



TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS
MÉDICAS, MENCIÓN BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR.
ESCUELA DE MEDICINA. UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO.

Título

**MicroRNAs en plasma como marcadores epigenéticos de
disfunción metabólica temprana en niños prepuberales.**

Alumno: Ivo Carrasco-Wong, Mg.

Tutora: Paola Casanello Toledo, PhD

Patrocinante: Mario Párraga San Román, PhD

A todos quienes que con cariño me apoyaron en este largo proyecto.
Mil Gracias.

Índice

1.- Resumen.	5
2.- Introducción.	7
2.1.- Síndrome metabólico.	8
2.2.- Mecanismos epigenéticos.	9
2.3.- Biogénesis de microRNAs y mecanismos de regulación transcripcional.	9
2.4.- microRNAs circulantes en plasma.	13
3.- Hipótesis.	15
4.- Objetivos del trabajo.	15
4.1.- Objetivo 1.	15
4.2.- Objetivo 2.	15
5.- Materiales y Métodos.	16
5.1.- Consideraciones éticas.	16
5.2.- Muestras.	16
5.3.- Sujetos de la muestra.	17
5.4.- Criterio para definir Síndrome Metabólico.	17
5.5.- Análisis de muestras de sangre.	18
5.6.- Extracción de RNA desde plasma.	19
5.7.- Transcripción Reversa.	19
5.8.- Preamplificación y amplificación.	19
5.9.- Predicción de blancos y su interacción para Hsa-miR-Let-7e y Hsa-miR-126.	20
5.10.- Estadística.	20
6.- Resultados.	22
6.1.- Síndrome metabólico y sus componentes.	22
6.1.1.- Características antropométricas y metabólicas de los sujetos estudiados.	22
6.1.2.- Componentes de síndrome metabólico según el género de los sujetos.	22
6.1.3.- Niveles de insulina plasmática y HOMA-IR se asocian con componentes de SM.	25
6.1.4.- Medidas antropométricas al nacer y su asociación con el síndrome metabólico en edades pre-puberales.	25
6.2.- MicroRNAs circulantes presente en el plasma de los niños incluidos en el estudio.	31
6.2.1.- Purificación de los microRNAs.	31

6.2.2.- Determinación de los niveles de expresión de los microRNAs en el plasma de niños con dos o más componentes de SM y en controles.	31
6.2.3.- Niveles plasmáticos de microRNAs según género.	32
6.2.4.- Niveles plasmáticos de microRNAs según cantidad de componentes de SM.	32
6.2.5.- Niveles plasmáticos de microRNAs según componentes de SM.	32
6.2.6.- Correlaciones entre niveles plasmáticos de microRNAs y componentes de SM.....	37
6.2.7.- Análisis de especificidad, sensibilidad y curva ROC para Hsa-miR-Let7e.	41
6.2.8.- Análisis in silico de las posibles vías celulares comprometidas por Hsa-miR-Let7e y Hsa-miR-126.	41
7.- Discusión.	44
7.1.- Características antropométricas y metabólicas de los sujetos estudiados.	44
7.2.- Síndrome metabólico en sujetos pre-puberales y su asociación con medidas antropométricas perinatales.....	45
7.3.- microRNAs circulantes como biomarcadores.	46
7.4.- microRNAs circulantes y componentes de SM.	50
7.4.1.- Hsa-miR-Let7e.	50
7.4.2.- Hsa-miR-126.....	51
7.4.3.- Hsa-miR-132 y Hsa-miR-145.	53
7.4.4.-Hsa-miR-33b.....	54
8.- Conclusión.	56
9.- Referencias.....	58
10.- Anexos.....	63

1.- Resumen.

Marco teórico. En la actualidad existe una sólida evidencia que muestra la relación entre un peso al nacer alterado y el riesgo de sufrir enfermedades crónicas del adulto, como el síndrome metabólico, concepto denominado “origen temprano de las enfermedades en el adulto” (DOHaD) o “programación fetal”. Las enfermedades que conforman el llamado síndrome metabólico (SM), son obesidad central, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, dislipidemia e hipertensión arterial. Este cambio estaría mediado por mecanismos epigenéticos (microRNAs, metilación del DNA y modificaciones postraduccionales de histonas) adquiridos durante la gestación o en las primeras etapas de la vida que alterarían el metabolismo del individuo. Sin embargo, en la actualidad no existe consenso respecto de cómo detectar factores de riesgo para padecer SM en niños pre-púberes, por lo cual se hace imprescindible el desarrollo de marcadores que permitan pesquisar de manera certera y oportuna la presencia del síndrome o sus componentes, en etapas sub-clínicas. Existe un creciente número de trabajos que han demostrado una fuerte asociación entre los niveles plasmáticos de microRNAs, estados patológicos y/o procesos fisiológicos, con importantes implicancias a nivel vascular y metabólico. Entre estos microRNAs se encuentran el miR33b, 126, 132, 145 y let7e.

Hipótesis. En jóvenes pre-púberes los niveles plasmáticos de los microRNAs Hsa-miR-126, Hsa-miR-132, Hsa-miR-145, Hsa-miR-33b y Hsa-miR-let7e se correlacionan con marcadores precoces de daño vascular y alteración en la función metabólica. Estos marcadores epigenéticos se correlacionarían con parámetros bioquímicos y de medidas antropométricas alteradas, asociándose a un mayor riesgo de presentar síndrome metabólico.

Material y método. El diseño experimental incluyó la selección de una sub-muestra de 156 individuos seleccionados desde de una cohorte general de 3325 niños y niñas entre 10 y 11 años de edad, quienes poseían cero, uno, dos y tres o más, componentes del síndrome metabólico. A todos ellos se extrajo RNA desde el plasma y se cuantificaron los niveles de miRNAs circulantes anteriormente mencionados. Posteriormente se realizaron comparaciones entre los distintos niveles de miRNAs y su asociación estadística con el síndrome metabólico o sus componentes.

Resultados. Los hallazgos principales indican que Hsa-miR-let7e y Hsa-miR-126 se asocia y correlaciona, respectivamente, al síndrome metabólico y a sus componentes. Además se definió el poder predictor de hsa-miR-let7e sobre la presencia se síndrome metabólico, mediante curvas ROC. Mediante un análisis *in silico* se mostró que 26 mRNAs putativos de ser blanco de Hsa-miR-Let7e y Hsa-miR-126 se traducen a proteínas que interactúan entre sí; involucradas principalmente en la señalización del receptor de insulina IRS1. En la misma línea, se observó que niveles elevados de Hsa-miR-Let7e se asociaron con insulinemia e índice de HOMA-IR alterados.

Conclusión. La presente tesis muestra por primera vez que los niveles circulantes de miRNAs, como Hsa-let7e y 126, pueden utilizarse como biomarcadores de patologías complejas como el síndrome metabólico. Y que, por sobre todo, son útiles en el pródromo del síndrome, a edades tan importantes como la pre-púber en donde puede definirse la aparición o no de enfermedades cardio-metabólicas en la adultez.

2.- Introducción.

Estudios pioneros liderados por David Barker en el Reino Unido en la segunda mitad de la década de los '80 y principios de los '90, demostraron la asociación entre el bajo peso al nacer y un aumento en la susceptibilidad de presentar condiciones clínicas que forman parte del llamado síndrome metabólico (SM)¹⁻³. Trabajos posteriores han llevado a determinar que no sólo el menor crecimiento intrauterino, sino también la macrosomía fetal (peso al nacer ≥ 4000 g) se asocia con esta programación fetal^{4,5}. Dicha programación, actualmente conocida como Origen durante el Desarrollo de la Salud y Enfermedad (Developmental Origin of Health and Disease, DOHaD), se sustenta a nivel molecular en el establecimiento de modificaciones epigenéticas (i.e. metilaciones del DNA, modificaciones post-traduccionales de histonas y expresión de microRNAs), las cuales participarían en la generación de una “programación” a nivel celular^{6,7}. Al respecto, existe un creciente número de estudios enfocados en demostrar la presencia de marcadores epigenéticos, principalmente relacionados con la susceptibilidad a desarrollar Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2) en individuos que presentaron bajo peso al nacer⁸⁻¹⁰. Sin embargo, del sistema vascular, cuyo desarrollo es altamente influenciado por mecanismos epigenéticos^{11,12}, existe escasa evidencia que relacione los efectos de un desarrollo intrauterino alterado con un mayor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares¹³.

Estudios recientes han demostrado que el crecimiento intrauterino deficiente no sólo se asocia con el riesgo de enfermedades en la vida adulta, sino también con cambios fisiológicos y metabólicos detectables durante la niñez y la pubertad. En este contexto, un bajo peso al nacer se asocia a un mayor índice de masa corporal (IMC) en niños y adolescentes¹⁴⁻¹⁷, lo cual es agravado en sociedades en transición nutricional, como el caso

de Chile¹⁸. Cabe destacar que los fenotipos asociados a DOHaD han sido revertidos a nivel experimental, regulando desde temprana edad la ganancia de peso. Estos antecedentes sugieren que el uso de marcadores tempranos de programación cardiometabólica contribuiría a prevenir o tratar oportunamente el riesgo metabólico y vascular asociado al crecimiento intrauterino alterado¹⁹. Para que esto sea factible es determinante estudiar y definir biomarcadores que permitan pesquisar de manera oportuna la presencia de programación fetal del SM en niños.

2.1.- Síndrome metabólico.

El SM, referido anteriormente como síndrome X, se refiere a una condición donde se presentan al menos tres de las siguientes condiciones clínicas: hipertrigliceridemia, bajo colesterol HDL (C-HDL), obesidad central, hiperglicemia en ayunas e hipertensión arterial^{20,21}, que en su combinación se asocian a riesgo cardiometabólico. Esta condición resulta de la conjugación de múltiples factores de riesgos lo largo de la vida (i.e. genéticos, conductuales y ambientales), los que pueden estar asociados a cambios metabólicos presentes desde muy temprana edad. El criterio NECP-ATP III, modificado recientemente para el nivel de corte de glicemia, es el que se aplica para el diagnóstico de SM en adultos²². En el caso de la población infantil se han generado diversas adaptaciones, destacando la propuesta de Cook y cols. para niños púberes²³. Aún no se han validado criterios diagnósticos de SM aplicables a población infantil chilena.

2.2.- Mecanismos epigenéticos.

La epigenética puede entenderse como un conjunto de mecanismos moleculares que regulan, en el mediano y/o largo plazo, la plasticidad fenotípica en una célula u organismo²⁴. Los principales mecanismos epigenéticos corresponden a metilación del DNA, modificaciones post-traduccionales en histonas, remodelamiento de cromatina dependiente de ATP y microRNAs endógenos. Todos estos mecanismos moleculares presentan la característica común de alterar la expresión de genes en una manera célula específica, ya sea posibilitando o inhibiendo la unión de factores de transcripción al DNA y/o la traducción del mRNA²⁴. Cabe destacar que el efecto de cada uno de estos mecanismos (i.e. represión o activación génica) en algunos casos no es fácilmente deducible, sin embargo tanto la metilación del DNA como los microRNA generan una caída en la expresión de los genes sobre los cuales actúan, o sobre el nivel de proteína codificado por ese gen.

La idea que RNAs no codificantes pudiesen regular la expresión de genes fue propuesta inicialmente en los años 1960's²⁵; sin embargo, los mecanismos implicados en este fenómeno han comenzado a conocerse en los últimos años, entregando una función más dinámica al RNA, aparte de sus funciones clásicas en la transcripción y traducción.

2.3.- Biogénesis de microRNAs y mecanismos de regulación transcripcional.

Los microRNAs son transcritos por RNA polimerasa II o RNA polimerasa III, desde regiones intergénicas o intrónicas del genoma. Se transcriben como precursores de 60-100 nucleótidos de largo, llamados pri-microRNAs, que hibridizan consigo mismo para

formar horquillas; estas horquillas son reconocidas por el complejo Drosha–DGCR8, que procesa al pri-microRNAs para formar el llamado pre-microRNA de 70 nucleótidos. Los pre-microRNAs se asocian a exportina 5–RanGTP, para ser exportado a citoplasma. Una vez allí, la endonucleasa DICER procesa y elimina la horquilla de pre-microRNA, formando el microRNA maduro que consta de 2 hebras de RNA que hibridan entre sí. El dúplex de microRNA es cargado en el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), el cuál desecha una de las hebras de RNA; la que queda acoplada al complejo sirve de hebra guía que hibridiza con el mRNAs blanco, induciendo la represión de la traducción²⁶.

La traducción activa implica la circularización del mRNA, generado por la interacción de las proteínas de unión a la cola poli-A (PABP), unida al factor de iniciación 4G (eIF4G) que cumple el rol de proteína andamio entre PABP y el factor de iniciación 4E (eIF4E) que se une a la estructura “CAP” (7-metilguanosina unida al primer nucleótido) del mRNA. Se han descrito 3 mecanismos por los que el complejo RISC-microRNA es capaz de inhibir la traducción: (1) Inhibición de la iniciación. El microRNA del complejo se une a la región 3'-utr del mensajero, previo a la cola poli-A, el resto del complejo se une a “CAP”, impidiendo que las proteínas de iniciación de la traducción puedan formar complejo (el mRNA no es degradado); (2) Degradación de mRNA. Se ha descrito que los mRNAs que han sido inhibidos en su traducción son acumulados en los llamados cuerpos-P, los que a su vez están enriquecidos en la proteína GW182, que actuaría como proteína andamio que permitiría el reclutamiento de enzimas decapping (DCP1 y DCP2) y de enzimas deadenilasas, iniciando la degradación del mRNA por el extremo 5'y 3'; (3) Inhibición post-iniciación de la traducción. Una vez que ya se hubiese iniciado la

traducción activa de un mRNA, el complejo RISC puede unirse a la región 3'UTR e inducir el llamado "Ribosome Drop-off", que es generar la salida de los ribosomas antes que completen la traducción total del mRNA (Figura 1).

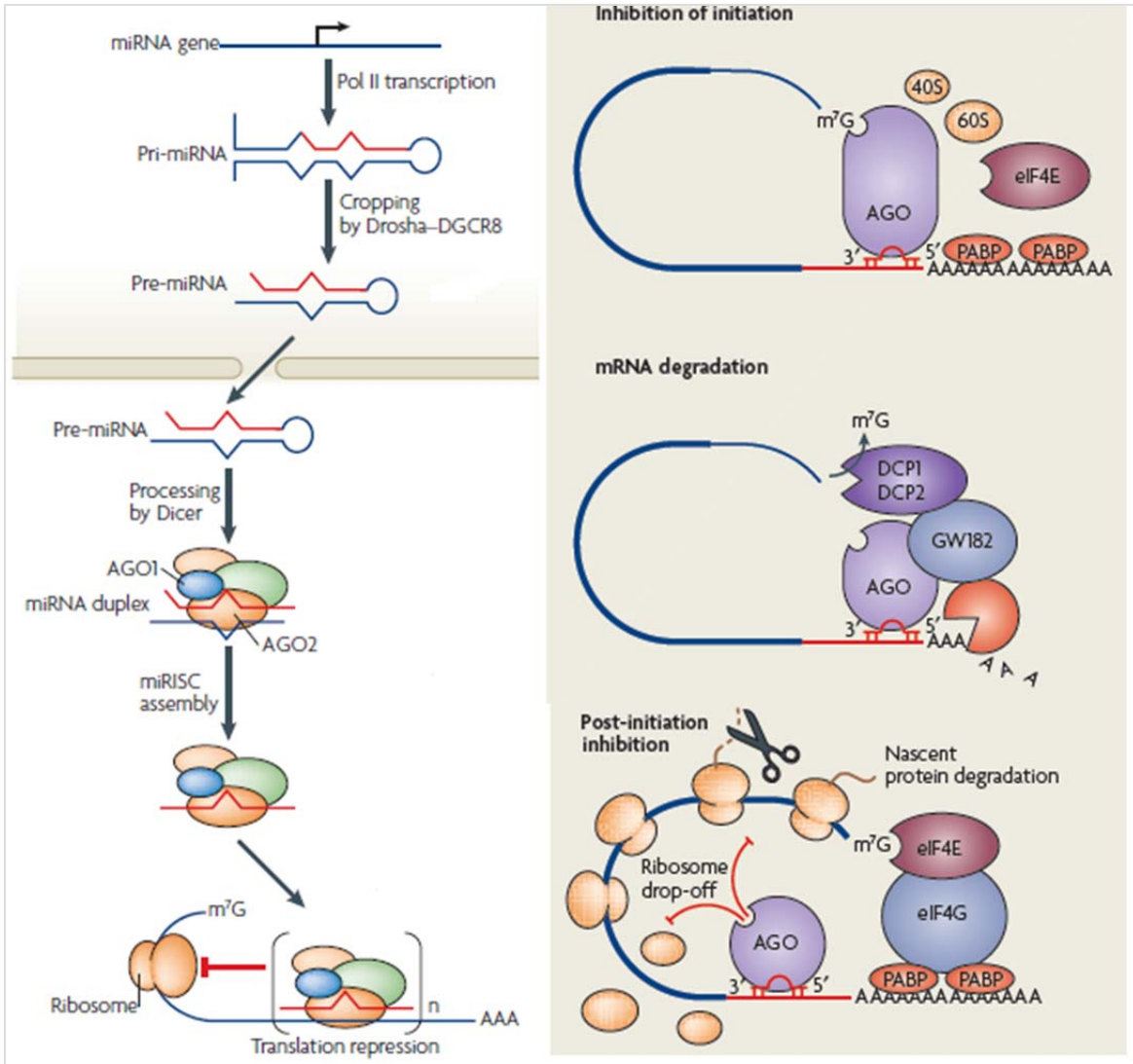


Figura 1. Biogénesis de microRNAs²⁶ y mecanismos de inhibición transcripcional²⁷.

2.4.- microRNAs circulantes en plasma.

Ha sido estudiado y debatido largamente cómo los microRNAs son exportados hacia el espacio extracelular, cómo circulan sin ser degradados en el torrente sanguíneo y cómo reconocen e ingresan a células blanco. En la actualidad es claro que en la célula donante, el pre-microRNA es cargado dentro de exosomas y/o cuerpos multivesiculares (MVB) y que éstas vesículas son liberadas hacia el medio extracelular; paralelamente se propone que los microRNAs pueden circular en forma libre de vesículas, asociados a la proteína de unión a RNA Nuceofosmina-1 (NPM1). El ingreso de los exosomas y/o MVB a la célula blanco se propone que ocurre por endocitosis; los pre-microRNAs asociados con NPM1 serían endocitados mediante la interacción con receptores de la membrana plasmática. Tampoco son conocidos los mecanismos celulares que permiten la liberación de los pre-microRNAs hacia el citosol, para su procesamiento por DICER, y qué impiden la degradación de la vesícula endocítica por la vía lisosomal²⁸.

Existe un creciente número de trabajos que han demostrado una fuerte asociación entre los niveles plasmáticos de microRNAs en estados patológicos y/o procesos fisiológicos, con importantes implicancias a nivel vascular y metabólico²⁹⁻³¹. Se ha reportado que los microRNAs circulantes en plasma poseen las características requeridas para ser considerados biomarcadores: son estables en diversos fluidos del cuerpo; las secuencias de los microRNAs son conservadas entre distintas especies; la expresión de los microRNAs son específico de cada tejido y de condiciones biológicas; lo anterior implica que pueden ser asociados a estados patológicos; técnicamente son de fácil medición; poseen una vida media larga; y están presentes en la circulación sistémica por lo que su recolección se considera poco invasiva³².

Con el fin de determinar la presencia de componentes del síndrome metabólico en una cohorte de chilenos pre-púberes se desarrolló un proyecto Fondecyt dirigido por el Dr. Francisco Mardones, que logró reunir un grupo de cerca de 3200 niños. Estos niños fueron clasificados de acuerdo a sus características antropométricas (peso, talla y pliegues), presión arterial, glicemia en ayunas, niveles de colesterol total y HDL e insulinemia (HOMA), grosor de la íntima media de la arteria carótida, como marcador de disfunción vascular.

En esta tesis se propone estudiar la presencia de un grupo de microRNAs plasmáticos en pacientes pre-púberes de la cohorte antes mencionada, los que poseen obesidad, disfunción vascular y/o alteraciones metabólicas compatibles con el SM y estudiar su correlación con marcadores clínicos de SM en un grupo de pre-púberes.

3.- Hipótesis

En jóvenes pre-púberes los niveles plasmáticos de los microRNAs Hsa-miR-126, Hsa-miR-132, Hsa-miR-145, Hsa-miR-33b y Hsa-miR-let7e se correlacionan con marcadores precoces de daño vascular y alteración en la función metabólica. Estos marcadores epigenéticos se correlacionarían con parámetros bioquímicos y de medidas antropométricas alteradas, asociándose a un mayor riesgo de presentar síndrome metabólico.

4.- Objetivos del trabajo

4.1.- Objetivo 1.

Analizar los cambios en la expresión en plasma de los microRNAs Hsa-miR-126, Hsa-miR-132, Hsa-miR-145, Hsa-miR-33b y Hsa-miR-let7e en un grupo seleccionado de escolares y correlacionarlo con los factores de riesgo para síndrome metabólico.

4.2.- Objetivo 2.

Correlacionar los cambios en la expresión de los microRNAs Hsa-miR-126, Hsa-miR-132, Hsa-miR-145, Hsa-miR-33b y Hsa-miR-let7e con los resultados de los exámenes bioquímicos de función metabólica (glicemia, insulinemia, colesterol total y HDL) y de medidas antropométricas en un grupo de escolares y correlacionarlo con los factores de riesgo para síndrome metabólico.

5.- Materiales y Métodos.

5.1.- Consideraciones éticas.

El desarrollo de esta tesis estuvo acorde con los principios expresados en la Declaración de Helsinki. Los padres o representantes legales de los infantes firmaron un consentimiento informado, y los jóvenes firmaron un asentimiento informado. El estudio fue aprobado por el comité de ética de la Escuela de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile y FONDECYT.

5.2.- Muestras.

En esta tesis se utilizaron muestras obtenidas desde la cohorte estudiada en el proyecto Fondecyt 1090594, donde se determinó la presencia de componentes del SM en 3325 niños (y niñas, en adelante “niños”) entre 10 y 14 años de edad en el periodo 2010 y 2013. Entre los niños que presentaron una combinación preestablecida de componentes de SM se conformaron grupos a los cuales se les realizó determinaciones específicas con la finalidad de profundizar en la caracterización de su condición vascular y metabólica. Del total de niños, aproximadamente el 20% fueron normales para su estado nutricional y fueron incluidos como grupo control.

Las muestras de plasma para el análisis de microRNAs circulantes fueron obtenidas durante el último año de medición. Las muestras fueron procesadas en forma ciega respecto de las características de los pacientes y la presencia de factores de riesgo cardiovascular de los sujetos estudiados.

5.3.- Sujetos de la muestra.

Para esta tesis se incluyó un grupo de 156 niños, de los cuales 90 fueron mujeres y 66 fueron hombres, provenientes de 20 escuelas públicas administradas por la municipalidad de Puente Alto³². Una vez obtenidas las muestras estas fueron clasificadas en base a la presencia de uno, dos o tres de los componentes de SM de acuerdo a los criterios de Cook: con un componente de SM (n=50), dos componentes de SM (n=41), 3 o más componentes de SM (n=35) o la ausencia de componentes de SM (n=30), quienes conformaron el grupo control. El estatus socioeconómico fue estimado mediante el número de años de educación formal de la madre.

5.4.- Criterio para definir Síndrome Metabólico.

El criterio de Cook et al. fue utilizado para definir SM en los sujetos estudiados³³, el cuál fue diagnosticado cuando al menos 3 de los 5 componentes siguientes estuvieron presentes: perímetro de cintura (PC) \geq percentil 90; presión arterial sistólica (PSS) o diastólica (PSD) \geq percentil 90, lipoproteínas de alta densidad (HDL-C) \leq 40 mg/dL; triglicéridos (TG) $>$ 110 mg/dL y glicemia (GLU) \geq 100 mg/ dL. Las evaluaciones realizadas en los colegios fueron realizadas por una enfermera entrenada y por una nutricionista. El peso y talla fueron medidos utilizando una balanza con estadiómetro Seca®, con precisión de 50 g. El peso y talla final corresponden a la media de tres mediciones. El perímetro de cintura fue medida con una cinta inextensible desde el borde lateral superior del ilion derecho en la línea media axilar al final de una exhalación; tres mediciones fueron promediadas y se usó el percentil \geq 90 como valor de corte³⁴.

El monitor de presión sanguínea Critikon ® Dinamap Pro 100 fue utilizado para de acuerdo con normativa internacional, para realizar 3 mediciones independientes de PSS y PSD, las que fueron posteriormente promediadas. Las medias de las determinaciones que resultaron ser \geq al percentil 90, calculado a partir de la distribución de la cohorte completa de niños estudiada (n=3325), fueron clasificadas como anormales³⁵. Un reporte voluntario y privado, que cada sujeto llenó, fue solicitado para evaluar el estado de maduración puberal, el cual fue acompañado por fotografías del desarrollo de los senos en niñas y genitales en niños, incluyendo la presencia de vello púbico. Todos los valores de corte aplicados a los sujetos de esta tesis fueron referidos a las curvas generadas por el estudio de cohorte previamente indicado.

5.5.- Análisis de muestras de sangre.

Las muestras de sangre venosa fueron colectadas en condiciones de ayuno para la determinación de glucosa (Gluco-quant method, Glucose / Hexokinase, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) e insulina (immunoassay direct luminometer chemotherapy, ADVIA Centaur ® XP. Bayer HealthCare LLC, Kyowa Medex Co, Japan) este método mide las concentraciones de insulina desde 0.5 hasta 300 mUI/mL (con una sensibilidad de 0.5 mUI/mL), un coeficiente de variación de 3.48% y 6.71% para concentraciones de 23.51 mUI/mL y 62.49 mUI/mL, respectivamente. HOMA-IR, (homeostasis model assessment - insuline resistance) fue calculado usando la fórmula $[(\text{Glucosa (mmol / L)} \times \text{insulinemia (mUI / mL)}) / 22.5]$. Triglicéridos y HDL-C fueron analizados en la plataforma modular Analytics P-800 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

5.6.- Extracción de RNA desde plasma.

La extracción de RNA y posterior determinación de los niveles de microRNA fue realizado de modo doble ciego, para minimizar el sesgo de los resultados. La obtención de plasma, la extracción de RNA y la normalización con microRNA sintético fue realizado de acuerdo con la metodología descrita en Fichtlscherer et al.³⁶, Brevemente, la sangre total fue colectada en anticoagulante EDTA. El plasma de cada muestra, fue obtenido mediante el método de 2^{ble} centrifugación (una primera centrifugación de la sangre total a 1700g por 10 minutos y tras rescatar el plasma este fue centrifugado nuevamente a 2000g por 10 minutos obteniendo la fracción sobrenadante 1. El RNA total fue extraído desde 250 uL de la fracción sobrenadante 1 de acuerdo a las instrucciones del fabricante del kit miRNAeasy (Qiagen). Para evaluar la trazabilidad de la extracción y además, normalizar los datos obtenidos se agregó 250 pmol de miRNA sintético mimic de cel-miR-39 (Qiagen) a la fracción sobrenadante 1 justo antes del paso de desnaturalización en el protocolo de extracción de RNA³⁶.

5.7.-Transcripción Reversa.

Se realizó una transcripción reversa secuencia específica de los miRNAs Hsa-miR-33b, Hsa-miR-126, Hsa-miR-132, Hsa-miR-145, Hsa-miR-Let-7e y Cel-miR-39, mediante el kit TaqMan microRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystem).

5.8.- Preamplificación y amplificación.

Se realizó un paso de preamplificación antes de la amplificación final y determinación de los niveles de miRNAs, usando TaqMan PreAmp Master Mix y TaqMan

Universal PCR Master Mix II, respectivamente (Applied Biosystem). La cantidad relativa fue calculada mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ en relación al control sintético cel-miR-39.

5.9.- Predicción de blancos y su interacción para Hsa-miR-Let-7e y Hsa-miR-126.

La predicción de blancos fue realizado mediante la previamente validada herramienta on-line TargetScan 6.2 (<http://www.targetscan.org>)³⁷⁻³⁹. La selección de los RNAs mensajeros blancos fue hecha en base a la presencia de un bajo “context score” y una elevada “probability of conserved targeting”. A continuación, la posible interacción entre las proteínas, cuyos mRNAs fueron identificados como posibles blancos de los miRNAs estudiados, fue evaluada mediante la herramienta on-line String 9.05 (<http://string-db.org/>)^{40,41}, utilizando el más elevado valor de confianza (0.9) para la interacción proteína-proteína y un máximo de 20 posibles interacciones.

5.10.- Estadística.

Las diferencias entre las medias de la antropometría (PC, Razón cintura-cadera, IMC) análisis bioquímico en sangre (TG, VLDL, HDL, glicemia, insulina, HOMA-IR) y niveles de miRNA en plasma (Let7e, 126, 132 y 145) respecto a la cantidad de componentes de SM fueron evaluadas usando ANOVA de una vía para muestras independientes. Comparaciones post hoc fueron hechas con la correcciones de Tamane y Bonferroni. Adicionalmente, la asociación entre variables continuas fue evaluada utilizando test de correlación de Pearson. Para describir un posible efecto aditivo para cada componente de SM, el test ANOVA para muestras independientes, y su test post hoc, fue

usado entre las medias de los miRNAs en 3 grupos: sin componente específico de SM, con 1 sólo componente de SM y con 2 componentes de SM. Las curvas ROC fueron construidas en base a sensibilidad y especificidad de los miRNAs estudiados para definir el poder diagnóstico de SM. Todos los análisis fueron realizados en SPSS 17.0. Un valor-p estadísticamente significativo fue definido como <0.05 .

6.- Resultados.

6.1.- Síndrome metabólico y sus componentes.

6.1.1.- Características antropométricas y metabólicas de los sujetos estudiados.

El gráfico de Venn describe a la población estudiada desde un el punto de vista del SM (Figura 2). En ella los que presentaron sólo 1 componente de SM correspondieron a: 35.7% (n=45) perímetro de cintura aumentado, 2.4% (n=3) sólo triglicéridos en plasma elevado y 1.6% (n=2) niveles de HDL en plasma disminuidos. Los grupos que presentaron 2 componentes de SM incluyeron: perímetro de cintura y triglicéridos en plasma elevado en un 22.2% (n=28); perímetro de cintura aumentado y niveles de HDL en plasma disminuidos en un 9.5% (n=12); triglicéridos en plasma elevado y niveles de HDL en plasma disminuidos en un 0.8% (n=1). Un total de 35 sujetos presentaron 3 componentes de SM correspondiendo a un 27.8% de la población estudiada.

6.1.2.- Componentes de síndrome metabólico según el género de los sujetos.

Al analizar el género de los sujetos estudiados se evidencia una diferencia significativa en la cantidad de individuos que presentan alteraciones antropométricas y/o de marcadores bioquímicos de un estado metabólico alterado, según se muestra en la Tabla 1. Los hombres mostraron mayor tasa de obesidad (n=41, correspondiendo al 71.9% de los hombres) y HOMA-IR alterado (n=20, correspondiendo al 30.3% de los hombres). Las mujeres presentaron con mayor frecuencia sobrepeso (n=34, que corresponde a un 37% del grupo) y niveles de triglicéridos elevados (n=46, siendo el 50% del grupo).

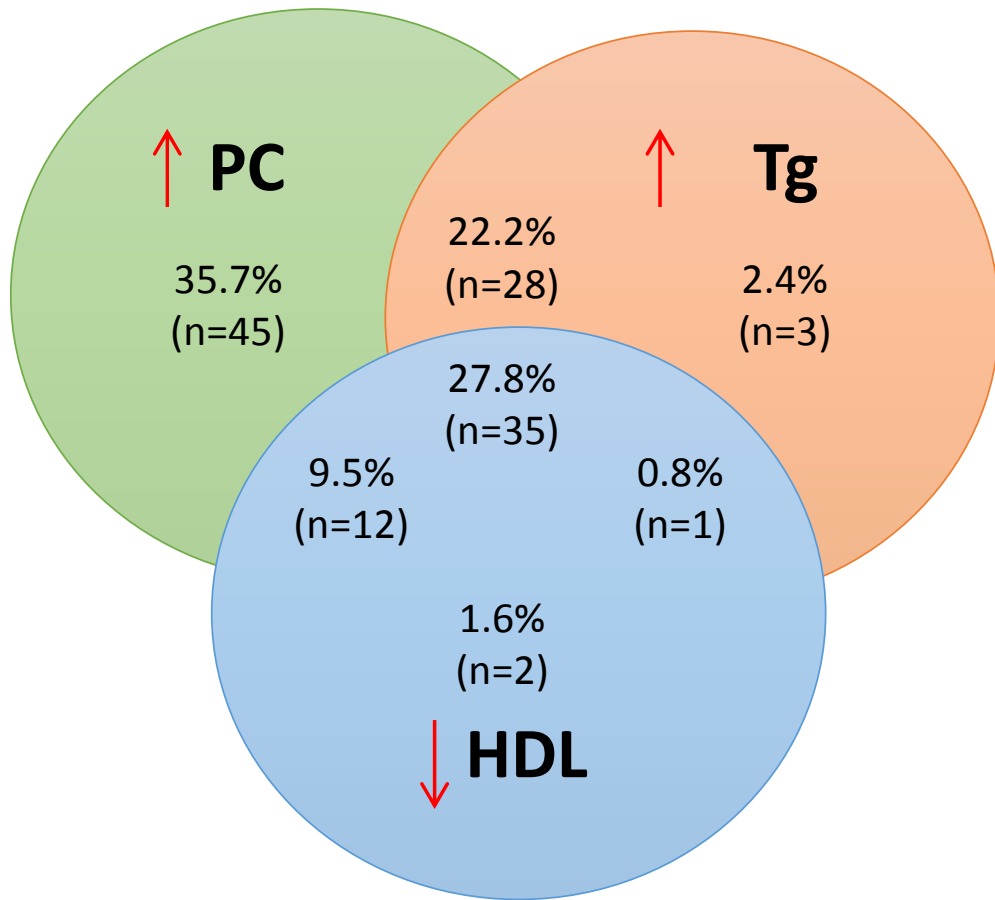


Figura 2. Diagrama de Venn para los componentes de síndrome metabólicos en la población estudiada. Se indica el porcentaje de individuos y que presentaron los componentes en forma única, con uno de los otros componentes o con los otros dos componentes. Perímetro de cintura (PC) elevado, niveles de Triglicéridos elevados y niveles de HDL disminuidos.

Tabla 1. Características generales del grupo en estudio según género.

	Niños	Niñas	Total	Valor p
	N=66	N=92	N= 158	
Edad (años, media [± DE])	11.63 [0.92]	11.65 [0.90]	11.64 [0.90]	0.920
Índice Puberal (Tanner II-V, n [%])	54 [81.8]	91 [98.9]	145 [91.8]	<0.001*
Peso (Kg, media [± DE])	57.3 [12.1]	55.3 [11.4]	56.2 [11.7]	0.285
Talla (cm, media [± DE])	151 [7.4]	150 [6.3]	150.4 [6.8]	0.337
IMC (media [± DE])	24.9 [4.0]	24.4 [4.0]	24.6 [4.0]	0.432
z-IMC (media [± DE])	1.6 [0.7]	1.4 [0.8]	1.5 [0.8]	0.079
Obesidad (n [%])	46 [71.9]	41 [44.6]	87 [55.8]	0.001*
Sobrepeso (n [%])	10 [15.6]	34 [37.0]	44 [28.2]	0.004*
PC ≥ percentil 90 (n [%])	52 [81.3]	68 [73.9]	120 [76.9]	0.285
Trilgicéridos ≥ 110 mg/dL (n [%])	21 [32.8]	46 [50.0]	67 [42.9]	0.033*
HDL ≤ 40 mg/dL (n [%])	16 [25.0]	34 [37.0]	50 [32.1]	0.115
HOMA-IR ≥ percentil 90 (n [%])	20 [30.3]	15 [16.7]	35 [22.4]	0.044*
Componentes SM ≥3 (n [%])	10 [15.6]	25 [27.2]	35 [22.4]	0.089

PC, Perímetro de Cintura

6.1.3.- Niveles de insulina plasmática y HOMA-IR se asocian con componentes de SM.

Los niveles plasmáticos de insulina aumentan en la medida que los individuos estudiados presentan mayor cantidad de componentes de SM, alcanzando una diferencia significativa, respecto al control, cuando el individuo presenta como mínimo 2 componentes de SM; y se diferencia aún más cuando los individuos presentan 3 componentes (o SM propiamente tal); generando incluso una diferencia respecto al grupo que presenta 2 componentes de SM. El mismo fenómeno ocurre con el indicador de resistencia a la insulina HOMA-IR (Figura 3).

6.1.4.- Medidas antropométricas al nacer y su asociación con el síndrome metabólico en edades pre-puberales.

Se evaluó la asociación del peso al nacer de los sujetos estudiados, con la presencia de componentes del SM. No se observó diferencia significativa entre los pesos de los sujetos, cuando la muestra fue categorizada de acuerdo al número de componentes de SM (Figura 4 A). Lo mismo ocurre al comparar los porcentajes de sujetos pertenecientes a categorías de pesos al nacer según el número de componentes de SM (Figura 4 B); y también, al considerar sólo 1 o más componentes de SM (Figura 4 C). Se puede apreciar que de los sujetos que presentaron macrosomía fetal (igual o mayor a 4000 g de peso al nacer), todos presentaron al menos 1 componente de SM; y viceversa, en el grupo sin componentes de SM, ninguno de los individuos presentó macrosomía al nacer (Figura 4 B y C).

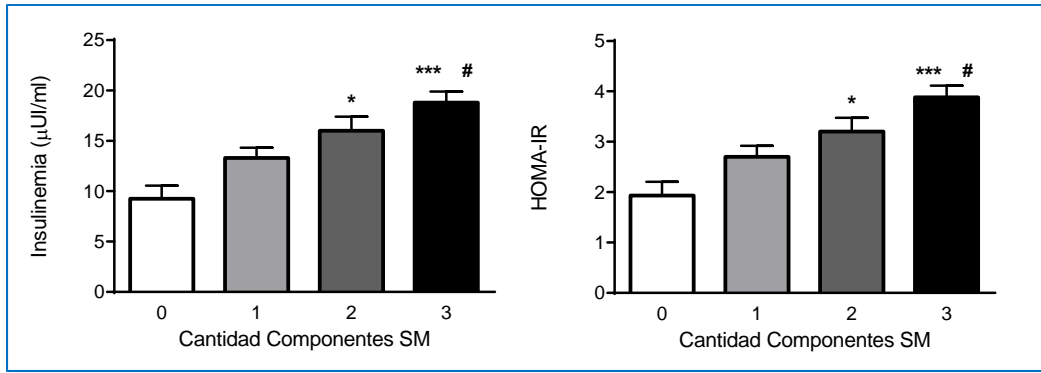


Figura 3. Niveles plasmáticos de Insulina e indicador HOMA-IR se asocian al número de componentes de SM. Se generaron categorías según número de componentes de SM, sin (barras blancas) y con uno (barras gris claro), dos (barras gris oscuro) o tres (barras negras) componentes de SM, y entre ellas se compararon los niveles de insulina plasmática y de indicador HOMA-IR. Los valores corresponden a medias \pm SEM, * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ vs. controles, y # $p < 0.05$ vs. un componente de SM, ANOVA.

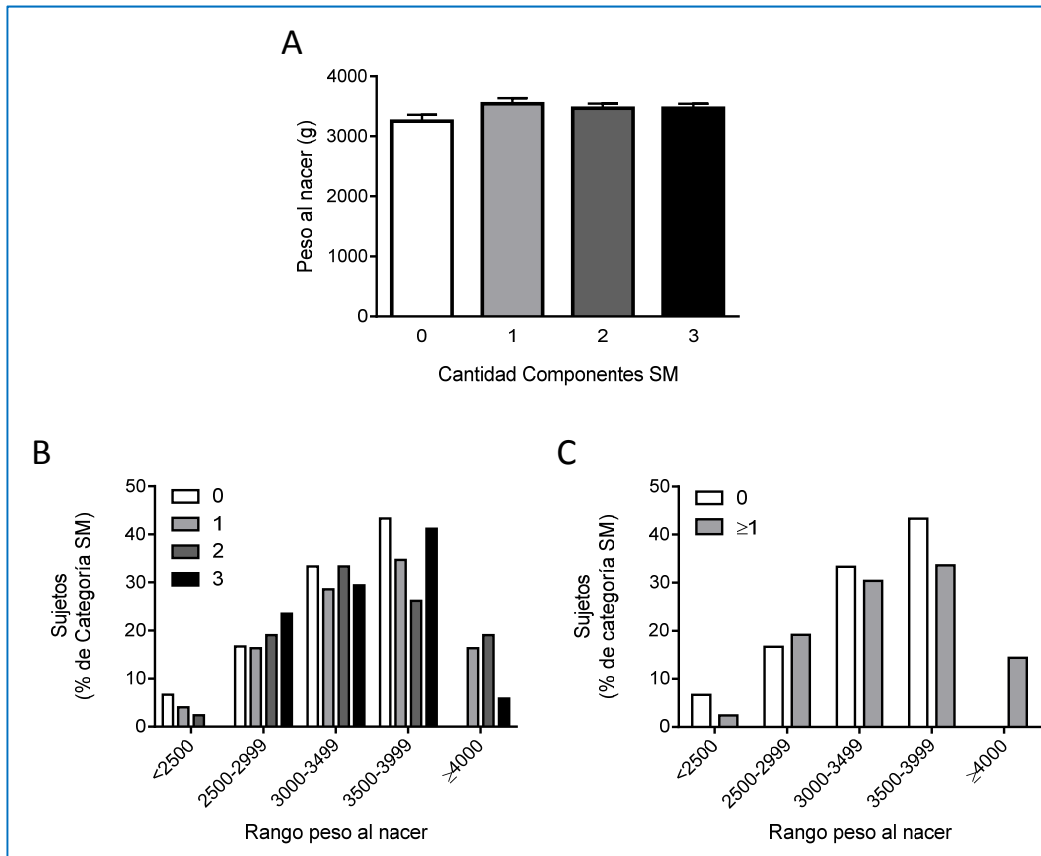


Figura 4. Los pesos al nacer no se asocian con SM o sus componentes en edades pre-puberales. A) Media de los pesos al nacer y B) Distribución de los pesos al nacer de infantes sin (control, barras blancas) y con un (barras gris claro), dos (barras gris oscuro) y tres (barras negras) componentes de SM. C) Distribución de los pesos al nacer en infante sin (Control, barra blanca) y con uno o más componentes del síndrome metabólico (barras gris claro). Valores en A son medias \pm SEM, B y C son porcentajes del total de sujetos incluidos en cada grupo.

Al evaluar la talla al nacer, se encontró que la categoría de 1 componente de SM presentó significativamente más en los sujetos presentaron mayor talla (Figura 5A). Al observar la distribución de los sujetos según su talla al nacer y los componentes de SM, se logra observar que los sujetos con más talla generaron por lo menos 1 componente de SM en su edad pre-puberal. (Figura 5B), lo que se confirma en el análisis realizado en la Figura 5 C. Aun así, se observa claramente que el mayor número de sujetos que presentó por lo menos 1 componente del SM tuvo tallas al nacer catalogadas como normales (entre 50-51 cm), según se observa en la Figura 5 B y C.

Aparentemente la edad gestacional de los sujetos evaluados no posee asociación alguna con la presencia de componentes de SM, como se observa en la Figura 6 A, B y C.

El índice ponderal, tampoco ofrece mayores asociaciones con los componentes del SM en los sujetos estudiados, lo que se puede ver en la Figura 7 A, B y C.

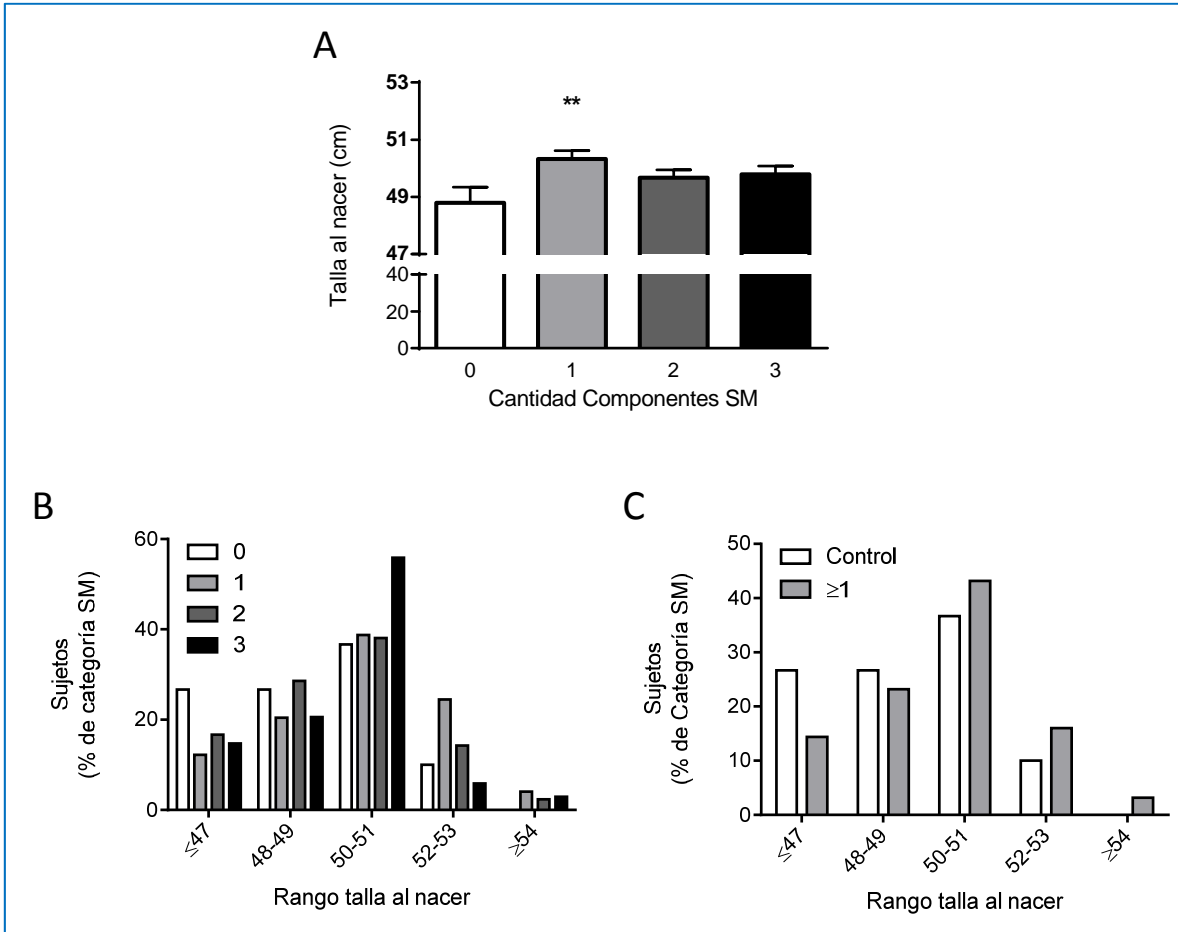


Figura 5. Las tallas al nacer se asocian al menos 1 componente de SM en edades pre-puberales. A) Media de talla al nacer y B) Distribución de talla al nacer de infantes sin (control, barras blancas) y con un (barras gris claro), dos (barras gris oscuro) y tres (barras negras) componentes de SM. C) Distribución de las tallas al nacer en infantes sin (Control, barra blanca) y con uno o más componentes del síndrome metabólico (barras gris claro). Valores en A son medias \pm SEM, B y C son porcentajes del total de sujetos incluidos en cada grupo. ** $p < 0.01$ vs. control, ANOVA.

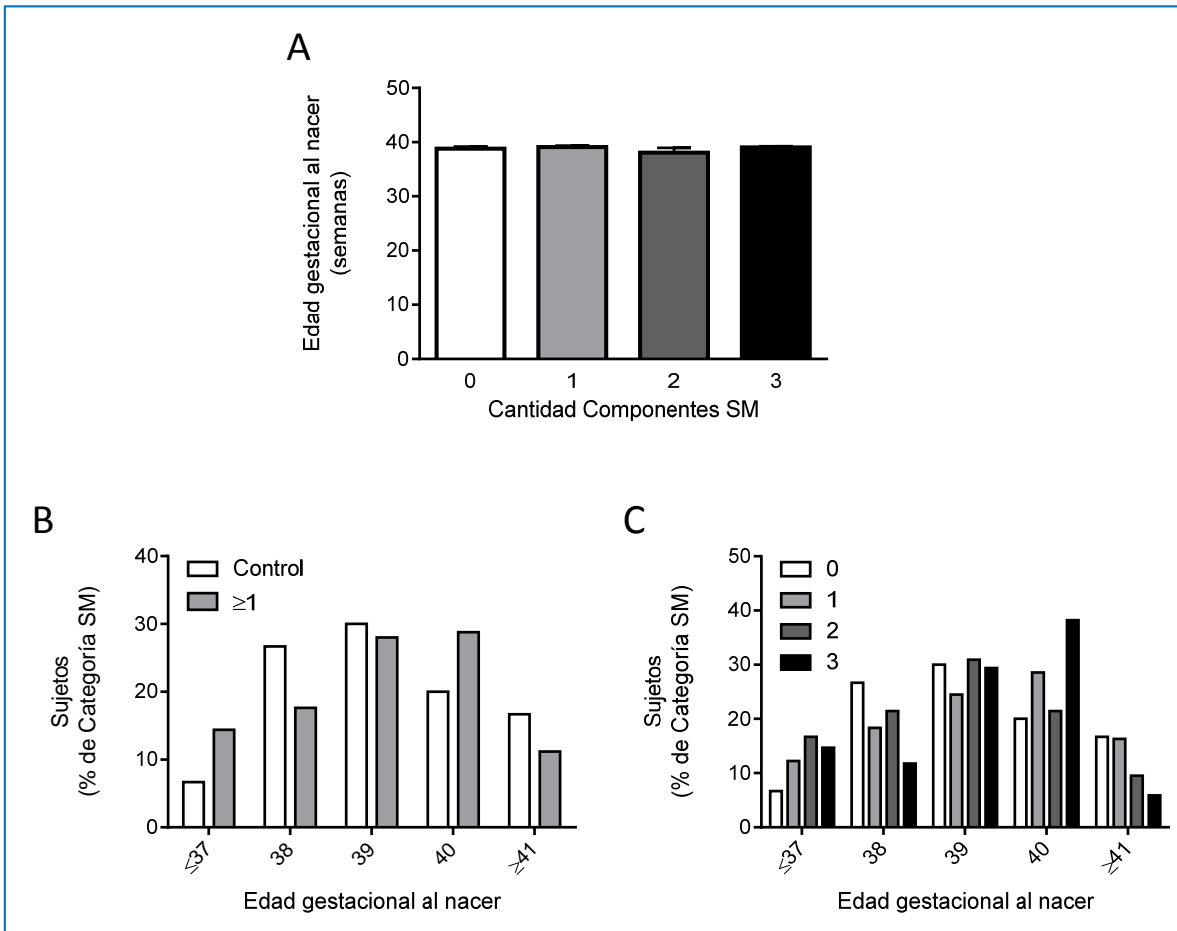


Figura 6. La edad gestacional no se asocia con SM o sus componentes en edades pre-puberales. A) Media de la edad gestacional y B) Distribución de la edad gestacional de infantes sin (control, barras blancas) y con un (barras gris claro), dos (barras gris oscuro) y tres (barras negras) componentes de SM. C) Distribución de la edad gestacional en infante sin (Control, barra blanca) y con uno o más componentes del síndrome metabólico (barras gris claro). Valores en A son medias \pm SEM, B y C son porcentajes del total de sujetos incluidos en cada grupo.

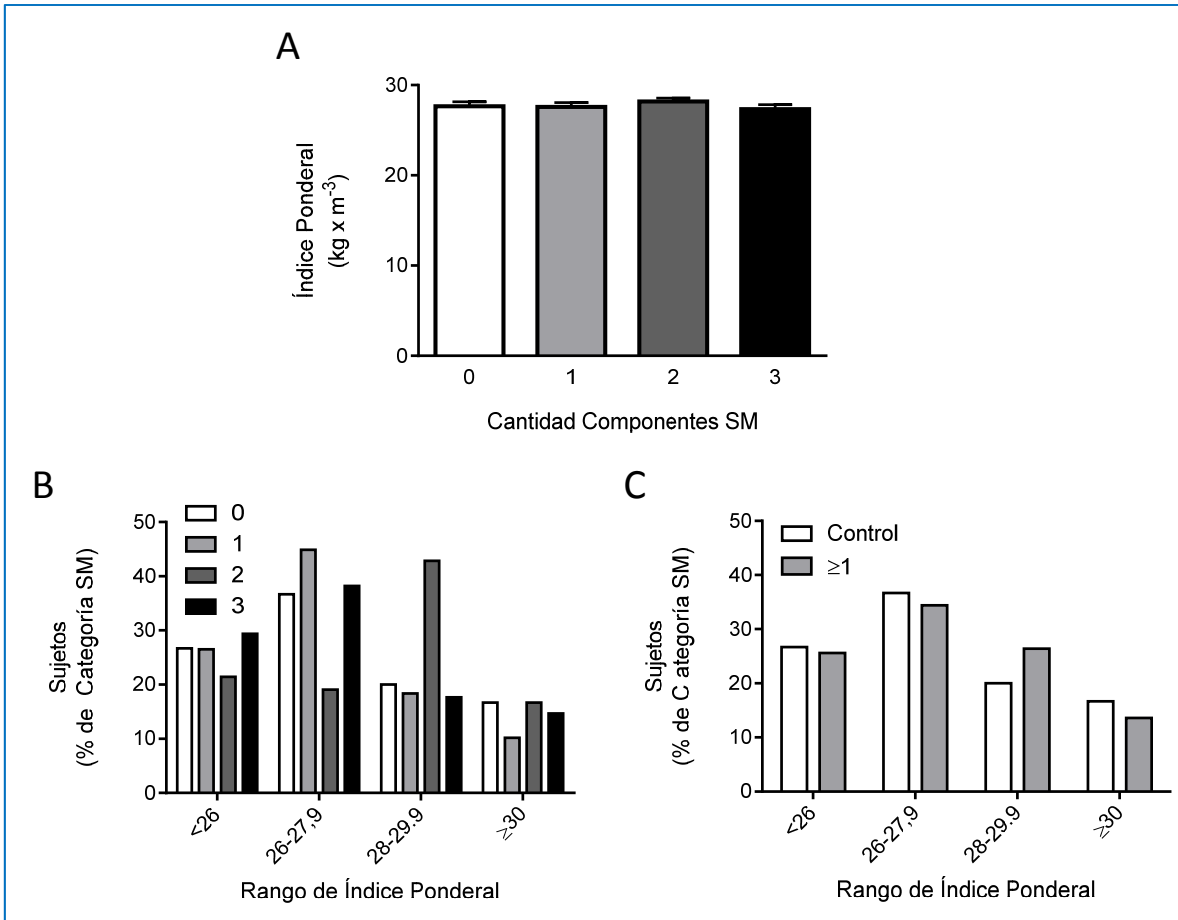


Figura 7. El Índice Ponderal no se asocia con SM o sus componentes en edades pre-puberales.

A) Media de Índice Ponderal y B) Distribución de la edad gestacional de infantes sin (control, barras blancas) y con un (barras gris claro), dos (barras gris oscuro) y tres (barras negras) componentes de SM. C) Distribución de la edad gestacional en infante sin (Control, barra blanca) y con uno o más componentes del síndrome metabólico (barras gris claro). Valores en A son medias \pm SEM, B y C son porcentajes del total de sujetos incluidos en cada grupo.

6.2.- MicroRNAs circulantes presente en el plasma de los niños incluidos en el estudio.

6.2.1.- Purificación de los microRNAs.

Siguiendo el protocolo descrito en la sección de material y método se logró extraer RNA total desde el plasma, cuyas concentraciones están expresadas en Anexo 1.

6.2.2.- Determinación de los niveles de expresión de los microRNAs en el plasma de niños con dos o más componentes de SM y en controles.

Siguiendo el protocolo descrito en la sección material y método se realizaron retrotranscripciones secuencia específica para los microRNAs Hsa-miR-126, Hsa-miR-132, Hsa-miR-145, Hsa-miR-33b, Hsa-miR-let7e y Cel-miR-39, utilizando el kit TaqMan microRNA Reverse Transcription (Applied Biosystem). La Tabla 2 muestra las referencias que sirvieron de base para la elección de los microRNA estudiados, basados en la presencia de estos microRNAs en patologías en adultos.

Las reacciones de Amplificación se realizaron según lo descrito en la sección material y método. El primer objetivo fue obtener las eficiencias de reacción. Si las reacciones de amplificación poseen eficiencias marcadamente distintas, el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ no es adecuado para obtener cantidades relativas, ya que dicho método asume que ambas eficiencias son el 100%⁴⁶. Para este propósito, se realizaron curvas de diluciones de los pre-amplificados, desde las cuales se calcularon las eficiencias de la reacción para cada partidor, según lo indica la Figura 8.

Debido a la falta de amplificación de Hsa-miR-33b en los sobrenadantes analizados; utilizando la misma metodología, se usó RNA de células HEK-293 como control positivo,

quedando demostrado que la ausencia de amplificación es inherente a la muestra y no a la técnica, según indica la Figura 9.

Finalmente, se amplificaron en triplicado todos los cDNAs; y se les calculó la cantidad relativa de cada microRNA. Los resultados se muestran en Anexo 2.

6.2.3.- Niveles plasmáticos de microRNAs según género.

Al comparar los niveles de microRNAs circulantes entre dos grupos de niños de diferentes géneros, se observó que no existe diferencia significativa alguna entre ellos; como se muestran en la Tabla 3.

6.2.4.- Niveles plasmáticos de microRNAs según cantidad de componentes de SM.

De los cuatro microRNAs estudiados, el único que presentó una diferencia significativa entre los grupos fue Hsa-miR-Let7e, el cuál presentó un incremento de cuatro veces sobre el grupo control cuando los individuos presentaban 3 componentes de SM, como se observa en la Figura 10.

6.2.5.- Niveles plasmáticos de microRNAs según componentes de SM.

Al indagar en mayor detalle respecto a cuál componente de SM estaría relacionado con el aumento significativo de miR-Let-7e, se compararon los niveles de dicho microRNA entre el grupo control y los grupos de individuos que presentaron un elevado perímetro de cintura, niveles elevados de triglicéridos o niveles de HDL disminuidos. La Figura 11A muestra los resultados obtenidos, donde se observa que en cada una de las comparaciones,

Tabla 2. Referencias de microRNAs en plasma.

microRNA	Estado en plasma	Patología	Referencia
Hsa-miR-126	Reducido	Diabetes Mellitus	Zampetaki et al. 2010 ⁴²
Hsa-miR-132	Reducido	Obesidad	Heneghan et al. 2011 ⁴³
Hsa-miR-145	Reducido	Diabetes Mellitus	Fichtlscherer et al. 2010 ³⁶
	Aumentado	Enfermedad Coronaria	D'Alessandra et al. 2013 ⁴⁴
Hsa-Let7e	Aumentado	Hipertensión	Li et al. 2011 ⁴⁵
Hsa-miR-33b	No detectado	Homeostasis Lipídica	Rottiers et al. 2012

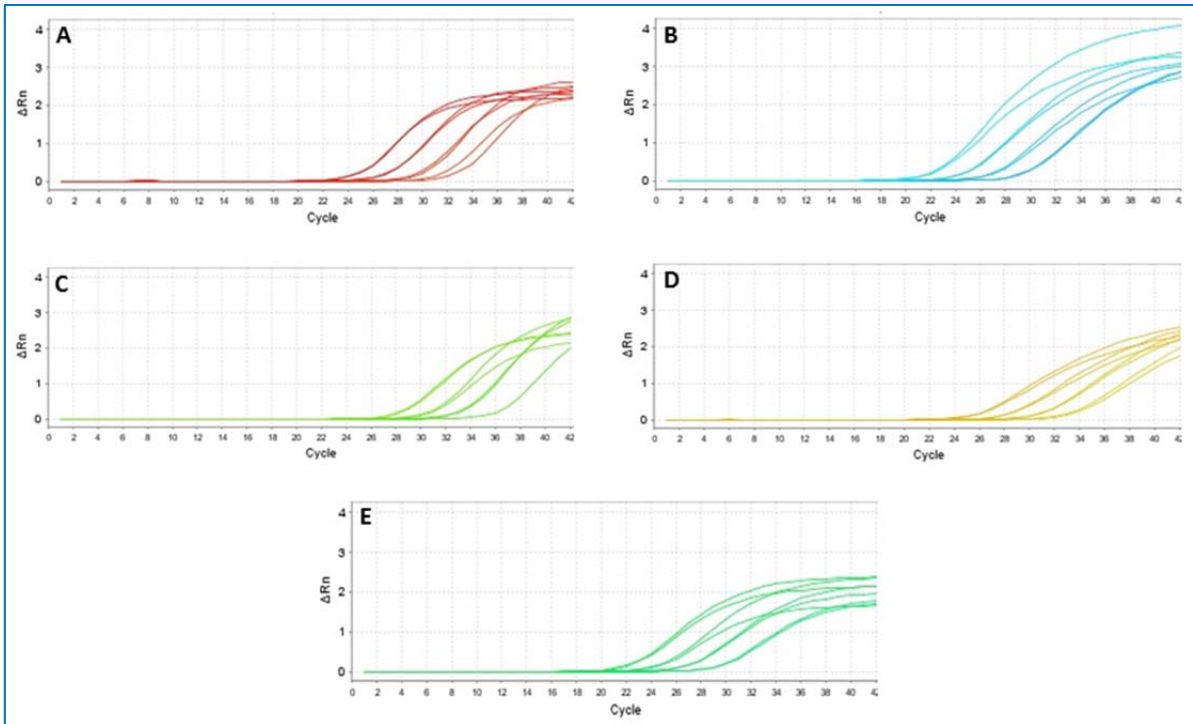


Figura 8. Eficiencia de reacciones de PCR. Se realizaron 4 diluciones seriadas 1/5 de cDNA, a partir de las cuales se calculó la eficiencia de la reacción de amplificación para cada pareja de partidores. Para Hsa-miR-let7e se obtuvo una eficiencia de 93.85% (A), Hsa-miR-126 un 91.6% (B), Hsa-miR-132 un 92.6% (C), Hsa-miR-145 un 93.5% (D) y para Cel-miR-39 un 90.3%(E).

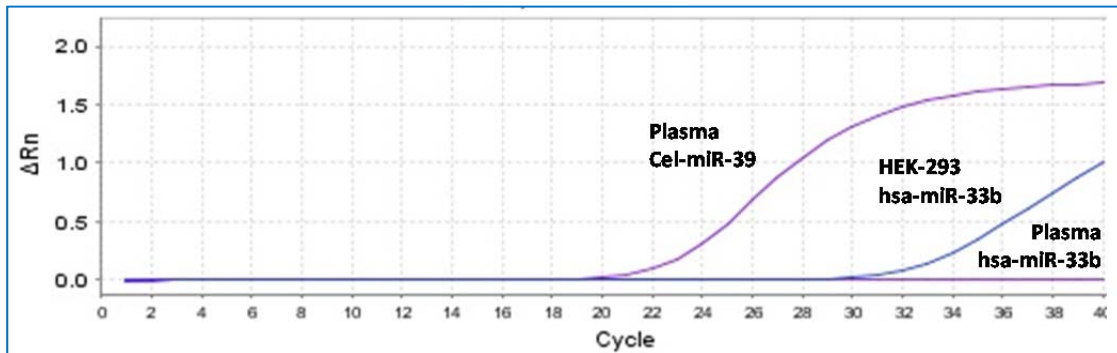


Figura 9. Control de amplificación de Hsa-miR-33b. En un mismo ensayo se procesaron muestras de cDNAs derivados de plasma y células HEK-293, determinándose la presencia de Hsa-miR-33b. Cel-miR-39 fue también pesquisado en el plasma, para controlar la presencia de cDNA en la reacción.

Tabla 3. Cantidades relativas de microRNAs en plasma según género.

	Niños	Niñas	Total	Valor p
	N=66	N=92	N= 158	
CR miR-Let7e (media [± DE])	2.37 [4.15]	2.57 [4.41]	2.49 [4.29]	0.776
CR miR- 145 (media [± DE])	1.57 [2.72]	1.89 [4.53]	1.74 [3.87]	0.646
CR miR-132 (media [± DE])	2.27 [5.40]	1.56 [2.03]	1.86 [3.82]	0.252
CR miR-126 (media [± DE])	1.78 [2.28]	2.07 [3.23]	1.95 [2.87]	0.535

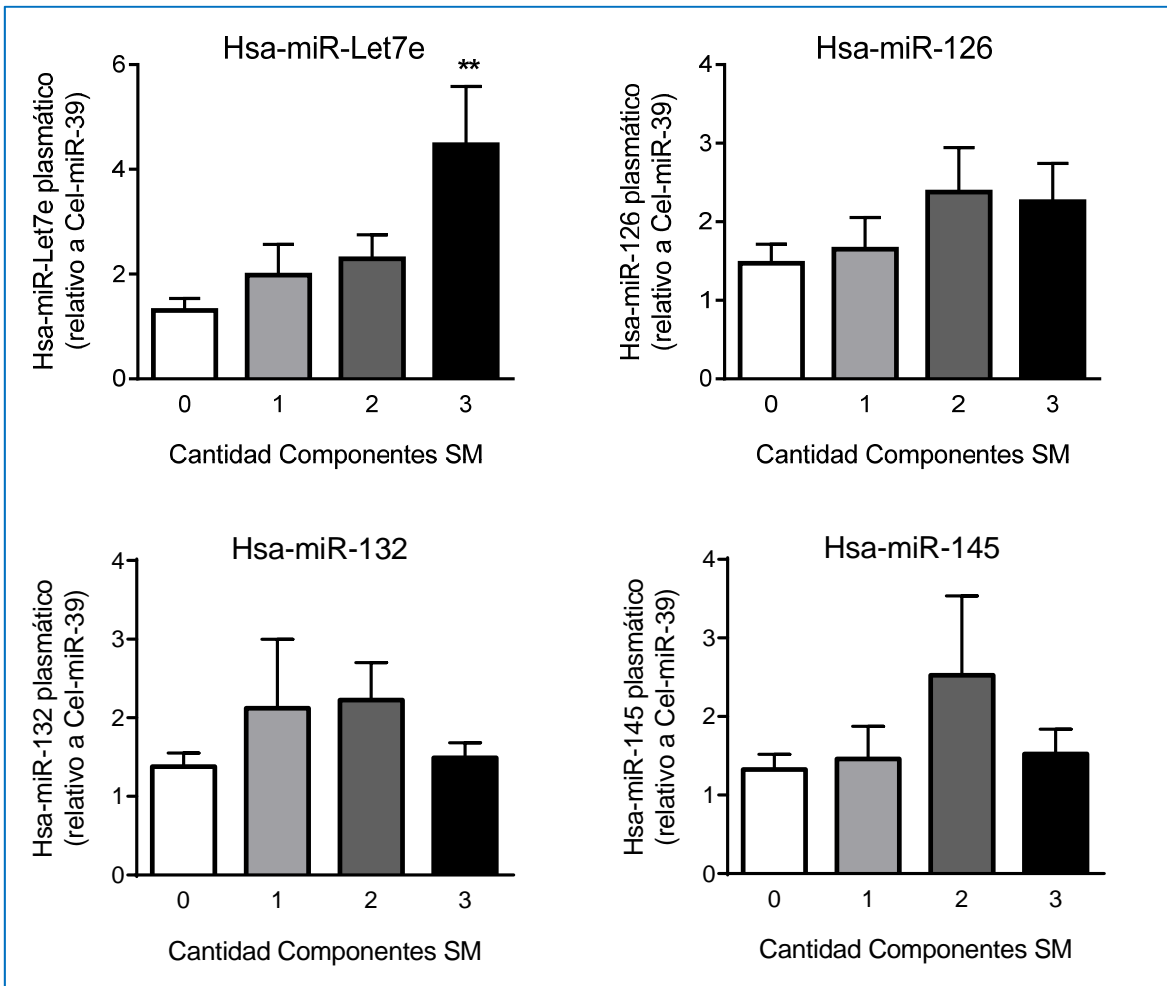


Figura 10. Niveles plasmáticos de microRNAs según número de componentes de SM. Se categorizaron los individuos según la cantidad de componentes de SM; y se compararon los niveles de miRNAs en cada grupo. ** $p < 0.01$ vs. control, ANOVA.

los individuos con la medida antropométrica y las pruebas bioquímicas alteradas presentaban un aumento significativo en el nivel circulante del microRNA Hsa-miR-Let7e. Para indagar si el incremento de Hsa-miR-Let7e estaría asociado a la presencia de un sólo componente de SM, se generaron dos nuevas categorías, una de ellas es el grupo de individuos con sólo un componente de SM; y la segunda, un grupo con un componente fijo más cualquier otro componente de SM. Como se observa en la Figura 11B, el nivel aumentado de Let7e se condiciona a la existencia de al menos 2 componentes de SM.

Adicionalmente se evaluó la posible asociación del incremento en los niveles de circulantes de Hsa-miR-Let7e y niveles de insulinemia basal alterados y HOMA-IR alterado, encontrándose una diferencia significativa entre los grupos con estas alteraciones respecto del grupo control sin componentes de SM, como se muestra en la Figura 12.

6.2.6.- Correlaciones entre niveles plasmáticos de microRNAs y componentes de SM.

En conjunto a los análisis de asociación estadística, se realizaron análisis de correlaciones entre los niveles de todos los miRNAs estudiados y los datos antropométricos y bioquímicos del SM. De los cuatro miRNAs evaluados, sólo 3 mostraron correlaciones significativas con componentes de SM, Hsa-miR-Let7e con niveles de HDL y número de componentes de SM, Hsa-miR-126 con perímetro de cintura, razón cintura-cadera, IMC, nivel de triglicéridos y nivel de VLDL y Hsa-miR-132 con la razón cintura-cadera, según se observa en la Tabla 4; las correlaciones no significativas se encuentran en Anexo 3.

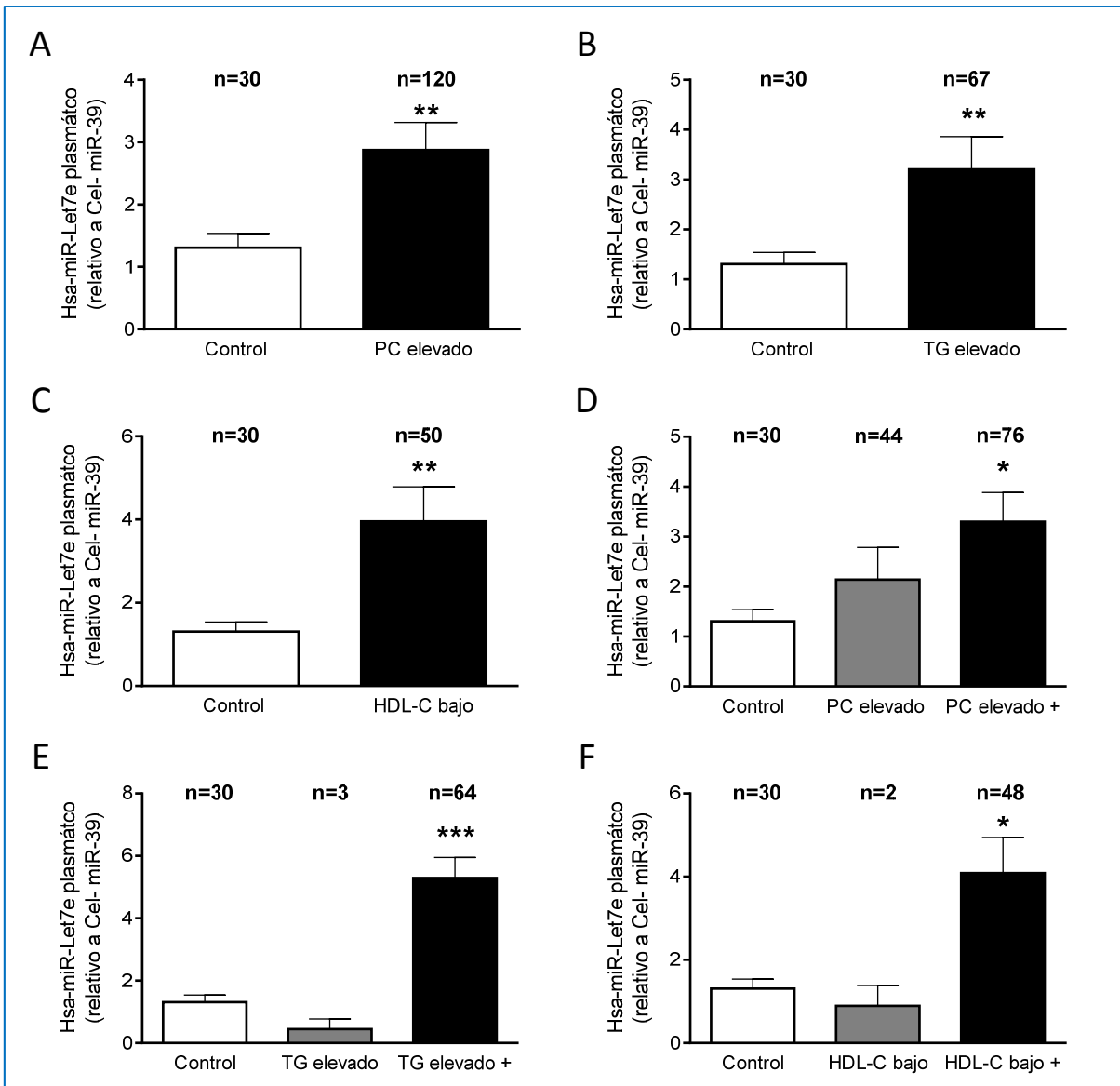


Figura 11. Niveles plasmáticos de Hsa-miR-Let7e están aumentados en individuos con 2 o más componentes de SM. A, B y C) Se compararon los niveles de Hsa-miR-Let7e entre individuos control e individuos que presentaban al menos perímetro de cintura, niveles de triglicéridos y niveles de c-HDL alterados. D, E y F) se compararon los niveles de Hsa-miR-Let7e en individuos control, individuos con sólo perímetro de cintura, niveles de triglicéridos y niveles de HDL alterados, sin y con un componente de SM adicional. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ vs. Control, ANOVA.

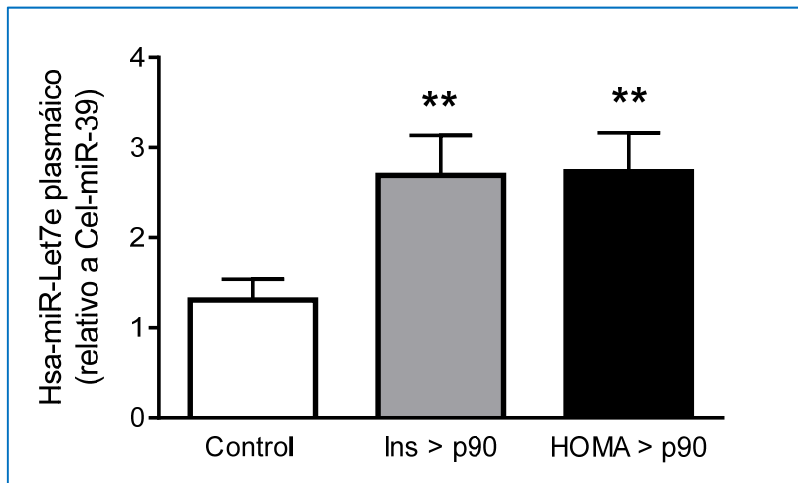


Figura 12. Niveles plasmáticos de Hsa-miR-Let7e están aumentados en individuos con resistencia a la insulina. Se generaron categorías de individuos control, con niveles de insulinemia alterados y HOMA-IR alterado, y se compararon los niveles de Hsa-miR-Let7e de cada grupo. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ vs. control, ANOVA.

Tabla 4. Correlaciones significativas de diferentes componentes de SM con niveles plasmáticos de microRNAs.

		miR-Let7e	miR-126	miR-132
Perímetro cintura (cm)	Coef. Correlación p	/	0.210 0.008	/
Razón cintura-cadera (cm/cm)	Coef. Correlación p	/	0.220 0.006	0.183 0.021
IMC (kg/m ²)	Coef. Correlación p	/	0.185 0.020	/
Triglicéridos (mg/dL)	Coef. Correlación p	/	0.175 0.028	/
HDL (mg/dL)	Coef. Correlación p	-0.168 0.035	/	/
VLDL (mg/dL)	Coef. Correlación p	/	0.173 0.030	/
Número de componentes SM	Coef. Correlación p	0.255 0.001	/	/

6.2.7.- Análisis de especificidad, sensibilidad y curva ROC para Hsa-miR-Let7e.

De los cuatro miRNAs estudiados, Hsa-Let-7e fue el único que presentó una diferencia significativa en el área bajo la curva ROC, generada al enfrentar la sensibilidad y la especificidad de cada miRNA para asociarse positivamente a SM. EL área bajo la curva fue de 0,681, con un intervalo de confianza de 95% entre 0.579- 0.783 y un valor $p=0.001$. La Curva ROC arrojó que el punto de corte 1.52 para este microRNA es el mínimo que predeciría la presencia de SM con una sensibilidad de 62.9% y una especificidad de 71.1% (Figura 13).

6.2.8.- Análisis *in silico* de las posibles vías celulares comprometidas por Hsa-miR-Let7e y Hsa-miR-126.

Debido a las asociaciones y correlaciones obtenidas, se realizó un análisis *in silico* para identificar blancos putativos, y luego las vías celulares a las cuales las proteínas blanco pertenecen, realizando un análisis de interacción entre proteínas con la herramienta on-line String 9.05.

El análisis de los potenciales blancos de Hsa-miR-let7 y Hsa-miR-126 en humanos mostró 339 posibles mRNA blancos de Hsa-miR-Let-7; y, 101 para Hsa-miR-126. Adicionalmente el análisis de interacción usando el puntaje de mayor confianza mostró que 23 de las 440 proteínas blancos putativos de los miRNAs potencialmente interactuarían entre ellas, como se observa en Figura 14 y en Anexo 4. Estas proteínas estuvieron relacionadas principalmente con el ciclo celular, apoptosis, factores de crecimientos y metabolismo, según se muestra en la Tabla 8. En forma interesante una parte importante de las proteínas están involucradas en la vía de señalización de insulina e IGF1.

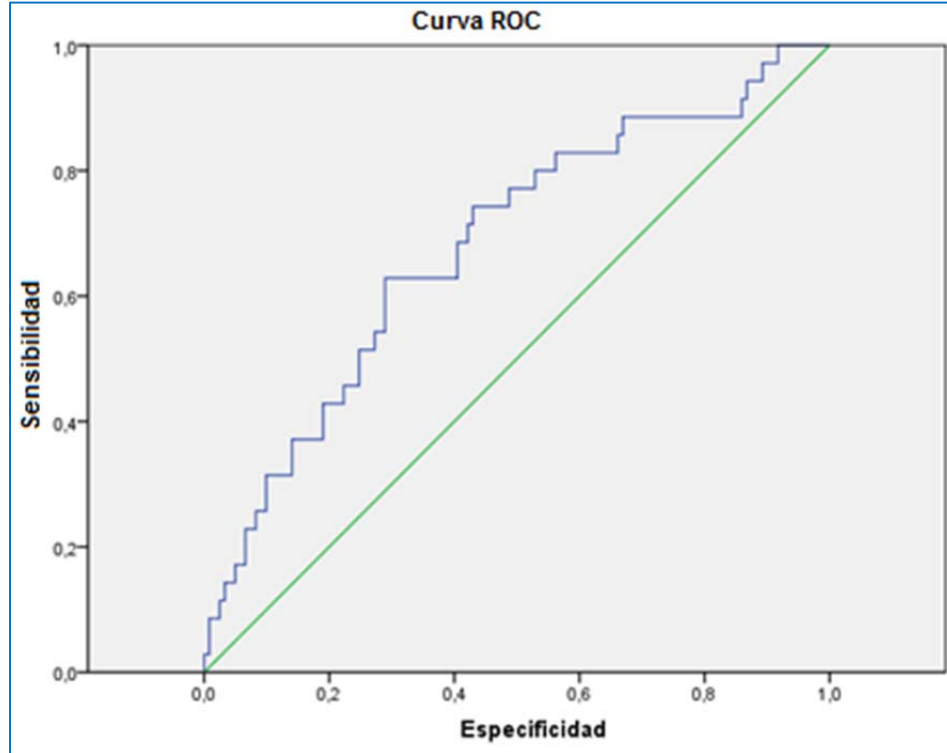


Figura 13. Curva ROC que describe la especificidad y sensibilidad de Hsa-miR-Let7e para predecir la presencia de SM. El área bajo la curva mostró un valor de 0,681 y un punto de corte calculado de 1.52, sobre el cual se asocia significativamente con el SM ($p=0.001$).

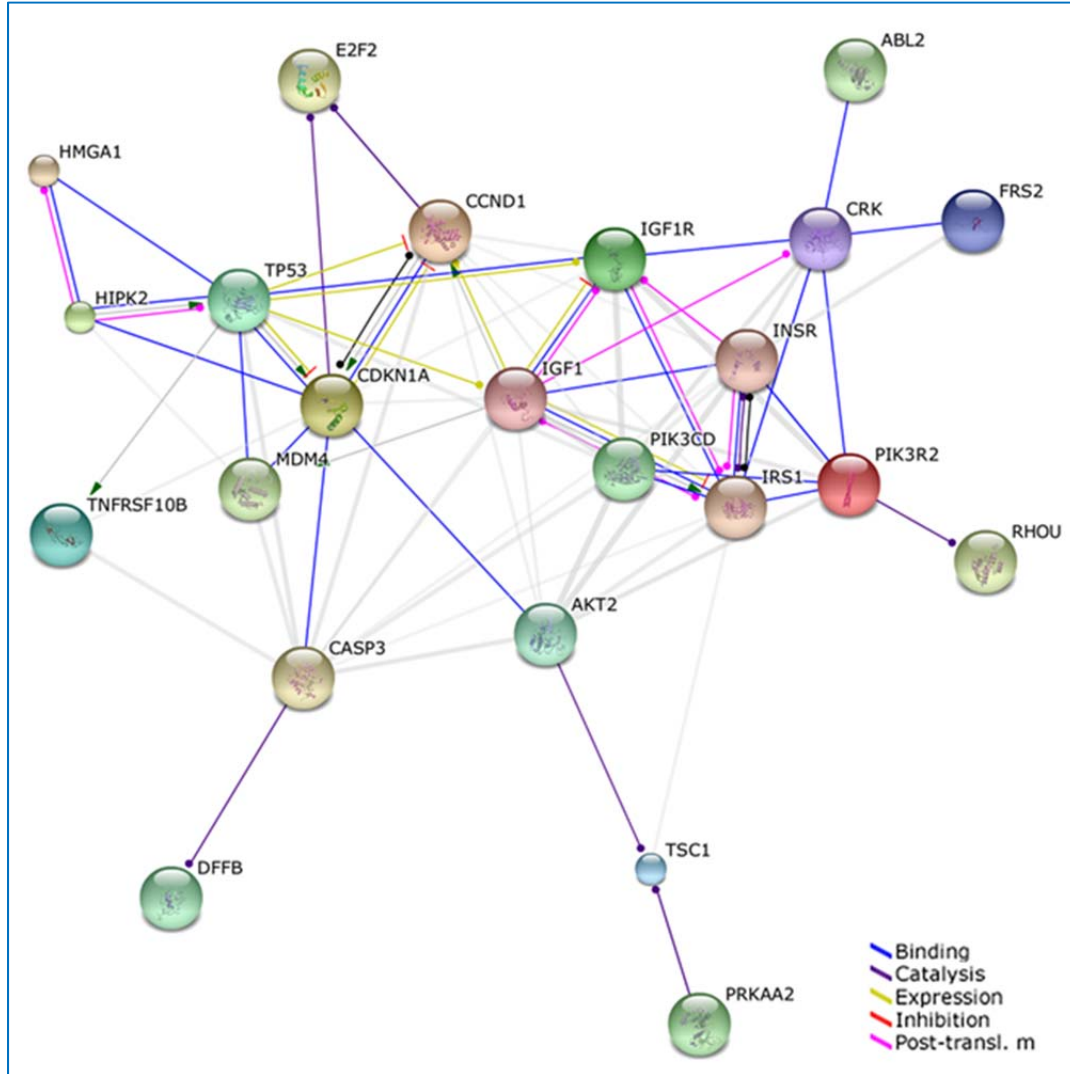


Figura 14. Análisis *in silico* de la interacción entre las proteínas blanco de los microRNAs estudiados. Las proteínas de los mRNAs blancos putativos para Hsa-miR-Let7e y Hsa-miR-126 fueron analizados mediante la herramienta on-line String 9.05, utilizando la mayor unidad de confianza.

7.- Discusión.

7.1.- Características antropométricas y metabólicas de los sujetos estudiados.

La muestra, al ser un subgrupo de la cohorte de Mardones et al.³², posee prevalencias distintas de los componentes de SM y SM respecto a dicha cohorte; como ejemplo claro, se puede ver que la muestra utilizada en esta tesis posee un 27.8% de sujetos con SM (35 individuos de un total de 156) como se puede apreciar en la Figura 2, versus un 7.3% presentado por la cohorte original (250 individuos de un total de 3325). Recordando que el objetivo principal de la tesis es comparar dos grandes grupos Control y SM, además de subgrupos de SM, lo anterior es efecto de los criterios de inclusión y exclusión utilizados para seleccionar esta sub-muestra.

Al diferenciar a los individuos por género, se logra apreciar algunas diferencias y similitudes respecto de la cohorte original. En la muestra utilizada en esta tesis al igual que en la cohorte original, se observa una cantidad significativamente mayor de hombres con obesidad respecto a las mujeres (71.9% en esta muestra y un 18.9% en la cohorte original); de la misma manera las mujeres presentaron significativamente más individuos con niveles de triglicéridos elevados que los hombres en ambas muestras (50% para esta muestra y 30.8% para la cohorte original). En esta sub-muestra existe además un aumento en el número de mujeres con sobrepeso (37%), la cual no se observó en la cohorte original. Por el contrario, se observaron variadas diferencias en la cohorte original, que no quedan reflejadas en esta sub-muestra: Perímetro de cintura aumentado en mujeres (23.5%), niveles de colesterol-HDL elevado aumentado en mujeres (18.9%), niveles de glicemia aumentados en hombres (8.9%), Síndrome Metabólico significativamente aumentado en mujeres (8.7%)³².

En la muestra analizada en esta tesis, un número mayor de sujetos de género masculino presentó el índice HOMA-IR aumentado (30.3%); diferencia no observada en la cohorte original. En la cohorte original se describe un HOMA-IR significativamente aumentado (sobre el percentil 90) en sujetos que presentan SM. Los análisis de esta tesis confirman este resultado, incluso en sujetos con sólo 2 componentes de SM, lo que podría considerarse un estado previo al SM, también presentan un aumento significativo de HOMA-IR. Los hallazgos se replican al evaluar los niveles plasmáticos de insulinemia en ayunas, lo que apoyaría la hipótesis que el SM es secundario a la resistencia a la insulina³².

7.2.- Síndrome metabólico en sujetos pre-puberales y su asociación con medidas antropométricas perinatales.

A pesar que no existe una diferencia significativa en los pesos al nacer entre los distintos grupos de sujetos estudiados categorizados según el número de componentes de SM, se logra observar que ninguno de los sujetos controles (que no presentaron componentes de SM) nació con peso igual o mayor a 4000 gramos. Lo anterior podría indicar que nacer con macrosomía podría asociarse con la presencia de al menos un componente de SM en la edad pre-puberal. En la misma línea, Mardones et al. evidenció que los sujetos pre-puberales chilenos, nacidos con macrosomía, poseen mayor riesgo de presentar obesidad y un perímetro de cintura incrementado; OR= 2.97 y OR=1.77, respectivamente⁴⁷.

En forma interesante la talla al nacer muestra una asociación significativa entre el número de componentes de SM y la talla. Es así que los sujetos con una talla mayor a 54 cm al nacer presentan mayor tasa de SM. Al evaluar la distribución de los sujetos según su

talla al nacer y el número de componentes de SM que poseen, se observa que los sujetos sin componentes de SM presentaron tallas inferior a 54 cm (esta fue la categoría superior). Estos indicadores antropométricos al nacer (peso y talla) confirman que fetos nacidos grandes para su edad gestacional tendrían mayor probabilidad de presentar al menos un componente del SM en su etapa pre-puberal. Mardones et al. reportaron que la talla al nacer elevada (≥ 54 cm) presentó un OR= 2.04 de generar una presión sanguínea elevada (\geq al percentil 90), siendo el extremo inferior de talla (≤ 48 cm) el que presentó el mayor riesgo, con un OR= 2.22⁴⁷.

Al evaluar la edad gestacional como un posible factor asociado al SM, al contrario de lo reportado por Mardones et al., en donde se observó un incremento del riesgo de padecer el SM cuando la edad gestacional fuese ≤ 37 semanas de gestación (OR= 2.14), el presente estudio no evidenció diferencia significativa alguna. El mismo resultado se obtuvo al ser evaluar el índice ponderal como factor asociado a SM.

7.3.- microRNAs circulantes como biomarcadores.

Los biomarcadores han sido definidos por Hulk et al ⁴⁸ como “alteraciones celulares, bioquímicas o moleculares que son medibles en medios biológicos tales como tejidos humanos, células o fluidos. En la práctica los biomarcadores incluyen herramientas y tecnologías que pueden ayudar en el entendimiento de la predicción, causa, diagnóstico, progresión, regresión o resultado del tratamiento de una enfermedad ⁴⁹. Es así como se describen 2 grandes grupos de biomarcadores: Biomarcadores de Exposición, los cuales se usan para predicción de riesgo, principalmente en agentes químicos o tóxicos; y, Biomarcadores de Enfermedad, los cuales son utilizados como screening y diagnóstico, y

también como monitoreo en la progresión de una enfermedad ⁴⁹. Es del mayor interés para la medicina actual definir biomarcadores que logren diagnosticar en el pródromo de una enfermedad o inclusive en un estado preclínico de ella. Para que un indicador biológico, asociado a un estado patológico pueda ser considerado un biomarcador, es necesario según Shulte y Perera⁴⁸ que se cumplan tres aspectos en la medición de su validez: 1) Validez de Contenido, que muestra el grado en el cual el biomarcador refleja el fenómeno biológico estudiado, 2) Validez de Constructo, que se comparten con otras características de la enfermedad u otro biomarcadores, 3) Validez de Criterio, el cual muestra el grado en que un biomarcador se correlaciona con la enfermedad específica y es usualmente medida por medio de la sensibilidad, especificidad y poder predictivo⁴⁹.

Se ha descrito que los microRNAs circulantes se ajustan a todos los criterios de la definición de biomarcador: son estables en diversos fluidos corporales, la secuencia de la mayoría de los microRNAs es conservada en diferentes especies, son tejido-específico y también específicas de estados biológicos y, finalmente, existen metodologías suficientemente precisas para medir diferencias en sus niveles⁵⁰.

Un creciente número de reportes indican una asociación de niveles alterados de microRNAs circulantes y enfermedades cardiovasculares, recientemente revisado en profundidad por Tijssen et al ⁵¹. A pesar de poseer metodologías similares, son poco los microRNAs que se repiten entre los diferentes reportes, lo que refleja la necesidad de una estandarización en los métodos y en los criterios de inclusión de los individuos en los distintos estudios, como sugiere Mayeux et al⁴⁹.

Técnicamente, la detección de microRNAs circulantes posee varios desafíos, Kroh et al.⁵² describen una serie de variables que pueden afectar las mediciones de microRNAs,

entre las que se encuentran el tipo de muestra a partir de la cual se obtiene el RNA, plasma o suero, indicando que la metodología de obtención desde el plasma puede generar el rompimiento de células y la salida de microRNAs celulares. Fichtlscherer et al.⁵¹ proponen una metodología de doble centrifugación que permita la eliminación de la mayor cantidad de detritus celulares, previo a la extracción de RNA, lo que podría reducir los microRNAs contaminantes celulares, pero no los que ya se hubiesen liberado por la lisis celular. Así, ambos autores proponen descartar cualquier muestra que presente signos de hemólisis. Otros posibles interferentes, no evaluados, incluyen: las variaciones de los niveles de microRNAs durante el día, el efecto del ayuno (en base al aumento de vesículas lipídicas posterior a la ingesta), el conteo de glóbulos blancos, el bisel de la aguja con que se tome la muestra (en el sentido del posible daño en la piel que podría liberar en mayor o menor medida microRNAs celulares) y el tipo de anticoagulante que se utilice⁵². Al igual que en otros reportes, se ha descrito que mantener el plasma o suero a -80° C parece ser la forma correcta de almacenar las muestras previo a la extracción^{53,54}.

Con respecto a la metodología de normalización existe una controversia vigente. Tradicionalmente las cuantificaciones relativas y comparativas hechas mediante qPCR, se basan en la normalización de los resultados de amplificación para el gen/mRNA en estudio respecto a los resultados de amplificación de genes/mRNA de abundancia invariable (housekeeper o controles endógenos). Esta aproximación ha sido puesta en duda en la cuantificación de microRNAs circulantes ya que a la fecha no se han encontrado microRNAs circulantes invariables. Se ha propuesto un par de microRNAs circulantes como controles endógenos, tales como RNU6B y Hsa-miR-16. Un trabajo reciente, evidencia que por lo menos Hsa-miR-U6 sufre de variaciones en sus niveles en sepsis y

fibrosis hepática⁵⁵; invalidando, o por lo menos, cuestionando su utilización como control endógenos en otras patologías. En base a la ausencia de controles endógenos validados, Fichtlscherer et al.⁵¹ propone la normalización respecto a microRNAs sintéticos que se agregan, en cantidades conocidas, a la muestra de plasma antes de iniciar la extracción de RNA, permitiendo así asegurar la reproducibilidad de los ensayos y un punto objetivo de normalización.

La metodología utilizada en esta tesis se apoya principalmente en lo propuesto por Fichtlscherer et al.⁵¹, por considerar que se ocupa de puntos sensibles de la técnica que podrían generar resultados erróneos.

Claramente la técnica utilizada en esta tesis, permite detectar niveles plasmáticos de microRNAs que, si se compara con la carga de Cel-miR-39 utilizada, está en torno a los picomoles. La tecnología de sondas TaqMan utilizadas, permite asegurar la especificidad de la retrotranscripción y la amplificación, asegurando que no existen amplificaciones inespecíficas. La no detección de microRNA Hsa-miR-33b concuerda con reportes anteriores⁵⁶ donde describen la ausencia extracelular de este miRNA, lo que permite avalar también la especificidad de la técnica y los resultados obtenidos en esta tesis.

Finalmente, esta tesis se suma a los reportes que indican que efectivamente los microRNAs circulantes pueden ser detectados mediante qPCR, que además su obtención, estabilidad y la factibilidad técnica de medirlos permite considerarlos como potenciales biomarcadores de diversos estados fisiológicos o patológicos en sujetos humanos. Como proyección del uso de microRNAs como biomarcadores, queda pendiente evaluar cuántos y cuáles microRNAs circulantes tienen el poder suficiente de definir y predecir patologías y,

posteriormente, describir la forma en que los microRNAs circulantes serían parte de la patología, abriendo una nueva ventana para los tratamientos de las enfermedades humanas.

7.4.- microRNAs circulantes y componentes de SM.

Fichtlscherer et al.⁵¹ fue el primero en encontrar microRNAs plasmáticos característicos en pacientes con enfermedad de las arterias coronarias. En su estudio, seleccionaron 8 microRNAs a partir de los resultados de un microarreglo, y evaluaron su presencia en un grupo de 36 pacientes con enfermedad coronaria y 17 pacientes control, ambos adultos. Se encontró en el grupo enfermo un incremento en los microRNAs Hsa-miR-126, Hsa-miR-17 y Hsa-miR-92 provenientes de las células endoteliales, Hsa-miR-145 de las células del músculo liso y finalmente Hsa-miR-133 y Hsa-miR-208 de cardiomiocitos. Los resultados de esta tesis muestran que los niveles circulantes de Hsa-miR-145 no presentaron diferencia alguna entre los grupos estudiados, encontrándose correlaciones significativas sólo con Hsa-miR-126, lo que puede ser reflejo de la importante diferencia etaria, fisiológica o de compromiso cardiovascular entre los sujetos estudiados por Fichtlscherer et al. y la cohorte de Mardones et al.³²

7.4.1.- Hsa-miR-Let7e.

Existen escasos reportes que involucran a microRNA Hsa-Let-7e en patologías cardiometabólicas. Li et al.⁵⁷, utilizando microarreglos en un principio y luego confirmando sus resultados mediante qPCR, encontraron que los niveles circulantes de Hsa-Let-7e estaban incrementados en 1.62 veces en pacientes adultos con hipertensión arterial esencial.

Por su parte, Stather et al.⁵⁸, informa una disminución significativa de Hsa-Let-7e circulante, en 1.95 veces, en pacientes con enfermedad arterial periférica.

No existe reporte alguno que indique una variación significativa en los niveles de Has-Let-7e circulante en pacientes pre-púberes con síndrome metabólico o alguna patología metabólica; por lo que los hallazgos de esta tesis se vuelven relevantes en el campo de los biomarcadores, y por sobre todo, cuando se evalúa el estado fisiológico-nutricional de los infantes. Apoyando el valor observado en los niveles plasmáticos de Hsa-Let-7e en el síndrome metabólico, los análisis de poder diagnóstico realizados mediante curvas ROC, primero evidencian que el nivel plasmático de Hsa-Let-7e es un biomarcador útil para pesquisar SM; y además que al supera 1.52 veces los niveles circulantes, el paciente puede efectivamente estar desarrollando Síndrome Metabólico.

7.4.2.- Hsa-miR-126.

Describiéndosele un origen endotelial⁵⁹, sus niveles en plasma se asocian principalmente con disfunción vascular, aterogénesis y diabetes mellitus tipo 2. Jansen et al.⁶⁰ concluyen que el nivel de Hsa-miR-126 en microvesículas circulantes posee la capacidad de predecir eventos cardiovasculares en pacientes que presentan enfermedad coronaria en una forma estable. En la misma línea, Jiang et al., a pesar de no presentar una diferencia significativa de los niveles plasmáticos de Hsa-miR-126 en pacientes arterioscleróticos y pacientes pre-arterioscleróticos, determinó una correlación negativa con los niveles de BNP (B type-natriuretic peptide), marcador de una lesión miocárdica aguda⁶¹.

También se ha asociado a Hsa-miR-126 con estados de diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) y el síndrome pre-diabético. Liu et al. describieron que los niveles en suero de Hsa-miR-126 son significativamente menores en sujetos adultos que presentan una alteración en la tolerancia a la glucosa en conjunto a niveles de glucosa alterados en ayuna (condición de síndrome pre-diabético) y en sujetos diagnosticados recientemente (y por tanto sin tratamiento) de Diabetes Mellitus tipo 2. Los autores indican también que los individuos que presentan el tercil más bajo de niveles de Hsa-miR-126 en suero presentan un Odds ratio de 3.5 de riesgo de presentar DMT2. Finalmente, midieron la exactitud de la medición de los niveles de Hsa-miR-126 para diagnosticar DMT2 y encontraron que el área bajo una curva ROC es de 0.893 (95% CI, 0.838–0.947), concluyendo que la medición de Hsa-miR-126 en suero puede ser considerado como un biomarcador.

Los resultados de esta tesis indican que a pesar de poseer una diferencia significativa entre los diversos grupos de sujetos (sanos, intermedios y con SM) sí existen correlaciones significativas con componentes del SM como el perímetro cintura, razón cintura-cadera, IMC, y niveles de Triglicéridos y VLDL, todas correlaciones positivas. Interesantemente, no existe correlación ni asociación estadística con insulinemia ni con el indicador HOMA-IR, quizás debido a que la presencia de DMT2 se consideró como criterio de exclusión en la selección de los sujetos. Aun así, las correlaciones encontradas van en la misma línea de resultados publicados por otros autores, en la cual los niveles circulantes de Hsa-miR-126 podrían ser utilizados como indicadores de un estado cardiometabólico alterado, no sólo en adultos sino que también en sujetos pre-puberales.

En concordancia con el análisis *in silico* realizado en esta tesis, donde se obtuvo que Hsa-miR-126 y Hsa-miR-let7e putativamente tendrían la capacidad de interferir en la vía de

señalización del receptor de insulina, Fernandez-Twinn et al. usando un modelo murino indican que la secuencia de Hsa-miR-126 es complementaria con la región 3'UTR del mRNA de IRS1. Los autores indican también que los adipocitos y preadipocitos de crías nacidas de madres obesas, poseen niveles disminuidos de IRS1 y elevados de miR-126, en conjunto con niveles elevados de insulina plasmática⁶².

Como ya se ha analizado, el poder diagnóstico y predictivo de los miRNAs circulantes es mucho mayor cuando estos son considerados dentro de un grupo de biomarcadores⁶³. Los análisis *in silico* realizados apoyan dicha idea, ya que indican que Hsa-miR-126 y Hsa-miR-Let-7e, ambos alterados o correlacionados individualmente con componentes del síndrome metabólico, tendrían la capacidad de alterar la misma vía de señalización celular, dependiente de la activación de los receptores de insulina. Mayores determinaciones experimentales son necesarias para definir claramente si los miRNAs circulantes pesquisados poseen efectivamente la capacidad de intervenir y alterar la vía de señalización de los receptores de insulina.

7.4.3.- Hsa-miR-132 y Hsa-miR-145.

A pesar de que el nivel plasmático de Hsa-miR-132 no presentó una diferencia significativa entre los grupos estudiados, existen reportes que apoyan su participación en patologías cardiometabólicas. Heneghan et al. evidencian que los niveles de Hsa-miR-132 disminuye significativamente en el tejido adiposo omental como en la circulación sanguínea, en sujetos adultos con obesidad⁶⁴. En la misma línea, Nesca et al. proponen que el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa en sangre o la progresión hacia la intolerancia a la glucosa, en un modelo de obesidad/diabetes murino, puede ser determinada

por el balance en la expresión de determinados microRNAs, entre los que se considera a Hsa-miR-132⁶⁵.

En el mismo sentido, se decidió considerar en esta tesis los niveles de Hsa-miR-145 en base al reporte de Fichtlscherer et al. que indica que sus niveles plasmáticos se encuentran disminuidos significativamente en sujetos adultos con la enfermedad coronaria³⁶. Aunque su detección circulante no fue significativamente distintos entre nuestros grupos de estudios, existen evidencias que indican sus niveles circulantes pueden ser útiles para evaluar al sistema cardiovascular posterior a un infarto⁶⁶. Respecto al síndrome metabólico, en un modelo de ratas, para evaluar el crecimiento colateral coronario inducido por eventos repetitivos de isquemia y reperfusión (IR), Hutcheson et al., muestran que células del músculo liso vascular de animales con síndrome metabólico no pueden adquirir un fenotipo contráctil (característico del modelo), una alteración asociada a la no inducción de la expresión de miR-145 en células musculares del corazón. Los autores además reportan que la sobreexpresión de miR-145, en el modelo, logra restituir el fenotipo contráctil⁶⁷, lo que evidencia la alteración de sus niveles celulares inducidos por el síndrome metabólico.

7.4.4.-Hsa-miR-33b.

Dado que la dislipidemia es un componente del síndrome metabólico, Hsa-miR-33b fue considerado dentro del panel a evaluar, en base al reporte de Rayner et al. que muestra que en un modelo de primates no humanos la inhibición de la acción de Hsa-miR-33b induce el incremento de los niveles hepáticos del transportador ABCA1, crucial en la vía de

liberación de HDL, el cual también se incrementa a nivel sanguíneo como efecto final de la inhibición del microRNA⁶⁸.

Nuestros datos evidencian que los niveles plasmáticos de Hsa-miR-33b no son detectables en ninguno de los estados fisiológicos ni patológicos estudiados, a pesar que el sujeto en estudio presentase dislipidemia, por lo tanto su crucial función es restringida al espacio intracelular. En línea con nuestros resultados, Gao et al. muestran que tanto en pacientes control como en pacientes con enfermedad coronaria, los niveles de Hsa-miR-33b no son detectables⁵⁶. Aun así, se ha reportado que en pacientes con bajos niveles plasmáticos de colesterol-HDL, el tratamiento con Xuezhikang induce no sólo el incremento de colesterol-HDL; sino también, los niveles plasmático de Hsa-miR-33b⁶⁹.

8.- Conclusión.

La obesidad en Chile, se ha vuelto una material de preocupación de salud pública, en base al incremento sostenido de su prevalencia en las dos encuestas nacionales de salud realizadas. En ese sentido, cada vez existe más evidencia que las características nutricionales de los infantes, incluso de la madre en el período de gestación, son capaces de alterar sutil pero eficazmente el funcionamiento de los sistemas cardiovascular y metabólico durante la progresión de la vida del individuo. Esta tesis, y el estudio de cohorte desde que se deriva, evidencian que una elevada talla al nacer se asocia con la presencia de un componente de síndrome metabólico en individuos pre-púberes, además que muestra que ninguno de los individuos que se clasificaron como control nació con una talla elevada.

La alteración de mediciones antropométricas y metabólicas, son reflejo de un estado alterado del individuo, por lo que el tratamiento conduce a evitar un empeoramiento de la condición. Se ha vuelto crucial el poseer herramientas diagnósticas lo suficientemente sensibles para poder diagnosticar en una etapa pre-clínica o pre-sintomática De las enfermedades. Los miRNAs circulantes en sangre se han ido fortaleciendo como biomarcadores, ya que poseen características como la capacidad de ser detectado, la toma de muestra no invasiva, la asociación de sus niveles con determinados tipos celulares e incluso tejidos y por sobre todo su estabilidad.

En esta tesis se ha mostrado, por primera vez, que Hsa-miR-Let7e y Hsa-miR-126 se asocian a un estado patológico sistémico complejo como es el Síndrome Metabólico; y a los componentes del SM, lo que resulta ser quizás más importante, ya que se muestran como herramientas predictores y diagnósticas en un estado pre-síndrome, lo que permitiría a los clínicos tomar mejores decisiones terapéuticas más tempranamente.

En base a la amplia literatura existente, queda claro que la alteración de uno o dos miRNAs circulantes no es suficiente para alcanzar la mayor potencia diagnóstica. En el mismo sentido, y en base a que el síndrome metabólico implica la alteración de la función de variados tejidos, se vuelve determinante ampliar la búsqueda de más miRNAs circulantes que se asocien con el SM y sus componentes en un grupo etario que ha sido subestimado, pero que sin lugar a dudas es la base y quizás punto pivotal del desarrollo de las patologías crónicas no transmisibles en el individuo adulto.

Aunque por lo general no se considera como parte del fin diagnóstico, las vías celulares y moleculares por las cuales los miRNAs circulantes ejercerían su acción, no pueden dejar de ser consideradas, ya que sin duda son parte del mecanismo patológico y pueden presentar nuevas herramientas y estrategias terapéuticas.

9.- Referencias

1. Barker, D. J. & Osmond, C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* **1**, 1077–1081 (1986).
2. Hales, C. N. *et al.* Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ* **303**, 1019–1022 (1991).
3. Barker, D. J. *et al.* Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* **36**, 62–67 (1993).
4. Ong, K. K. & Dunger, D. B. Birth weight, infant growth and insulin resistance. *Eur J Endocrinol* **151 Suppl**, U131–9 (2004).
5. Eriksson, M., Wallander, M. A., Krakau, I., Wedel, H. & Svardsudd, K. Birth weight and cardiovascular risk factors in a cohort followed until 80 years of age: the study of men born in 1913. *J Intern Med* **255**, 236–246 (2004).
6. Cutfield, W. S., Hofman, P. L., Mitchell, M. & Morison, I. M. Could epigenetics play a role in the developmental origins of health and disease? *Pediatr Res* **61**, 68R–75R (2007).
7. Hanson, M., Godfrey, K. M., Lillycrop, K. A., Burdge, G. C. & Gluckman, P. D. Developmental plasticity and developmental origins of non-communicable disease: theoretical considerations and epigenetic mechanisms. *Prog Biophys Mol Biol* **106**, 272–280 (2011).
8. McLean, M., Chipps, D. & Cheung, N. W. Mother to child transmission of diabetes mellitus: does gestational diabetes program Type 2 diabetes in the next generation? *Diabet Med* **23**, 1213–1215 (2006).
9. Devaskar, S. U. & Raychaudhuri, S. Epigenetics--a science of heritable biological adaptation. *Pediatr Res* **61**, 1R–4R (2007).
10. Godfrey, K. M. *et al.* Epigenetic gene promoter methylation at birth is associated with child's later adiposity. *Diabetes* **60**, 1528–1534 (2011).
11. McDonald, O. G. & Owens, G. K. Programming smooth muscle plasticity with chromatin dynamics. *Circ Res* **100**, 1428–1441 (2007).
12. Matouk, C. C. & Marsden, P. A. Epigenetic regulation of vascular endothelial gene expression. *Circ Res* **102**, 873–887 (2008).
13. Krause, B., Sobrevia, L. & Casanello, P. Epigenetics: new concepts of old phenomena in vascular physiology. *Curr Vasc Pharmacol* **7**, 513–520 (2009).
14. Rogers, I. The influence of birthweight and intrauterine environment on adiposity and fat distribution in later life. *Int J Obes Relat Metab Disord* **27**, 755–777 (2003).
15. Laitinen, J., Pietilainen, K., Wadsworth, M., Sovio, U. & Jarvelin, M. R. Predictors of abdominal obesity among 31-y-old men and women born in Northern Finland in 1966. *Eur J Clin Nutr* **58**, 180–190 (2004).

16. Dolan, M. S., Sorkin, J. D. & Hoffman, D. J. Birth weight is inversely associated with central adipose tissue in healthy children and adolescents. *Obes. (Silver Spring)* **15**, 1600–1608 (2007).
17. Schroeder, D. G., Martorell, R. & Flores, R. Infant and child growth and fatness and fat distribution in Guatemalan adults. *Am J Epidemiol* **149**, 177–185 (1999).
18. Uauy, R., Kain, J. & Corvalan, C. How can the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) hypothesis contribute to improving health in developing countries? *Am J Clin Nutr* **94**, 1759S–1764S (2011).
19. Gluckman, P. D., Hanson, M. A. & Beedle, A. S. Early life events and their consequences for later disease: a life history and evolutionary perspective. *Am J Hum Biol* **19**, 1–19 (2007).
20. Bruce, K. D. & Byrne, C. D. The metabolic syndrome: common origins of a multifactorial disorder. *Postgr. Med J* **85**, 614–621 (2009).
21. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* **285**, 2486–2497 (2001).
22. Grundy, S. M. *et al.* Diagnosis and management of the metabolic syndrome. An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. Executive summary. *Cardiol Rev* **13**, 322–327 (2005).
23. Cook, S., Weitzman, M., Auinger, P., Nguyen, M. & Dietz, W. H. Prevalence of a metabolic syndrome phenotype in adolescents: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Arch Pediatr Adolesc Med* **157**, 821–827 (2003).
24. Krause, B., Sobrevia, L. & Casanello, P. Epigenetics: new concepts of old phenomena in vascular physiology. *Curr Vasc Pharmacol* **7**, 513–520 (2009).
25. Britten, R. J. & Davidson, E. H. Gene regulation for higher cells: a theory. *Science (80-.)*. **165**, 349–357 (1969).
26. Rana, T. M. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 23–36 (2007).
27. Stefani, G. & Slack, F. J. Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 219–230 (2008).
28. Cortez, M. A. *et al.* MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **8**, 467–77 (2011).
29. Hulsmans, M., De Keyzer, D. & Holvoet, P. MicroRNAs regulating oxidative stress and inflammation in relation to obesity and atherosclerosis. *FASEB J* **25**, 2515–2527 (2011).
30. Zhang, T. *et al.* Plasma miR-126 is a potential biomarker for early prediction of type 2 diabetes mellitus in susceptible individuals. *Biomed Res. Int.* **2013**, 761617 (2013).
31. Jansen, F. *et al.* MicroRNA Expression in Circulating Microvesicles Predicts Cardiovascular Events in Patients With Coronary Artery Disease. *J. Am. Heart Assoc.* **3**, e001249–e001249 (2014).

32. Mardones, F. *et al.* Estado nutricional , síndrome metabólico y resistencia a la insulina en niños de Santiago , Chile AND INSULIN RESISTANCE IN CHILDREN FROM. *Nutr. Hosp.* **28**, 1999–2005 (2013).
33. Cook, S., Weitzman, M., Auinger, P., Nguyen, M. & Dietz, W. H. Prevalence of a metabolic syndrome phenotype in adolescents: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Arch Pediatr Adolesc Med* **157**, 821–827 (2003).
34. Fernández, J. R., Redden, D. T., Pietrobelli, A. & Allison, D. B. Waist circumference percentiles in nationally representative samples of African-American, European-American, and Mexican-American children and adolescents. *J. Pediatr.* **145**, 439–44 (2004).
35. National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Children and Adolescents. The Fourth Report on the Diagnosis, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure in Children and Adolescents. *Pediatrics* **114**, 555–576 (2004).
36. Fichtlscherer, S. *et al.* Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ. Res.* **107**, 677–84 (2010).
37. Grimson, A. *et al.* MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol. Cell* **27**, 91–105 (2007).
38. Friedman, R. C., Farh, K. K.-H., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* **19**, 92–105 (2009).
39. Garcia, D. M. *et al.* Weak seed-pairing stability and high target-site abundance decrease the proficiency of lsy-6 and other microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 1139–46 (2011).
40. Szklarczyk, D. *et al.* The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. *Nucleic Acids Res.* **39**, D561–8 (2011).
41. Franceschini, A. *et al.* STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res.* **41**, D808–15 (2013).
42. Zampetaki, A., Willeit, P., Drozdov, I., Kiechl, S. & Mayr, M. Profiling of circulating microRNAs: from single biomarkers to re-wired networks. *Cardiovasc. Res.* **93**, 555–62 (2012).
43. Heneghan, H. M., Miller, N., McAnena, O. J., O'Brien, T. & Kerin, M. J. Differential miRNA expression in omental adipose tissue and in the circulation of obese patients identifies novel metabolic biomarkers. *J Clin Endocrinol Metab* **96**, E846–50 (2011).
44. D'Alessandra, Y. *et al.* Diagnostic potential of plasmatic MicroRNA signatures in stable and unstable angina. *PLoS One* **8**, e80345 (2013).
45. Li, S. *et al.* Signature microRNA expression profile of essential hypertension and its novel link to human cytomegalovirus infection. *Circulation* **124**, 175–84 (2011).
46. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402–8 (2001).

47. Mardones, F. *et al.* Associations of prenatal growth with metabolic syndrome, insulin resistance, and nutritional status in Chilean children. *Biomed Res. Int.* **2014**, 472017 (2014).
48. Overview of biological markers. In: Biological markers in epidemiology. at <http://courses.washington.edu/epi573/Hulka_1990.pdf>
49. Mayeux, R. Biomarkers : Potential Uses and Limitations. **1**, 182–188 (2004).
50. Velu, V. K., Ramesh, R. & Srinivasan, a R. Circulating MicroRNAs as Biomarkers in Health and Disease. *J. Clin. Diagn. Res.* **6**, 1791–5 (2012).
51. Tijssen, A. J., Pinto, Y. M. & Creemers, E. E. Circulating microRNAs as diagnostic biomarkers for cardiovascular diseases. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **303**, H1085–95 (2012).
52. Kroh, E. M., Parkin, R. K., Mitchell, P. S. & Tewari, M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods* **50**, 298–301 (2010).
53. Gilad, S. *et al.* Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One* **3**, e3148 (2008).
54. Mitchell, P. S. *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 10513–8 (2008).
55. Benz, F. *et al.* U6 is unsuitable for normalization of serum miRNA levels in patients with sepsis or liver fibrosis. *Exp. Mol. Med.* **45**, e42 (2013).
56. Gao, W. *et al.* Plasma levels of lipometabolism-related miR-122 and miR-370 are increased in patients with hyperlipidemia and associated with coronary artery disease. *Lipids Health Dis.* **11**, 55 (2012).
57. Li, S. *et al.* Signature microRNA expression profile of essential hypertension and its novel link to human cytomegalovirus infection. *Circulation* **124**, 175–84 (2011).
58. Stather, P. W. *et al.* Differential microRNA expression profiles in peripheral arterial disease. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **6**, 490–7 (2013).
59. Wang, S. *et al.* An Endothelial-specific microRNA Governs Vascular Integrity and Angiogenesis. *Dev Cell* **15**, 261–271 (2009).
60. Jansen, F. *et al.* MicroRNA Expression in Circulating Microvesicles Predicts Cardiovascular Events in Patients With Coronary Artery Disease. *J. Am. Heart Assoc.* **3**, e001249–e001249 (2014).
61. Jiang, Y. *et al.* Peripheral blood miRNAs as a biomarker for chronic cardiovascular diseases. *Sci. Rep.* **4**, 5026 (2014).
62. Fernandez-Twinn, D. S. *et al.* Downregulation of IRS-1 in adipose tissue of offspring of obese mice is programmed cell-autonomously through post-transcriptional mechanisms. *Mol. Metab.* **3**, 325–33 (2014).
63. Liu, Y. *et al.* The role of circulating microRNA-126 (miR-126): a novel biomarker for screening prediabetes and newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 10567–77 (2014).

64. Heneghan, H. M., Miller, N., McAnena, O. J., O'Brien, T. & Kerin, M. J. Differential miRNA expression in omental adipose tissue and in the circulation of obese patients identifies novel metabolic biomarkers. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, E846–50 (2011).
65. Nesca, V. *et al.* Identification of particular groups of microRNAs that positively or negatively impact on beta cell function in obese models of type 2 diabetes. *Diabetologia* **56**, 2203–12 (2013).
66. Yu-Mei Dong , Xiao-Xia Liu , Guo-Qian Wei , Ying-Nan Da , Li Cha, C.-S. M. Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation - 0(0):1 - PDF, Informa Healthcare. *Scand. J. Clin. Lab. Investig.* (2014). at <<http://informahealthcare.com/doi/pdf/10.3109/00365513.2014.981855>>
67. Hutcheson, R. *et al.* MicroRNA-145 restores contractile vascular smooth muscle phenotype and coronary collateral growth in the metabolic syndrome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 727–36 (2013).
68. Rayner, K. J. *et al.* Inhibition of miR-33a/b in non-human primates raises plasma HDL and lowers VLDL triglycerides. *Nature* **478**, 404–7 (2011).
69. Cao, R. *et al.* Xuezhikang therapy increases miR-33 expression in patients with low HDL-C levels. *Dis. Markers* **2014**, 781780 (2014).

10.- Anexos

Anexo 1. Cuantificaciones de RNA total obtenidas del plasma de sujetos del grupo Control, Síndrome Metabólico (SM) y con 1 - 2 componentes del SM.

Normal			SM			1-2 componentes		
N°	código	RNA (ng/uL)	N°	código	RNA (ng/uL)	N°	código	RNA (ng/uL)
1	304	10.56	27	309	8.24	60	303	5.18
2	305	11.04	28	310	34.24	61	307	3.4
3	368	49.36	29	311	27.36	62	312	12.3
4	383	36.16	30	314	21.6	63	313	25.6
5	384	9.92	31	315	5.8	64	318	23.8
6	414	20.32	32	316	7.7	65	322	7.8
7	418	6	33	317	10.96	66	323	10.9
8	421	15.92	34	319	19.44	67	327	1.4
9	437	4.28	35	320	47.28	68	328	18.7
10	449	4.4	36	321	13.44	69	329	1.8
11	306	3.2	37	324	19.44	70	330	1.2
12	308	16.2	38	325	12.96	71	331	8.4
13	9	22.2	39	326	14.16	72	334	4.8
14	14	9.28	40	332	19.68	73	335	48
15	28	22.3	41	333	7.28	74	336	S/lectura
16	35	9.28	42	337	16.96	75	343	S/lectura
17	40	37.8	43	338	5.84	76	344	7.2
18	42	6.9	44	339	6.64	77	345	7.6
19	44	16.32	45	340	5.46	78	346	2.7
20	50	8.32	46	341	2.96	79	348	7.1
21	51	11.28	47	342	25.68	80	349	7.4
22	52	5.04	48	347	5.76	81	350	2.5

N°	código	RNA (ng/uL)	N°	código	RNA (ng/uL)	N°	código	RNA (ng/uL)
24	60	8.5	50	407	6.4			
25	63	29.9	51	409	15.76			
26	64	10.32	52	410	9.68			
			53	411	25.36			
			54	412	21.12			
			55	417	13.36			
			56	427	47.2			
			57	432	19.92			
			58	443	6.96			
			59	447	7.76			

Anexo 2. Expresión plasmática relativa a Cel-miR-39 de los miRNAs estudiados. Se muestran las cantidades relativas calculadas para cada microRNA, en cada muestra, respecto a la media del grupo control.

Cod.	miR-let7e	miR-145	miR-132	miR-126	Cod.	miR-let7e	miR-145	miR-132	miR-126	Cod.	miR-let7e	miR-145	miR-132	miR-126
Normal					MetS					1 - 2 signos				
304	6.20	3.35	2.34	4.92	309	6.57	6.89	3.95	9.09	303	1.41	1.86	0.77	1.29
305	4.68	1.88	1.99	5.42	310	1.18	1.01	1.32	1.61	307	1.64	2.87	0.69	1.89
306	1.42	1.25	0.72	1.97	311	7.56	4.21	4.33	8.42	312	1.96	0.99	0.65	2.81
308	0.53	0.54	0.33	0.50	314	5.91	1.42	2.72	4.36	313	8.53	9.43	6.92	9.86
368	0.38	0.07	0.28	0.28	315	10.88	2.45	3.35	10.50	318	0.53	0.42	1.18	0.44
383	0.89	0.39	0.24	0.22	316	1.57	0.40	0.87	0.68	322	1.09	1.21	0.60	0.48
384	1.52	1.06	1.28	1.03	317	1.26	0.69	0.73	0.61	323	26.69	17.12	7.80	0.91
414	1.12	0.33	0.23	0.15	319	2.18	0.78	1.57	1.02	324	1.20	0.64	1.32	0.69
418	0.11	0.22	0.19	0.14	320	1.53	0.50	1.65	0.75	327	11.90	41.34	17.35	18.48
421	1.48	0.67	1.36	0.85	321	2.19	0.73	1.29	1.30	328	3.88	3.78	1.63	4.10
437	0.33	0.20	0.28	0.30	325	1.98	0.49	1.50	0.79	329	7.43	4.85	3.38	16.06
449	1.00	1.14	2.31	1.10	326	1.76	0.33	0.46	0.65	330	9.18	8.92	3.46	10.81
9	1.92	3.27	3.70	2.78	332	18.38	6.26	2.34	4.41	331	7.21	6.52	2.82	6.21
14	2.15	2.38	2.38	2.40	333	31.92	6.91	3.60	6.95	334	7.65	9.92	3.35	10.73
28	0.28	0.19	0.34	0.55	337	18.52	1.76	1.88	4.15	335	3.56	1.63	4.65	4.47
35	2.54	1.62	1.91	2.35	338	6.23	1.14	1.75	1.32	336	3.57	1.36	3.66	3.32
40	1.63	1.26	1.73	1.93	339	4.17	1.09	1.49	0.75	343	4.05	4.48	43.17	4.79
42	0.82	1.64	1.85	1.60	340	9.10	3.14	2.23	1.59	344	0.77	0.72	0.65	0.44
44	1.47	2.50	2.90	3.48	341	1.55	0.85	1.36	2.09	345	0.38	0.25	0.22	0.39
50	1.51	2.54	2.54	2.80	342	4.44	0.59	1.47	1.17	346	0.94	0.29	0.51	0.61
51	1.30	1.78	1.87	1.69	347	0.27	0.34	0.49	0.47	348	1.11	0.46	0.50	0.51
52	1.42	2.46	1.94	1.60	355	0.60	0.09	0.69	0.43	349	2.00	1.03	1.16	1.48
56	1.07	2.09	0.72	0.90	407	1.08	0.40	0.52	7.82	350	0.71	0.60	0.90	0.38
60	1.55	2.60	1.02	1.14	409	0.13	0.34	0.27	0.25	432	0.59	0.21	0.89	0.60
63	1.52	1.70	1.44	1.83	410	1.30	0.38	0.31	0.18					

Cod.	miR-let7e	miR-145	miR-132	miR-126	Cod.	miR-let7e	miR-145	miR-132	miR-126	Cod.	miR-let7e	miR-145	miR-132	miR-126
		Normal					MetS					1 - 2 signos		
64	1.09	3.59	2.39	1.94	411	1.79	0.57	0.35	0.17					
					412	1.14	0.45	0.27	0.18					
					417	0.98	0.31	0.18	0.20					
					427	1.63	2.73	1.65	1.16					
					443	1.01	0.40	0.51	0.57					
					447	3.39	2.36	2.91	1.94					

Anexo 3. Correlaciones no significativas de diferentes componentes de SM con niveles plasmáticos de microRNAs.

		miR-Let-7e	miR-126	miR-132	miR-145
Perímetro de cintura (cm)	Coef. Correlación p	0.091 0.255	/	0.106 0.184	0.080 0.317
Razón cintura-tobillo (cm/cm)	Coef. Correlación p	0.031 0.697	/	/	0.126 0.114
Peso corporal (kg)	Coef. Correlación p	0.088 0.272	0.145 0.069	0.042 0.604	0.031 0.696
IMC (kg/m ²)	Coef. Correlación p	0.093 0.248	/	0.109 0.171	0.075 0.351
Triglicéridos (mg/dL)	Coef. Correlación p	0.127 0.111	/	-0.025 0.752	0.090 0.261
HDL (mg/dL)	Coef. Correlación p	/	-0.070 0.381	0.013 0.868	-0.005 0.950
VLDL (mg/dL)	Coef. Correlación p	0.126 0.115	/	-0.028 0.722	0.086 0.282
Insulinemia (μUI/mL)	Coef. Correlación p	0.030 0.710	-0.051 0.521	-0.087 0.275	-0.104 0.195
HOMA	Coef. Correlación p	-0.030 0.708	-0.059 0.459	-0.083 0.302	-0.105 0.190
Media Presión sanguínea (mmHg)	Coef. Correlación p	0.011 0.891	0.063 0.434	0.007 0.931	-0.023 0.777
Presión sanguínea diastólica (mmHg)	Coef. Correlación p	0.035 0.658	0.121 0.130	0.016 0.846	0.016 0.843
Presión sanguínea sistólica (mmHg)	Coef. Correlación p	-0.049 0.542	-0.100 0.212	-0.016 0.841	-0.095 0.235

Anexo 4. Descripción de proteínas traducidas de los mRNAs blancos de Let7e y miR-126, que interactúan entre sí, usando String 9.05.

Protein	Name	Function	Targeted by
ABL2	Abelson tyrosine-protein kinase 2	Cytoskeleton, cell motility	miR-Let-7
AKT2	RAC-beta serine/threonine-protein kinase	Cell signaling kinase/phosphatase	miR-Let-7
CASP3	Caspase-3	Cell cycle/apoptosis	miR-Let-7
CCND1	Cyclin D1	Cell cycle/apoptosis	miR-Let-7
CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	Cell cycle/apoptosis	miR-Let-7
CRK	Adapter molecule crk	Cell cycle/apoptosis	miR-126
DFFB	DNA fragmentation factor subunit beta	Cell cycle/apoptosis	miR-126
E2F2	E2F transcription factor 2	Cell cycle/apoptosis	miR-Let-7
FRS2	Fibroblast growth factor receptor substrate 2	Growth factor/metabolism	miR-Let-7
HIPK2	Homeodomain interacting protein kinase 2	Cell cycle/apoptosis	miR-Let-7
HMGA1	High mobility group AT-hook 1	Cell cycle/apoptosis	miR-Let-7
IGF1	Insulin-like growth factor 1	Growth factor/metabolism	miR-Let-7
IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor	Growth factor/metabolism	miR-Let-7
INSR	Insulin receptor	Growth factor/metabolism	miR-Let-7
IRS1	Insulin receptor substrate 1	Growth factor/metabolism	miR-126
MDM4	Mdm4 p53 binding protein homolog	Cell cycle/apoptosis	miR-Let-7
PIK3CD	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit delta	Cell signaling kinase/phosphatase	miR-126
PIK3R2	Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 2 (beta)	Cell signaling kinase/phosphatase	miR-126
PRKAA2	Protein kinase, AMP-activated, alpha 2 catalytic subunit	Growth factor/metabolism	miR-Let-7
RHOU	Ras homolog family member U	Cell cycle/apoptosis	miR-126
TNFRSF10B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	Cell cycle/apoptosis	miR-126
TP53	Tumor protein p53	Cell cycle/apoptosis	miR-Let-7
TSC1	Tuberous sclerosis 1	Growth factor/metabolism	miR-126