
1		35-44	160-199	130-139			
2	35-39	<35		140-149	120-129		
3			200-239		130-139	Yes	
4	40-44		240-279	150-159			Yes
5	45-49		280+	160+	140-149		
6					150-159		
7	50-54				160+		
8	55-59						
9	60-64						
10	65-69						
11	70-74						
12	75+						
Total							

HTA, Hipertensión Arterial Sistólica.

Tabla 2.2 Puntaje para riesgo cardiovascular en hombres

Puntos	Edad, años	HDL	Colesterol total	HTA No tratada	HTA Tratada	Fumador	Diabético
-2		60+		<120			
-1		50-59					
0	30-34	45-49	<160	120-129	<120	No	No
1		35-44	160-199	130-139			
2	35-39	<35	200-239	140-159	120-129		
3			240-279	160+	130-139		Yes
4			280+		140-159	Yes	
5	40-44				160+		
6	45-49						
7							
8	50-54						
9							
10	55-59						
11	60-64						
12	65-69						
13							
14	70-74						
15	75+						
Total							

HTA, Hipertensión Arterial Sistólica.

Tabla 2.3 Riesgo cardiovascular total en mujeres

Puntos	Riesgo, %
≤ -2	<1
-1	1.0
0	1.2
1	1.5
2	1.7
3	2.0
4	2.4
5	2.8
6	3.3
7	3.9
8	4.5
9	5.3
10	6.3
11	7.3
12	8.6
13	10.0
14	11.7
15	13.7
16	15.9
17	18.5
18	21.5
19	24.8
20	28.5
21+	>30

Tabla 2.4 Riesgo cardiovascular total en mujeres

Puntos	Riesgo, %
≤ -3 o menos	<1
-2	1.1
-1	1.4
0	1.6
1	1.9
2	2.3
3	2.8
4	3.3
5	3.9
6	4.7
7	5.6
8	6.7
9	7.9
10	9.4
11	11.2
12	13.2
13	15.6
14	18.4
15	21.6
16	25.3
17	29.4
18+	>30

Escala de riesgo de diabetes

La escala de riesgo de aparición de diabetes en los próximos 8 años de Framingham está basada en el estudio publicado en el 2007 por Wilson PW y colaboradores, donde los investigadores plantean un tiempo de seguimiento de 7 años y una población de interés de 45 a 64 años (37, 38).

La tabla 2.5 muestra el puntaje establecido para cada variable con miras a establecer el riesgo de diabetes en población adulta y la tabla 2.6 muestra un porcentaje aproximado de riesgo teniendo en cuenta la sumatoria de la tabla 2.5.

Tabla 2.5 Puntaje para riesgo de diabetes en población adulta

Variable	Puntos
Nivel de glucosa en ayunas 100-126 mg/dL	10
IMC 25.0-29.9	2
IMC >30.0	5
HDL-C <40 mg/dL en hombres o <50 mg/dL en mujeres	5
Antecedente familiar de diabetes mellitus	3
Triglicéridos >150 mg/dL	3
Tensión Arterial >130/85 mmHG o en tratamiento	2

IMC, Índice de Masa Corporal

Tabla 2.6 Porcentaje de riesgo de diabetes en población adulta

Total de puntos	Riesgo en 8 años, %
≤10	< 3
11	4
12	4
13	5
14	6
15	7
16	9
17	11
18	13
19	15
20	18
21	21
22	25
23	29
24	33
≥ 25	> 35

2.4 Evaluación del riesgo cardiovascular en infantes

En una revisión sistemática publicada en el año 2021 en la revista *journals of pediatrics* (39), recogieron los datos de 210 estudios prospectivos que relacionaron factores de riesgo en infancia con enfermedades cardiovasculares en la adultez, encontrando evidencia bastante consistente para exposiciones como la adiposidad infantil, la hipertensión y la hiperlipidemia, sin embargo, los autores refieren que aún existen brechas significativas en la comprensión de cómo la salud y los comportamientos infantiles se traducen en el riesgo de ECV en la edad adulta.

Actualmente, no hay un consenso sobre los puntos de corte a tener en cuenta para establecer una variable como potencial riesgo cardiovascular, adicional a esto, no hay una escala que evalúe un riesgo de padecer una ECV de forma global a diferencia con las escalas de Framingham en población adulta, sin embargo, dos de los criterios más utilizados para evaluar criterios de riesgo en población infantil se describen en la tabla 2.7

Tabla 2.7 Variables de riesgo cardiovascular infantil

Variable	IDF 10-16 años	Cook et al.
Obesidad central	CC $\geq$ P90	CC $\geq$ P90
Hipertensión	PAS $\geq$ 130 mmHg o PAD $\geq$ 85 mmHg o tratamiento con medicación	PA $\geq$ P90
Hipertrigliceridemia	TG $\geq$ 150 mg/dL	TG $\geq$ 110 mm/Hg
HDL bajo	HDL $<$ 40 mg/dL	HDL $<$ 40 mg/dL
Glucosa elevada	Glucosa $\geq$ 100 mg/dL o diagnóstico de DM2	Glucosa $\geq$ 100 mg/dL

IDF; Federación Internacional de Diabetes; CC, Circunferencia de cintura; PAS, Presión arterial sistólica; PAD, Presión arterial diastólica; TG, triglicéridos.

2.5 Biomarcadores de riesgo

Son parámetros biológicos que dan información acerca del estado de un individuo o una población (normal o patológico), y son utilizados para comprender diferentes enfermedades en aspectos como: tratamiento, prevención, diagnóstico y progresión de la enfermedad (40).

El término “biomarcador” se utiliza para evaluar la interacción entre un sistema biológico y un agente de tipo químico, físico o biológico, siendo una respuesta funcional o fisiológica, que ocurre a nivel celular o molecular, y que se encuentra asociada con la probabilidad de desarrollar cierta enfermedad (40).

En la actualidad, la predicción para el desarrollo de una enfermedad metabólica, se basa principalmente en la medición de los parámetros séricos accesibles, como la glucosa, los triglicéridos, el colesterol, las lipoproteínas y los niveles de glucosa / insulina después de las pruebas de tolerancia, y la hemoglobina glucosilada HbA1c (41).

En los últimos años se han desarrollado investigaciones encaminadas en encontrar biomarcadores alternativos a los tradicionales, algunos relacionados con los procesos inflamatorios encontrados en éstas patologías, entre los más conocidos se encuentran la PCR, el TNF- α y la IL-6 los cuales se han asociado positivamente con la adiposidad, la resistencia a la insulina y otros factores de riesgo de ECV (41).

Diferentes organizaciones de salud sugieren el uso de las mediciones antropométricas, como el IMC y la circunferencia de la cintura (CC), para identificar el riesgo metabólico relacionado con la obesidad en población infantil (42). Estas mediciones no invasivas se pueden obtener en casi todos los sujetos de manera simple y precisa; por lo cual se podrían generar tamaños de muestra más altos, sin aumentar los costos, brindando información significativa relacionada con el riesgo metabólico en la población pediátrica (42).

Por otro lado, la actividad física en los jóvenes mejora la condición física relacionada con la salud (CFRS), afectando su riesgo metabólico (42). Diferentes estudios encuentran niveles bajos de aptitud cardiorrespiratoria y musculo-esquelética en adolescentes con sobrepeso y obesidad en comparación con sus compañeros de peso normal, reportado

asociaciones con el riesgo de enfermedad cardio-metabólica, salud mental, cognición y salud ósea. La evidencia muestra que una baja condición física relacionada con la salud (CFRS) en la infancia y adolescencia está significativamente relacionada con la mortalidad prematura en la edad adulta (43).

2.6 Condición Física Relacionada con la Salud

La condición Física Relacionada con la Salud (CFRS) es la habilidad que tiene una persona para realizar actividades de la vida diaria con vigor, así como aquellos atributos y capacidades que se asocian con un menor riesgo de enfermedades crónicas y muerte prematura, entre los cuales se encuentran: la capacidad aeróbica, la capacidad músculo-esquelética, la capacidad motora y la composición corporal (44). Tanto la capacidad musculo-esquelética como la cardiorrespiratoria son importantes marcadores de salud en niños y adolescentes, por ello, es importante su valoración desde la edad preescolar y también en la edad escolar (45).

En escolares la evaluación de la CFRS se realiza mediante una batería o un conjunto de pruebas de campo que evalúan los diferentes componentes de CFRS. Esta metodología tiene la ventaja de evaluar a varios sujetos simultáneamente, por lo que consume poco tiempo, es segura, de fácil aplicación y además de ser de bajo costo (46).

Una de las metodologías más utilizada para establecer la condición física relacionada con la salud es la batería ALPHA-Fitness la cual fue desarrollada por Ruiz y colaboradores (44) después de una extensa revisión de la literatura científica y de estudios metodológicos sobre validez, fiabilidad, viabilidad y seguridad de las pruebas de condición física. La figura 2.1, muestra la batería ALPHA-Fitness basada en la evidencia y las pruebas incluidas en esta.

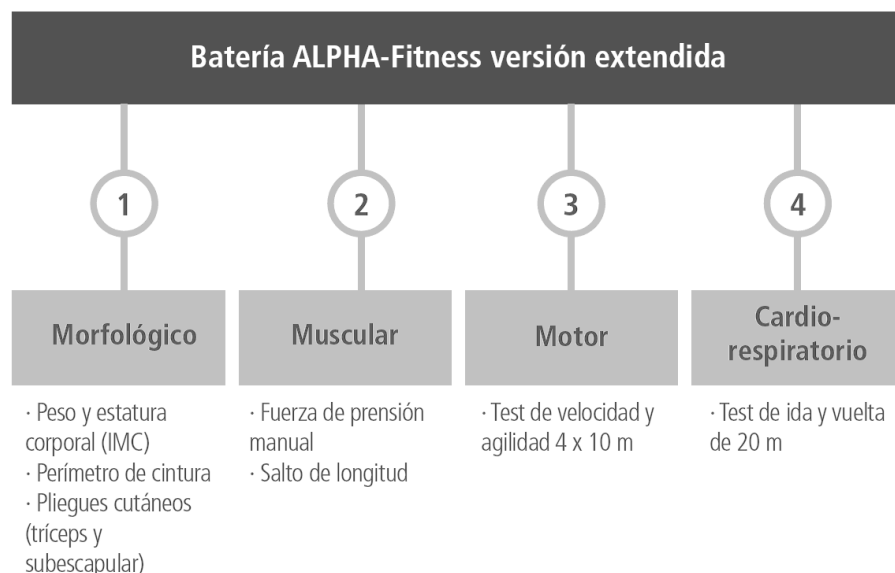


Figura 2.1 Batería Alpha-Fitness versión extendida (47).

El componente inicial de la batería tiene un enfoque antropométrico, evaluando variables como el índice de masa corporal, el perímetro de cintura y los pliegues cutáneos, que nos permiten estimar la presencia de alteraciones como sobrepeso, obesidad y porcentaje de grasa elevado, los cuales han sido relacionados en múltiples estudios con alteraciones cardio-metabólicas en la adultez (13-15, 35, 39).

Otras de las pruebas incluidas en la batería ALPHA-Fitness son: el test de ida y vuelta de 20 metros validado para evaluar la capacidad aeróbica, la cual se asoció con un mejor perfil cardiovascular en la adultez (44). La fuerza de prensión manual, el salto a pies y el test de velocidad y agilidad son test válidos para evaluar la capacidad musculoesquelética que se relacionó con menor acumulación de masa grasa, un mejor perfil cardio-metabólico en la adultez, además de un menor riesgo de muerte prematura (44).

2.7 RNAS no codificantes

A partir del genoma humano se realizan decenas de miles de transcripciones de moléculas de RNA tanto largas como pequeñas que no codifican proteínas, la función de estas moléculas ha sido estudiada y se ha sugerido que estas regiones del genoma podrían jugar un papel importante en la fisiología de humanos y mamíferos. Las funciones biológicas de los RNA pequeños no codificantes comenzaron a emerger a un ritmo rápido después de que se descubrió el papel de estos RNA en el silenciamiento de genes.

Los RNA pequeños no codificantes (ncRNA) contienen entre 20 y 30 nucleótidos y son componentes centrales del proceso de interferencia del mRNA (RNAi). Los RNA pequeños no codificantes se pueden agrupar en tres categorías principales según su longitud y síntesis: pequeños RNA de interferencia (siRNA), microRNA (miRNA) y RNA que interactúan con Piwi (piRNA). Al servir como guías para el reconocimiento de RNA diana, estas moléculas juegan un papel clave en la modulación de la expresión génica (48).

2.8 MicroRNAs

Los miRNAs fueron descubiertos en 1993 por Lee y colaboradores en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*. En estos organismos, se encontró que la regulación a la baja de la proteína LIN-14 es esencial para el desarrollo larvario. Además, se descubrió que la regulación a la baja de LIN-14 depende de la transcripción de un segundo gen llamado *lin-4*. Curiosamente, el *lin-4* transcrito no se tradujo en una proteína biológicamente activa, en cambio, dio lugar a 2 RNA pequeños de aproximadamente 21 y 61 nucleótidos de longitud (49).

Tiempo después encontraron que el RNA más pequeño tenía complementariedad anti-sentido con múltiples sitios del mRNA de *lin-14*. La unión entre estas regiones complementarias disminuyó la expresión de la proteína LIN-14 sin causar ningún cambio significativo en sus niveles de mRNA. Se pensó por primera vez que este nuevo modo de regular la expresión génica era un fenómeno exclusivo de *C. elegans*, sin embargo, posteriormente se descubrieron homólogos de *let-7* en muchos otros organismos, entre ellos humanos, en los cuales se secuenciarían muchos otros miRNAs en años posteriores (50).

Los miRNA (miRNA) son una clase de RNA pequeños (~ 19-24 nucleótidos), endógenos, que se han conservados evolutivamente y que funcionan como reguladores postranscripcionales de la expresión génica (8). Funcionan principalmente uniéndose a secuencias diana complementarias en el RNA mensajero (mRNA) e interfiriendo con la maquinaria de traducción, previniendo o alterando así la producción de la proteína. Los estudios de seguimiento también revelaron que, además de reprimir la traducción, la unión del miRNA a su mRNA diana también desencadenó el reclutamiento y la asociación

de factores de descomposición del mRNA, lo que condujo a la desestabilización, degradación y disminución del mRNA resultante en los niveles de expresión (51). Los miRNAs son altamente específicos para la regulación génica, y las alteraciones en la expresión de estas moléculas implican la desregulación de procesos biológicos importantes, que a menudo son la causa de la enfermedad. Además de esto, los miRNAs están presentes en suero o plasma en una forma notablemente estable, soportando incluso ciclos repetitivos de congelación / descongelación, y se encuentran protegidos contra RNAsas (43). Estos perfiles de expresión de miRNAs que se han demostrado en múltiples investigaciones, los han propuesto como biomarcadores novedosos, simples, económicos y altamente sensibles para la detección temprana, clasificación, pronóstico y predicción de muchas enfermedades metabólicas (52, 53).

Síntesis de miRNAs y regulación de expresión de genes

Los genomas complejos codifican cientos de miRNAs; por ejemplo, el genoma humano tiene más de 1000 zonas de miRNAs los cuales son transcritos por la RNA polimerasa II (Pol II), o en ocasiones por RNA polimerasa III, para producir los transcritos de miRNAs primarios (pri-miRNAs) (54).

El primer paso en la maduración de los miRNAs es el rompimiento nuclear del pri-miRNA, el cual se corta por los dos dominios de Drosha mediado por el sistema microprocesador, teniendo como resultado el miRNA precursor (pre-miRNA), con una longitud de 60 a 100 nts y con un saliente característico de dos nucleótidos en el extremo terminal 3'. Una vez que el pre-miRNA ha sido exportado al citoplasma la enzima Dicer de la RNasa III junto con sus cofactores corta el pre-miRNA en un dúplex mediante la eliminación de la horquilla pre-miRNA (figura 2.2) (55). Posteriormente, la cadena guía de miRNA madura se carga en el RISC, y el complejo miRNA / RISC está listo para hibridar con el mRNA objetivo (56).

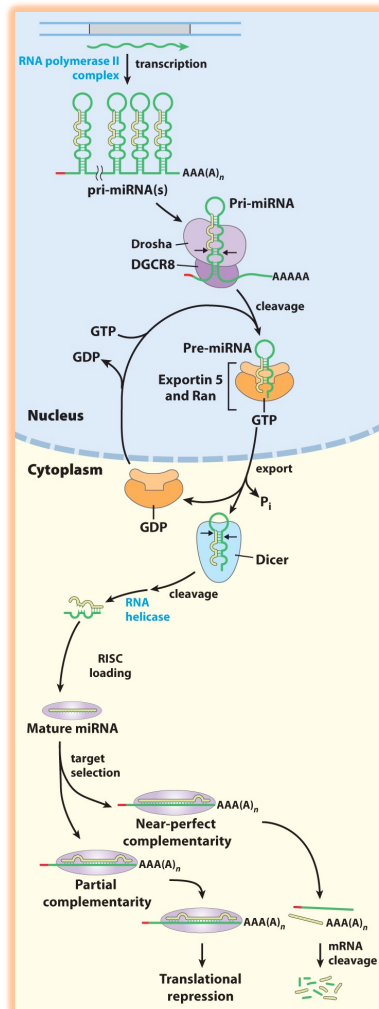


Figura 2.2 Síntesis y maduración de los microRNAs. El transcrito primario (pri-miRNA) es un RNA de mayor longitud. El proceso de su maduración está a cargo principalmente de Drosha y Dicer, dos endoribonucleasas de la familia de la RNasa III. En el núcleo ocurre la reducción del pri-miRNA hasta precursor de miRNA (pre-miRNA) de unos 70 a 80 nucleótidos de longitud, esta reducción se produce por la acción de Drosha y DGCR8. A continuación el pre-miRNA se exporta al citoplasma mediante la formación de un complejo con las proteínas exportina-5 y con la GTPasa Ran. En el citoplasma, Ran hidroliza el GTP y libera la exportina-5 y el pre-miRNA. El pre-miRNA es modificado por DICER para producir un miRNA casi maduro, posteriormente una RNA helicasa completa el proceso de maduración y el miRNA maduro es incorporado a un complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) el cual se une al mRNA diana. Si la complementariedad entre el miRNA y el mRNA es casi perfecta, el mRNA es cortado y degradado. Si la complementariedad es solo parcial el complejo bloquea la traducción del mRNA diana. DGCR8, Región Crítica 8 del síndrome de DiGeorge; GDP, Guanosín Difosfato; GTP, Guanosín Trifosfato; RISC, Complejo de Silenciamiento inducido por RNA. Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2017). Figura tomada de: Lehninger principles of biochemistry (7th ed.). W.H. Freeman.

Los miRNA se reclutan para el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), y suprime la expresión de genes codificantes de proteínas en el nivel pos-transcripcional dirigiendo la represión de la traducción, la desestabilización del mRNA o una combinación de los dos (53, 57).

Con el objetivo de regular la expresión génica los miRNAs se unen a la cadena de mRNA mediante una complementación imperfecta, bloqueando la expresión del gen diana mediante el silenciamiento de la traducción, o mediante complementación perfecta generando la degradación del gen (Figura 2.3) (56, 58).

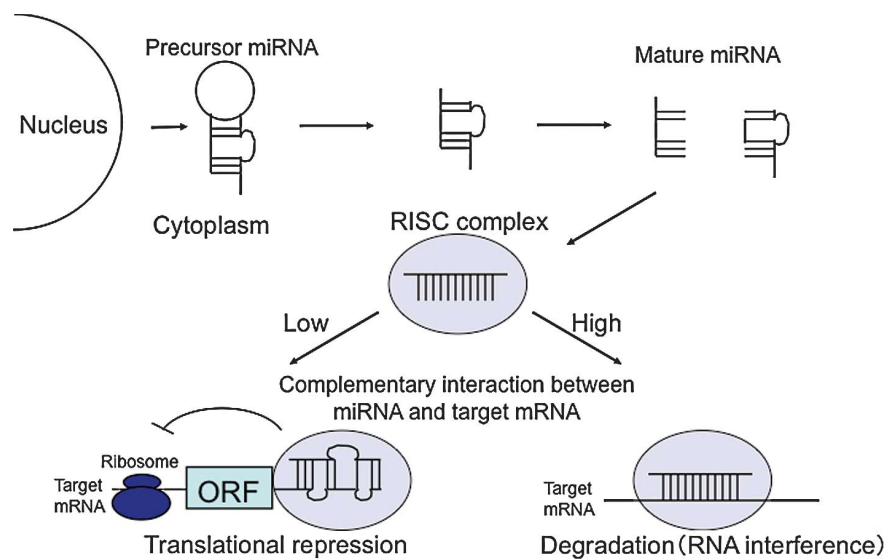


Figura 2.3 Producción de los microRNAs y regulación de la expresión de genes. El miRNA maduro se incorpora al complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), el cual reconoce al mRNA diana utilizando el miRNA como guía e inhibiendo la traducción del mRNA o generando su degradación. La degradación ocurre cuando el miRISC tiene una alta complementariedad con el mRNA, mientras que la inhibición de la traducción del mRNA ocurre cuando la interacción miRISC / mRNA tiene una complementariedad relativamente baja. RISC, Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA. Yanokura, M., Banno, K., Kobayashi, Y., Kisu, I., Ueki, A., Ono, A., Aoki, D. (2010). MicroRNA and endometrial cancer: Roles of small RNAs in human tumors and clinical applications (Review). *Oncology Letters*, 1, 935-940. <https://doi.org/10.3892/ol.2010.173>

En estudios en animales, se ha encontrado que es más común que los miRNAs afecten las transcripciones a través de un emparejamiento de bases imperfecto a múltiples sitios en regiones 3' no traducidas (UTR). Los híbridos de miRNA-mRNA imperfectos con protuberancias centrales (nucleótidos 9-12) permiten la inhibición de la traducción(59).

Se piensa que la multiplicidad del sitio objetivo aumenta el grado de represión realizado por los miRNAs, con lo cual podrían tener cientos de transcripciones objetivo cada uno, debido a los pocos requisitos de apareamiento de bases que tienen (59).

Los miRNAs en los últimos años se han asociado con diversas funciones metabólicas y endocrinas como la muerte celular, la respuesta al estrés, el metabolismo energético, o la diferenciación y proliferación celular (50, 60, 61). Además, sus niveles de expresión alterados se relacionaron con patologías como obesidad (62), diabetes (63), hipertensión (64) o enfermedad cardiovascular (20, 65).

2.9 miRNAs asociados con metabolismo energético y enfermedades crónicas

Los niveles plasmáticos de los miRNAs miR-122 y miR-33 aumentan en pacientes con hiperlipidemia, y se han asociado con ECV (66, 67). Investigaciones recientes *in vitro* sugieren que su expresión a su vez afecta directamente la diferenciación de los adipocitos (66). Del mismo modo se demostró que miR-33 tiene una función en el metabolismo de los ácidos biliares, la respuesta inflamatoria, la señalización de la insulina y la homeostasis de la glucosa (67, 68).

Los miRNAs miR-193b y miR-126 también se han asociado a obesidad, debido a que reprimen la expresión de la citocina inflamatoria CCL2 en adipocitos blancos humanos, cuyos niveles están aumentados en la obesidad (9). En una revisión sistemática realizada en el marco de la presente investigación se encontraron en población adulta diferentes miRNAs asociados con síndrome metabólico y las diferentes alteraciones incluidas en su diagnóstico (Material suplementario 1). En la tabla 2.8 se muestran los principales hallazgos.

Tabla 2.8 miRNAs asociados con síndrome metabólico en adultos

MicroRNA	Componentes del Smet ($p < 0,05$)	Autores que lo reportaron
<i>miR-505-5p</i>	HPT, TG, OB	Raitoharju 2014, McManus 2017
<i>miR-148a-3p</i>	IR	Raitoharju 2014, McManus 2017
<i>miR-19b-3p</i>	IR, HPT	Raitoharju 2014, Shah 2017
<i>miR-320b</i>	IR, OB, HDL	McManus 2017, Shah 2017
<i>miR-342-3p</i>	IR, TG, OB	Raitoharju 2014, McManus 2017, Shah 2017
<i>miR-197-3p</i>	IR, HPT, TG, OB	McManus 2017, Shah 2017
<i>miR-122-5p</i>	IR, HPT, TG, OB, HDL	Shah 2017, Guo 2019, Hess 2020, Trzybulska 2017
<i>miR-103</i>	IR, HPT, TG, HDL	Karolina 2012, Chen 2016
<i>miR-130a</i>	IR, HPT	Karolina 2012, Marques-Rocha 2016
<i>miR-155-5p</i>	IR, TG	McManus 2017, Trzybulska 2017
<i>miR-375</i>	IR, OB, HDL	McManus 2017, Ramzan 2020

IR, Resistencia a la insulina; HPT, Hipertensión; TG, Triglicéridos; OB, Obesidad; HDL, lipoproteína de alta densidad.

MicroRNAs y alteraciones metabólicas en niños:

Diversos miRNAs se han empezado a asociar con alteraciones metabólicas que inician en edades tempranas. En una revisión sistemática publicada en el 2019 por Oses M. y colaboradores se encontró que la expresión de los miR-222, miR-142-3, miR-140-5p, y miR-143 estaba alterada en niños y adolescentes entre 3 y 19 años con obesidad (62). En otro investigación, Cui X. y colaboradores hallaron una expresión elevada de los miRNAs: miR-486, miR-146b y miR-15b tanto en niños obesos como en pacientes adultos con diabetes mellitus tipo II, lo cual sugiere que el aumento de este perfil de miRNAs en la infancia podría indicar un riesgo futuro de diabetes en la adultez (69). En un estudio realizado por Ibrahim A. y colaboradores en 120 niños y adolescentes con diabetes mellitus tipo I (DM1) se encontraron alteraciones en los perfiles de expresión del miR-34a exosómico, que, además, presentaba una asociación con marcadores de disfunción endotelial y dislipidemia (70).

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Identificar los miRNAs asociados a riesgo cardiovascular y a diabetes que se expresan en plasma de escolares de 6 a 10 años de la ciudad de Cali.

3.2 Objetivos específicos

- Medir los niveles de expresión de los miRNAs que han sido previamente asociados con enfermedad cardiovascular y diabetes en plasma de escolares de 6 a 10 años de la ciudad de Cali.
- Establecer el perfil de expresión diferencial de miRNAs asociados a riesgo cardiovascular y diabetes entre niños con bajo y alto riesgo cardiovascular.
- Establecer los posibles RNAs mensajeros diana y rutas metabólicas reguladas por los miRNAs que tengan expresión diferencial entre niños con bajo y alto riesgo cardiovascular.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Diseño

Se realizará un estudio descriptivo de corte transversal

4.2 Población

La selección de sujetos para este estudio se realizó a partir de la población de niños entre 6 y 10 años pertenecientes a instituciones educativas públicas de la Ciudad de Cali que participaron del estudio *“Riesgo cardiovascular, condición física relacionada con la salud y su relación con la expresión de microRNAs en población escolar: aproximación a una herramienta diagnóstica para la prevención temprana desde al aula”* realizado por Mosquera M. y cols” el cual cuenta con el aval del Comité Institucional de Revisión de Ética Humana (CIREH) de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle incluyendo el uso secundario de muestras y datos para otros estudios (Acta de aprobación 008-018).

Los niños incluidos en este estudio cumplieron con los siguientes criterios:

- Edad entre 6 y 10 años.
- Sin ningún tipo de diagnóstico de patologías que afecten las capacidades motrices propias para su edad.
- Niños que no presenten algún tipo de discapacidad que les impida realizar las pruebas físicas.
- Que se encuentren matriculados en las instituciones educativas oficiales de la ciudad de Cali.
- Que sus representantes legales acepten la participación y firmen el consentimiento informado y el niño el asentimiento.

4.3 Muestra

En esta investigación se realizaron muestras de sangre las cuales fueron tomadas después de 12 horas de ayunas, a cada participante se le extrajeron 5 mL de sangre, usando tubos vacutainer con anticoagulante EDTA-K2. y las muestras fueron almacenadas a 4° C; la separación del plasma se realizó dentro de los siguientes 30 minutos por medio de centrifugación a 4000 rpm/10 min a 4° C, las muestras de plasma fueron alicuotadas y almacenadas a -80°C hasta su posterior procesamiento.

La muestra de plasma se separó en 4 alícuotas en una de las cuales se midió Colesterol total (CT), Triglicéridos (TG), Colesterol HDL (C-HDL) y Glucosa en mg/dl, usando el autoanalizador A15 de Biosystems®, Reagents & Instruments (Barcelona-España) con métodos enzimáticos-colorimétricos y reactivos de Biosystems®. Para el cálculo de Colesterol VLDL y Colesterol LDL, se utilizaron las ecuaciones de Friedewald: $C\text{-VLDL} = TG/5$ y $C\text{-LDL} = CT - C\text{-HDL} - VLDL$.

Para la selección de la muestra se estableció una clasificación de riesgo cardiovascular y diabetes basada en el puntaje de riesgo de Framingham tanto para riesgo de sufrir enfermedad cardiovascular (37), como para riesgo de padecer diabetes (38), esto con el fin de establecer perfiles de miRNAs asociados a las patologías nombradas anteriormente. Los criterios de puntaje para cada tipo de riesgo se muestran en las tablas 4.1 y 4.2.

Esta escala de riesgo fue aplicada a los 310 sujetos correspondientes a la población evaluada por Mosquera M. y cols. Se realizó una sumatoria de ambos puntajes y se seleccionaron los 30 sujetos con mayor riesgo (> Percentil 75) y los 30 con menor nivel de riesgo (< Percentil 25) de los cuales se seleccionaron de manera aleatoria simple 16 muestras para cada nivel de riesgo.

Tabla 4.1 puntuación de riesgo de padecer diabetes en población infantil

VARIABLE	PUNTOS
HOMA-IR	10
Perímetro de Cintura	3
% Grasa	2
IMC	2
HDL-C	5
Triglicéridos	3
Tensión Arterial	2
Capacidad aeróbica	1
Capacidad muscular	1

Se otorgó el puntaje a los participantes que estuvieran por encima del P90 para cada variable según sexo y edad. HOMA-IR; modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina, IMC; índice de Masa Corporal, HDL-C; colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad.

Tabla 4.2 puntuación de riesgo cardiovascular en población infantil

VARIABLE	PUNTOS
Colesterol < 160	0
Colesterol 160-199	4
Colesterol 200-239	7
Colesterol 240-279	9
Colesterol $\geq$ 280	11
HDL-c $\geq$ 60	-1
HDL-c 50-59	0
HDL-c 40-49	1
HDL-c<40	2
Tensión sistólica < 120	0
Tensión sistólica 120-129	0
Tensión sistólica 130-139	1
Tensión sistólica 140-159	1
Tensión sistólica $\geq$ 160	2

HDL-C; colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad.

4.4 Cuantificación de microRNAs

La extracción de RNA se realizó a partir de una alícuota de plasma de 400 µl, usando el kit miRNeasy Serum/Plasma (Quiagen®) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, brevemente, se añadió QIAzol a las muestras de plasma para realizar la fase de lisis celular, además, se adicionó el control Spike-In cel-miR-39. Posteriormente se realizó una separación por fases con la adición de cloroformo y extrayendo la fase acuosa resultante a un tubo eppendorf de 1.5mL al cual se le agregó etanol al 100% para precipitar los ácidos nucleicos. Inmediatamente se transfiere a una columna de extracción donde se realizan varios pasos de centrifugación y lavado con diferentes buffers incluidos en el kit comercial. Se evaluó la concentración y la calidad del RNA por medio del espectrofotómetro NanoDrop 2000.

La medición de miRNAs se realizó por medio de PCR en tiempo real usando el termociclador LightCycler® 480 Instrument II (Roche). Esta determinación se ejecutó por medio de dos pasos, inicialmente el RNA fue convertido a cDNA usando el kit miScript II RT (Quiagen®), para esto se realizó un MasterMix utilizando los reactivos: 5X miScript Buffer HiSpec, 10X miScript Nucleic Mix, Agua libre de RNasas y miScript Reverse Transcriptase Mix y se adicionó con la mezcla en tubos eppendorf de 0.5 mL. La PCR se realizó en el termociclador Benchmark TC9639, al obtener el cDNA se normalizó la concentración de las muestras en 10 ng/µL.

La determinación de los perfiles de expresión de miRNA se realizaron usando los arreglos pathway-focused miScript miRNA PCR array (Quiagen®) diseñados para evaluar 168 microRNAs de enfermedades cardiovasculares y diabetes. Para esto se realizó un mix añadiendo: 2x QuantiTect® SYBR Green PCR Master Mix, 10x miScript Universal Primer, Agua libre de RNasa y la muestra de cDNA. Posteriormente se sirvieron los arreglos adicionando 10 µL en cada poso. La distribución de los diferentes miRNAs en los arreglos se muestran en las figuras 4.1 y 4.2.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	hsa-let-7e-5p		hsa-let-7f-5p		hsa-let-7i-5p		hsa-miR-1-3p		hsa-miR-103a-3p		hsa-miR-107		hsa-miR-125a-5p		hsa-miR-125b-5p		hsa-miR-126-5p		hsa-miR-127-3p		hsa-miR-129-2-3p		hsa-miR-129-5p	
C	hsa-miR-130a-3p		hsa-miR-130b-3p		hsa-miR-133a-3p		hsa-miR-133b		hsa-miR-135b-5p		hsa-miR-143-3p		hsa-miR-146a-5p		hsa-miR-148a-3p		hsa-miR-150-5p		hsa-miR-152-3p		hsa-miR-15b-5p		hsa-miR-183-5p	
D	hsa-miR-184		hsa-miR-185-5p		hsa-miR-190a-5p		hsa-miR-193a-3p		hsa-miR-194-5p		hsa-miR-195-5p		hsa-miR-196b-5p		hsa-miR-199a-5p		hsa-miR-19a-3p		hsa-miR-200a-3p		hsa-miR-204-5p		hsa-miR-206	
E	hsa-miR-212-3p		hsa-miR-214-3p		hsa-miR-21-5p		hsa-miR-23a-3p		hsa-miR-23b-3p		hsa-miR-24-3p		hsa-miR-26a-5p		hsa-miR-26b-5p		hsa-miR-27a-3p		hsa-miR-27b-3p		hsa-miR-296-5p		hsa-miR-29a-3p	
G	hsa-miR-29b-3p		hsa-miR-29c-3p		hsa-miR-301a-3p		hsa-miR-30a-5p		hsa-miR-30c-5p		hsa-miR-3121-3p		hsa-miR-320b		hsa-miR-324-3p		hsa-miR-324-5p		hsa-miR-330-5p		hsa-miR-335-5p		hsa-miR-34a-5p	
I	hsa-miR-34c-5p		hsa-miR-361-5p		hsa-miR-365b-3p		hsa-miR-370-3p		hsa-miR-375		hsa-miR-376a-3p		hsa-miR-377-3p		hsa-miR-380-5p		hsa-miR-381-3p		hsa-miR-382-5p		hsa-miR-424-5p		hsa-miR-433-3p	
J	hsa-miR-4458		hsa-miR-4500		hsa-miR-450a-5p		hsa-miR-451a		hsa-miR-4699-3p		hsa-miR-4729		hsa-miR-490-3p		hsa-miR-506-3p		hsa-miR-542-3p		hsa-miR-7-5p		hsa-miR-96-5p		hsa-miR-99b-5p	
K	cel-miR-39-3p		cel-miR-39-3p		SNORD61		SNORD68		SNORD72		SNORD95		SNORD96A		RNU6-6P		miRTC		miRTC		PPC		PPC	
L																								
M																								
N																								
O																								
P																								

Figura 4.1 Arreglo de miRNAs asociados a diabetes: evalúa 84 microRNAs asociados a la enfermedad. miRTC, Controles transcripción reversa; PC, Controles positivos de PCR.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	let-7a-5p		let-7b-5p		let-7c		let-7d-5p		let-7e-5p		let-7f-5p		miR-1		miR-100-5p		miR-103a-3p		miR-107		miR-10b-5p		miR-122-5p	
B																								
C	miR-124-3p		miR-125a-5p		miR-125b-5p		miR-126-3p		miR-130a-3p		miR-133a		miR-133b		miR-140-5p		miR-142-3p		miR-143-3p		miR-144-3p		miR-145-5p	
D																								
E	miR-146a-5p		miR-149-5p		miR-150-5p		miR-155-5p		miR-15b-5p		miR-16-5p		miR-17-5p		miR-181a-5p		miR-181b-5p		miR-182-5p		miR-183-5p		miR-185-5p	
F																								
G	miR-18b-5p		miR-195-5p		miR-199a-5p		miR-206		miR-208a		miR-208b		miR-21-5p		miR-210		miR-214-3p		miR-22-3p		miR-221-3p		miR-222-3p	
H																								
I	miR-223-3p		miR-224-5p		miR-23a-3p		miR-23b-3p		miR-24-3p		miR-25-3p		miR-26a-5p		miR-26b-5p		miR-27a-3p		miR-27b-3p		miR-29a-3p		miR-29b-3p	
J																								
K	miR-29c-3p		miR-302a-3p		miR-302b-3p		miR-30a-5p		miR-30c-5p		miR-30d-5p		miR-30e-5p		miR-31-5p		miR-320a		miR-328		miR-342-3p		miR-365a-3p	
L																								
M	miR-378a-3p		miR-423-3p		miR-424-5p		miR-451a		miR-486-5p		miR-494		miR-499a-5p		miR-7-5p		miR-92a-3p		miR-93-5p		miR-98-5p		miR-99a-5p	
N																								
O	cel-miR-39-3p		cel-miR-39-3p		SNORD61		SNORD68		SNORD72		SNORD95		SNORD96A		RNU6-2		miRTC		miRTC		PPC		PPC	
P																								

Figura 4.2 Arreglo de miRNAs asociados a enfermedad Cardiovascular: evalúa 84 microRNAs asociados a la enfermedad. miRTC, Controles transcripción reversa; PC, Controles positivos de PCR.

Los resultados de los miRNAs fueron comparados entre los dos grupos (menor riesgo vs mayor riesgo), utilizando la herramienta de análisis de datos de Qiagen GeneGlobe Data Analysis (<https://geneglobe.qiagen.com/co/analyze>) recomendada por el fabricante para los resultados obtenidos con arreglos, normalizando con los valores de C_T promedio globales. El software utiliza la ecuación $2^{-\Delta C_t}$ para calcular los valores de Fold Change (FC) (cantidad de cambio en expresión del grupo de riesgo con respecto al grupo control). Los miRNAs con un valor de FC de ± 2 y un valor p de $< 0,1$, fueron seleccionados para los análisis posteriores.

4.5 Análisis informático

Para analizar las interacciones que se podrían producir a partir de aquellos miRNAs que se encontraron significativamente desregulados en infantes con mayor riesgo cardiovascular y de diabetes, realizamos un análisis bioinformático utilizando la herramienta DIANA-miRPath v3.0 (DIANA tools). Esta versión utiliza algoritmos de predicción de objetivos, mediante el uso de interacciones previstas derivadas de DIANA-microT-CDS y TargetScan 6.2, así como más de 600.000 interacciones respaldadas experimentalmente derivadas de DIANA-TarBase v7.0; permitiendo revisar la función del miRNA con soporte experimental en una escala similar a las predicciones *in silico* (71).

En esta investigación el análisis se realizó filtrando inicialmente para TarBase v7.0 o TargetScan como segunda opción, se establecieron las asociaciones se utilizando:

Unión de genes: Este es un método de análisis *a priori* que calcula la unión de genes objetivo por los miRNAs seleccionados y realiza un análisis estadístico de enriquecimiento, el cual identifica vías significativamente enriquecidas con los genes encontrados.

Unión de vías: En este modo, el servidor identifica todas las vías significativamente asociadas con los miRNAs seleccionados. El servidor realiza inicialmente el análisis de enriquecimiento y calcula los niveles de significancia (valores p) entre cada miRNA y cada vía. Posteriormente, para cada vía se extrae un valor p fusionado utilizando el método de metaanálisis de Fisher. Los valores p combinados significan que al menos un miRNA del grupo seleccionado inicialmente se dirige a una vía en particular. Este es un método de análisis *a posteriori*.

4.6 Análisis estadístico

Se evaluó la normalidad en la distribución de las variables mediante la prueba de kolmogorov-Smirnov. Se realizaron pruebas t-student para realizar un comparativo inicial de las variables antropométricas y bioquímicas en los grupos de alto riesgo y el control o bajo riesgo. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando IBM SPSS Statistics Premium (versión 25.0).

5. RESULTADOS

5.1 Características de la población evaluada

Se incluyeron 32 participantes para el análisis, con una edad promedio de 8.34 ± 1.3 . Las variables de IMC, TA, perímetro de cintura, grasa corporal, insulina, índice HOMA, colesterol total, LDL, HDL, triglicéridos y VO₂max presentaron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo de riesgo como era de esperarse, la fuerza prensil a pesar de ser una de las características de separación de los grupos no presentó diferencias significativas (tabla 5.1). En la tabla 5.2 la distribución de los sujetos de acuerdo con las clasificaciones de riesgo y cada uno de sus criterios.

Tabla 5.1 Principales características de la población estudio

VARIABLE	CONTROL	RIESGO	T-student (p)
N	16	16	
Sexo femenino, n (%)	5 (31.25)	11 (68.75)	n/a
Edad (años)	8.09 ± 1.2	8.58 ± 1.5	0.327
IMC (kg/m ²)	16.09 ± 0.9	21.98 ± 3.2	0.001**
TA Sistólica (mmHG)	95.27 ± 9.1	109.54 ± 15.4	0.007**
TA Diastólica (mmHG)	60.60 ± 8.1	77.23 ± 20.3	0.001**
Perímetro de cintura (cm)	55.91 ± 2.5	68.65 ± 7.2	0.001**
Grasa Corporal (%)	18.34 ± 3.5	31.98 ± 6.1	0.001**
Glucosa en ayunas (mg/dl)	93.27 ± 6.2	96.92 ± 7.6	0.216
Insulina en ayunas (uU/mL)	5.14 ± 1.8	15.05 ± 11	0.001**
Índice HOMA	1.18 ± 0.4	3.61 ± 2.6	0.001**
Colesterol total (mg/dL)	159.8 ± 32.1	186 ± 24.2	0.008**
Colesterol HDL (mg/dL)	53.96 ± 9.2	40.63 ± 10.2	0.001**
Colesterol LDL (mg/dL)	89.54 ± 23.2	120.98 ± 23.8	0.001**
Triglicéridos (mg/dL)	79.8 ± 34.8	120.31 ± 49.8	0.001**
Fuerza prensil derecha (kg)	10.60 ± 3	12.14 ± 2.8	0.114
Fuerza prensil izquierda (kg)	10.69 ± 2.5	12.01 ± 3	0.150
VO ₂ máximo (ml/kg/min)	35.99 ± 2.9	33.63 ± 2.9	0.039*

Los datos son presentados como promedio $\pm$ desviación estandar o n. IMC, Índice de Masa Corporal; TA, Tensión Arterial; HOMA, modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina; HDL, lipoproteínas de alta densidad; LDL, lipoproteínas de baja densidad; VO₂, consumo de oxígeno, n/a; no aplica; *, < 0,05; **, < 0.01.

Tabla 5.2 distribución de los diferentes sujetos de acuerdo con las clasificaciones de riesgo

	Grupo Riesgo		Grupo Control	
	Sexo Femenino, n	Sexo Masculino, n	Sexo Femenino, n	Sexo Masculino, n
Clasificación Riesgo de Diabetes				
HOMA-IR (>P90)	6	2	0	0
Perímetro de Cintura (>P90)	5	4	0	0
% Grasa (>P90)	4	3	0	0
IMC (>P90)	4	3	0	0
HDL-C (<P10)	6	2	0	0
Triglicéridos (>P90)	6	2	1	0
PAS (>P90)	1	1	0	0
Capacidad aeróbica (<P10)	3	1	0	0
Capacidad muscular(<P10)	1	0	1	2
Clasificación Riesgo Cardiovascular				
Colesterol < 160	0	0	2	7
Colesterol 160-199	9	3	2	3
Colesterol 200-239	2	2	1	0
Colesterol 240-279	0	0	0	0
Colesterol ≥ 280	0	0	0	0
HDL-c ≥ 60	0	1	3	0
HDL-c 50-59	1	0	2	7
HDL-c 40-49	3	2	0	3
HDL-c<40	7	2	0	1
PAS < 120	10	4	5	11
PAS 120-129	1	1	0	0

Los datos son presentados como frecuencia (n). IMC, Índice de Masa Corporal; PAS, Presión Arterial Sistólica; HOMA, modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina; HDL, lipoproteínas de alta densidad; LDL, lipoproteínas de baja densidad

5.2 MicroRNAs y Riesgo Cardiovascular

De los ochenta y cuatro miRNAs evaluados en el arreglo de enfermedad cardiovascular, cuatro presentaron diferencias significativas en su expresión en el grupo de riesgo respecto al grupo control (Figura 5.1). Los hsa-miR-181a-5p (FC = 2,55) y hsa-miR-7-5p (FC = 10,31) presentaron alzas en su expresión y los miRNAs hsa-miR-210-3p (FC = -2,32) y hsa-miR-378a-3p (FC = -3.39) presentaron una expresión disminuida comparada con los controles. Los miRNAs restantes no tuvieron diferencias significativas en su expresión (Tabla S1, material suplementario 2).

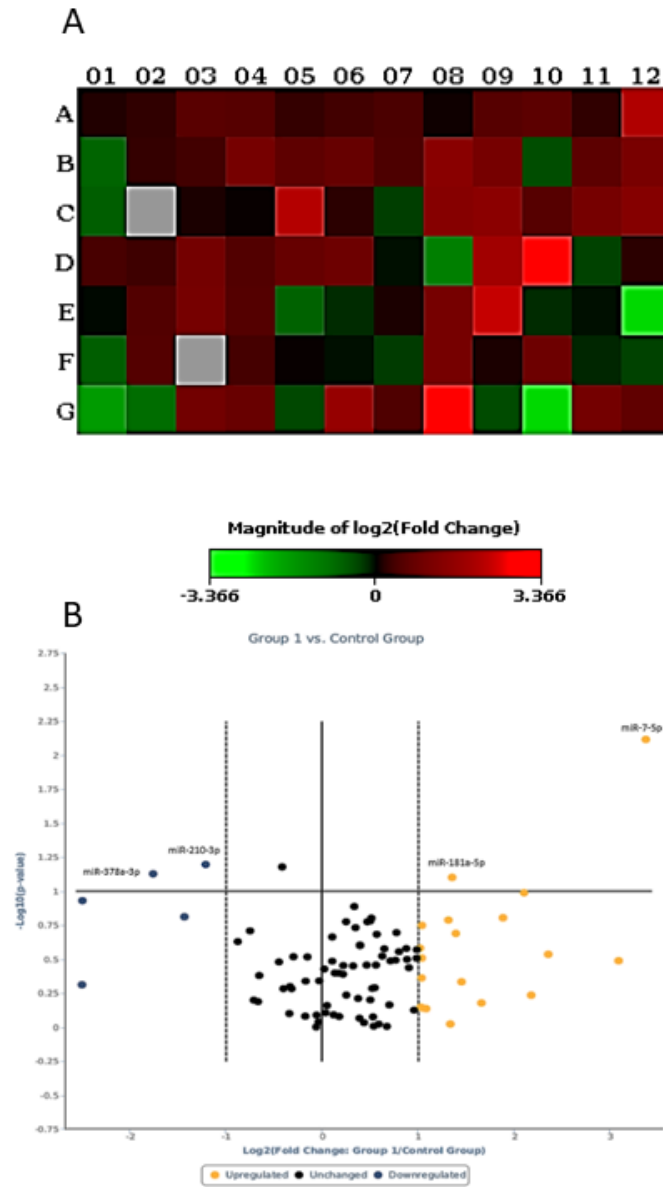


Figura 5.1 Perfil de expresión del arreglo de miRNAs asociados con enfermedad cardiovascular. A) Mapa de calor B) Volcano plot

5.3 MicroRNAs y Diabetes

De los ochenta y cuatro miRNAs evaluados en el arreglo de riesgo de diabetes, solo el hsa-miR-365b-3p presentó un aumento significativo de expresión (FC = 5,24) en el grupo de riesgo respecto al grupo control (Figura 5.2). Los miRNAs restantes no tuvieron diferencias significativas en su expresión (Tabla S2, material suplementario 2)

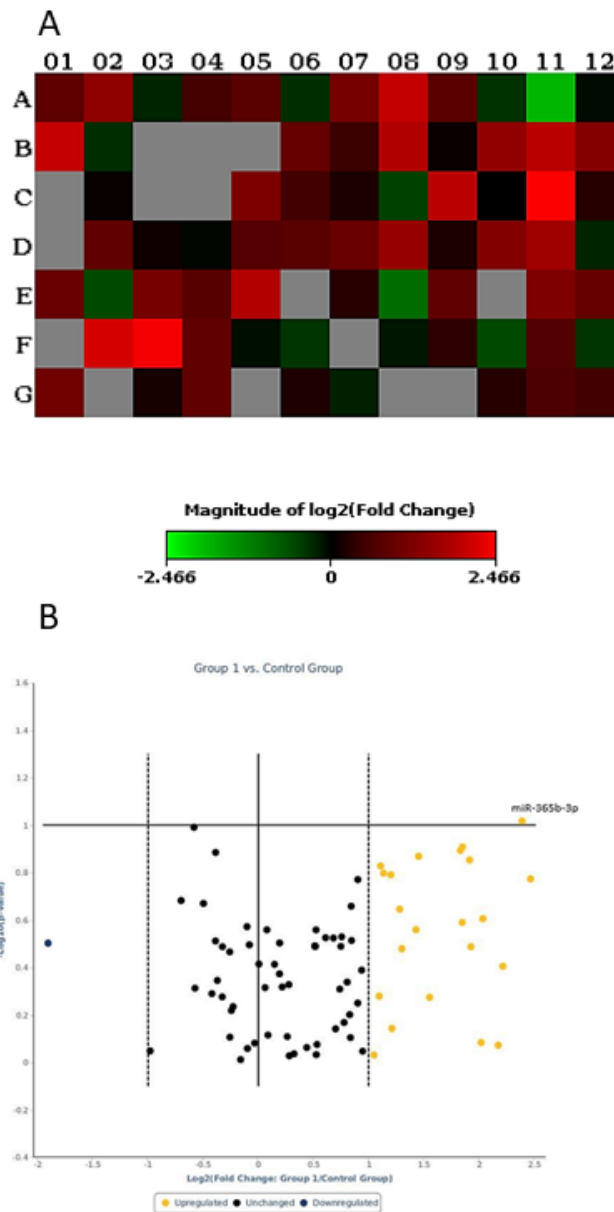


Figura 5.2 Perfil de expresión del arreglo de microRNAs asociados con diabetes. A) Mapa de calor B). Volcano plot

5.4 Análisis informático de interacciones miRNAs-genes

El análisis *in silico* de las vías blanco de los miRNAs hallados en este estudio, se realizó de manera aditiva, determinando los blancos de cada miRNA por separado y la modificación de vías blanco cuando se incluían los 5 miRNAs. El miRNA hsa-miR-210-3p no mostró resultados para TarBase 7.0 por tanto se analizó con TargetScan. En la tabla 5.3 se muestran las vías asociadas con los miRNAs del perfil de expresión mediante la metodología genes de unión y se seleccionaron las vías blanco relacionadas con metabolismo de los 5 miRNAs. En la tabla S3 (material suplementario 2) se muestra el resultado de todas las vías blanco encontradas en el análisis.

La figura 5.3 resumen las vías que contienen genes objetivo de los miRNAs reportados con cambios significativos en su expresión en los arreglos de enfermedad cardiovascular y diabetes, utilizando la metodología unión de vías. Se encontraron asociaciones significativas ($P < 0.05$) con genes relacionados con las vías de síntesis de ácidos grasos, y metabolismo de biotina, además de las vías de señalización de estrógenos, PI3K-Akt, Prolactina, VEGF y adrenérgicas en cardiomiocitos.

El miRNA-7-5p es el que presenta mayor cantidad de asociaciones con vías metabólicas como se evidencia en la figura 5.3 y el miRNA-210-3p es el que presenta menor cantidad de asociaciones. Dentro de los hallazgos de los blancos de los miRNAs de este estudio, se hallaron varias vías asociadas a neoplasia y cáncer que también podrían afectarse por cambios en la expresión de estos miRNAs y son evidenciadas por el software, sin embargo, se tomaron únicamente las vías relacionadas directamente con las enfermedades estudiadas. En el documento suplementario 3 se encuentran las figuras explicativas de cada una de las rutas que figuran en la tabla 5.3.

Tabla 5.3 Vías metabólicas relacionadas con el perfil de expresión de miRNAs

KEGG pathway	p-value	#genes	#miRNAs	miRNAs
Fatty acid biosynthesis	2,60E-03	4	3	hsa-miR-7-5p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-378a-3p
Biotin metabolism	6,10E+04	3	2	hsa-miR-7-5p, hsa-miR-181a-5p
Estrogen signaling pathway	0.0004	26	4	hsa-miR-7-5p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-365b-3p
PI3K-Akt signaling pathway	0,0065	107	4	hsa-miR-7-5p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-365b-3p
Prolactin signaling pathway	0.0164	26	4	hsa-miR-7-5p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-365b-3p
VEGF signaling pathway	0.0409	24	4	hsa-miR-7-5p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-365b-3p
Adrenergic signaling in cardiomyocytes	0.0097	44	5	hsa-miR-7-5p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-365b-3p, hsa-miR-210-3p

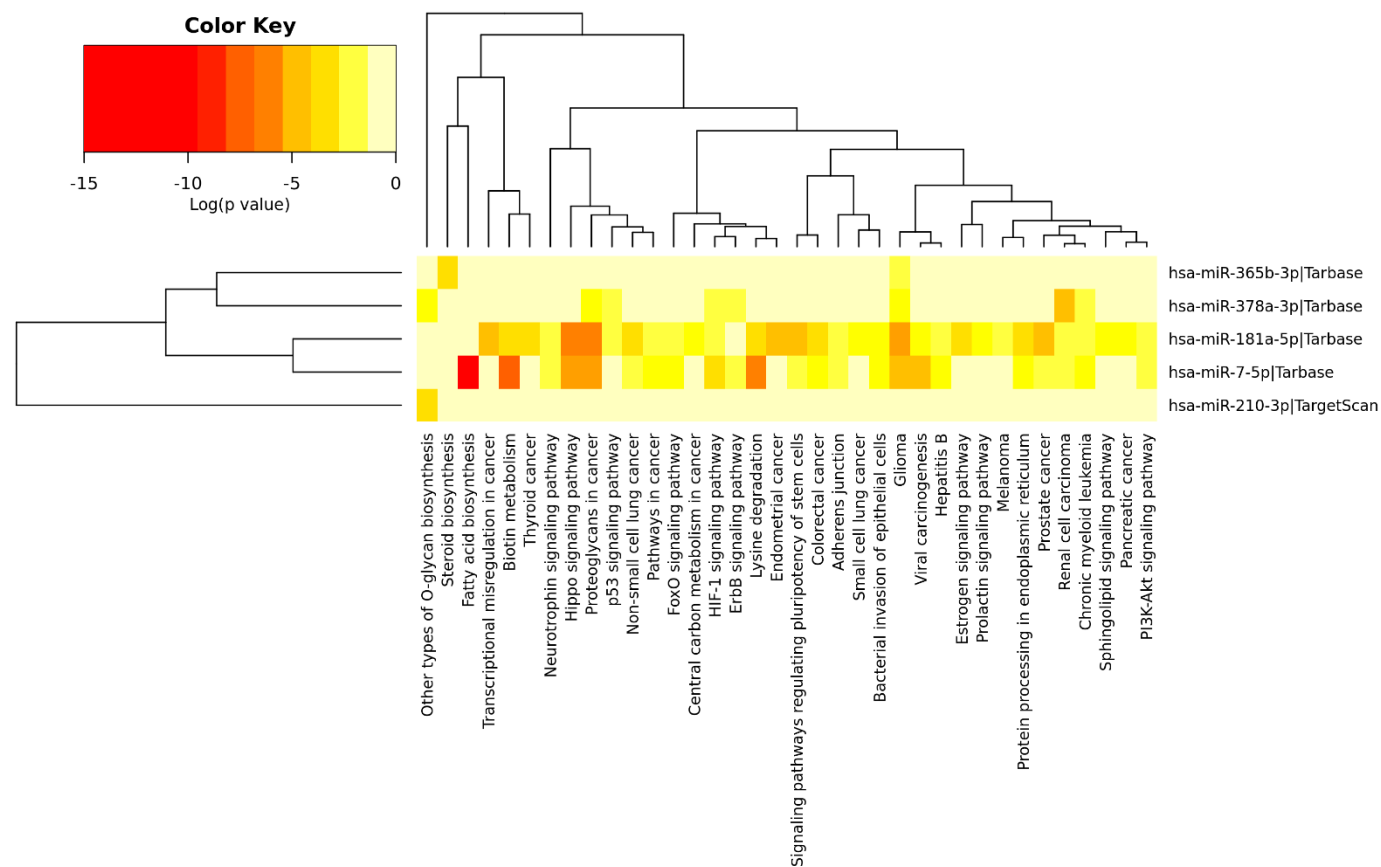


Figura 5.3 Mapa de calor vías metabólicas relacionadas con el perfil de expresión de miRNAs

6. DISCUSIÓN

Los miRNAs circulantes son un foco de interés creciente como potenciales biomarcadores de diversas patologías. Esta investigación es uno de los primeros acercamientos a la evaluación de miRNAs plasmáticos en infantes latinoamericanos con un perfil de riesgo cardiovascular y de diabetes. Encontramos 5 miRNAs (miR-7-5p, miR-181a-5p, miR-365b-3p, miR-378a-3p y miR-210-3p) con un FC > 2 o < -2 y un p-valor $< 0,1$, al comparar el perfil de expresión entre los niños con riesgo vs los controles sanos.

La expresión elevada de hsa-miR-7-5p ha sido relacionada previamente con liberación de insulina (72), enfermedad aterosclerótica (73) y enfermedad coronaria (74). Por su parte, el aumento de hsa-miR-181a-5p se asoció con cardiomiopatía hipertrófica (75) y la elevación de la expresión de hsa-miR-365b-3p se encontró relacionada con disfunción endotelial y obesidad infantil (76). Estos resultados son coherentes con hallazgos en nuestra investigación donde encontramos los niveles de los miRNAs nombrados anteriormente expresados al alta en la población infantil con riesgo cardiovascular y de diabetes.

La evidencia sobre los cambios en la expresión de hsa-miR-378a-3p se ha mostrado contradictoria, ratones expuestos a dietas altas en grasa se ha encontrado disminución de este miRNA (77) y también su bloqueo se asoció con disminución en la supervivencia celular de cardiomiocitos (78). Sin embargo, en otras investigaciones su expresión elevada se relacionó con la exposición a dietas altas en grasa en ratones (79), diabetes gestacional (80) o aumento en la adipogénesis (81). En nuestra investigación se encontraron niveles bajos en la expresión del hsa-miR-378a-3p en el grupo de niños con riesgo cardiovascular y de diabetes respecto a los controles.

El aumento hsa-miR-210-3p se asoció con diabetes mellitus de tipo 1 (82), enfermedad coronaria (74), y aterosclerosis (83) en población adulta. Nuestros resultados difieren, encontrando una regulación a la baja, sin embargo, no encontramos un estudio que evaluara los niveles de expresión de este miRNA en población infantil.

En la figura 6.1 se muestra un resumen de la posible explicación del perfil de expresión encontrado y de las vías asociadas en el análisis en mirPath v3. Desde nuestra

perspectiva sugerimos que los cambios iniciales se presentan a partir de una alimentación con ingesta elevada de carbohidratos, produciendo una elevación en la síntesis de ácidos grasos y posterior acumulación de tejido adiposo lo cual se asoció en nuestro estudio con la expresión de miR-7-5p, 181a-5p y 378a-3p.

El aumento de la adiposidad se asoció positivamente con cambios en los niveles de estrógenos y sus vías de señalización, lo que encontramos asociado con la expresión alterada de los miR-378a-3p, miR-7-5p, 181a-5p y 365b-3p. (84). Esta alteración generaría una potencial disminución en la vasodilatación, además de una reducción en la glucólisis y la beta-oxidación (85).

Otra alteración asociada con la ingesta elevada de carbohidratos es la disminución en niveles de biotina (86, 87), generando un aumento de los triglicéridos, el colesterol total y el colesterol LDL circulante (88), lo cual concuerda con las diferencias en estas variables para los dos grupos evaluados en nuestra investigación. Todas estas alteraciones posiblemente se asocien con la expresión aumentada de los miRNAs miR-181a-5p y miR-7-5p.

En nuestra investigación se encontró que los niveles de expresión de los miR-378a-3p, miR-7-5p, 181a-5p y 365b-3p se asociaron con cambios en las vías de señalización asociadas a PI3K/AKT posiblemente causados por alteraciones en la homeostasis glucosa-insulina, generando disminución en el transporte de glucosa, la síntesis de glucógeno, y la producción y secreción de insulina (89).

Las alteraciones en el metabolismo de glucosa e insulina también se asociaron con cambios en la función endocrina del sistema hipotálamo-pituitaria (90), afectando directamente los niveles de prolactina y generando una mayor acumulación de tejido adiposo (91). Parece que esta alteración endocrina también se podría explicar en parte por los cambios en la expresión de miR-378a-3p, miR-7-5p, 181a-5p y 365b-3p nombrados anteriormente.

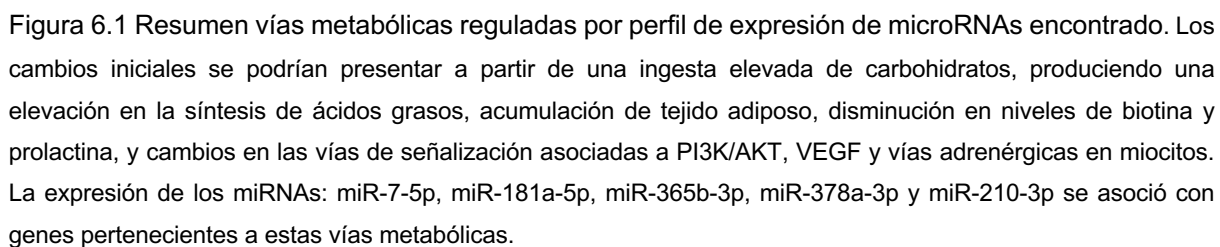
Otras vías metabólicas que se mostraron relacionadas con el perfil de expresión fueron las vías de señalización de VEGF y las adrenérgicas en miocitos. La alteración de la primera se ha asociado con disminución de la síntesis de óxido nítrico e inadecuada

regeneración tisular del endotelio (92), mientras que la alteración de la segunda se asoció con aumento de la tensión arterial y disminución de la fuerza de contracción en cardiomiocitos (93). La vía de señalización de VEGF se asoció con cambios en la expresión de miR-378a-3p, miR-7-5p, 181a-5p y 365b-3p, y por su parte la vía de señalización adrenérgica en miocitos con la expresión alterada de miR-378a-3p, miR-7-5p, 181a-5p, 365b-3p y miR-210-3p.

Nuestra hipótesis es que las diferencias entre algunos miRNAs expresados a la alta y otros a la baja asociados con las diferentes vías metabólicas nombradas anteriormente, podría explicarse como un intento de mantener la homeostasis de estas, teniendo en cuenta que son estadios iniciales de alteraciones cardiometabólicas.

De manera interesante, de los 168 miRNAs evaluados en nuestra investigación y que habían sido previamente reportados en varias investigaciones como expresados diferencialmente en adultos con enfermedad cardiovascular o con diabetes, solamente 5 tuvieron diferencias significativas en nuestra población infantil evaluada, lo cual sugiere que hay diferencias grandes en los perfiles de expresión de miRNAs circulantes entre estas dos poblaciones. Por tanto, es importante en futuras investigaciones realizar los perfiles de expresión asociados siempre a la edad de los participantes y no solo a las patologías o disfunciones estudiadas.

Una de las limitaciones de este estudio es que no se pudo realizar la validación de los miRNAs encontrados en los microarreglos, esta validación que se debe realizar en un futuro permitirá determinar la expresión de los miRNAs hallados en este estudio en una población de niños con factores de riesgo y asociar su expresión a la presencia o ausencia de características biológicas relacionados con ECV o diabetes. Otra limitación, radica en que en la presente investigación se utilizó una selección de miRNAs previamente asociados con enfermedad cardiovascular o con diabetes en población adulta. Un análisis de secuenciación para los miRNAs circulantes podría potencialmente identificar otros miRNAs asociados con el riesgo cardiovascular y de diabetes específicamente en población infantil. Sin embargo, los hallazgos descritos permiten establecer un potencial perfil de miRNAs relacionados con riesgo cardiovascular en población infantil colombiana.



En esta investigación, se identificaron varios miRNAs elevados en población infantil con riesgo, que podrían servir como biomarcadores no invasivos en un futuro. Además, se generó una hipótesis de la posible explicación biológica de este perfil de expresión encontrado, lo cual podría dar un indicio de los orígenes de las patologías estudiadas y los mecanismos bioquímicos que las subyacen. En futuros estudios será importante validar los cambios en la expresión del perfil de miRNAs con los diferentes niveles en cada variable asociada a riesgo cardiovascular o de diabetes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Salud OPdl. Día Mundial del Corazón: Enfermedades cardiovasculares causan 1,9 millones de muertes al año en las Américas. 2012.
2. Asivamosensalud.org. Tasa de Mortalidad por Diabetes Mellitus-Georeferenciado. 2020.
3. Baena Díez JM, del Val García JL, Tomàs Pelegrina J, Martínez Martínez JL, Martín Peñacoba R, González Tejón I, et al. Epidemiología de las enfermedades cardiovasculares y factores de riesgo en atención primaria. *Revista Española de Cardiología*. 2005;58(4):367-73.
4. Organization WH. Obesity and overweight 2020 [Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>].
5. Social MdSyP. Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia. In: Departamento Administrativo de la Presidencia de La República INdS, Instituto Colombiano de Bienestar, editor. 2015.
6. Srikanthan K, Feyh A, Visweshwar H, Shapiro JI, Sodhi K. Systematic review of metabolic syndrome biomarkers: a panel for early detection, management, and risk stratification in the West Virginian population. *International journal of medical sciences*. 2016;13(1):25.
7. Reddy MA, Zhang E, Natarajan R. Epigenetic mechanisms in diabetic complications and metabolic memory. *Diabetologia*. 2015;58(3):443-55.
8. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell*. 2004;116(2):281-97.
9. Párrizas M, Novials A. Circulating microRNAs as biomarkers for metabolic disease. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2016;30(5):591-601.
10. Organización mundial de la Salud, Informe sobre la situación mundial de las enfermedades no transmisibles. Informe sobre la situación mundial de las enfermedades no transmisibles 2014.
11. Forouhi NG, Wareham NJ. Epidemiology of diabetes. *Medicine (Abingdon, England : UK Ed)*. 2014;42(12):698-702.
12. Aschner P. Epidemiología de la diabetes en Colombia. *Avances en Diabetología*. 2010;26(2):95-100.
13. Kelsey MM, Zaepfel A, Bjornstad P, Nadeau KJ. Age-Related Consequences of Childhood Obesity. *Gerontology*. 2014;60(3):222-8.
14. Simmonds M, Llewellyn A, Owen CG, Woolacott N. Predicting adult obesity from childhood obesity: a systematic review and meta-analysis. *Obesity Reviews*. 2016;17(2):95-107.
15. Llewellyn A, Simmonds M, Owen C, Woolacott N. Childhood obesity as a predictor of morbidity in adulthood: A systematic review and meta-analysis. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2015;17.
16. Córdova-Villalobos JÁ, Barriguete-Meléndez JA, Lara-Esqueda A, Barquera S, Rosas-Peralta M, Hernández-Ávila M, et al. Las enfermedades crónicas no transmisibles en México: sinopsis epidemiológica y prevención integral. *Salud pública de México*. 2008;50(5):419-27.
17. Organización Mundial de la Salud, Prevención y control de las enfermedades no transmisibles: aplicación de la estrategia mundial. In: Ejecutivo C, editor. 122a Reunión 2008.
18. Ministerio de Salud y Protección Social, Plan Decenal Pública 2012–2021: La salud en Colombia la construyes tú. Ministerio de Salud y Protección Social 2013.
19. Resolución 003280, (2018).
20. Wang Q, Ma J, Jiang Z, Wu F, Ping J, Ming L. Identification of microRNAs as diagnostic biomarkers for acute myocardial infarction in Asian populations: A systematic review and meta-analysis. *Medicine*. 2017;96(24):e7173.
21. Organización Mundial de la Salud, ECNT Perfiles de países, Colombia. 2014.
22. Rodil-García P, Salazar-Olivo L. La expresión neonatal de microRNAs como potenciales biomarcadores tempranos del síndrome metabólico. *Perinatología y Reproducción Humana*. 2015;29(1):14-20.

23. Martínez RR, Díaz FAE. Las enfermedades crónicas no transmisibles en Colombia. Boletín del observatorio en salud. 2010;3(4).
24. Muka T, Imo D, Jaspers L, Colpani V, Chaker L, van der Lee SJ, et al. The global impact of non-communicable diseases on healthcare spending and national income: a systematic review. *European Journal of Epidemiology*. 2015;30(4):251-77.
25. Marimón Torres ER, Orraca Castillo O, Casanova Moreno MC, Paredes Díaz R, Mendoza Ferreiro M. Prevalencia de factores de riesgo de enfermedades no transmisibles. *Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río*. 2013;17(2):2-12.
26. Moreno M, Manrique M, Guzmán S, Maiz A, Patiño C, Valdés R, et al. Cambios en los factores de riesgo metabólicos en pacientes obesos en tratamiento. *Revista médica de Chile*. 2000;128(2):193-200.
27. Valeska O, Soumyalekshmi N, Omar E, Claudio A, Carlos S, Felipe AZ. Association between insulin resistance and the development of cardiovascular disease. *Cardiovascular Diabetology*, Vol 17, Iss 1, Pp 1-14 (2018). 2018(1):1.
28. Bornfeldt KE, Tabas I. Insulin resistance, hyperglycemia, and atherosclerosis. *Cell Metabolism*. 2011;14(5):575-85.
29. Giles TD, Materson BJ, Cohn JN, Kostis JB. Definition and Classification of Hypertension: An Update. *The Journal of Clinical Hypertension*. 2009;11(11):611-4.
30. Fuchs FD, Whelton PK. High Blood Pressure and Cardiovascular Disease. *Hypertension*. 2020;75(2):285-92.
31. Klop B, Elte J, Cabezas M. Dyslipidemia in Obesity: Mechanisms and Potential Targets. *Nutrients*. 2013;5(4):1218.
32. Kwiterovich PO. Detection and Treatment of Children and Adolescents with Dyslipidemia. In: Garg A, editor. *Dyslipidemias: Pathophysiology, Evaluation and Management*. Totowa, NJ: Humana Press; 2015. p. 67-97.
33. Vega Abascal J, Guimará Mosqueda M, Vega Abascal L. Riesgo cardiovascular, una herramienta útil para la prevención de las enfermedades cardiovasculares. *Revista Cubana de Medicina General Integral*. 2011;27(1):91-7.
34. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Whelton PK, He J. Worldwide prevalence of hypertension: a systematic review. *Journal of hypertension*. 2004;22(1):11-9.
35. Raj M. Obesity and cardiovascular risk in children and adolescents. *Indian journal of endocrinology and metabolism*. 2012;16(1):13-9.
36. National Heart L, and Blood Institute (NHLBI). About FHS | Framingham Heart Study 2021 [Available from: <https://framinghamheartstudy.org/fhs-about/>].
37. D'Agostino RB, Sr., Vasan RS, Pencina MJ, Wolf PA, Cobain M, Massaro JM, et al. General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2008;117(6):743-53.
38. Wilson PW, Meigs JB, Sullivan L, Fox CS, Nathan DM, D'Agostino RB, Sr. Prediction of incident diabetes mellitus in middle-aged adults: the Framingham Offspring Study. *Arch Intern Med*. 2007;167(10):1068-74.
39. Pool LR, Aguayo L, Brzezinski M, Perak AM, Davis MM, Greenland P, et al. Childhood Risk Factors and Adulthood Cardiovascular Disease: A Systematic Review. *J Pediatr*. 2021;232:118-26.e23.
40. Arango SS. Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*. 2012;30(1):75-82.
41. Nobili V, Giorgio V, Pongiglione G. Circulating biomarkers for metabolic disorders as a predictor of cardiovascular disease risk: what's new? *Biomarkers in Medicine*. 2012;6:715+.
42. Gomes TN, Nevill A, Katzmarzyk PT, Pereira S, Santos MM, Buranarugs R, et al. Identifying the best body-weight-status index associated with metabolic risk in youth. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. 2018;28(11):2375-83.

43. García-Hermoso A, Correa-Bautista JE, Olloquequi J, Ramírez-Vélez R. Health-related physical fitness and weight status in 13- to 15-year-old Latino adolescents. A pooled analysis. *Jornal de Pediatria*. 2018.
44. Ruiz JR, España Romero V, Castro Piñero J, Artero EG, Ortega FB, Cuenca García M, et al. Batería ALPHA-Fitness: test de campo para la evaluación de la condición física relacionada con la salud en niños y adolescentes. *Nutrición Hospitalaria*. 2011;26:1210-4.
45. Martínez Martínez J, de los Reyes-Corcuera M, Borrell-Lizana V, Pastor-Vicedo JC. Valoración de los niveles de condición física de escolares de 11-12 años, mediante la aplicación de la Batería ALPHAFITNES. *SPORT TK-Revista EuroAmericana de Ciencias del Deporte*. 2018;7(2):37-42.
46. Secchi JD, García GC, España-Romero V, Castro-Piñero J. Condición física y riesgo cardiovascular futuro en niños y adolescentes argentinos: una introducción de la batería ALPHA. *Archivos argentinos de pediatría*. 2014;112(2):132-40.
47. Secchi JD, García GC, Arcuri CR. Evaluación de la condición física relacionada con la salud en el ámbito escolar: un enfoque práctico para interpretar e informar los resultados. *Enfoques: revista de la Universidad Adventista del Plata*. 2016;28(2):67-87.
48. Patil VS, Zhou R, Rana TM. Gene regulation by non-coding RNAs. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 2014;49(1):16-32.
49. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *cell*. 1993;75(5):843-54.
50. Bhaskaran M, Mohan M. MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. *Veterinary pathology*. 2014;51(4):759-74.
51. Gebert LFR, MacRae IJ. Regulation of microRNA function in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2019;20(1):21-37.
52. Cui X, You L, Zhu L, Wang X, Zhou Y, Li Y, et al. Change in circulating microRNA profile of obese children indicates future risk of adult diabetes. *Metabolism*. 2018;78:95-105.
53. Omran A, Elimam D, He F, Peng J, Yin F. Potential role of blood microRNAs as non-invasive biomarkers for early detection of asymptomatic coronary atherosclerosis in obese children with metabolic syndrome. *Medical hypotheses*. 2012;79(6):889-93.
54. Graves P, Zeng Y. Biogenesis of Mammalian MicroRNAs: A Global View. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*. 2012;10(5):239-45.
55. Sand M. *miRNA Maturation, Methods and Protocols*: Springer; 2014. 3-10 p.
56. Musso G, Gambino R, Cassader M. Emerging molecular targets for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Annual review of medicine*. 2010;61:375-92.
57. Navickas R, Gal D, Laucevičius A, Taparauskaitė A, Zdanytė M, Holvoet P. Identifying circulating microRNAs as biomarkers of cardiovascular disease: a systematic review. *Cardiovascular research*. 2016;111(4):322-37.
58. Yanokura M, Banno K, Kobayashi Y, Kisu I, Ueki A, Ono A, et al. MicroRNA and endometrial cancer: Roles of small RNAs in human tumors and clinical applications (Review). *Oncol Lett*. 2010;1(6):935-40.
59. Brodersen P, Voinnet O. Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2009;10(2):141-8.
60. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology*. 2018;9(402).
61. Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, Ghaffari SH. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol*. 2019;234(5):5451-65.
62. Oses M, Margareto Sanchez J, Portillo MP, Aguilera CM, Labayen I. Circulating miRNAs as Biomarkers of Obesity and Obesity-Associated Comorbidities in Children and Adolescents: A Systematic Review. *Nutrients*. 2019;11(12):2890.

63. Raitoharju E, Seppälä I, Oksala N, Lyytikäinen L-P, Raitakari O, Viikari J, et al. Blood microRNA profile associates with the levels of serum lipids and metabolites associated with glucose metabolism and insulin resistance and pinpoints pathways underlying metabolic syndrome: The cardiovascular risk in Young Finns Study. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2014;391(1):41-9.
64. Nemecz M, Alexandru N, Tanko G, Georgescu A. Role of MicroRNA in Endothelial Dysfunction and Hypertension. *Current Hypertension Reports*. 2016;18(12):87.
65. Patterson AJ, Song MA, Choe D, Xiao D, Foster G, Zhang L. Early Detection of Coronary Artery Disease by Micro-RNA Analysis in Asymptomatic Patients Stratified by Coronary CT Angiography. *Diagnostics (Basel)*. 2020;10(11).
66. Liao C-H, Wang C-Y, Liu K-H, Liu Y-Y, Wen M-S, Yeh T-S. MiR-122 marks the differences between subcutaneous and visceral adipose tissues and associates with the outcome of bariatric surgery. *Obesity Research & Clinical Practice*. 2018.
67. Gharipour M, Sadeghi M. Pivotal role of microRNA-33 in metabolic syndrome: A systematic review. *ARYA atherosclerosis*. 2013;9(6):372.
68. Ramírez CM, Goedeke L, Fernández-Hernando C. “Micromanaging” metabolic syndrome. *Cell Cycle*. 2011;10(19):3249-52.
69. Cui X, You L, Zhu L, Wang X, Zhou Y, Li Y, et al. Change in circulating microRNA profile of obese children indicates future risk of adult diabetes. *Metabolism*. 2018;78:95-105.
70. Ibrahim AA, Wahby AA, Ashmawy I, Saleh RM, Soliman H. Association of Exosomal miR-34a with Markers of Dyslipidemia and Endothelial Dysfunction in Children and Adolescents with T1DM. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2020;12(4):401-9.
71. Vlachos IS, Zagganas K, Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Karagkouni D, Vergoulis T, et al. DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic acids research*. 2015;43(W1):W460-W6.
72. Matarese A, Gambardella J, Lombardi A, Wang X, Santulli G. miR-7 regulates GLP-1-mediated insulin release by targeting β -Arrestin 1. *Cells*. 2020;9(7):1621.
73. Huang S, Zeng Z, Sun Y, Cai Y, Xu X, Li H, et al. Association study of hsa_circ_0001946, hsa-miR-7-5p and PARP1 in coronary atherosclerotic heart disease. *International Journal of Cardiology*. 2021;328:1-7.
74. Patterson AJ, Song MA, Choe D, Xiao D, Foster G, Zhang L. Early Detection of Coronary Artery Disease by Micro-RNA Analysis in Asymptomatic Patients Stratified by Coronary CT Angiography. *Diagnostics*. 2020;10(11):875.
75. Shi H, Li J, Song Q, Cheng L, Sun H, Fan W, et al. Systematic identification and analysis of dysregulated miRNA and transcription factor feed-forward loops in hypertrophic cardiomyopathy. *J Cell Mol Med*. 2019;23(1):306-16.
76. Khalyfa A, Kheirandish-Goza L, Bhattacharjee R, Khalyfa AA, Goza D. Circulating microRNAs as potential biomarkers of endothelial dysfunction in obese children. *Chest*. 2016;149(3):786-800.
77. Chartoumpekis DV, Zaravinos A, Ziros PG, Iskrenova RP, Psyrogiannis AI, Kyriazopoulou VE, et al. Differential expression of microRNAs in adipose tissue after long-term high-fat diet-induced obesity in mice. *PloS one*. 2012;7(4):e34872.
78. Knezevic I, Patel A, Sundaresan NR, Gupta MP, Solaro RJ, Nagalingam RS, et al. A novel cardiomyocyte-enriched microRNA, miR-378, targets insulin-like growth factor 1 receptor: implications in postnatal cardiac remodeling and cell survival. *J Biol Chem*. 2012;287(16):12913-26.
79. Ortega FJ, Moreno-Navarrete JM, Pardo G, Sabater M, Hummel M, Ferrer A, et al. MiRNA Expression Profile of Human Subcutaneous Adipose and during Adipocyte Differentiation. *PLOS ONE*. 2010;5(2):e9022.

80. Joshi A, Azuma R, Akumuo R, Goetzel L, Pinney SE. Gestational diabetes and maternal obesity are associated with sex-specific changes in miRNA and target gene expression in the fetus. *International Journal of Obesity*. 2020;44(7):1497-507.
81. Huang N, Wang J, Xie W, Lyu Q, Wu J, He J, et al. MiR-378a-3p enhances adipogenesis by targeting mitogen-activated protein kinase 1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015;457(1):37-42.
82. Assmann TS, Recamonde-Mendoza M, Punales M, Tschiedel B, Canani LH, Crispim D. MicroRNA expression profile in plasma from type 1 diabetic patients: Case-control study and bioinformatic analysis. *Diabetes research and clinical practice*. 2018;141:35-46.
83. Qiao XR, Wang L, Liu M, Tian Y, Chen T. MiR-210-3p attenuates lipid accumulation and inflammation in atherosclerosis by repressing IGF2. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2020;84(2):321-9.
84. Mair KM, Gaw R, MacLean MR. Obesity, estrogens and adipose tissue dysfunction – implications for pulmonary arterial hypertension. *Pulmonary Circulation*. 2020;10(3):2045894020952019.
85. Chen JQ, Brown TR, Russo J. Regulation of energy metabolism pathways by estrogens and estrogenic chemicals and potential implications in obesity associated with increased exposure to endocrine disruptors. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1793(7):1128-43.
86. Järvinen E, Ismail K, Muniandy M, Bogl LH, Heinonen S, Tummers M, et al. Biotin-dependent functions in adiposity: a study of monozygotic twin pairs. *Int J Obes (Lond)*. 2016;40(5):788-95.
87. Marshall MW, Haubrich M, Washington VA, Chang M-LW, Young CW, Wheeler MA. Biotin Status and Lipid Metabolism in Adult Obese Hypercholesterolemic Inbred Rats. *Nutrition and Metabolism*. 1976;20(1):41-61.
88. Vilches-Flores A, Fernández-Mejía C. Efecto de la biotina sobre la expresión genética y el metabolismo. *Revista de investigación clínica*. 2005;57:716-24.
89. Huang X, Liu G, Guo J, Su Z. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. *International journal of biological sciences*. 2018;14(11):1483-96.
90. Goldstone AP. The hypothalamus, hormones, and hunger: alterations in human obesity and illness. In: Kalsbeek A, Fliers E, Hofman MA, Swaab DF, van Someren EJW, Buijs RM, editors. *Progress in Brain Research*. 153: Elsevier; 2006. p. 57-73.
91. Kopelman PG. Physiopathology of prolactin secretion in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000;24 Suppl 2:S104-8.
92. Pandey AK, Singhi EK, Arroyo JP, Ikizler TA, Gould ER, Brown J, et al. Mechanisms of VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) Inhibitor-Associated Hypertension and Vascular Disease. *Hypertension*. 2018;71(2):e1-e8.
93. Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen T. What Is the Role of β -Adrenergic Signaling in Heart Failure? *Circulation Research*. 2003;93(10):896-906.