



Universitat
de les Illes Balears

TREBALL DE FI DE GRAU

miARNs PRESENTS AL LÍQUID AMNIÒTIC, SANG DEL CORDÓ UMBILICAL I LLET MATERNA I LA SEVA RELACIÓ AMB LA PROGRAMACIÓ METABÒLICA DE L'OBESITAT

Àngela Esteve Vidal

Grau de Bioquímica

Facultat de Ciències

Any acadèmic 2021-22

miARNs PRESENTS AL LÍQUID AMNIÒTIC, SANG DEL CORDÓ UMBILICAL I LLET MATERNA I LA SEVA RELACIÓ AMB LA PROGRAMACIÓ METABÒLICA DE L'OBESITAT

Àngela Esteve Vidal

Treball de Fi de Grau

Facultat de Ciències

Universitat de les Illes Balears

Any acadèmic 2021-22

Paraules clau del treball:

miARNs, obesitat, dianes, llet materna, glàndula mamària, líquid amniòtic, cordó umbilical, miR-99b, miR-195, miR-181a, miR-30d.

Nom del tutor / la tutora del treball: Juana Sànchez Roig

Nom del tutor / la tutora (si escau)

Autoritz la Universitat a incloure aquest treball en el repositori institucional per consultar-lo en accés obert i difondre'l en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Autor/a		Tutor/a	
Sí	No	Sí	No
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

RESUM

L'obesitat és una patologia complexa multifactorial deguda a l'acumulació anormal i excessiva del teixit adipós. Aquesta presenta una creixent incidència mundial, predominant als països occidentals. Evidències recents manifesten la importància del paper dels miARNs, molècules d'ARN petites no codificades d'entre 19 i 23 nucleòtids de longitud, com a moduladors de respostes fisiològiques i patologies del metabolisme. Concretament, aquest Treball de Fi de Grau (TFG) s'orientà a l'estudi bibliogràfic del paper dels miARNs en la llet materna, glàndula mamària, líquid amniòtic i cordó umbilical, relacionant-los amb la programació metabòlica a l'obesitat. En aquesta recerca, es van seleccionar miR-99b, miR-195, miR181a i miR-30d. Mitjançant una anàlisi *in silico*, s'estudiaren les dianes moleculars dels miARNs esmentats, i les rutes metabòliques més rellevants en les quals actuen, per comparar-les amb l'obesitat. De manera experimental, es van quantificar els nivells d'aquests 4 miARNs a mostres de llet materna i glàndula mamària de rates Wistar adultes control i amb obesitat induïda per la dieta (OID). Els resultats obtinguts en el procediment experimental evidenciaren, d'una banda, un increment de l'expressió del miR-181a a mostres de glàndula mamària de les rates amb OID, i, d'altra banda, una disminució de miR-99b (a llet materna) i miR-30d (a llet i a glàndula mamària), a les rates amb OID respecte les control. Per tant, es pot concloure que la ingesta d'una dieta que induïx obesitat altera els nivells d'expressió de certs miARNs que podrien tenir relació amb aquesta obesitat. Tanmateix, calen més investigacions per entendre els papers metabòlics dels miRNAs en el desenvolupament primerenc de l'obesitat.

RESUMEN

La obesidad es una patología compleja multifactorial debida a la acumulación anormal y excesiva del tejido adiposo. Ésta presenta una creciente incidencia mundial, predominante en los países occidentales. Evidencias recientes manifiestan la importancia del papel de los miARNs, moléculas de ARN pequeñas no codificadas de entre 19 y 23 nucleótidos de longitud, como moduladores de respuestas fisiológicas y patologías del metabolismo. Concretamente, este Trabajo de Fin de Grado (TFG) se orientó al estudio bibliográfico del papel de los miARNs en la leche materna, glándula mamaria, líquido amniótico y cordón umbilical, relacionándolos con la programación metabólica en la obesidad. En esta búsqueda, se seleccionaron miR-99b, miR-195, miR181a y miR-30d. Mediante un análisis *in silico*, se estudiaron las dianas moleculares de dichos miARNs, y las rutas metabólicas más relevantes en las que actúan, para compararlas con la obesidad. De forma experimental, se cuantificaron los niveles de estos 4 miARNs a muestras de leche materna y glándula mamaria de ratas Wistar adultas control y con obesidad inducida por la dieta (OID). Los resultados obtenidos en el procedimiento experimental evidenciaron, por un lado, un incremento de la expresión del miR-

181a en muestras de glándula mamaria de las ratas con OID, y, por otra parte, una disminución de miR-99b (a leche materna) y miR-30d (leche y glándula mamaria), en las ratas con OID respecto a las control. Por tanto, se puede concluir que la ingesta de una dieta que induce obesidad altera los niveles de expresión de ciertos miARNs que podrían tener relación con esta obesidad. Sin embargo, son necesarias más investigaciones para entender los papeles metabólicos de los miRNAs en el desarrollo temprano de la obesidad.

ABSTRACT

Obesity is a complex multifactorial pathology due to the abnormal and excessive accumulation of adipose tissue. It has an increasing incidence worldwide, predominantly in Western countries. Recent evidence shows the importance of the role of miRNAs, small non-coding RNA molecules between 19 and 23 nucleotides in length, as modulators of physiological responses and metabolic pathologies. Specifically, this Bachelor's Thesis was oriented to the bibliographic study of the role of miRNAs in breast milk, mammary gland, amniotic fluid and umbilical cord, relating them to metabolic programming in obesity. In this search, miR-99b, miR-195, miR181a and miR-30d were selected. Using in silico analysis, the molecular targets of these miRNAs, and the most relevant metabolic pathways in which they act, were studied for comparison with obesity. Experimentally, the levels of these 4 miRNAs were quantified in breast milk and mammary gland samples from adult Wistar rats with control and diet-induced obesity (DIO). The results obtained in the experimental procedure evidenced, on the one hand, an increase in the expression of miR-181a in mammary gland samples from rats with OID, and, on the other hand, a decrease of miR-99b (to breast milk) and miR-30d (milk and mammary gland), in rats with OID with respect to control rats. Therefore, it can be concluded that the intake of an obesity-inducing diet alters the expression levels of certain miRNAs that could be related to this obesity. However, further research is needed to understand the metabolic roles of miRNAs in the early development of obesity.

Agraïments

M'agradaria transmetre el meu més sincer agraïment a tots aquells que m'han ajudat i han contribuït a que aquest treball hagi sigut possible. En primer lloc, a la meva tutora, la Doctora Joana Sánchez Roig, per la seva ajuda en la planificació i organització d'aquest Treball Final de Grau, així com en el seu suport emocional, tranquil·litat transmesa i confiança posada sobre mi. També, agrair a Pere Bibiloni Coll per dedicar-me el seu temps i paciència tant al laboratori com amb l'anàlisi estadístic de les dades.

En segon lloc, a tota la meva família durant tots aquests anys al Grau de Bioquímica, per confiar plenament amb mi, recolzar-me en els moments més durs i per les abraçades a distància "de les nostres". Finalment, a tots els meus amics. Gràcies a les de casa pel suport i la seguretat de saber que en arribar sempre hi havia un "has tornat i pareix que no haja passat ni una setmana". I gràcies a les del pis i als de poble per aguantar-me i, fer d'aquests anys una experiència increïble i inoblidable en tots els aspectes.

A tots ells, mil gràcies.

ÍNDEX

RESUM.....	3
RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
1. INTRODUCCIÓ.....	7
1.1 miARNs	7
1.2 RELACIÓ DELS miARNs AMB L'OBESITAT	7
1.3 OBESITAT.....	8
2. OBJECTIUS.....	9
3. MATERIALS I MÈTODES	10
3.1 RECERCA BIBLIOGRAFICA.....	10
3.2 ANÀLISI <i>IN SILICO</i> DE LES DIANES DELS miARNs SELECCIONATS.....	11
3.3 QUANTIFICACIÓ miARNs	12
3.3.1 DISSENY EXPERIMENTAL.....	12
3.3.2 ANÀLISI EXPRESSIÓ miARNs LLET I GLÀNDULA MAMÀRIA.....	12
3.3.3 ANÀLISI ESTADÍSTICA.....	13
4 RESULTATS I DISCUSSIÓ	14
4.1 RESULTATS RECERCA BIBLIOGRAFICA	14
4.1.1 EL PAPER DELS miARNs A LLET MATERNA, GLÀNDULA MAMÀRIA, CORDÓ UMBILICAL I LÍQUID AMNIÒTIC.	14
4.2 ANALISI miARNs SELECCIONATS A MOSTRES DE LLET I GLÀNDULA MAMÀRIA	17
4.2.1 RECERCA BIBLIOGRÀFICA DELS miARNs SELECCIONATS AMB RELACIÓ A L'OBESITAT	17
4.2.2 ANÀLISIS <i>IN SILICO</i> DE LES DIANES DELS miARNs SELECCIONATS	19
4.2.3 QUANTIFICACIÓ miARNs SELECCIONATS A MOSTRES DE LLET I GLÀNDULA MAMÀRIA.....	23
5 CONCLUSIONS.....	26
6 BIBLIOGRAFIA	27

1. INTRODUCCIÓ

1.1 miARNs

Els microARNs (miARNs o miR) són molècules d'ARN petites no codificants que s'expressen en els diferents tipus de cel·lulars i/o teixits, i estan formats entre uns 19 i 23 nucleòtids de longitud. Van ser detectats per primera vegada en 1993, i des d'aquest moment han suposat un especial interès en els científics degut a les seves funcions reguladores sobre el metabolisme ^{1,2}.

Aquestes molècules regulen entre el 30 i 80% de l'expressió de gens codificants de proteïnes diana mitjançant la unió a ARN missatgers (ARNm). Això suposa una disminució d'expressió d'aquests gens i, per tant, una repressió post-transcripcional. Un mateix miARN es pot unir a diverses regions diferents i influir en l'expressió de diferents gens ¹⁻³.

El miARN madurs deriven d'un procés de biogènesi que comença amb un fragment d'ADN codificat en el genoma humà, que es troba al nucli, i serà processat, per posteriorment ser exportat al citoplasma ⁴.

Primerament, aquest fragment d'ADN es transcrit per l'ARN polimerasa II, donant lloc a una molècula llarga d'ARN denominada pri-miARN. Aquest pri-miARN prematur és processat per un complex format per la ribonucleasa DROSHA (nucleasa primària que executa el pas d'inici del processament de miARN al nucli), el cofactor DGCR8 (*DiGeorge Syndrome Critical Regional*) i l'ARNasa III. El complex genera el pre-miARN d'uns 60-70 nucleòtids, el qual serà posteriorment exportat al citoplasma mitjançant una exportina ⁴.

Una vegada la molècula ha sigut exportada, serà reconeguda i escindida per un complex format per DICER (ribonucleasa membre de la família de les ARNases III) i dues proteïnes, Argonauta i TRBT (*TAR RNA binding protein*) per generar un miARN de doble cadena. Finalment, una vegada es desenrotlli de la doble cadena, una cadena d'aquest dúplex de miARN serà degradada, i l'altra s'assemblarà amb la proteïna RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*), formant així el miARN madur ⁴.

1.2 RELACIÓ DELS miARNs AMB L'OBESITAT

Els miARNs presenten una important funció en la regulació d'una àmplia gamma de vies metabòliques pel que poden contribuir a la regulació de l'homeòstasi energètica i metabòlica. Una expressió alterada d'aquestes molècules s'ha associat a la desregulació de l'estat fisiològic, generant una major prevalença a patologies com l'obesitat, diabetis o envelliment ⁴.

Així doncs, es coneix una àmplia varietat de miARNs implicats en la regulació del metabolisme de la glucosa i lípids, com en l'activació d'adipogènesi o senyalització de la insulina, entre altres ⁴.

Aquestes molècules són un punt clau en el control de l'obesitat, també en processos inflamatoris d'aquesta patologia, com d'altres relacionades. S'ha demostrat que els miARNs afecten als teixits principals en el metabolisme durant el desenvolupament de la síndrome metabòlica, a més, de l'expressió diferencial de certs miARNs en el teixit adipós d'individus amb obesitat respecte individus amb normopès ⁵.

Actualment, s'evidencia que la inflamació induïx respostes a canvis en l'expressió de miARN específics als adipòcits i afecta la fisiopatologia de la inflamació del teixit adipós induïda per l'obesitat ⁴.

Aleshores, s'entén el paper dels miARNs com moduladors de respostes fisiològiques i patologies del metabolisme. El que dona a entendre la relació entre patologies com l'obesitat amb la regulació o desregulació de l'expressió dels miARNs involucrats ³.

1.3 OBESITAT

L'obesitat és l'acumulació anormal i excessiva de teixit adipós, sent categoritzada com una patologia complexa multifactorial amb molts factors involucrats. Per definició un individu pateix d'obesitat quan el seu índex de massa corporal (IMC) és major a 30 kg/m². Aquesta malaltia presenta una creixent prevalença mundial des fa uns anys, motiu pel qual molts autors l'han designat com epidèmia. L'Organització Mundial de la Salut (OMS) va estimar al 2016 què més de 650 milions de persones adultes patien obesitat. I, al voltant de 4 milions moren cada any per complicacions relacionades amb aquesta patologia ^{2,6}.

L'obesitat s'ha associat a patologies cròniques com la diabetis, hipertensió, dislipèmies, malalties cardíques, fetge gras, etc. ⁴ fet que pot conduir a canvis patològics en l'organisme, generant complicacions com la inflamació o la resistència a la insulina per part d'alguns teixits ⁷.

L'etiologia de l'obesitat es deu en gran part a factors ambientals, però també un punt important és la contribució de la genètica i epigenètica. Pel que fa la predisposició genètica, estudis recents han demostrat la presència de *loci* del genoma associats amb l'obesitat i fenotips relacionats. D'altra banda, els factors ambientals es veuen alterats per l'excés d'ingesta energètica de glúcids i lípids, poca activitat física, sedentarisme, estrès, etc ⁴.

Les modificacions epigenètiques són les modificacions heretables que no es troben a la seqüència de l'ADN. Aquestes modificacions poden ser modulades per l'exposició ambiental, de manera que es considera com la interacció entre factors genètics i ambientals. L'estudi de l'epigenoma relacionat amb l'obesitat es centra principalment en l'estudi a gran escala dels patrons de metilació de l'ADN, concretament dels gens candidats a l'obesitat. S'ha observat, els nivells de metilació s'associen tant negativa o positivament amb la presència d'IMC elevat o obesitat ^{8,9}.

A més a més, molts autors coincideixen en la relació entre la prevalença a l'obesitat i la nutrició en les primeres etapes del desenvolupament d'un individu, el que s'anomena com programació metabòlica. Per tant, té importància de l'estil de vida de la mare gestant i lactant sobre el possible risc a l'obesitat de la descendència ¹⁰.

2. OBJECTIUS

Aquest Treball Fi de Grau (TFG) està centrat en l'estudi global del paper dels miARNs en llet materna, glàndula mamària, líquid amniòtic, i cordó umbilical en la programació metabòlica de l'obesitat. Per assolir l'objectiu, es realitzarà una recerca bibliogràfica i treball experimental, amb els següents objectius específics:

Objectiu 1.

La recerca bibliogràfica l'objectiu principal és l'estudi i coneixement dels miARNs que es troben presents a la llet materna, glàndula mamària, líquid amniòtic i sang de cordó umbilical, el seu paper i la seva relació amb la programació metabòlica de l'obesitat. A més, a partir d'aquesta recerca es farà una selecció dels miARNs interessants degut a la seva relació amb la programació metabòlica.

Objectiu 2.

El treball experimental es durà a terme a partir dels miARNs seleccionats a l'objectiu 1. La finalitat d'aquesta part és determinar els nivells dels miARNs seleccionats a mostres de llet i glàndula mamària de rates Wistar amb obesitat induïda per la dieta (OID) comparant amb un altre grup de rates amb dieta control. A més, s'identificaran els seus ARNm diana amb una anàlisi *in silico*. La finalitat d'aquest segon objectiu és determinar si l'obesitat materna, o una dieta hiperlipídica durant la lactància, pot alterar els nivells de miARNs, i tenir relació amb la programació metabòlica de l'obesitat.

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1 RECERCA BIBLIOGRÀFICA

La recerca bibliogràfica sobre els miARN en glàndula mamària, llet materna, líquid amniòtic i cordó umbilical en la programació metabòlica de l'obesitat, va ser realitzada a partir dels articles que, baix les condicions i filtres específics, es trobaven disponibles a la base de dades *PubMed* abans de dia 13 d'abril del 2022.

Els articles emprats per aquesta revisió s'han obtingut a partir de la base de dades *PubMed*. La principal paraula clau usada per la recerca ha sigut *miRNA*, per una informació més genèrica sobre el tema. A partir dels coneixements assolits d'aquesta primera recerca, es van afegir altres paraules clau per centrar-se en els òrgans i fluids específics de l'estudi, com *mammary gland*, *breast milk*, *umbilical cord* i *amniotic fluid*.

A més d'acotar la recerca amb paraules clau específiques, es van fent servir certs filtres per restringir articles, com: la data de publicació dels articles (2000-2022), el tipus de document (*Review* i *Systematic Review*), la disponibilitat del text (*Free Full Text*); i l'idioma (anglès, castellà).

Per centrar més l'estudi en la programació metabòlica de l'obesitat d'aquests miARN, es va aplicar la paraula clau *obesity* a cada una de les variants de la recerca, i es va realitzar una revisió i lectura dels títols i resums dels articles per filtrar més la recerca.

Tal com es pot observar a la **Figura 1**, primerament, rere la recerca més específica amb l'aplicació dels filtres, s'obtingueren uns resultats més acotats. Per la llet materna s'obteniren 47 articles, per la glàndula mamària 31, pel cordó umbilical 14 i pel líquid amniòtic 10 articles. Finalment, amb la lectura i revisió dels articles aconseguits, per elegir de manera més específica i exhaustiva els articles utilitzats, es seleccionaren: 3 articles relacionats amb la llet materna, 6 amb la glàndula mamària, 7 amb líquid amniòtic i 5 amb cordó umbilical. Tots connectant els miARN, l'obesitat i la programació metabòlica.

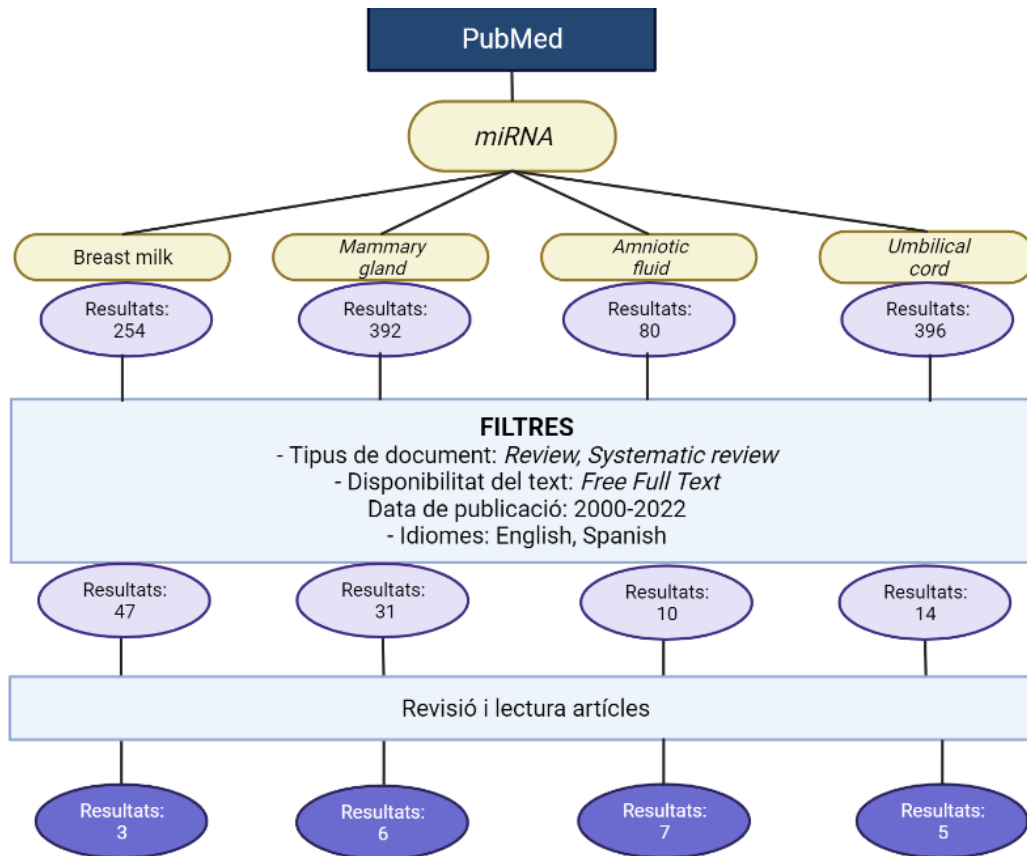


Figura 1. Esquema de la recerca bibliogràfica dins l'objectiu 1.

3.2 ANÀLISI *IN SILICO* DE LES DIANES DELS miARNs SELECCIONATS

Sabent que els miARNs regulen múltiples gens en unir-se als ARNm diana, controlant així l'estabilitat i la traducció dels ARNm que codifiquen proteïnes ¹. Per tant, es va realitzar una anàlisi *in silico* per conèixer les dianes específiques dels miARN seleccionats.

A través de la base de dades en línia *miRDB* (<http://mirdb.org/>) ¹¹, es van predir els ARNm dianes dels miARNs tractats en aquest TFG. Aquesta base de dades té un algorisme de predicció de dianes i assigna una puntuació. A major puntuació, més confiança de què la predicció sigui correcta. Les dianes considerades rellevants a analitzar van ser les que presentaven una puntuació major a 80, segons el que recomana la pròpia base de dades.

Seguidament, es va dur a terme un agrupament de tots els gens diana obtinguts dels 4 miARNs seleccionats. L'objectiu d'aquesta tasca va ser gestionar un mapeig global per identificar les vies metabòliques, o processos biològics en els quals estan implicades les dianes dels miARNs. Aquest procés va ser gestionat per la base de dades en línia gratuïta de vies biològiques anomenada *REACTOME* (<https://reactome.org/>) ¹².

3.3 QUANTIFICACIÓ miARNs

3.3.1 DISSENY EXPERIMENTAL

En aquest treball es determinaren els nivells del miARNs a mostres de llet materna i glàndula mamària de rates amb obesitat induïda per la dieta (OID) i rates control. Aquest és el principal objectiu experimental, per tal de determinar si l'obesitat materna durant la lactància altera els nivells dels miARNs seleccionats per la seva possible relació amb la programació metabòlica de l'obesitat.

Així doncs, es varen seleccionar els miARN relacionats amb l'obesitat segons la bibliografia: miR-195-5p, miR-99b-5p, miR-181a-5p i miR30d-3p. Aquets miARNs es van determinar tant a la glàndula mamària com a la llet materna, a dia 21 i 15 del període de lactància respectivament, de 8 rates Wistar adultes amb dieta control i d'altres 8 rates Wistar adultes OID. Es va emprar com a miARN de referència o *housekeeping* (HK) el miR-99a-5p.

Les mostres que s'utilitzaren per fer aquest TFG van ser recollides prèviament per membres del Laboratori de Biologia Molecular Nutrició i Biotecnologia ¹³. A partir d'aquestes mostres, a aquest TFG es va realitzar el protocol per la determinació dels nivells del miARN seleccionats.

3.3.2 ANÀLISI EXPRESSIÓ miARNs LLET I GLÀNDULA MAMÀRIA

Primerament, es va extreure l'ARN de totes les mostres. Amb el Nanodrop es va quantificar la concentració d'ARN, i la relació de l'absorbància 260/280 per determinar la contaminació per proteïnes i la relació de l'absorbància 260/230 per determinar la possible contaminació per composts fenòlics. A continuació, es diluïren les mostres per obtenir una concentració de 5 ng/μL en totes elles.

En un primer pas, es va dur a terme una retrotranscripció mitjançant l'enzim retrotranscriptasa, el qual permet aconseguir ADNc (ADN complementari) a partir de les mostres d'ARN de llet materna i glàndula mamària de les rates control i amb fenotip obès. Aquest es va fer emprant un protocol RT Universal per microARNs amb el *kit de miRCURY® LNA®*, per la detecció de RT-PCR d'alta sensibilitat en temps real de miARNs utilitzant SYBR® Green. Per la preparació de la RT, el kit contenia la *miRNA mix* (1 μL miRCURY RT Reaction Buffer, 0.5 μL 10x miRCURY RT Enzyme Mix, 0.25 μL Synthetic RNA Spike-in i 2.25 μL d'aigua lliure d'ARNases) i 1 μL ARN total [5 ng/μL]. Les reaccions es van incubar en el termociclador en una placa de 96 pouets, amb el següent protocol de temperatures: a 42 °C durant 60 min pel pas de la transcripció inversa, seguit d'una reacció d'inactivació a 95 °C durant 5 min i finalment, deixant-lo reposar a 4 °C indefinidament.

Seguidament, es va realitzar una dilució 1/15 dels productes de RT (ADNc).

A continuació, es va dur a terme la PCR en temps real. En aquest cas, emprant un protocol de *kit de PCR miRCURY LNA SYBR® Green*. El volum final per a fer la PCR fou de 10 µL, i incloïa: 3 µL d'ADNc (dilució 1/15) i 7 µL de mix de PCR (5 µL de 2 x miRCURY SYBR® Green Master Mix, 0.5 µL de ROX Reference Dye, 1 µL PCR primer específic de cada miARN i 0.5 µL d'aigua lliure d'ARNases). Les reaccions van ser incubades en una placa de 96 pouets a 95 °C durant 2 min, seguit de 40 cicles de 95 °C durant 15 s i 56 °C durant 1 min, usant l'instrument StepOnePlus Real-Time PCR Systems.

Paral·lelament a les mostres, es van realitzar un blanc per la RT i altre per la qPCR.

Per l'anàlisi de resultats de les RT-qPCRs va emprar-se el programa *StepOne™ and StepOnePlus™ Software v2.3* de ThermoFisher, el qual permet obrir i analitzar les dades generades des del sistema StepOne. Així doncs, s'analitza la *Melt Curve*, el senyal de fluorescència depenent de la temperatura específica per cada amplicó; i l'*Amplification Plot*, el senyal de fluorescència per cada un dels 40 cicles. S'obtingué el cicle llindar (Ct), el qual es defineix com el número de cicle al qual hi ha un increment exponencial de la fluorescència.

A més dels miARN d'interès, es va dur a terme l'anàlisi de miR-99a-5p, el qual es va fer servir de referència (*housekeeping*). Finalment, s'extrapolaren les dades a un Excel on s'ordenaren les dades per tal d'aplicar la següent fórmula per normalitzar els miARN diana amb el *housekeeping*:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(Ct \text{ miARN diana} - Ct \text{ miARN HK})}$$

3.3.3 ANÀLISI ESTADÍSTICA

Les dades van ser processades estadísticament. Amb *Microsoft Excel* es va obtenir la mitjana i l'error estàndard de la mitjana (SEM) de les mostres amb fenotip del grup OID i de les mostres del grup control. Les dades es presenten respecte al 100% de les mostres control. Seguidament, per la comparació de les mitjanes entre els dos grups experimentals (control i OID), es representaren els resultats a un gràfic de barres per cada un dels miARNs corresponents.

Finalment, amb el programa *RStudio* s'executà el test no paramètric *U de Mann-Whitney Wilcoxon* per determinar si hi havia diferències estadísticament significatives. Aquest test és el més idoni per mostres que no segueixen una distribució normal, mostres independents i mostres per grup amb $n \leq 10$, com les analitzades a aquest estudi.

4 RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1 RESULTATS RECERCA BIBLIOGRAFICA

4.1.1 EL PAPER DELS miARNs A LLET MATERNA, GLÀNDULA MAMÀRIA, CORDÓ UMBILICAL I LÍQUID AMNIÒTIC.

Els miARNs estan presents en fluids corporals com la llet materna, les glàndules mamàries, el líquid amniòtic i el cordó umbilical, entre altres. Aquestes molècules són unes de les principals que s'involucren en els mecanismes moleculars fisiològics i patològics dels individus al llarg de totes les etapes de la vida .

La llet materna és la font nutritiva principal pel creixement i desenvolupament dels nadons, fins a almenys 6 mesos – 2 anys després del naixement, segons les recomanacions de l'Organització Mundial de la Salut (OMS) ^{6,14,15}.

Els principals components de la llet humana són els macronutrients i micronutrients, entre els quals es troben carbohidrats, proteïnes, minerals i vitamines; també és rica en hormones i factors de creixement. En els últims anys s'ha descobert la presència i l'important paper de comunitats microbianes i els miARNs, els quals influeixen sobre el sistema immunitari dels infants, entre altres funcions ¹⁴⁻¹⁶.

A l'igual que durant l'embaràs, en la lactància, la mare gestant i lactant ha de seguir un estil de vida adequat i específic per evitar la fluctuació dels components de la llet. Fet que podrà suposar una programació metabòlica adequada al recent nat per la resta de la seva vida ¹⁵.

A un estudi amb rates lactants, en el qual s'investigà l'impacte de l'alimentació amb dieta de cafeteria durant la lactància, es va demostrar l'alteració dels nivells de determinats miARNs de la llet materna a causa d'aquest tipus de dieta. Aquest fet, podria afectar el fenotip de la descendència respecte a la prevalença a l'obesitat ¹⁷. Així com s'ha demostrat a altre estudi en humans, l'alteració de la interacció entre determinats miARNs presents en la llet materna de mares lactants amb obesitat i una possible relació amb el creixement/desenvolupament dels lactants ¹⁸.

Concretament, la llet materna és un fluid amb una gran quantitat d'ARNs i miARNs. S'estima que hi ha quasi 1.400 espècies diferents de miARNs en la llet. L'actuació principal, com s'ha comentat, és sobre el sistema immunitari i la programació metabòlica del desenvolupament del bebè ¹⁴. Aquests miARNs són sintetitzats principalment a la glàndula mamària, i durant la lactància es secreten amb la llet de manera lliure o en forma de vesícules o exosomes d'uns 30-100 nm de diàmetre. Amb la lactància s'evidencia que es transporten a l'intestí dels nins, i

s'absorbeixen per les cèl·lules epitelials d'aquest per arribar a diversos teixits de l'organisme ^{15,19,20}.

D'altra banda, estudis han demostrat la intervenció dels miARNs en la llet sobre la correcta maduració de l'intestí, desenvolupament microbià, regulació del sistema immune i desenvolupament o prevenció a llarg termini de malalties metabòliques com l'obesitat i diabetis ^{15,16,19}.

La glàndula mamària està formada per greix i teixit conjuntiu i mamari ²¹. La funció principal és la síntesi i secreció de la llet materna durant la seva lactància per part les cèl·lules mamàries epitelials ^{22,23}. Encara això, també presenta altres tipus de cèl·lules amb diverses funcions, com les cèl·lules epitelials vasculars, els fibroblasts o cèl·lules immunitàries ²⁴. Durant l'etapa fetal comença el desenvolupament d'aquestes glàndules, i seguidament, van progressant amb les diverses etapes de la vida: desenvolupament embrionari, prepuberal, puberal, l'embaràs, lactància i finalment, involució mamària ²². Sent la pubertat, l'embaràs i la lactància els períodes més decisius ²³. No obstant això, un dels punts claus pel desenvolupament de les glàndules mamàries, és l'ambient. Concretament, la nutrició i composició de la dieta. Més enllà del correcte desenvolupament, la dieta també afectarà plenament l'expressió i funció dels miARNs que puguin estar involucrats amb la funció de les glàndules mamàries ²³.

L'expressió de miARNs és crucial per la regulació de les glàndules mamàries en les diferents etapes del desenvolupament ²⁵. Així com la proliferació, diferenciació i la mort cel·lular, són els fenòmens fisiològics regulats pels miARNs ²². La majoria dels miARNs produïts a les glàndules presenten funcions sobre la immunitat, desenvolupament i ràtio salut/malaltia dels pits. Com també en la secreció i regulació de la lactància ^{23,26}.

Hi ha evidència de la relació entre la disminució dels nivells de certs miARNs de la glàndula mamària, com el miR-140, amb certes patologies dels individus, entre les quals destaquen la fibrosi i l'obesitat. Els miARNs de la llet podran actuar com biomarcadors de l'estat d'aquestes glàndules, de les quals provenen ^{24,25}.

El líquid amniòtic per la seva part, és un fluid protector del sac amniòtic, format per un 98-99% d'aigua i la resta de proteïnes, carbohidrats, lípids, urea i electròlits. Aquesta composició química va alterant-se a mesura que avança la gestació. Aquest fluid envolta el fetus mentre es desenvolupa en l'etapa gestacional dins l'úter. Unes de les principals funcions de líquid amniòtic cap al fetus, igual que de la llet materna cap al nadó, és la nutrició, protecció i

regulació ²⁷. Com les característiques immunològiques pel correcte desenvolupament i creixement de l'individu ²⁸.

De la mateixa manera que la placenta humana s'encarrega de generar miARNs per la immunitat, la implantació i el manteniment de l'embaràs ²⁹, els miARNs del líquid amniòtic s'ocupen del desenvolupament del sistema nerviós i certs òrgans del fetus, com també de la neuroprotecció d'aquests ³⁰. Aquest fet evidencia que, els miARNs del líquid amniòtic es fan càrrec de modular l'expressió de certs gens pel desenvolupament, fisiologia i possibles patologies de l'embrió durant l'embaràs ³¹. No obstant això, una sobreexpressió o inexpressió de certs miARNs al líquid amniòtic pot resultar ser crítics per processos relacionats amb l'obesitat, com l'adipogènesi o alteració de la diferenciació adipògena ³².

Finalment, el cordó umbilical és un teixit extraembrionari amb dues artèries i una via umbilical que aporten sang oxigenada i substàncies nutritives al fetus. Aquest teixit connecta la placenta amb el fetus en desenvolupament. Està format per teixit connectiu mucós (gelatina de Wharton), amb una matriu de glicosaminoglicans i col·lagen ^{28,33}. Presenta, a més cèl·lules per la renovació de totes les cèl·lules sanguínies anomenades cèl·lules mare sanguínies (MSC) ³⁴. Aquestes cèl·lules s'autorenoven, proliferen, es diferencien i interaccionen amb altres com les cèl·lules immunitàries, suposant una major protecció a l'embrió durant l'embaràs.

El cordó umbilical també pot alliberar exosomes amb miARNs entre altres molècules, per la correcta implantació i desenvolupament d'embrions ³³. De fet, els miARNs d'aquest teixit presenten un important potencial cardioprotector, neuroregulador i immunomodulador ^{28,35}. Això és degut al fet que intervien la transdiferenciació neuronal de les MSC ³⁶, i actuen sobre rutes bioquímiques per la inflamació, apoptosi i metabolisme ²⁸.

Un estudi recent en el qual s'han estudiat els miARNs del cordó umbilical amb relació al risc a l'obesitat, ha demostrat que alguns miARNs poden actuar com biomarcadors per la identificació primerenca d'una possible obesitat futura, entre altres funcions biològiques. Un exemple és el miR-181a. Alteracions en aquest miARN present en el sèrum del cordó umbilical poden resultar ser un punt clau per la determinació de la prevalença a l'obesitat infantil, sent així un miARN biomarcadors predictiu d'aquesta patologia ³⁷.

Hi ha pocs estudis sobre la informació de la relació dels miARNs del líquid amniòtic i cordó umbilical amb la programació metabòlica de l'obesitat. Per tant, es posa de manifest la necessitat d'estudis futurs i amb un nombre major de mostres per la validació completa

d'aquesta. D'altra banda, hi ha més estudis que indiquen la relació dels miARNs de la llet materna i glàndula mamària amb la programació metabòlica a l'obesitat.

4.2 ANÀLISI miARNs SELECCIONATS A MOSTRES DE LLET I GLÀNDULA MAMÀRIA

En aquest apartat, com es comenta anteriorment, s'elabora una anàlisi de la relació de la programació metabòlica a l'obesitat amb els miARN seleccionats a l'estudi i els seus nivells relatius a glàndula mamària a dia 21 i llet materna a dia 15.

Així doncs, per obtenir una visió completa d'aquesta relació, primerament, es va realitzar una recerca bibliogràfica per comprovar la relació de cada un d'aquests miARNs amb l'obesitat. Seguidament, es realitzà una anàlisi *in silico* per determinar els ARNm diana d'aquests miARNs i estimar les rutes metabòliques en les quals actuaven. Finalment, es va poder dur a terme un estudi experimental i quantificar així els miARNs seleccionats a mostres de llet i glàndula mamària de rates Wistar adultes control i OID.

4.2.1 RECERCA BIBLIOGRÀFICA DELS miARNs SELECCIONATS AMB RELACIÓ A L'OBESITAT

En aquest cas, per la recerca bibliogràfica esmentada, també al cercador *Pubmed*, es consultaren com a paraules clau *obesity* o *overweight* juntament amb cada un dels noms dels miARN estudiats (miR-195a, miR-99b, miR-181a, miR-30d). Després d'una selecció de títols i una lectura dels articles. Es van obtenir el següent nombre d'articles per cada miARN com es pot observar a la **Figura 2**, i consultar la seva relació amb l'obesitat a la **Taula 1**.

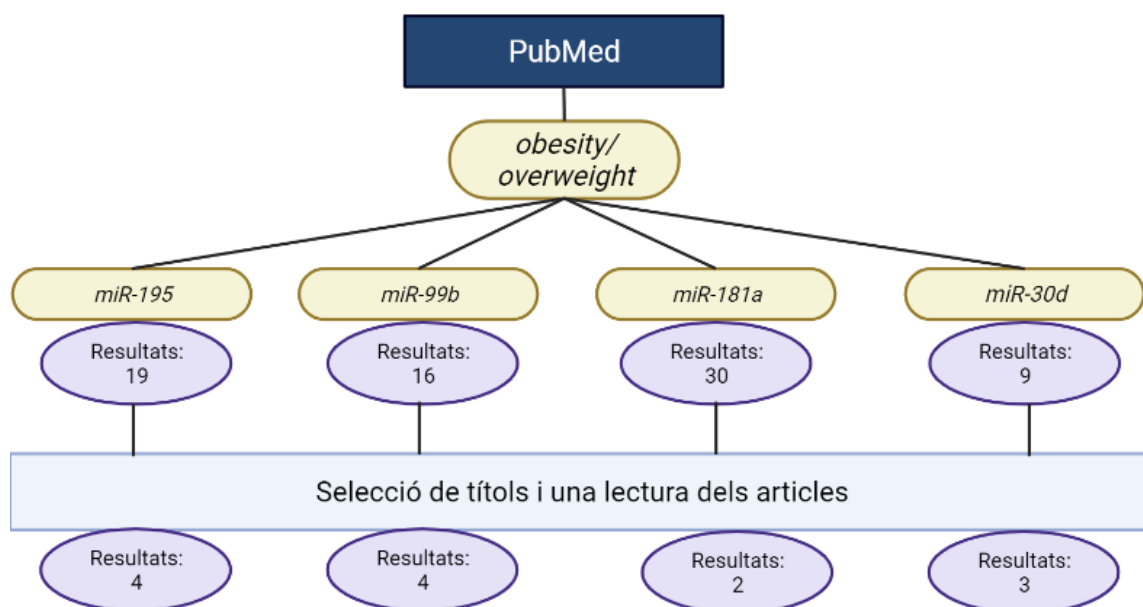


Figura 2. Esquema recerca bibliogràfica per la relació obesitat-miARNs.

miARN	Nom article	Resultats
<i>miR-195</i>	Data on the expression of PEPCK in HepG2 hepatocytes transfected with miR-195 ³⁸	miR-195 regulat a l'alça per una dieta alta en àcids grassos saturats
	Saturated fatty acid-induced miR-195 impairs insulin signalling and glycogen metabolism in HepG2 cells ³⁹	Expressió de miR-195 augmentava en ratolins DIO
	MicroRNAs modulation and clinical outcomes at 1 year of follow-up in obese patients with pre-diabetes treated with metformin vs. Placebo ⁴⁰	Expressió de miR-195-5p en individus obesos més elevada que en individus normopès
	Weight-reduction through a low-fat diet causes differential expression of circulating microRNAs in obese C57BL/6 mice ⁴¹	Expressió de miR-195-5p en individus obesos més elevada
<i>miR-99b</i>	Intestinal Lipid Metabolism Genes Regulated by miRNAs ⁴²	miR-99b-5p un dels principals reguladors dels gens del metabolisme lipídic
	MiR-99b-5p Attenuates Adipogenesis by Targeting SCD1 and Lpin1 in 3T3-L1 Cells ³⁵	Nivell d'expressió de miR-99b-5p disminuït al teixit adipós en individus obesos
	Mtor mechanistic target of rapamycin kinase [<i>Rattus norvegicus</i> (Norway rat)] ⁴³	miR-99b és biomarcador de l'obesitat
	Metabolic recovery after weight loss surgery is reflected in serum microRNAs ⁴⁴	miR-99b amb nivells més elevats en individus sans

<i>miR-181a</i>	Altered Expression of miR-181a-5p and miR-23a-3p Is Associated with Obesity and TNF α -Induced Insulin Resistance ⁴⁵	miR-181a-5p en individus no obsessos relacionada a resistència a la insulina induïda per TNF α
	Decreased miR-181a expression in monocytes of obese patients is associated with the occurrence of metabolic syndrome and coronary artery disease ⁴⁶	miR-181a regulat a la baixa en pacients obesos
<i>miR-30d</i>	Sirt3 sirtuin 3 [<i>Rattus norvegicus</i> (Norway rat)] ⁴⁷	miR-30d-3p regulador del gen Sirt3: biomarcador de l'obesitat
	Elevated and Correlated Expressions of miR-24, miR-30d, miR-146a, and SFRP-4 in Human Abdominal Adipose Tissue Play a Role in Adiposity and Insulin Resistance ³	nivells miR-30d elevats es relacionen amb l'obesitat i diabetis
	Circulating miRNA Signatures Associated with Insulin Resistance in Adolescents with Obesity ⁷	nivells miR-30d elevats es relacionen amb l'obesitat i diabetis

Taula 1. Taula resum articles recerca bibliogràfica per la relació obesitat-miARNs

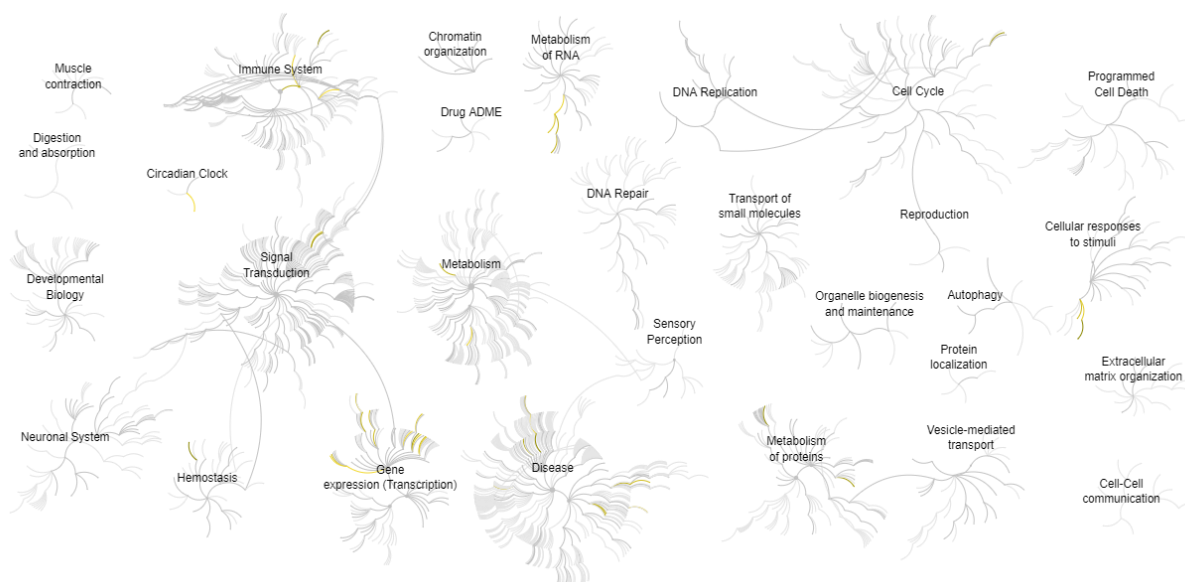
Per tant, tots aquests miARNs es relacionen amb l'obesitat i patologies associades.

4.2.2 ANÀLISIS *IN SILICO* DE LES DIANES DELS miARNs SELECCIONATS

Les dianes dels miARNs es van aconseguir a partir de la base de dades *miRDB*. Per miR99b-5p s'obtingueren 8 ARNm diana rellevants amb una puntuació major a 80. D'altra banda, per miR-195-5p es van adquirir 187 ARNm, per miR-181a-5p es van obtenir 178 i per miR-30d-3p 128.

A partir d'aquest conjunt de 501 ARNm diana teòriques, amb el programa *REACTOME* es van explorar les rutes més representades i específiques on actuen aquestes dianes dels miARNs esmentats. Aquestes rutes metabòliques implicades les podem observar a la **Imatge 1** i classificades a una taula a la **Taula 2**.

Les 7 rutes més enriquides, amb un major p-valor van ser: la via implicada amb el control molecular del rellotge circadiari, la via de senyalització de la interleuquina 10, la via de transcripció intervinguda per FOXO, la via de transcripció de gens regulats per RUNX1, la regulació de la biosíntesi de colesterol per SREBP (SREBF), la via de senyalització de FLT3 i la inhibició de la producció d'òxid nítric (NO).



Imatge 1. Esquema de tots les rutes metabòliques on actuen aquestes dianes dels miARNs seleccionats.

Pathway name	Entities found	Entities Total	Entities ratio	Entities pValue	Entities FDR	Reactions found	Reactions total	Reactions ratio	Species name
BMAL1:CLOCK,NPAS2 activates circadian gene expression	6	43	0.003	6.37E-4	4.75E-1	5	20	0.001	Homo sapiens
Interleukin-10 signaling	8	86	0.006	1.18E-3	4.75E-1	2	15	0.001	Homo sapiens
FOXO-mediated transcription	9	110	0.007	1.44E-3	4.75E-1	16	85	0.006	Homo sapiens
RUNX1 regulates transcription of genes involved in differentiation of myeloid cells	3	11	0.001	2.42E-3	4.94E-1	4	7	0.001	Homo sapiens
Circadian Clock	8	105	0.007	3.98E-3	4.94E-1	15	59	0.004	Homo sapiens
FOXO-mediated transcription of cell cycle genes	4	27	0.002	4.16E-3	4.94E-1	3	22	0.002	Homo sapiens
Regulation of cholesterol biosynthesis by SREBP (SREBF)	7	87	0.006	5.18E-3	4.94E-1	11	52	0.004	Homo sapiens
FLT3 Signaling	5	48	0.003	6.14E-3	4.94E-1	7	43	0.003	Homo sapiens
Transport of Mature Transcript to Cytoplasm	7	90	0.006	6.18E-3	4.94E-1	13	13	0.001	Homo sapiens
Inhibition of nitric oxide production	2	5	0	6.48E-3	4.94E-1	4	5	0	Homo sapiens
FGFR3 mutant receptor activation	3	17	0.001	8.04E-3	4.94E-1	10	10	0.001	Homo sapiens
Signaling by activated point mutants of FGFR3	3	17	0.001	8.04E-3	4.94E-1	6	6	0	Homo sapiens
ATF6 (ATF6-alpha) activates chaperones	3	17	0.001	8.04E-3	4.94E-1	2	10	0.001	Homo sapiens
RUNX2 regulates genes involved in differentiation of myeloid cells	2	6	0	9.18E-3	4.94E-1	2	2	0	Homo sapiens
RUNX3 regulates BCL2L11 (BIM) transcription	2	6	0	9.18E-3	4.94E-1	2	2	0	Homo sapiens
RUNX2 regulates chondrocyte maturation	2	7	0	1.23E-2	4.94E-1	4	4	0	Homo sapiens
IRS activation	2	7	0	1.23E-2	4.94E-1	3	3	0	Homo sapiens
TP53 Regulates Transcription of Genes Involved in G1 Cell Cycle Arrest	3	20	0.001	1.24E-2	4.94E-1	8	17	0.001	Homo sapiens
Transport of Mature mRNA derived from an Intron-Containing Transcript	6	81	0.005	1.36E-2	4.94E-1	4	4	0	Homo sapiens
Nuclear import of Rev protein	4	41	0.003	1.71E-2	4.94E-1	6	7	0.001	Homo sapiens

Taula 2. Taula de totes les rutes metabòliques més rellevants on actuen aquestes dianes dels miARNs seleccionats.

Primerament, el rellotge molecular en el sistema nerviós central regula un conjunt de processos del ritme circadiari que envien senyals als teixits perifèrics a través del sistema nerviós autònom⁴⁸. Suposant un rellotge molecular per l'homeòstasi metabòlica⁴⁹, la ingesta d'aliments, activitat física i processos metabòlics mantenen un equilibri energètic a l'organisme que mostren un ritme circadiari⁴⁸. S'ha descrit que, l'alteració o interrupció d'aquest equilibri suposa l'aparició de trastorns, com malalties cardiovasculars, la diabetis o l'obesitat⁵⁰. Un altre aspecte per l'asincronia d'aquest rellotge molecular és la son. En aquest cas, s'estaria parlant

d'un rellotge molecular del cicle vigília/son. El desacoblament d'aquesta proporció es deu a la interrupció de la son, treball per torns, *jet-lag*, estrès, etc ⁵¹. Estudis, demostren que aquests són associats a un augment de l'apetit, prevalença a l'obesitat, síndrome metabòlic, diabetis i inclòs certs tipus de càncer ^{50,51}. Així doncs, la desregulació de les rutes metabòliques en les quals està implicat el rellotge molecular presenta una relació directament proporcional amb la programació metabòlica a l'obesitat.

D'altra banda, la interleuquina 10 és una citoquina antiinflamatòria i immunosupressora important ⁵². En condicions fisiològiques, el teixit adipós disminueix la inflamació mitjançant la secreció de citoquines com la IL-10 ^{53,54}. No obstant això, en condicions d'obesitat, es produeix l'estat inflamatori al teixit adipós. Aquest estat es caracteritza per nivells alterats de citoquines, ⁵⁵ on predominen les adipoquines proinflamatòries, com IL-6, TNF- α ; i la disminució alhora, d'adipoquines antiinflamatòries com IL-10 ⁵⁶. Estudis recents, afirmen que la via senyalització de la interleuquina 10 pot inhibir la fase primerenca de l'adipogènesi ⁵⁷. I a més, altre estudi realitzat per Gotaro Toda et al., il·lustra el potencial de la senyalització d'IL-10 al fetge per alleujar la resistència hepàtica a la insulina en condicions d'obesitat ⁵⁸. Així doncs, l'obesitat s'associa amb una reducció concurrent dels nivells d'IL-10, per això aquesta interleuquina podria presentar un efecte protector sobre trastorns com la hipertrigliceridèmia i, per tant, l'obesitat ⁵².

Una altra ruta metabòlica que imparteix un efecte significatiu amb la disfunció metabòlica com l'obesitat és la transcripció intervinguda per FoxO. FoxO és un factor transcripcional que actua sobre el metabolisme de la glucosa i lípids per tal de proporcionar energia ⁵⁹. Tapan Behl et al. afirmen "la investigació creixent també mostra que a través de FoxO1, els microARN (miR) duen a terme mecanismes de regulació de lípids, cosa que suggereix que FoxO1 podria estar implicat en els canvis genètics implicats en l'obesitat" ⁶⁰. La disminució de FOXO provoca la disminució de la degradació de glucogen i augment de la producció de glucosa hepàtica. Per tant, les dades presentades proposen que el paper de FoxO1 es pot reduir en subjectes obesos en comparació amb subjectes sans ⁵⁹.

Els miARNs seleccionats també presenten gens diana implicats a la ruta en la qual actua el factor de transcripció relacionat amb Run1 (RUNX1). Aquest és un factor de transcripció que s'ha relacionat amb l'obesitat ⁶¹. A l'article de Xiaoli Hou et al. estudia el procés de *browning* del teixit adipós al suprimir RUNX1. En aquest, s'observa com, mitjançant la inhibició per fosforilació del factor RUNX1, es desestabilitza el factor i augmenta predisposició a l'obesitat

i altres malalties metabòliques relacionades ⁶². Es coneix, per tant, que l'expressió de RUNX1 es troba disminuïda en individus amb sobrepès o obesitat en comparació a individus amb normopès ⁶². Aquest fet explica que la pèrdua de la funció de RUNX1 suposa la fosforilació i, per tant, la inhibició d'Akt, de la via de senyalització d'insulina PI3K/Akt. Així doncs, es dona una desregulació del metabolisme, com la disminució de la captació de glucosa per part del teixit adipós (disminució de l'adipogènesi) ⁶³.

La regulació de la biosíntesi de colesterol per SREBP és una ruta metabòlica important en què participen gens diana dels miARNs seleccionats a aquest TFG. Concretament, el SREBF és un factor de transcripció essencial que regula molts gens del metabolisme lipídic i glucídic, i homeòstasi energètica al promoure la glucòlisi, lipogènesi i adipogènesi ⁶⁴. Aleshores, la ingesta induïx l'augment d'expressió de SREBP; fet que suposa major predisposició a malalties metabòliques com l'obesitat, diabetis o dislipèmia ⁶⁴. Tanmateix, aquest gen presenta diverses isoformes, pel que pot presentar diferents respostes al colesterol ⁶⁵. I així, també diferents riscos a l'obesitat i problemes metabòlics relacionats. Generalment, l'activació de la via SREBP és comú en les cèl·lules adiposes d'individus amb obesitat ⁶⁶. John F. Reichard i Lynne T. Haber a un estudi van trobar com ratolins transgènics amb SREBP serien resistents a la insulina i presentaren complicacions d'obesitat ⁶⁷. A altre estudi amb rates obesas induïdes per la dieta per rica en greix, tractades amb licorina (alcaloide cristal·lí terapèutic), el gen SREBF es regulava a la baixa a les rates amb gràcies a un tractament amb licorina ⁶⁸. Per tant, la via de SREBP es troba directament relacionada amb l'obesitat.

FLT3 és un gen que codifica una proteïna que participa en la formació i multiplicació de cèl·lules sanguínies noves ⁶⁹. La via de senyalització d'aquest gen s'associa amb l'obesitat. Mutacions en el gen FLT3 juntament amb el metabolisme dels àcids grassos poliinsaturats presenten una associació amb un IMC més elevat ⁷⁰. Una investigació realitzada per Luca Mazzearella et al. va confirmar que certes mutacions en FLT3 van relacionar positivament la via de senyalització d'aquest gen amb l'obesitat. FLT3 mutat quan s'uneix al seu lligand específic suposa un canvi conformacional en certs residus de tirosina de diverses vies de senyalització cel·lular inhibint-les, una de les quals s'inclou és la via PI3K/Akt ⁷¹. Segons la bibliografia i com s'ha comentat anteriorment, un bloqueig o disminució en la via PI3K/Akt de la insulina altera el metabolisme cel·lular i, per tant, comporta a condicions patològiques com l'obesitat o malalties relacionades ⁷¹.

Finalment, l'última ruta metabòlica en la qual estan involucrats ARNm diana dels miARNs seleccionats és la inhibició de la producció d'òxid nítric (NO). NO és un regulador fisiològic vasodilatador i antioxidant, que presenta diverses funcions a l'organisme ⁷², regula el metabolisme de substàncies energètiques, per la qual cosa està categoritzat com regulador central del metabolisme energètic i composició corporal ⁷³. La biodisponibilitat de NO és major en persones amb normopès ⁷⁴. Per la qual cosa, persones amb obesitat a causa de la seva vasoconstricció i augment de certes substàncies, els nivells de NO es veuran disminuïts ⁷⁴. Per tant, Brian E. Sansbury i Bradford G. Hill afirmen "La biodisponibilitat de NO disminueix en models animals d'obesitat induïda per la dieta i en pacients obesos i resistent a la insulina; i l'augment de la producció de NO té efectes notables sobre l'obesitat i la resistència a la insulina" ⁷³.

4.2.3 QUANTIFICACIÓ miARNs SELECCIONATS A MOSTRES DE LLET I GLÀNDULA MAMÀRIA

Per estudiar els nivells dels miARN seleccionats, es va realitzar una retrotranscripció i una qPCR del miR-195, miR-99b, miR-181a i miR-30d a mostres de glàndula mamària i llet materna de rates OID i rates control. En concret es van determinar els nivells de cada un dels miARN seleccionats a mostres de llet materna a dia 15 i glàndula mamària a dia 21.

Amb les Ct de les reaccions RT-qPCR de cada un dels miARN seleccionats i el *housekeeping* (miR-99a), es va calcular la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Es va atribuir com a referència, el 100% a les mostres control. Així es van obtenir els percentatges d'expressió dels miARNs de les mostres OID respecte al grup control. Els resultats de l'anàlisi dels nivells d'expressió dels miARN seleccionats del grup OID respecte a les mostres control, tant a glàndula mamària com a llet materna, es representen a la **Figura 3**.

Observem que els nivells de miR-195 a les mostres de llet materna i glàndula mamària del grup OID respecte del grup control, no canvien la seva expressió relativa. S'ha descrit que el miR-195 en els hepatòcits, està regulat a l'alçada per una dieta alta en àcids grassos saturats i altera la senyalització de la insulina hepàtica a través de la supressió d'INSR (receptor de insulina) ³⁸. A més, segons un estudi en el qual van emprar ratolins amb obesitat induïda per la dieta, es va veure com l'expressió de miR-195 al teixit adipós augmentava respecte a ratolins control ³⁹. De manera que, l'expressió de miR-195-5p, sol ser més elevada amb condició normopès en comparació al sobrepès ^{40,41}.

Els nivells d'expressió de miR-99b, tant a les mostres de llet materna com a les de la glàndula mamària del grup OID estan regulades a la baixa respecte a les del grup control. A més, es veu com aquesta expressió en les mostres de llet presenta un p-valor molt significatiu (p-valor= 0.0037). El miR-99b-5p és un dels principals reguladors dels gens relacionats amb el metabolisme dels lípids ⁴². Segons uns estudis, el nivell d'expressió de miR-99b-5p es troba disminuït al teixit adipós en individus amb obesitat sent així un biomarcador de diverses malalties entre les quals es troba l'obesitat ^{35,43}.

L'expressió relativa de miR-181a-5p en cas de les mostres de la glàndula tendeix a augmentar en les mostres OID respecte dels control, tot i que, aquest augment poc significatiu (p valor<0.1). Segons la bibliografia consultada l'expressió de miR-181a-5p en individus amb obesitat es correlaciona inversament a l'adipositat i resistència a la insulina induïda per TNF α ⁴⁵. És a dir, l'expressió del miR-181a en el teixit adipós està regulada a la baixa en pacients amb obesitat ⁴⁶.

Finalment, l'expressió de miR-30d-3p presenta diferències significatives com podem observar a la **Figura 3.D**, tant en la llet com en la glàndula mamària. En ambdós casos, l'expressió està regulada a la baixa a les rates del grup OID respecte al grup control amb un p-valor menor de 0.1 i 0.05 en la llet materna i glàndula mamària, respectivament. Així doncs, es pot afirmar que l'expressió d'aquest miARN disminueix amb la inducció de l'obesitat mitjançant la dieta a rates lactants. La relació entre miR-30d-3p i l'obesitat es corrobora perquè aquest miARN és un regulador del gen Sirt3, el qual s'ha postulat com biomarcador de l'obesitat, entre altres patologies ⁴⁷. A més a més, segons la bibliografia uns nivells circulants de miR-30d elevats es relacionen positivament amb nivells de trànscripats de la proteïna SFRP4 al teixit adipós, la qual és clau en el desenvolupament del teixit gras ^{3,7}. Aquesta proteïna SFRP4 és un membre de la família SFRP que exerceix un paper fonamental en la patogènia de l'obesitat i la diabetis de tipus 2, i té un paper en la regulació del creixement cel·lular i la diferenciació de certs tipus de cèl·lules específiques ⁷. Per tant, nivells circulants de miR-30d elevats es relacionen amb l'obesitat i diabetis ^{3,7}, al contrari del que s'observa al nostre estudi. Aquesta possible diferència pot deure's al fet que, al nostre estudi, es tracta d'individus als quals se'ls ha induït l'obesitat mitjançant la dieta durant un període curt de temps (15 dies amb dieta obesògena). Els altres estudis, els individus tenien una obesitat més instaurada, i a més, no es poden descartar diferències específiques entre el teixit adipós en el cas de l'estudi i la glàndula mamària del TFG.

Hi ha diferències en el perfil de miARNs relacionats amb el desenvolupament de l'obesitat a glàndula mamària i llet materna de rates lactants amb OID. Per tant, aquestes diferències podrien tenir implicacions a la programació metabòlica de la descendència.

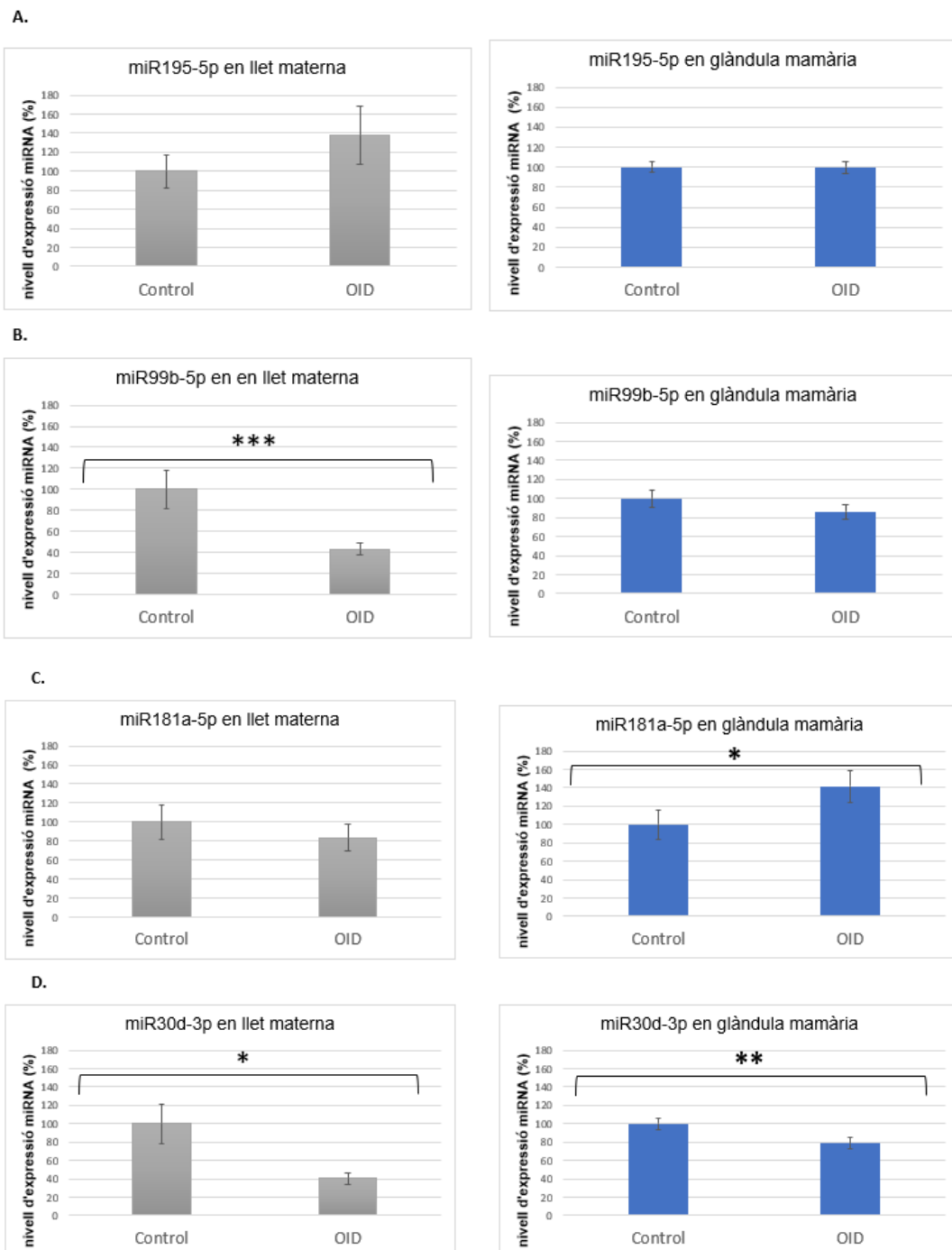


Figura 3. Nivells dels miARNs en llet (gris) i glàndula mamària (blau) de mostres de grup control i grup d'obesitat induïda per la dieta (OID). Es representa el percentatge d'expressió (%) amb les mitjanes \pm SEM del grup OID en relació al grup control, el qual s'ha agafat de referència. Estadístiques del test de Mann-Whitney Wilcoxon: * $p < 0.1$, ** $p < 0.05$, * $p < 0.01$.**

5 CONCLUSIONS

En definitiva, segons les dades recopilades i una vegada finalitzada la revisió sobre la relació entre els miARN i l'obesitat, es conclou:

- La glàndula mamària, la llet materna, el líquid amniòtic i el cordó umbilical presenten miARNs. Aquests miARNs, sobretot els de la llet i glàndula, podrien exercir accions sobre mecanismes fisiològics i patològics relacionats amb la prevalença a l'obesitat.
- Els miARN miR-195, miR-99b, miR-181a i miR-30d, presenten múltiples ARNm diana que actuen sobre una gran varietat de rutes metabòliques, entre les quals 7 d'aquestes podrien relacionar-se, directa o indirectament, amb la programació metabòlica de l'obesitat.
- Els perfils d'expressió de miR-99b, miR-181a i miR-30d a glàndula mamària i llet materna estan alterats a Wistar amb OID. En concret, es troben nivells elevats de miR-miR-181a a la glàndula mamària de rates lactants amb OID en comparació a les controls; i nivells disminuïts de miR-99b (a llet), i miR-30d (tan a llet com a glàndula mamària) a les rates amb OID.

Com conclusió global, es pot confirmar la gran rellevància que presenten els miARNs en certs teixits i fluids en concordança a la programació metabòlica de l'obesitat. Tot i això, és necessari un major coneixement del rol metabòlic dels miARN, si aquest canvis poden a regular l'expressió gènica de la descendència i, en concret en afectar al desenvolupament primerenc de l'obesitat.

6 BIBLIOGRAFIA

1. Kiran S, Kumar V, Kumar S, Price RL, Singh UP. Adipocyte, Immune Cells, and miRNA Crosstalk: A Novel Regulator of Metabolic Dysfunction and Obesity. *Cells*. 2021;10(5):1004. doi:10.3390/CELLS10051004
2. Alves JM, Teles RHG, Gatto CDVG, Muñoz VR, Cominetti MR, de Oliveira Duarte ACG. Mapping Research in the Obesity, Adipose Tissue, and MicroRNA Field: A Bibliometric Analysis. *Cells*. 2019;8(12). doi:10.3390/CELLS8121581
3. Lopez YON, Garufi G, Pasarica M, Seyhan AA. Elevated and correlated expressions of miR-24, miR-30d, miR-146a, and SFRP-4 in human abdominal adipose tissue play a role in adiposity and insulin resistance. *International Journal of Endocrinology*. 2018;2018. doi:10.1155/2018/7351902
4. Iacomino G, Siani A. Role of microRNAs in obesity and obesity-related diseases. *Genes & Nutrition*. 2017;12(1). doi:10.1186/S12263-017-0577-Z
5. Vienberg S, Geiger J, Madsen S, Dalgaard LT. MicroRNAs in metabolism. *Acta Physiologica (Oxford, England)*. 2017;219(2):346. doi:10.1111/APHA.12681
6. Organización Mundial de la Salud (OMS). Obesidad y sobrepeso. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
7. Lin H, Tas E, Børsheim E, Mercer KE. Circulating miRNA Signatures Associated with Insulin Resistance in Adolescents with Obesity. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. 2020;13:4929. doi:10.2147/DMSO.S273908
8. María Aguilera C, Anguita-Ruiz A. Epigenética de la obesidad >> Resumen Palabras clave epigenética, metilación del ADN, obesidad, tejido adiposo, humanos. *Nutr Clin Med*. 2018;XII(2):47-60. doi:10.7400/NCM.2018.12.2.5062
9. Casanello P, Krause BJ, Castro-Rodríguez JA, Uauy R. Epigenética y obesidad. *Revista Chilena de Pediatría*. 2016;87(5):335-342. doi:10.1016/J.RCHIPE.2016.08.009
10. Picó C, Palou M, Priego T, Sánchez J, Palou A. Metabolic programming of obesity by energy restriction during the perinatal period: different outcomes depending on gender and period, type and severity of restriction. *Frontiers in Physiology*. 2012;3. doi:10.3389/FPHYS.2012.00436
11. Chen Y, Wang X. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Research*. 2020;48(D1):D127. doi:10.1093/NAR/GKZ757
12. Gillespie M, Jassal B, Stephan R, et al. The reactome pathway knowledgebase 2022. *Nucleic Acids Research*. 2022;50(D1):D687-D692. doi:10.1093/NAR/GKAB1028
13. Pomar CA, Van Nes R, Sánchez J, Picó C, Keijer J, Palou A. Maternal consumption of a cafeteria diet during lactation in rats leads the offspring to a thin-outside-fat-inside phenotype. *Int J Obes (Lond)*. 2017;41(8):1279-1287. doi:10.1038/IJO.2017.42
14. Kim SY, Yi DY. Components of human breast milk: from macronutrient to microbiome and microRNA. *Clinical and Experimental Pediatrics*. 2020;63(8):301. doi:10.3345/CEP.2020.00059

15. Esch BCAM van, Porbahaie M, Abbring S, et al. The Impact of Milk and Its Components on Epigenetic Programming of Immune Function in Early Life and Beyond: Implications for Allergy and Asthma. *Frontiers in Immunology*. 2020;11:2141. doi:10.3389/FIMMU.2020.02141
16. Jiang X, You L, Zhang Z, et al. Biological Properties of Milk-Derived Extracellular Vesicles and Their Physiological Functions in Infant. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021;9:693534. doi:10.3389/FCELL.2021.693534
17. Pomar CA, Castro H, Picó C, Serra F, Palou A, Sánchez J. Cafeteria Diet Consumption during Lactation in Rats, Rather than Obesity Per Se, alters miR-222, miR-200a, and miR-26a Levels in Milk. *Mol Nutr Food Res*. 2019;63(8). doi:10.1002/MNFR.201800928
18. Zamanillo R, Sánchez J, Serra F, Palou A. Breast Milk Supply of MicroRNA Associated with Leptin and Adiponectin Is Affected by Maternal Overweight/Obesity and Influences Infancy BMI. *Nutrients*. 2019;11(11). doi:10.3390/NU11112589
19. Melnik BC, Schmitz G. Exosomes of pasteurized milk: potential pathogens of Western diseases. *Journal of Translational Medicine*. 2019;17(1). doi:10.1186/S12967-018-1760-8
20. Melnik BC. The Pathogenic Role of Persistent Milk Signaling in mTORC1- and Milk-MicroRNA-Driven Type 2 Diabetes Mellitus. *Current Diabetes Reviews*. 2015;11(1):46. doi:10.2174/1573399811666150114100653
21. Definición de glándula mamaria - Diccionario de cáncer del NCI - NCI. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/glandula-mamaria>
22. Jena MK, Jaswal S, Kumar S, Mohanty AK. Molecular mechanism of mammary gland involution: An update. *Developmental Biology*. 2019;445(2):145-155. doi:10.1016/J.YDBIO.2018.11.002
23. Hue-Beauvais C, Faulconnier Y, Charlier M, Leroux C. Nutritional Regulation of Mammary Gland Development and Milk Synthesis in Animal Models and Dairy Species. *Genes (Basel)*. 2021;12(4). doi:10.3390/GENES12040523
24. Macias H, Hinck L. Mammary Gland Development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2012;1(4):533. doi:10.1002/WDEV.35
25. Jena MK. MicroRNAs in the development and neoplasia of the mammary gland. *F1000Res*. 2017;6:1018. doi:10.12688/F1000RESEARCH.12005.2
26. Gigli I, Maizon DO. microRNAs and the mammary gland: A new understanding of gene expression. *Genetics and Molecular Biology*. 2013;36(4):465. doi:10.1590/S1415-47572013005000040
27. Floris I, Kraft JD, Altosaar I. Roles of MicroRNA across Prenatal and Postnatal Periods. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(12). doi:10.3390/IJMS17121994
28. Cargnoni A, Papait A, Masserdotti A, et al. Extracellular Vesicles From Perinatal Cells for Anti-inflammatory Therapy. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021;9. doi:10.3389/FBIOE.2021.637737
29. Kamity R, Sharma S, Hanna N. MicroRNA-Mediated Control of Inflammation and Tolerance in Pregnancy. *Frontiers in Immunology*. 2019;10(APR). doi:10.3389/FIMMU.2019.00718

30. Kingsbury C, Stuppia L. Stem cell secretome derived from human amniotic fluid affords neuroprotection in an ischemic model. *Brain Circulation*. 2021;7(1):18. doi:10.4103/BC.BC_8_21
31. di Tizio D, di Serafino A, Upadhyaya P, Sorino L, Stuppia L, Antonucci I. The Impact of Epigenetic Signatures on Amniotic Fluid Stem Cell Fate. *Stem Cells International*. 2018;2018. doi:10.1155/2018/4274518
32. Trohatou O, Zagoura D, Orfanos NK, et al. miR-26a Mediates Adipogenesis of Amniotic Fluid Mesenchymal Stem/Stromal Cells via PTEN, Cyclin E1, and CDK6. <https://home.liebertpub.com/scd>. 2017;26(7):482-494. doi:10.1089/SCD.2016.0203
33. Boroujeni ME, Gardaneh M. Umbilical cord: an unlimited source of cells differentiable towards dopaminergic neurons. *Neural Regeneration Research*. 2017;12(7):1186. doi:10.4103/1673-5374.211201
34. Gobierno de España M de S. Organización Nacional de Transplantes. Fundación Príncipe de Asturias. <http://www.ont.es/Paginas/Home.aspx>
35. Xu Y, Chen X, Zhao C, et al. MiR-99b-5p Attenuates Adipogenesis by Targeting SCD1 and Lpin1 in 3T3-L1 Cells. *J Agric Food Chem*. 2021;69(8):2564-2575. doi:10.1021/ACS.JAFC.0C07451
36. Chen J, Venkat P, Zacharek A, Chopp M. Neurorestorative Therapy for Stroke. *Frontiers in Human Neuroscience*. 2014;8(JUNE). doi:10.3389/FNHUM.2014.00382
37. Takatani R, Yoshioka Y, Takahashi T, et al. Investigation of umbilical cord serum miRNAs associated with childhood obesity: A pilot study from a birth cohort study. *J Diabetes Investig*. Published online June 2, 2022. doi:10.1111/JDI.13863
38. Yang WM, Min KH, Park SW, Lee W. Data on the expression of PEPCK in HepG2 hepatocytes transfected with miR-195. *Data in Brief*. 2017;15:747. doi:10.1016/J.DIB.2017.10.061
39. Yang WM, Jeong HJ, Park SY, Lee W. Saturated fatty acid-induced miR-195 impairs insulin signaling and glycogen metabolism in HepG2 cells. *FEBS Lett*. 2014;588(21):3939-3946. doi:10.1016/J.FEBSLET.2014.09.006
40. Sardu C, Trotta MC, Pieretti G, et al. MicroRNAs modulation and clinical outcomes at 1 year of follow-up in obese patients with pre-diabetes treated with metformin vs. placebo. *Acta Diabetol*. 2021;58(10):1381-1393. doi:10.1007/S00592-021-01743-5
41. Hsieh CH, Rau CS, Wu SC, et al. Weight-reduction through a low-fat diet causes differential expression of circulating microRNAs in obese C57BL/6 mice. *BMC Genomics*. 2015;16(1). doi:10.1186/S12864-015-1896-3
42. Ruiz-Roso MB, Gil-Zamorano J, López de las Hazas MC, et al. Intestinal Lipid Metabolism Genes Regulated by miRNAs. *Front Genet*. 2020;11. doi:10.3389/FGENE.2020.00707
43. Mtor mechanistic target of rapamycin kinase [*Rattus norvegicus* (Norway rat)] - Gene - NCBI. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=56718
44. Sangiao-Alvarellos S, Theofilatos K, Barwari T, et al. Metabolic recovery after weight loss surgery is reflected in serum microRNAs. *BMJ Open Diabetes Research & Care*. 2020;8(2):1441. doi:10.1136/BMJDRC-2020-001441

45. Lozano-Bartolomé J, Llauradó G, Portero-Otin M, et al. Altered Expression of miR-181a-5p and miR-23a-3p Is Associated With Obesity and TNF α -Induced Insulin Resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;103(4):1447-1458. doi:10.1210/JC.2017-01909
46. Hulsmans M, Sinnaeve P, van der Schueren B, Mathieu C, Janssens S, Holvoet P. Decreased miR-181a expression in monocytes of obese patients is associated with the occurrence of metabolic syndrome and coronary artery disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(7). doi:10.1210/JC.2012-1008
47. Sirt3 sirtuin 3 [Rattus norvegicus (Norway rat)] - Gene - NCBI. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=293615
48. Huang W, Ramsey KM, Marcheva B, Bass J. Circadian rhythms, sleep, and metabolism. *The Journal of Clinical Investigation.* 2011;121(6):2133. doi:10.1172/JCI46043
49. Chaix A, Lin T, Le HD, Chang MW, Panda S. Time-restricted feeding prevents obesity and metabolic syndrome in mice lacking a circadian clock. *Cell Metab.* 2019;29(2):303. doi:10.1016/J.CMET.2018.08.004
50. Tahara Y, Aoyama S, Shibata S. The mammalian circadian clock and its entrainment by stress and exercise. *The Journal of Physiological Sciences.* 2017;67(1):1. doi:10.1007/S12576-016-0450-7
51. Albrecht U. The circadian clock, metabolism and obesity. *Obes Rev.* 2017;18 Suppl 1:25-33. doi:10.1111/OBR.12502
52. Liu Y, Xu D, Yin C, Wang S, Wang M, Xiao Y. IL-10/STAT3 is reduced in childhood obesity with hypertriglyceridemia and is related to triglyceride level in diet-induced obese rats. *BMC Endocrine Disorders.* 2018;18(1). doi:10.1186/S12902-018-0265-Z
53. El tejido adiposo, protagonista en las alteraciones metabólicas de la obesidad | Revista de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular | SEEBM. <https://revista.sebbm.es/articulo.php?id=323&url=el-tejido-adiposo-protagonista-en-las-alteraciones-metabolicas-de-la-obesidad>
54. Toita R, Kawano T, Murata M, Kang JH. Anti-obesity and anti-inflammatory effects of macrophage-targeted interleukin-10-conjugated liposomes in obese mice. *Biomaterials.* 2016;110:81-88. doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2016.09.018
55. Dagdeviren S, Jung DY, Lee E, et al. Altered Interleukin-10 Signaling in Skeletal Muscle Regulates Obesity-Mediated Inflammation and Insulin Resistance. *Molecular and Cellular Biology.* 2016;36(23):2956. doi:10.1128/MCB.00181-16
56. Izaola O, de Luis D, Sajoux I, Domingo JC, Vidal M. Inflamación y obesidad (lipoinflamación). *Nutr Hosp.* 2015;31(6):2352-2358. doi:10.3305/nh.2015.31.6.8829
57. Kim YH, Pyo S. Interleukin-10 suppresses adipogenesis via Wnt5a signaling pathway in 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019;509(4):877-885. doi:10.1016/J.BBRC.2019.01.033
58. Toda G, Soeda K, Okazaki Y, et al. Insulin- and Lipopolysaccharide-Mediated Signaling in Adipose Tissue Macrophages Regulates Postprandial Glycemia through Akt-mTOR Activation. *Mol Cell.* 2020;79(1):43-53.e4. doi:10.1016/J.MOLCEL.2020.04.033

59. Kim HJ, Kobayashi M, Sasaki T, et al. Overexpression of FoxO1 in the hypothalamus and pancreas causes obesity and glucose intolerance. *Endocrinology*. 2012;153(2):659-671. doi:10.1210/EN.2011-1635
60. Behl T, Kaur I, Sehgal A, et al. Exploring the Genetic Conception of Obesity via the Dual Role of FoxO. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(6):1-25. doi:10.3390/IJMS22063179
61. Tang X, Sun L, Wang G, Chen B, Luo F. RUNX1: A Regulator of NF- κ B Signaling in Pulmonary Diseases. *Current Protein & Peptide Science*. 2018;19(2):172. doi:10.2174/1389203718666171009111835
62. Hou X, Zhang Y, Li W, et al. CDK6 inhibits white to beige fat transition by suppressing RUNX1. *Nat Commun*. 2018;9(1). doi:10.1038/S41467-018-03451-1
63. Vázquez-Jiménez JG, Roura-Guiberna A, Jiménez-Mena LR, Olivares-Reyes JA. El papel de los ácidos grasos libres en la resistencia a la insulina. *Gaceta medica de Mexico*. 2017;153(7):852-863. doi:10.24875/GMM.17002714
64. Eberlé D, Clément K, Meyre D, et al. SREBF-1 gene polymorphisms are associated with obesity and type 2 diabetes in French obese and diabetic cohorts. *Diabetes*. 2004;53(8):2153-2157. doi:10.2337/DIABETES.53.8.2153
65. Zhang S, Lin X, Lynn H, et al. Dietary cholesterol interacts with SREBF1 to modulate obesity in Chinese children. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2017;61(9):1700105. doi:10.1002/MNFR.201700105
66. Salic K, Gart E, Seidel F, et al. Combined Treatment with L-Carnitine and Nicotinamide Riboside Improves Hepatic Metabolism and Attenuates Obesity and Liver Steatosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(18). doi:10.3390/IJMS20184359
67. Reichard JF, Haber LT. Mode-of-action evaluation for the effect of trans fatty acids on low-density lipoprotein cholesterol. *Food and Chemical Toxicology*. 2016;98:282-294. doi:10.1016/J.FCT.2016.05.018
68. Zheng ZG, Zhu ST, Cheng HM, et al. Discovery of a potent SCAP degrader that ameliorates HFD-induced obesity, hyperlipidemia and insulin resistance via an autophagy-independent lysosomal pathway. *Autophagy*. 2021;17(7):1592. doi:10.1080/15548627.2020.1757955
69. Definición de gen FLT3 - Diccionario de cáncer del NCI - NCI. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/gen-flt3>
70. Lagunas Rangel FA. *Análisis Bioinformático y de Asociación Del Gen FLT3 En Pacientes Con Leucemia Mieloide Aguda*. 2017. http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/bitstream/handle/DGB_UMICH/2987/FCM-B-M-2017-0286.pdf?sequence=1&isAllowed=y
71. Mazzarella L, Botteri E, Matthews A, et al. Obesity is a risk factor for acute promyelocytic leukemia: evidence from population and cross-sectional studies and correlation with FLT3 mutations and polyunsaturated fatty acid metabolism. *Haematologica*. 2020;105(6):1559. doi:10.3324/HAEMATOL.2019.223925

72. Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, et al. Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011;12(5):3117. doi:10.3390/IJMS12053117
73. Sansbury BE, Hill BG. REGULATION OF OBESITY AND INSULIN RESISTANCE BY NITRIC OXIDE. *Free Radic Biol Med*. 2014;0:383. doi:10.1016/J.FREERADBIOMED.2014.05.016
74. Leite-Almeida L, Morato M, Cosme D, et al. Impact of physical activity on redox status and nitric oxide bioavailability in nonoverweight and overweight/obese prepubertal children. *Free Radic Biol Med*. 2021;163:116-124. doi:10.1016/J.FREERADBIOMED.2020.12.005