



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Doctorado en Fisiología
Tesis doctoral

Papel del receptor celular FFAR4 en el desarrollo de la obesidad, la inflamación y la resistencia a insulina

Doctorando:
Alan Codoñer Alejos

Directora:
Pilar Codoñer Franch

Tutor:
Francisco Dasí Fernández

Solicitud de depósito:
Enero 2024

Dña Pilar Codoñer Franch, Catedrática del Dpto. de Pediatría, Ginecología y Obstetricia de la Universitat de València,

CERTIFICA/N:

Que la presente memoria, titulada “Papel del receptor celular FFAR4 en el desarrollo de la obesidad, la inflamación y la resistencia a insulina”, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por D/Dña. Alan Codoñer Alejos, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Fisiología de la Universitat de València.

Y para que conste firma el presente certificado en Valencia, a 31/01/2024.

Fdo. Pilar Codoñer Franch

Quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a mi directora de tesis, la Dra. Pilar Codoñer Franch. Su experiencia, paciencia y capacidad de dirección han permitido que este doctorando acabara su tesis doctoral. Su confianza ciega en mí y su constante ayuda me ha permitido sobreponerme a todas las adversidades que han ido apareciendo a lo largo de todo este tiempo.

De igual manera, le agradezco a mi tutor, el Dr. Francisco Dasí Fernández, toda la ayuda que me ha prestado durante la tesis y por estar siempre dispuesto a atenderme y resolver mis dudas.

También quisiera agradecer a mi compañero, el Dr. Joaquín Carrasco Luna, que más que un compañero ha sido como un tutor en la sombra, actuando como tal cada vez que lo he necesitado.

Un sincero agradecimiento a todos los compañeros que estuvieron conmigo en los momentos más difíciles, dándome su apoyo y confianza.

Gracias a mi pareja, Ylenia, por haber estado a mi lado durante todos estos años ayudándome en todo lo necesario.

También a mi hijo Ferran, por mis largas ausencias durante la confección de esta tesis.

Pero en especial, me gustaría dar mis más notorios agradecimientos a mis padres, Emilia y Jose Enrique, por haberme dado su apoyo y su confianza en los momentos más complicados de mi vida, lo que me ha permitido llegar donde he llegado y ser la persona que soy ahora. Gracias infinitas.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. ANTECEDENTES.....	1
1.2. OBESIDAD INFANTIL.....	3
1.2.1. DEFINICIÓN Y PREVALENCIA.....	3
1.2.2. FACTORES DE RIESGO NO GENÉTICOS.....	4
1.2.3. PATOLOGÍAS ASOCIADAS A LA OBESIDAD INFANTIL.....	5
1.2.4. INDIVIDUOS OBESOS METABÓLICAMENTE SANOS.....	8
1.3. OBESIDAD Y GENÉTICA.....	9
1.4. EL GEN FFAR4.....	14
1.5. EL RECEPTOR FFAR4 Y SUS LIGANDOS.....	16
1.5.1. RECEPTOR FFAR4.....	16
1.5.2. LIGANDOS DEL RECEPTOR FFAR4.....	20
1.6. ESTUDIOS GENÉTICOS DEL GEN FFAR4.....	24
1.6.1. INTRODUCCIÓN.....	24
1.6.2. PRIMEROS ESTUDIOS.....	24
1.6.3. ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS.....	25

1.6.4. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN.....	26
1.6.5. ESTUDIOS DE SECUENCIACIÓN.....	26
2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	28
3. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	29
4. OBJETIVOS.....	30
5. METODOLOGÍA.....	31
5.1. GENERALIDADES.....	31
5.2. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN CON SNPS DEL GEN FFAR4.....	32
5.3. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE FFAR4.....	36
5.4. ESTUDIO DE SECUENCIACIÓN DEL GEN FFAR4.....	39
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
6.1. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN CON SNPS DEL GEN FFAR4.....	41
6.2. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE FFAR4.....	48
6.3. ESTUDIO DE SECUENCIACIÓN DEL GEN FFAR4.....	57
7. CONCLUSIONES FINALES.....	63
8. DESARROLLO FUTURO DEL TEMA TRATADO.....	66
9. BIBLIOGRAFÍA.....	68
10. ANEXOS.....	81

Abreviaturas

3'UTR	Región no traducida tres prima
5'UTR	Región no traducida cinco prima
AA	Ácido araquidónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AGL	Ácido gamma-linolénico
Akt	Proteinquinasa B
AL	Ácido linoleico
ALA	Ácido alfa-linolénico
ALT	Alanina aminotransferasa
ARN	Ácidos ribonucleicos
ARNm	ARN mensajero
AST	Aspartato aminotransferasa
CCK	Colecistoquinina
COX	Ciclooxygenasa
DAG	Diacilgliceroles
DHA	Ácido docosahexaenoico
DMII	Diabetes mellitus tipo II
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FFAR4	Receptor de ácidos grasos 4
FTO	Gen asociado a la obesidad y a la adiposidad
GGT	Gamma-glutamiltransferasa
GIPR	Receptor del polipéptido inhibidor gástrico
GLP-1	Péptido similar al glucagón tipo 1
GLUT4	Transportadores de glucosa tipo 4
GRK6	Quinasa 6 acoplada a proteínas G
GWAS	Estudios de asociación del genoma completo
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HGNA	Hígado graso no alcohólico
HOMA-IR	Índice de evaluación del modelo homeostático
hsCRP	Proteína C reactiva de alta sensibilidad

IMC	Índice de masa corporal
IRS-1	Substrato receptor de insulina 1
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LEP	Leptina
LEPR	Receptor de la leptina
LOX	Lisil oxidasa
MAFs	Frecuencias alélicas mínimas
MC4R	Receptor de melanocortina 4
MRAP2	Proteína accesoria del receptor de la melanocortina 2
NF_kB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NR0B2	Receptor nuclear subfamilia 0 grupo B miembro 2
NTRK2	Receptor neurotrófico tirosina quinasa 2
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI3K	Fosfoinositol 3-cinasa
PLC	Fosfolipasa-C
POMC	Proopiomelanocortina
PPARG	Receptor de peroxisomas activado por proliferación y
PUFAs	Ácidos grasos polinsaturados
RBP4	Gen de la proteína de unión a retinol
RIN	Número de integridad del ARN
RT-PCR	PCR a tiempo real
SH2B1	Gen de la proteína adaptadora 1 de SH2B
SM	Síndrome metabólico
SNP	Polimorfismo de nucleótido único
TAB1	Proteína de unión a TAK1 1
TAK1	Quinasa activada por el factor de crecimiento transformante beta
TLRs	Receptores Toll-like
WFS1	Wolframina

Figuras

- Figura 1** Modelos de interacción entre genotipo y estilo de vida para producir un fenotipo obeso. Obtenida de Pérusse L. et al, 2022 y editada por Alan Codoñer Alejos.
- Figura 2** Disposición de los genes *FFAR4* y *RBP4* sobre el cromosoma 10. El genoma de referencia utilizado es el GRCh38.p14. Imagen obtenida del GENE de NIH (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>).
- Figura 3** Perfiles de expresión del gen *FFAR4* de 16 tejidos humanos obtenidos mediante secuenciación de ARN. RPKM: lecturas por kilobase por millón de lecturas totales. Obtenida del proyecto Illumina bodyMap2 transcriptome desde la herramienta GENE de NIH (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/338557>).
- Figura 4** Receptor de membrana *FFAR4*, mostrando sus 7 dominios transmembrana. Se puede observar también los 16 aminoacidos de la isoforma larga. Obtenido de Senatorov I.S. et al, 2020.
- Figura 5** Ruta de señalización intracelular de *FFAR4* dependiente de la proteína *Gαq/1* que desencadena varias respuestas fisiológicas y patológicas. Obtenida de Zhang D. et al, 2014.
- Figura 6** Ruta de señalización intracelular de *FFAR4* dependiente de beta-arrestina que inhibe los procesos inflamatorios en los macrófagos y reduce la resistencia a insulina en tejidos adyacentes. Obtenida de Zhang D. et al, 2014.
- Figura 7** Biosíntesis de ácidos grasos omega-6 y omega-3. Se muestran los precursores y las enzimas responsables del proceso. Obtenida de Valenzuela B. y Nieto M. et al, 2001.
- Figura 8** Fórmula matemática utilizada para el cálculo de un tamaño muestral adecuado con una proporción de referencia.
- Figura 9** Se muestran los valores de expresión de *FFAR4* de cada uno de los 38 casos estudiados. Se agregó una línea roja al valor de 1, que indica el límite de pérdida o ganancia de expresión. El p-valor muestra las

diferencias entre la media de los valores de la expresión *FFAR4* y el valor de referencia 1 mediante la prueba t -Student de un valor.

- Figura 10** Diagrama de cajas que representa la comparación de los valores de expresión de *FFAR4* entre los genotipos C/C y C/T-T/T. El coeficiente estandarizado y el p-valor de la prueba t de Student se encuentran en la parte superior.
- Figura 11** Gráficos de dispersión y línea de tendencia de las correlaciones entre la expresión de *FFAR4* y la resistencia a la insulina (HOMA-IR) (A) e insulina (B). Los coeficientes de Spearman (ρ) y sus valores P se adjuntan en la parte superior derecha.
- Figura 12** Análisis de ligamiento de la región comprendida entre el SNP rs11187533 y el SNP rs41290218 del gen *FFAR4* (localización: 10:93586500-93587839). Datos obtenidos de la herramienta on-line de Ensembl. Población ibérica con 503 individuos de Super-Population, 1000 GENOMES, Phase 3, EUROPE.
- Figura 13** Detalle del SNP rs41290218 (marcado con flecha roja) en heterocigosis (C/A) obtenido del software Chromas.

Tablas

- Tabla 1** Frecuencias alélicas, frecuencias genotípicas y equilibrios de Hardy-Weinberg de los SNPs incluidos en el estudio.
- Tabla 2** Asociaciones entre los SNPs de FFAR4 y los parámetros relacionados con las comorbilidades de la obesidad.
- Tabla 3** Genotipado de los SNPs encontrados por secuenciación aguas abajo del SNP rs11187533 C/T.
- Tabla 4** Desequilibrio de ligamiento entre el SNP rs11187533 y los otros 11 SNPs identificados. Se utilizó la herramienta online SNP Stats.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES

La obesidad infantil se considera uno de los problemas más importantes de salud pública del siglo XXI. Las causas de esta enfermedad pueden ser múltiples e incluyen factores ambientales y genéticos que acaban provocando un desequilibrio entre la ingesta calórica y el gasto energético. El resultado es una acumulación excesiva de grasas en el cuerpo humano en edades tempranas que podría desencadenar, en un futuro, numerosas patologías asociadas como diabetes mellitus tipo II (DMII), hígado graso no alcohólico (HGNA), enfermedades cardiovasculares y síndrome metabólico (SM).

En el estudio ALADINO de 2019 se valoraron la obesidad y sus comorbilidades en una población de 16.665 niños entre 6 y 9 años residentes en España. Se encontró una prevalencia de sobrepeso del 23,3% y una prevalencia de obesidad del 17,3% (1). Las razones de estas cifras tan elevadas son variadas y se centran en la mala alimentación, la falta de ejercicio físico, la disminución en las horas de sueño y el estatus socio-económico de la familia.

Sin embargo, es bien sabido que parte de estas razones se encuentran en la herencia genética dada por sus progenitores. Esta herencia es la que en último lugar produciría una susceptibilidad mayor o menor para desarrollar obesidad. En un estudio reciente se ha revisado la predisposición genética a padecer obesidad analizando diferentes tipos de estudios anteriores y se concluyó que la heredabilidad estaría entre un 30-35% para poblaciones de peso normal y entre 60-80% para poblaciones con obesidad y obesidad extrema (2).

Para analizar con profundidad las causas de la obesidad es importante valorar interacciones entre la susceptibilidad genética y el estilo de vida (alimentación, ejercicio físico, horas de sueño) de cada individuo, siendo muy importante la epigenética, es decir, cómo la edad y los factores ambientales que rodean al individuo pueden alterar la expresión de ciertos genes. De esta manera, se ha propuesto recientemente que la transición entre la herencia genética y el fenotipo obeso podrían analizarse mediante dos modelos matemáticos

distintos en los que el estilo de vida podría actuar como mediador o moderador de estas interacciones (3).

Actualmente, se conocen un gran número de variantes genéticas que intervienen en el riesgo a padecer obesidad. Además, algunas variantes son capaces de producir obesidad por sí mismas, las cuales afectan principalmente al sistema leptina-melanocortina. En el gen asociado a la obesidad y a la adiposidad (*FTO*) se encuentran algunas de las variantes que producen las asociaciones más altas con parámetros como el índice de masa corporal (IMC), aunque todavía no se ha podido dar una explicación concluyente a nivel molecular y fisiológico que explique cómo variantes de este gen desencadenan un aumento del IMC. No obstante, existe una hipótesis mayoritaria que se expondrá en capítulos posteriores.

A los individuos que padecen obesidad pero, aparentemente tienen perfiles de personas sanas (no tienen patologías asociadas a la obesidad) se les denomina obesos metabólicamente sanos (4,5), aunque este concepto sigue estando actualmente en debate (6,7). Existen también algunos genes que son capaces de modular algunas comorbilidades de la obesidad y que definirían en última instancia a estos individuos metabólicamente sanos, es decir, variantes genéticas que afectarían directamente a la susceptibilidad de padecer enfermedades derivadas de la obesidad (8,9). En nuestro estudio, hemos seleccionado un gen candidato que podría ser uno de los genes importantes en esta modulación. Se trata del receptor de ácidos grasos 4 (*FFAR4*), un gen que codifica un receptor de membrana que se une a ácidos grasos omega-3 y omega-6.

Son numerosos los estudios que relacionan el gen *FFAR4* con la obesidad (10) y sus comorbilidades, como la DMII (11) y el HGNA (12,13). Estas comorbilidades podrían aparecer o agravarse por un funcionamiento insuficiente o incorrecto del receptor FFAR4, el cual tiene una función antinflamatoria y de sensibilización a la insulina en los tejidos que lleva a cabo mediante la expresión en la superficie de los macrófagos (14,15,16). También se expresa en tejidos clave para el control de la obesidad como el hígado, el tejido adiposo y el páncreas, donde también interviene en múltiples procesos que serían clave para un control adecuado de la enfermedad.

1.2. OBESIDAD INFANTIL

1.2.1. DEFINICIÓN Y PREVALENCIA

La obesidad se define como una acumulación excesiva y anormal de grasa que puede ser perjudicial para la salud y cuya causa principal es un desequilibrio energético entre calorías ingeridas y gastadas. Actualmente, la obesidad representa un problema grave de salud que, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), ha triplicado sus cifras de prevalencia en estas últimas 4 décadas. Ha llegado a niveles epidémicos en muchos países y la incidencia sigue subiendo tanto en adultos como en niños. Es la quinta causa de muerte en el mundo y contribuye a la aparición de numerosas enfermedades, incluyendo cáncer, DMII, SM y enfermedades cardiovasculares (17).

En adultos, la OMS define como sobrepeso $\text{IMC} \geq 25$ y como obesidad $\text{IMC} \geq 30$. Hay que tener en cuenta que el IMC, el cual se basa en el peso y la altura, es un valor aproximado que no mide de manera fiable el grado de obesidad de cada individuo. De este modo, factores como el sexo, la edad y la masa muscular de cada individuo podrían alterar este parámetro.

La obesidad adquiere una importancia notable cuando hablamos de individuos en edades pediátricas. Según la OMS, en 2016 había más de 340 millones de niños y adolescentes (de 5 a 19 años) con sobrepeso u obesidad. Estos valores aumentan año tras año como consecuencia de una educación alimentaria inadecuada y unos hábitos sedentarios en edades tempranas, adquiridos de sus progenitores o responsables legales.

En el caso de los niños, es necesario tener en cuenta la edad y el sexo al definir el sobrepeso y la obesidad ya que el IMC todavía es menos fiable en edades tempranas.

- En menores de 5 años, el sobrepeso es el peso para la estatura con más de dos desviaciones típicas por encima de la mediana establecida en los patrones de crecimiento infantil de la OMS y la obesidad es el peso para la estatura con más de tres desviaciones típicas por encima de la media establecida en los patrones de crecimiento infantil de la OMS.

- En niños de 5 a 19 años, el sobrepeso es el IMC para la edad con más de una desviación típica por encima de la media establecida en los patrones de crecimiento infantil de la OMS y la obesidad es mayor que dos desviaciones típicas por encima de la mediana establecida en los patrones de crecimiento infantil de la OMS.

Es muy importante identificar el sobrepeso y la obesidad en edades tempranas para poder empezar a controlar a los niños y evitar de esta manera una obesidad mayor en edades adultas, así como las enfermedades que se derivan de ella (18). Para la identificación de los individuos afectados, se realizan dos tipos de examen: un análisis de la historia del paciente que incluya la historia familiar y la psicosocial y un examen físico que mida todos los parámetros morfológicos, fisiológicos y bioquímicos necesarios para definir la obesidad infantil.

1.2.2.FACTORES DE RIESGO NO GENÉTICOS

Los factores de riesgo que determinan la obesidad se dividen en factores genéticos (y epigenéticos) y no genéticos, siendo muy importante la interacción entre ellos. A continuación, se resumen los factores de riesgo no genéticos más importantes (18):

- **Alimentación:** es importante valorar el tipo de alimentos que se ingieren, la cantidad de cada uno de ellos, así como los tiempos entre cada ingestión. Es bien conocido que la ingestión de alimentos hipercalóricos y/o de alto contenido en grasas saturadas o de azúcares simples, ha demostrado tener una relación directa con la obesidad. Cabe destacar también el mecanismo fisiológico del apetito y cómo se regula este hormonalmente.
- **Gasto energético:** se refiere a la cantidad de ejercicio físico, así como las horas de descanso, siendo la práctica de una vida sedentaria un riego evidente de padecer obesidad. El gasto energético junto con la alimentación son los factores más importantes y definen, formando un equilibrio, el nivel de obesidad de cada individuo.

- **Microbiota intestinal:** la microbiota juega un papel clave en la digestión de alimentos y en la producción de metabolitos beneficiosos (o perjudiciales). También es importante la interacción directa de la microbiota intestinal con el epitelio intestinal por vías de inflamación y tolerancia (19). Esta microbiota puede variar debido al tipo de alimentos ingerido y al uso de antibióticos.
- **Sueño:** se ha demostrado recientemente que la extensión del sueño de buena calidad (sin apneas) puede atenuar la obesidad y sus patologías asociadas, como el riesgo cardiovascular (20). Estudios preliminares sugieren que dormir adecuadamente puede mejorar el control glicémico y la presión arterial.
- **Enfermedades previas:** algunas enfermedades como, por ejemplo, el hipotiroidismo, son capaces de desencadenar obesidad por si solas.
- **Origen étnico y lugar de nacimiento:** el origen étnico interviene directamente en los índices de obesidad y va asociado también a la dotación genética de cada población para interaccionar con su ambiente. Este origen étnico, junto con el lugar de nacimiento, definen las características socioculturales y socioeconómicas de cada población, las cuales marcarán el tipo de alimentación, el gasto energético, la microbiota y las horas de sueño de cada población a estudio.

1.2.3. PATOLOGÍAS ASOCIADAS A LA OBESIDAD INFANTIL

La acumulación de grasa en exceso en niños produce un estado proinflamatorio en su organismo, una disminución del metabolismo de los ácidos grasos en todos los tejidos, un aumento de los triglicéridos en sangre y un aumento de la lipogénesis en el hígado que desencadenará una dislipemia y que es el origen de diferentes patologías (18,21). Se ha demostrado también que la localización visceral de esta grasa en exceso podría aumentar la probabilidad de padecer todas estas enfermedades asociadas a la obesidad (22).

Son numerosas las complicaciones y enfermedades asociadas a la obesidad que pueden encontrarse de forma individual o en conjunto, empeorando así el cuadro clínico del individuo. Aquí resumiremos algunas de ellas, las cuales están más relacionadas con nuestro trabajo.

- **Síndrome metabólico:** se define como un conjunto de anormalidades metabólicas que incluyen resistencia a insulina, hipertensión, obesidad y dislipemia. La causa principal sería la acumulación de grasa visceral que provoca un aumento de la resistencia a insulina, un desequilibrio hormonal e inflamación crónica en el organismo. Además, este síndrome está fuertemente asociado al riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular aterosclerótica (8,23). A pesar de presentarse raramente en edades pediátricas, este síndrome es el resultado de padecer obesidad de manera persistente durante edades tempranas.
- **Resistencia a insulina:** se define como la incapacidad de los tejidos para unir insulina en sus receptores celulares y desencadenar las señales intracelulares asociadas, principalmente la captación de glucosa. El exceso de grasa en el tejido adiposo puede desencadenar hiperplasia e hipertrofia que desencadenan un estado de inflamación de bajo grado. Esta inflamación viene favorecida por un aumento en la infiltración y polarización de macrófagos intersticiales y la producción de citoquinas proinflamatorias. Estas citoquinas proinflamatorias pueden inhibir las rutas de señalización de la insulina produciendo así resistencia en tejido adiposo y otros tejidos. La resistencia a insulina será el factor común en otras comorbilidades como la DMII y el síndrome metabólico (8,9,21). Este proceso inflamatorio que derivará en resistencia a insulina será clave para entender los efectos beneficiosos de un buen funcionamiento del receptor FFAR4 (11,15,16).
- **Diabetes mellitus tipo II:** se define como la incapacidad del organismo para regular adecuadamente la captación de glucosa, lo que a largo plazo provocaría una hiperglicemia crónica. La resistencia a insulina en los tejidos provocada por la presencia de obesidad durante etapas prolongadas desencadena hiperglicemia. Esta será compensada en las primeras etapas por una hiperinsulinemia que irá decayendo en el tiempo como consecuencia del deterioro de las células beta del páncreas (9,21).
- **Dislipemia:** es un desequilibrio de los niveles normales en sangre de lípidos y lipoproteínas que está estrechamente asociado a la aparición de la enfermedad cardiovascular. Se consideraría dislipemia cuando encontramos niveles de colesterol

≥ 200 mg/dL, colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL) ≥ 130 mg/dL, colesterol no unido a lipoproteínas de alta densidad (HDL) ≥ 145 mg/dL, triglicéridos ≥ 130 mg/dL (mayores de 10 años) y colesterol HDL < 40 mg/dL (18).

- **Hipertensión:** se define como una presión arterial superior al percentil 95 obtenida en tres ocasiones distintas, utilizando referencias de edad, sexo y altura (18). En niños obesos, está asociado a una acumulación de sodio, una mayor retención de líquidos, un aumento del gasto cardiaco y daños en el endotelio. Una hipertensión persistente en niños y con obesidad o sobrepeso puede desencadenar la enfermedad cardiovascular.
- **Enfermedad cardiovascular:** se trata de un conjunto de enfermedades que afectan al corazón y a los vasos sanguíneos como el accidente cerebrovascular y el infarto de miocardio. Es derivado de un estado proinflamatorio que se asocia con un estado de hipercoagulabilidad, fenómenos protrombóticos y eventos isquémicos secundarios. La obesidad y, más concretamente, la obesidad visceral definida con el perímetro de cintura, sería una de las causas más frecuentemente asociadas al desarrollo de esta enfermedad (24).
- **Hígado graso no alcohólico:** es un síndrome con una fisiopatología compleja que abarca desde la simple deposición excesiva de lípidos en el hígado hasta la esteatohepatitis no alcohólica, la fibrosis hepática y la cirrosis. La acumulación de ácidos grasos en el hígado, provocados por una dislipemia derivada de la obesidad, puede provocar una lipotoxicidad en el hígado. La dislipemia y la resistencia a insulina serán las otras dos patologías que inicien el proceso. Se ha demostrado también que el microbioma y la inmunidad innata juegan un papel importante en el desarrollo final del daño hepático y la muerte celular de los hepatocitos (25).
- **Otros:** la apnea del sueño es la interrupción del sueño en numerosas ocasiones como consecuencia del bloqueo de las vías respiratorias y la disminución de la captación de oxígeno. Es muy común en edades pediátricas siendo la prevalencia del 46% en grupos de niños obesos (26). Problemas mentales derivados de un rechazo de su cuerpo o de episodios de *bullying*. Problemas ortopédicos debido a una sobrecarga temprana de peso en los pies.

1.2.4.INDIVIDUOS OBESOS METABÓLICAMENTE SANOS

Ya desde los años 50, se ha venido observando que existe un grupo de individuos que tienen menos predisposición a padecer patologías como la diabetes mellitus tipo II, el síndrome metabólico o la enfermedad cardiovascular, derivadas de una acumulación excesiva de grasa en el organismo. Sabemos que existe un grupo de individuos dentro de los individuos obesos que no desarrollan complicaciones metabólicas y cardiovasculares o las desarrollan de forma más leve, normalmente asociadas a esta enfermedad (4,5). A este grupo de individuos son a los que llamamos obesos metabólicamente sanos. A pesar de todo, todavía existe debate de si este grupo representa un fenotipo estable y clínicamente relevante (6,7). De momento, no existe una definición unificada de los parámetros anatómicos, fisiológicos, y bioquímicos que deben presentar los obesos metabólicamente sanos.

Es probable que este grupo de individuos posean en su ácido desoxirribonucleico (ADN) ciertas peculiaridades que les confieren en última instancia una mayor tolerancia a la acumulación excesiva de grasa en el organismo y una mayor resistencia al desarrollo de enfermedades derivadas de la obesidad. Por tanto, existe un conjunto de genes cuya expresión y función diferencial confieran un fenotipo capaz de tolerar con mayor eficacia los efectos perjudiciales producidos por la obesidad (27,28,29). Esto será muy importante para nuestro trabajo ya que el gen candidato utilizado (*FFAR4*) podría formar parte de este conjunto de genes. *FFAR4* posee multitud de funciones en las células donde se expresa que están directamente relacionados con la capacidad de proporcionar al organismo una defensa contra la aparición y el desarrollo de las comorbilidades de la obesidad (14).

1.3. OBESIDAD Y GENÉTICA

En 1923, Davenport realizó un estudio para intentar explicar la heredabilidad de la obesidad (30). Este midió la altura y el peso de 1056 padres y sus 1732 hijos basándose en el Índice de Masa Corporal y encontró evidencias de una transmisión de la masa corporal de padres a hijos. Ahora sabemos que la obesidad de los progenitores se hereda a sus hijos, pero los datos de heredabilidad son muy variables entre cada familia y entre los tipos de estudio utilizado para medirla (2). La heredabilidad es un concepto estadístico que describe cuánta variación en un rasgo determinado puede considerarse variación genética. Se estiman valores de heredabilidad muy altos en estudios de comparación de gemelos (entre el 50 % y el 90 %), valores medios en los estudios de núcleos familiares (entre el 30 % y el 50 %) y valores bajos en los estudios de adopción (entre el 10 % y el 35 %). Lo más probable es que el valor de heredabilidad real esté entre un 40 % y un 50 %. Además, cabe destacar que este valor puede aumentar cuanto mayor sea la media de IMC de los individuos a estudiar, siendo del 80 % para individuos con obesidad extrema (2).

A continuación, se analizan y clasifican las variantes genéticas y epigenéticas responsables de la heredabilidad que se ha expuesto anteriormente. No obstante, todavía no se han logrado identificar todas las variantes genéticas y epigenéticas que representen el valor máximo de heredabilidad encontrada en los estudios de gemelos, núcleos familiares y de adopción, habiendo por tanto un valor elevado de heredabilidad perdida (31).

- Variantes genéticas con herencia mendeliana:

Son variantes del ADN localizadas en unos pocos genes que son capaces de producir obesidad por si solas con una herencia mendeliana clara (obesidad monogénica). Pueden ser polimorfismos de nucleótido único (SNPs), duplicaciones, inserciones, delecciones e incluso translocaciones que produzcan en un gen determinado una pérdida total de su expresión o de su función. La mayoría de estos genes transcriben para proteínas implicadas directa o indirectamente en la ruta de señalización de la leptina-melanocortina, la cual tiene un papel muy importante en el control del apetito y la saciedad (32).

Algunos de los genes más importantes serían: leptina (*LEP*), receptor de la leptina (*LEPR*), receptor de melanocortina 4 (*MC4R*), proteína accesoria del receptor de la melanocortina 2 (*MRAP2*), receptor nuclear subfamilia 0 grupo B miembro 2 (*NROB2*), receptor neurotrófico tirosina quinasa 2 (*NTRK2*), receptor de peroxisomas activado por proliferación γ (*PPARG*) (32).

En Europa, se ha demostrado que, entre un 3 y un 5 % de los casos con obesidad severa, son por obesidad monogénica, es decir, que está producida por variantes en un gen concreto y tienen una herencia mendeliana (33). Además, se ha visto que hasta un 30 % de los casos de obesidad severa en poblaciones con consanguinidad está producida por mutaciones en los genes *LEP*, *LEPR* y *MCR4*, siendo este último el que tiene la penetrancia más variable.

Como ejemplo de este tipo de variantes tenemos una mutación en el exón 3 del gen *LEP* (C350G>T). Esta mutación produce un ARNm aberrante que es eliminado por el propio organismo, lo que conlleva una carencia total de leptina funcional e implica una incapacidad para saciarse adecuadamente después de la ingesta de alimentos. Este defecto produce obesidad mórbida y numerosos problemas clínicos como hiperglicemia, resistencia a insulina, amenorrea y acné (34). Otro ejemplo de obesidad monogénica serían las mutaciones S94N y C293R del gen *MCR4*. Cuando aparecen en homocigosis o combinadas producen una pérdida total del receptor MC4R que provoca obesidad severa, hiperfagia e hiperinsulinemia (35).

- Variantes genéticas sin herencia mendeliana:

Se trata de SNPs repartidos por todo el genoma que pueden tener algún tipo de efecto sobre la aparición o el desarrollo de la obesidad, pero que no tienen una herencia mendeliana clara. Estas variantes se ven muy influenciadas por la interacción entre ellas y con factores ambientales produciendo un efecto sumatorio o de agregado. Algunos de estos SNPs son muy comunes en la población y otros presentan incidencias muy bajas.

La técnica que más se ha utilizado para analizar estos SNPs son los estudios de asociación de genoma completo (GWAS), a pesar de no poder analizar correctamente las variantes menos comunes con ella. Existen cientos de genes de este grupo cuyos SNPs han sido asociados con la obesidad (2).

El gen más importante, por producir las asociaciones más fuertes, tener el mayor número de SNPs asociados a la obesidad y ser el primer gen asociado a la obesidad es el gen *FTO* (36,37). Se trata de una enzima con actividad desmetilasa que se expresa mayoritariamente en el hipotálamo. La mayoría de SNPs se encuentran en el intrón 1 y se cree que producen sus efectos gracias a la interacción con el gen *IRX3* (38), que parece estar relacionado con la regulación del gasto energético y el desarrollo de los adipocitos.

Otro gen con numerosos SNPs asociados a la obesidad es el gen *MCR4*. Cabe recalcar que en este caso se trata de polimorfismos con un efecto sumatorio sobre el fenotipo, pero sin una herencia mendeliana clara (39).

Otros genes, como el gen de la proteína adaptadora 1 de SH2B (*SH2B1*), el gen de la proopiomelanocortina (*POMC*) o el gen del receptor del polipéptido inhibidor gástrico (GIPR), también tienen algunos SNPs en su secuencia capaces de elevar notablemente el riesgo a padecer obesidad. Además, estos tres genes están asociados a un mayor riesgo de padecer DMII (39).

No se ha encontrado ninguna asociación significativa entre SNPs del gen *FFAR4* y la obesidad o sus comorbilidades con estudios GWAS, quizás por el efecto reducido de este gen frente a otros. Donde sí se han encontrado asociaciones significativas es en los estudios de SNPs de *FFAR4* como gen candidato.

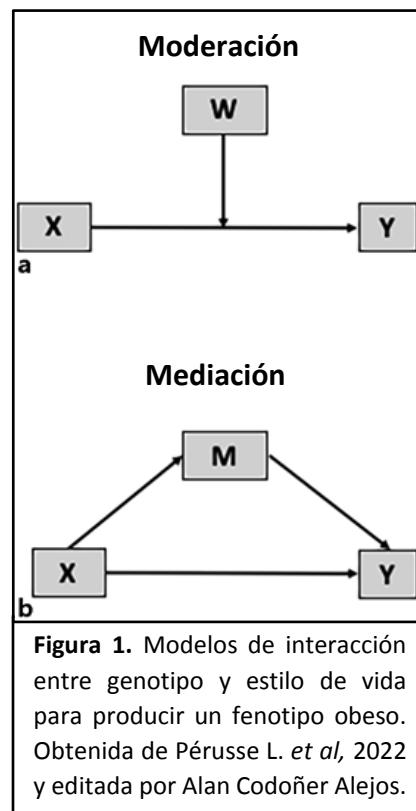
- Variaciones epigenéticas (metilación del ADN):

En las últimas décadas, numerosos estudios epigenéticos y, más concretamente, de metilación del ADN, han sido realizados en busca de una relación entre la obesidad y la metilación del genoma. La epigenética tiene una relación reciproca con el fenotipo estudiado ya que esta puede modular los efectos del fenotipo final pero también puede ser modificada por este. De esta

manera, los estímulos ambientales tempranos relacionados principalmente con la alimentación y el estilo de vida pueden producir cambios en el metiloma relacionados con la aparición o el desarrollo de la obesidad (40).

En los estudios de asociación de la obesidad con metilomas se han identificado un conjunto de genes candidatos con una asociación fuerte con la obesidad. Sin embargo, no se ha logrado encontrar una relación directa entre la epigenética, la transcriptómica y la metabolómica que explique de manera precisa los efectos de esta metilación sobre la obesidad (41).

Es bien sabido que el estilo de vida interactúa con la genética de cada individuo para producir el fenotipo final que podemos apreciar. Los enfoques actuales del estudio de los efectos genéticos sobre la obesidad se centran en incluir variantes de estilo de vida en sus análisis. Las interacciones entre estas dos variables pueden estudiarse con dos modelos distintos: moderación (W) y mediación (M) (Figura1).



Suponiendo que ciertas variantes genéticas o epigenéticas (X) puedan producir un fenotipo obeso (Y), ¿cómo actuaría el estilo de vida (W o M)? Si el estilo de vida actúa aumentando o disminuyendo este efecto de forma externa y sin participar directamente hablaríamos de una moderación. Si el estilo de vida es partícipe del efecto producido y ejerce un efecto directo sobre el fenotipo obeso hablaríamos de una mediación (3).

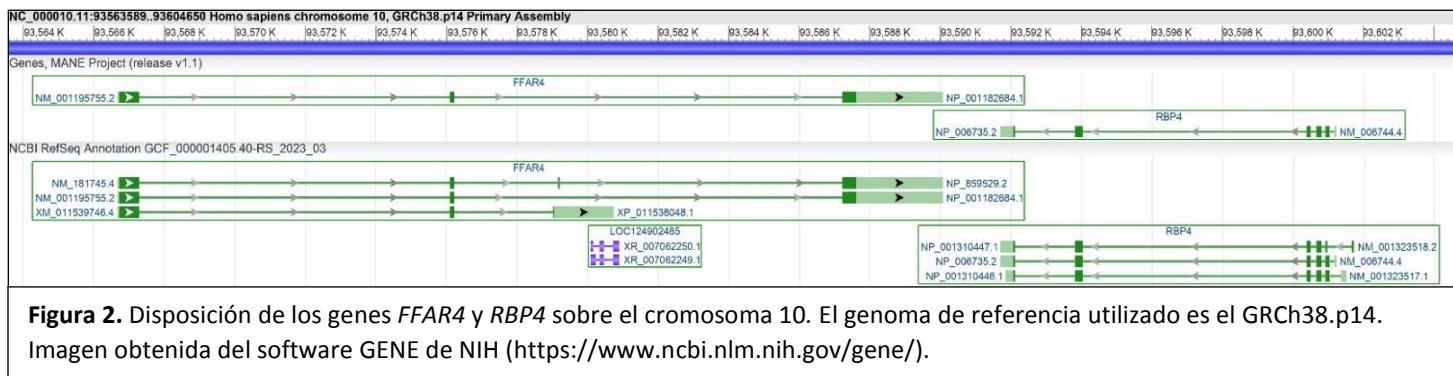
Moderación y mediación son dos modelos complementarios que representan dos enfoques para analizar las interacciones genotipo-fenotipo. Estos dos modelos son útiles para analizar interacciones y, por tanto, conocer mejor la relación causa-efecto entre los genes y la obesidad (3), pero de momento los modelos más utilizados han sido los de moderación.

En el trabajo que aquí se presenta no se incluye ninguna variable que represente el estilo de vida. Estudiaremos sólo la genética de nuestra población, valorando su posible efecto directo sobre el fenotipo obeso y las patologías que se asocian a este.

1.4. EL GEN *FFAR4*

El gen *FFAR4* (también conocido como *GPR120*) se localiza codificado en el brazo largo del cromosoma 10 (q23.3) y tiene un tamaño de 37.816 pares de bases. Tiene tres exones y dos intrones en su isoforma corta (isoforma 2: NM_001195755.2), la más común (ver apartado siguiente). En la forma larga (isoforma 1: NM_181745.4) se genera un exón alternativo al principio del segundo intrón, teniendo entonces 4 exones y 3 intrones (Figura 2).

Está situado muy próximo al gen de la proteína de unión a retinol (*RBP4*) y se transcribe de forma inversa a este (Figura 2). Curiosamente, este gen que traduce para una proteína que transporta retinol por el corriente sanguíneo está también muy relacionado con el control del balance energético (42,43,44). Nuestro grupo de investigación realizó un estudio de asociación de SNPs de este gen con la obesidad y sus comorbilidades (45). Fue descrita una asociación significativa entre la obesidad y el alelo menor C del SNP rs3758538 de *RBP4*. El mismo SNP junto con el rs12265684 fueron asociados también a un incremento de la concentración de triglicéridos en sangre.



El gen *FFAR4* se encuentra expresado en multitud de tejidos a niveles variables. En la Figura 3 se representa los valores de su expresión en diferentes tejidos. Es importante conocer dónde se expresa el gen que se estudia y en qué cantidades porque esto nos permite deducir en qué procesos fisiológicos está más implicado. Es muy importante también a la hora de medir la expresión del gen ya que dependiendo del tejido que se utilice

se podrá asociar con la función concreta de este tejido, dejando en segundo lugar su papel en el resto de ellos.

Como vemos en la imagen (Figura 3), se expresa de forma elevada en mama, luego en colon y pulmón y en menos proporción en cerebro, tejido adiposo, ovarios, testículos y leucocitos. Por el contrario, no se expresa nada en músculo esquelético. Además de los 16 tejidos expuestos en esta figura cabe destacar su expresión en páncreas y papillas gustativas.

En cuanto a la expresión en los distintos compartimentos celulares, *FFAR4* aparece expresado principalmente en la membrana celular, los lisosomas y los endosomas. Además, la isoforma 2 tiene un papel muy importante en los adipocitos indiferenciados (46,47).

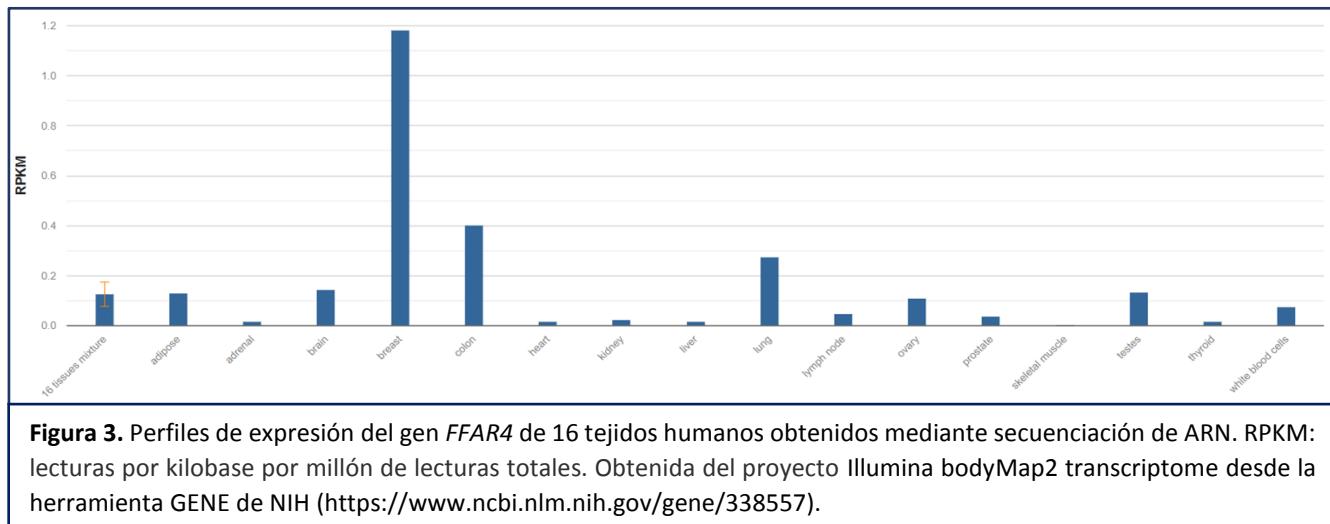


Figura 3. Perfiles de expresión del gen *FFAR4* de 16 tejidos humanos obtenidos mediante secuenciación de ARN. RPKM: lecturas por kilobase por millón de lecturas totales. Obtenida del proyecto Illumina bodyMap2 transcriptome desde la herramienta GENE de NIH (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/338557>).

Existen solo 5 variantes descritas en la secuencia de este gen con posible relevancia clínica. Cuatro de estas variantes son consideradas variantes de significado incierto y son muy infrecuentes (c.17C/G, c.226T/G, c.241C/T y c.490G/A). La otra variante es rs116454156 (c.761G/A; p.R270H) y su alelo menor tiene una frecuencia de 0,015 en Europa (1000 Genomas). Se trata de una variante de pérdida de sentido (*missense*) que produce un cambio de arginina por histidina que anula la función normal del receptor. Es considerada un factor de riesgo para tener un aumento anormal del IMC (10).

1.5. EL RECEPTOR FFAR4 Y SUS LIGANDOS

1.5.1. RECEPTOR FFAR4

FFAR4 es un receptor transmembrana acoplado a proteínas G de la familia de las rodopsinas. Sus ligandos son los ácidos grasos, sobre todo, los insaturados omega-3 y los omega-6. La proteína tiene un tamaño de 361 aminoácidos (isoforma 2) y posee 7 dominios transmembrana (Figura 4), aunque existe otra isoforma más larga con 16 aminoácidos más (isoforma 1), producida por empalme alternativo (*splicing*). La isoforma más común en los tejidos humanos es la corta, encontrándose la expresión de la isoforma larga principalmente en el colon. Esta isoforma larga tiene además una de las dos rutas de señalización intracelular desactivada (proteínas Gaq/1), ya que no produce la elevación de la concentración de calcio intracelular (46).

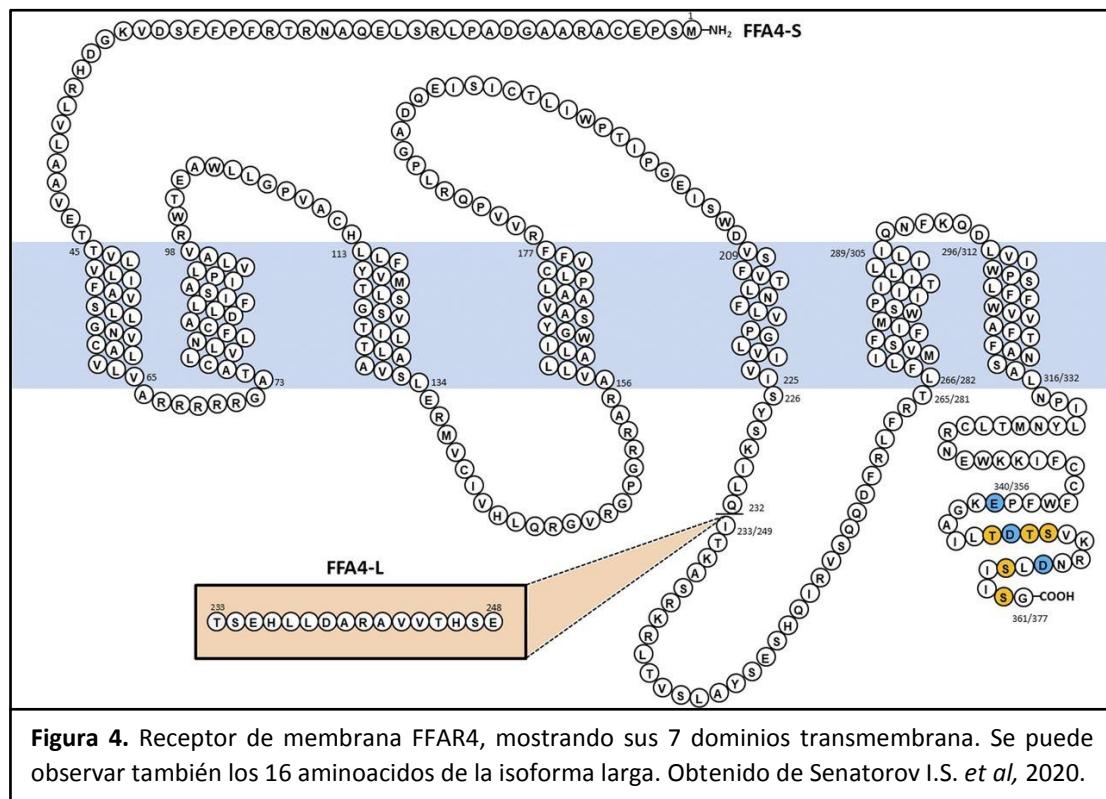


Figura 4. Receptor de membrana FFAR4, mostrando sus 7 dominios transmembrana. Se puede observar también los 16 aminoácidos de la isoforma larga. Obtenido de Senatorov I.S. et al, 2020.

El receptor FFAR4 está implicado en multitud de procesos fisiológicos muy variados y que dependen del tejido donde se expresa. Entre ellos se incluyen la secreción de hormonas (insulina, somatostatina y hormonas gastrointestinales), el control del apetito, la inhibición de procesos inflamatorios, la diferenciación adipogénica, la sensibilización a la insulina y la percepción de sabores (14).

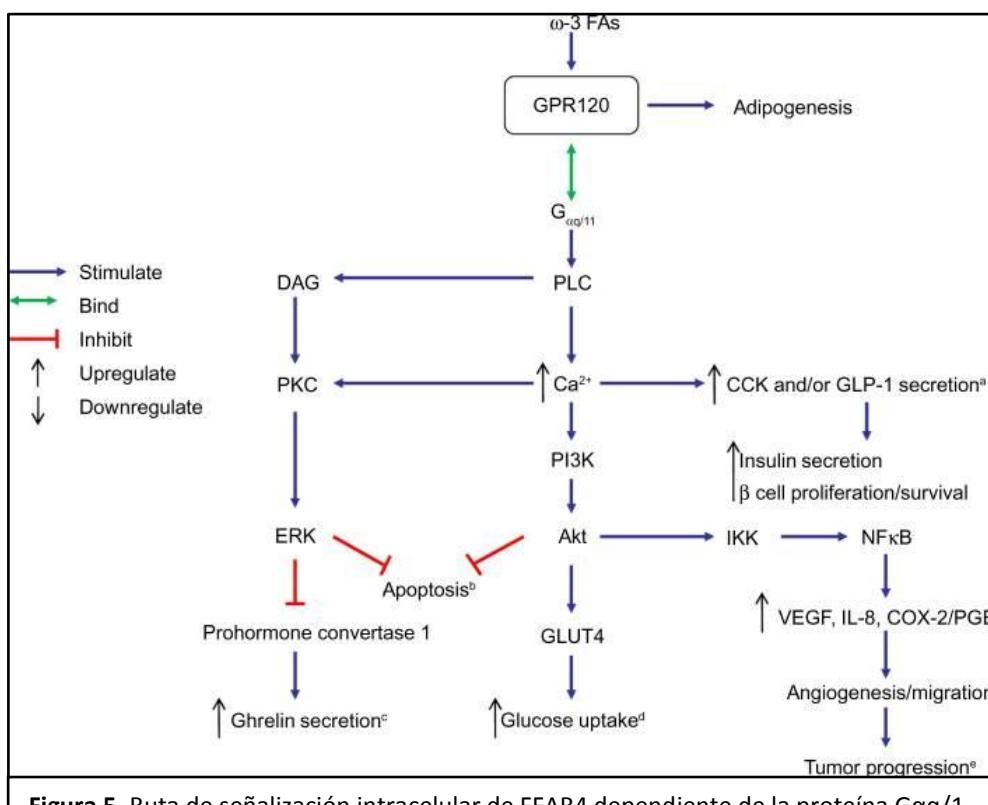
Es sabido que, tanto los ácidos grasos insaturados como los saturados, son capaces de unirse al receptor FFAR4. A pesar de ello, son los ácidos grasos insaturados omega-3 y el omega-6 los que tienen una mayor capacidad de transducir las señales apropiadas al interior celular y producir los efectos que se esperan de su activación (15,46). Además, se sabe que la mayor respuesta al ligando del receptor FFAR4, en cuanto a cinética e intensidad se refiere, la consigue el omega-3 ácido eicosapentaenoico (EPA), seguido por el omega-3 ácido docosahexaenoico (DHA) y acabando por el ácido linoleico (AL) (46). También se han descrito como ligandos el omega-3 ácido alfa-linolénico (AAL) y el monoinsaturado omega-7 ácido palmitoleico (15).

En cuanto a la transducción de la señal intracelular después de la interacción con sus ligandos, esta puede hacerse principalmente mediante dos rutas de señalización que variarán en importancia dependiendo del tejido en el que FFAR4 sea activado (11):

- **Proteína G_{aq/11}:** tiene su función principal en adipocitos, células gastrointestinales, páncreas y papilas gustativas. La unión de FFAR4 a sus ligandos activa la proteína G_{aq/11} que estimula la fosfolipasa-C (PLC), lo que conduce a un aumento de la concentración de Ca²⁺ intracelular y una activación de los diacilgliceroles (DAG). El aumento de la concentración de calcio desencadenará varios procesos dependientes de cada tipo celular (Figura 5):
 - Aumento de la translocación de transportadores de glucosa tipo 4 (GLUT4) en adipocitos, mediante la activación de la fosfoinositol 3-cinasa (PI3K) y la proteinasa B (Akt).
 - La producción de péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) y colecistoquinina (CCK) en células del tracto intestinal y de las papilas gustativas elevará la proliferación en las células beta del páncreas y la

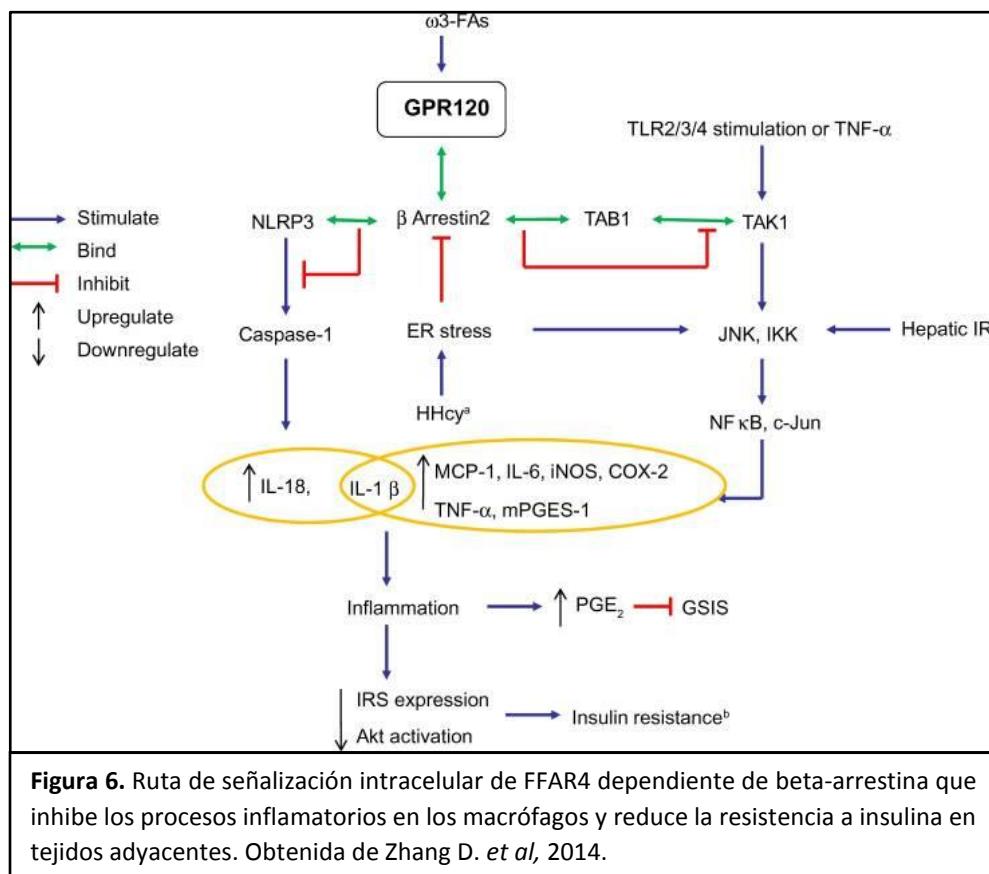
producción de insulina (48). También mediante la activación de la PI3K y Akt.

- Además, se ha demostrado que la activación de los FFAR4 en las células beta y alfa del páncreas activan la producción de insulina y somatostatina (49,50), mediante el aumento intracelular de la concentración de calcio.
- Por su parte, la activación de los DAG producirá un aumento de la secreción de grelina en el estómago. Esta hormona activa la producción de hormona del crecimiento y regula el metabolismo energético, aumentando el apetito (15,16).



- **Beta-arrestina:** tiene su función principal en monocitos y macrófagos. Cuando es estimulado por sus ligandos en estas células, FFAR4 es fosforilado por la

quinasa 6 acoplada a proteínas G (GRK6), lo que conlleva un incremento en la afinidad del dominio intracelular de FFAR4 por la proteína β -arrestina-2 (Figura 6). Esto tendría dos consecuencias: el bloqueo de la ruta vista anteriormente y la internalización del complejo FFAR4- β -arrestina-2. Este complejo es capaz de unirse a la proteína de unión a TAK1 1 (TAB1); cuando esto ocurre se evita la formación del complejo que forma esta proteína con la quinasa activada por el factor de crecimiento transformante beta (TAK1). Esto bloquea la ruta de señalización proinflamatoria procedente de la activación de los receptores Toll-like (TLRs). Mediante el bloqueo de esta ruta de señalización, se evita la formación de ciertas citoquinas y enzimas que participan en la inflamación.



Además, se ha demostrado que esta inflamación en los tejidos circundantes a estos macrófagos podría disminuir la expresión del substrato receptor de insulina 1 (IRS-1) que interviene en la transducción de señales de la insulina, así como

disminuir la activación de Akt, la cual se requiere para la translocación inducida por insulina del transportador de glucosa GLUT4 (15,16,51).

Como hemos visto, *FFAR4* se expresa en multitud de tejidos y desencadena diferentes respuestas intracelulares implicadas en el control del apetito, del balance energético, de la inflamación y de la sensibilización a la insulina. Por ello, se ha demostrado que un mal funcionamiento del receptor *FFAR4* en humanos o ratones está asociado a la aparición o empeoramiento de enfermedades como la obesidad, DM II, enfermedad cardiovascular, HGNA y cáncer (13,14,15,16,52,53).

Cabe destacar también el papel del receptor *FFAR4* en las papilas gustativas, donde aparte de la regulación de la producción de GLP-1 y CCK, se ha propuesto una segunda función en la identificación del sabor graso (54,55).

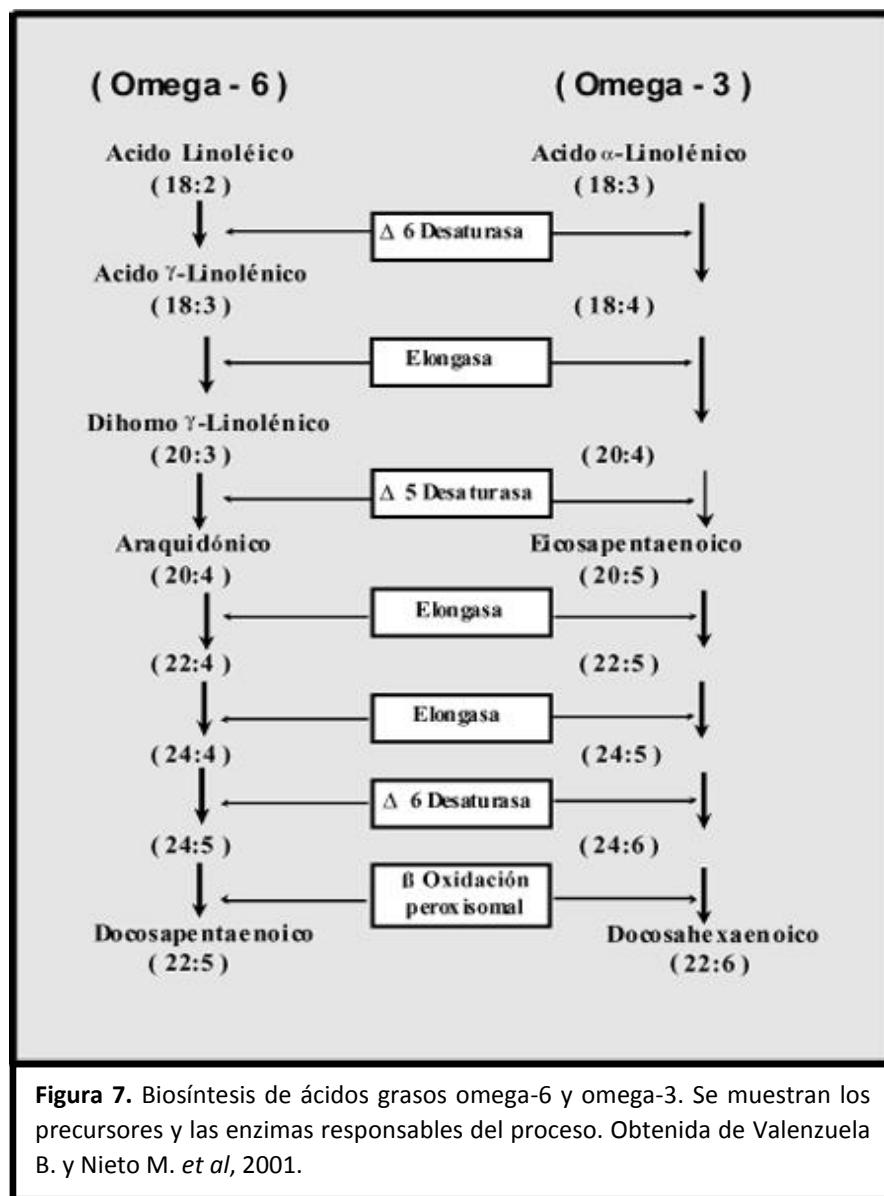
1.5.2. LIGANDOS DEL RECEPTOR *FFAR4*

Hay dos familias principales de ácidos grasos polinsaturados (PUFAs) que son relevantes para la salud humana: los omega-3 y los omega-6. Estos se distinguen por la posición del carbono del primer doble enlace.

Los PUFAs omega-6 tienen el primer doble enlace en la posición 6 mientras que los omega-3 tienen el primer doble enlace en la posición 3.

Existen 6 PUFAs omega-3 y 6 PUFAs omega-6 en el ser humano. El metabolismo humano es capaz de producirlos todos menos dos de ellos, los precursores AL y AAL, y utiliza las mismas enzimas para sintetizarlos a todos (Figura 7). Estos precursores, como no pueden ser sintetizados, deben ser incluidos en la dieta, por lo que se consideran ácidos grasos esenciales. Debido a que se sintetizan en plantas, AL y AAL se encuentran principalmente en alimentos de origen vegetal. El AL es predominante en los alimentos comparado con la AAL y, por tanto, es el sustrato principal de la enzima desaturasa que los metaboliza a los dos. Esto explicaría la baja presencia de PUFAs omega-3 en comparación con los omega-6 (56).

La ingesta baja de estos PUFAs está asociada a la aparición de dermatitis, hipertensión renal, trastornos de la actividad mitocondrial, DMII, deterioro del desarrollo cerebral, artritis, depresión y disminución de la resistencia del cuerpo a las infecciones (56).



- **Omega-6:** los más importantes son el AL, el ácido gammalinolénico (AGL) y el ácido araquidónico (AA). Forman parte de los fosfolípidos de membrana de

las células humanas. Está demostrado que una ingesta correcta de omega-6 es necesaria para un crecimiento y desarrollo normal del organismo.

El AL tiene un papel esencial en la estructura de la piel y su función de barrera, formando parte de las ceramidas de la matriz extracelular. Tiene un papel importante también en el control del colesterol total y las LDL, elevando la expresión de receptores LDL en el hígado y disminuyendo por tanto las LDL circulantes. Además, regula positivamente el catabolismo del colesterol lo que le confiere a la AL propiedades beneficiosas en la enfermedad cardiovascular. También tiene un papel importante en el cerebro, acaparando este órgano más de la mitad de las AL ingeridas. Su papel aquí todavía no está muy claro (56).

Los AA aportan hasta una cuarta parte de los ácidos grasos en los fosfolípidos de los músculos esqueléticos, el cerebro, el hígado, las plaquetas y las células inmunitarias. La conversión mediante diferentes enzimas de los AA permite la producción de eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos). Estos son lípidos bioactivos que tienen un papel mediador en la aparición y el desarrollo de la inflamación (pro-inflamatoria). Por ello, son dianas de muchos fármacos para tratar la inflamación en el organismo.

Omega-3: los más importantes son el ALA, el EPA y el DHA. En general, tienen un papel muy importante en el desarrollo del organismo, sobre todo en el sistema nervioso y la retina. También tienen una función importante en la regulación negativa de la inflamación (antinflamatoria).

EL DHA participa activamente en el transporte transmembrana de algunos aminoácidos, regula la función de los canales de sodio y ejerce como iniciador en los estímulos visuales.

Tanto el DHA como el EPA tienen un amplio rango de efectos antinflamatorios en el organismo. Numerosos estudios han relacionado la ingesta de DHA y EPA, o los niveles en sangre de estos lípidos, con la presencia de marcadores de inflamación como la proteína C-reactiva, citoquinas y moléculas de adhesión.

Algunas de sus propiedades antinflamatorias vienen dadas por los siguientes procesos (56):

- Reducen la producción de eicosanoïdes.
- Inhiben la función de las enzimas ciclooxigenasa (COX) y lisil oxidasa (LOX).
- Son precursores de resolovinas, protectinas y maresinas; encargadas de limitar los procesos de inflamación.
- Reducen la activación de la ruta de señalización proinflamatoria dependiente del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFkB). Esto se logra mediante la activación del receptor de membrana FFAR4 expresado, en este caso, en los macrófagos (51). Los PUFAs omega-6 también son capaces de activar a este receptor, pero producen cinéticas mucho más bajas (57). La activación de este receptor FFAR4, principal protagonista de este trabajo, y las señales intracelulares que generan serán ampliadas en el siguiente punto.

1.6. ESTUDIOS GENÉTICOS DEL GEN FFAR4

1.6.1. INTRODUCCIÓN

Numerosos estudios se han realizado hasta el momento para intentar relacionar una disfunción del gen *FFAR4* con diferentes patologías. Entre estos estudios, podemos encontrar estudios de funcionalidad del gen y análisis de estímulo-respuesta (ligandos naturales y sintéticos) en líneas celulares y modelos animales, estudios “knock-down” en ratones, estudios de asociación con valores de expresión del gen y estudios de asociación de variantes genéticas con enfermedades o fenotipos, tanto polimorfismos como variantes patogénicas.

1.6.2. PRIMEROS ESTUDIOS

El primer trabajo importante que asociaba disfunciones de FFAR4 con una patología fue el realizado por Oh *et al.* en 2010 (15). En él, se realizaron diferentes análisis con monocitos RAW 264.7, macrófagos intraperitoneales y ratones *knock-down* para FFAR4. Evidenciaron las propiedades de FFAR4 para mediar en efectos antiinflamatorios robustos y amplios, particularmente en macrófagos. Además, utilizaron ratones *knock-down* para FFAR4 para demostrar que los omega-3 causan efectos antiinflamatorios y de sensibilización a la insulina mediados por FFAR4.

Cuatro años después, el mismo grupo publicó otro trabajo donde midieron, en ratones, los efectos del agonista selectivo de FFAR4 cpdA en obesos alimentados con una dieta rica en grasas. Descubrieron una mejora de la tolerancia a la glucosa, una disminución de la hiperinsulinemia, un aumento de la sensibilidad a la insulina y una disminución de la esteatosis hepática (16).

Otro de los primeros trabajos relevantes fue el publicado por Ichimura *et al.* en 2012 (10). Estos demostraron, en línea con los trabajos de Oh *et al.*, que los ratones deficientes en FFAR4 alimentados con una dieta rica en grasas desarrollan obesidad, intolerancia a la glucosa e hígado graso. En humanos, evidenciaron que la expresión de *FFAR4* en tejido adiposo es significativamente mayor en individuos obesos que en controles de individuos

con normopeso. Además, mediante la secuenciación del gen *FFAR4* de individuos obesos identificaron la mutación p.R270H (rs116454156).

1.6.3. ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS

En cuanto a los trabajos con SNPs del gen *FFAR4*, como gen candidato, y su asociación con la obesidad y sus comorbilidades tenemos dos principalmente. En los dos trabajos se mide el efecto de los SNPs en combinación con una dieta concreta sobre el fenotipo obeso.

El primero es un estudio con 3 SNPs del gen *FFAR4*: dos localizados en el intrón 1 y uno localizado en el intrón 2. También intentaron genotipar la variante p.R270H (rs116454156) pero solo obtuvieron una persona con esta variante en heterocigosis, debido a que en Japón esta variante es muy infrecuente. A la mitad de los individuos se les administró una dieta rica en grasas y como marcador de obesidad utilizaron el IMC. Analizando los SNPs de forma individual, no se encontró ninguna asociación significativa con el IMC. Sí se encontraron asociaciones significativas con el IMC analizando estos 3 SNPs como haplotipos y en combinación con el factor dieta (58).

El segundo es un estudio con 12 SNPs del gen *FFAR4*: diez intrónicos, uno en la región no traducida cinco prima (5'UTR) y otro en la región no traducida tres prima (3'UTR). El estudio se realizó con individuos canadienses a los que se les suplementó su dieta con una combinación de ácidos grasos omega-3 DHA y EPA. Cuatro SNPs de los 12 estudiados mostraron asociaciones significativas con los niveles de insulina y resistencia a insulina, en combinación con la suplementación con omega-3. En particular, mostró resultados interesantes el SNP rs17108973 localizado en la región 3'UTR (59).

Como ya se ha comentado, Ichimura *et al.* demostraron una asociación entre la obesidad y una disfunción del receptor FFAR4. También demostraron que la presencia de esta variante en heterocigosis impedía la capacidad del receptor para transducir las señales exógenas y producir incrementos de la concentración de calcio intracelular cuando entraba en contacto con el AAL (10). Posteriormente, se ha asociado la presencia de la variante p.R270H (rs116454156) de *FFAR4* en humanos con comorbilidades de la obesidad como hiperglucemia (60), DMII (61) y daño hepático (13). A pesar de todo, en un trabajo realizado

en poblaciones europeas demostraron que esta mutación no presentaba ninguna asociación con la obesidad ni con sus comorbilidades (62).

1.6.4. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN

A continuación, documentaremos los estudios que han asociado los niveles de expresión del gen *FFAR4*, medidos con ácidos ribonucleicos (ARN) o proteínas, con la obesidad y/o sus patologías asociadas, y que son muy similares a la segunda parte de nuestro trabajo. Tenemos 2 trabajos importantes que al igual que en el nuestro, fueron realizados con niños.

En el primer trabajo, se encontró una asociación significativa entre los niveles de ARN de *FFAR4* en monocitos y los niveles plasmáticos del receptor FFAR4 con la obesidad medida con el IMC. También se observó una asociación significativa entre los niveles plasmáticos del receptor FFAR4 y la resistencia a insulina medida con el HOMA (63).

En el segundo trabajo, se encontró una disminución significativa de la expresión del gen *FFAR4* medida por ARN en células mononucleares de sangre periférica en niños con obesidad mórbida (64).

Además, existen diferentes estudios de asociación de la expresión de *FFAR4* con algunas patologías distintas a la obesidad y sus comorbilidades. Por ejemplo, fue hallada una correlación significativa entre el aumento de la expresión de los receptores FFAR4 y FFAR3 y la enfermedad por reflujo gastroesofágico (65).

Cabe destacar también, la relación entre un aumento de la expresión de *FFAR4* y la transición epitelio-mesenquima, proceso clave en el inicio de la metástasis, en el colangiocarcinoma humano (66). Además, se asoció esta hiperexpresión de *FFAR4* con un mal pronóstico de este tipo de cáncer.

1.6.5. ESTUDIOS DE SECUENCIACIÓN

Con estudios de secuenciación nos referimos a aquellos estudios en los que se ha secuenciado grandes regiones del gen *FFAR4* en individuos obesos con el fin de encontrar variantes con posibles efectos sobre la función del gen *FFAR4* y por lo tanto con un posible efecto sobre el desarrollo de la obesidad y sus comorbilidades.

El único trabajo publicado que sigue esta técnica en humanos es el llevado a cabo por Ichimura *et al.* en 2012 (10) y que se ha comentado en numerosas ocasiones (10). En este estudio, se secuenciaron los cuatro exones (3 exones + 1 exón alternativo) de *FFAR4* en 312 niños y adultos franceses con obesidad extrema y sin relación de parentesco entre ellos. Se identificaron dos variantes con pérdida de sentido del gen, p.R270H (rs116454156) y p.R67C (rs6186610), y cuatro variantes muy raras sin pérdida de sentido del gen. A pesar de ello, solo la variante p.R270H (rs116454156) demostró tener una asociación significativa con la obesidad. Utilizando un modelo de regresión logística ajustado por edad y sexo, demostraron que p.R270H (rs116454156) estaba asociado con la obesidad siguiendo un modelo aditivo. Además, solo esta variante presentó una disminución significativa de las respuestas intracelulares que produce este receptor al contactar con sus ligandos (10).

2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Vista la implicación del gen *FFAR4* en los procesos que controlan el balance energético y la inflamación, pensamos que podría tener un papel importante en la aparición de la obesidad infantil y el desarrollo de esta. También creemos que podría influir en la aparición y el desarrollo de enfermedades asociadas a la obesidad infantil.

Por todo ello, sería de vital importancia la identificación de variantes genéticas en *FFAR4* que pudieran estar modulando estas patologías y nos facilitaran la identificación temprana de los individuos que las vayan a padecer.

Al mismo tiempo, un estudio de expresión del gen *FFAR4* nos permitirá conocer a tiempo real cómo se comporta este gen bajo diferentes grados de obesidad y niveles de afectación de varias comorbilidades de esta.

Por último, la secuenciación de partes del gen *FFAR4* en individuos candidatos podría ayudar a definir haplotipos concretos sobre estas regiones y revelar si existe alguna variante no descrita previamente que esté asociada a los rasgos fenotípicos estudiados.

Para medir adecuadamente los niveles de asociación entre una pobre o mala función del gen *FFAR4* y las comorbilidades de la obesidad, es importante trabajar con una población formada por completo por individuos obesos, dado que no se pueden medir adecuadamente alteraciones derivadas de la obesidad en una población si esta no padece cierto grado de obesidad inicialmente. Además, es sabido que para identificar variantes genéticas asociadas a la misma obesidad también es mejor trabajar con altos índices de obesidad (2).

Al ser un gen que se traduce en un receptor de membrana, la identificación de variantes genéticas capaces de alterar la recepción de sus ligandos o la transducción de las señales serían de gran importancia en estudios farmacogenéticos. Además, los estudios de expresión nos informarían de en qué situaciones serían más eficaces los tratamientos o suplementaciones aplicados.

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Pensamos que podrían existir variantes genéticas del gen *FFAR4* (SNPs en nuestro caso) asociadas significativamente a variables clínicas relacionadas con comorbilidades de la obesidad infantil. Estas variantes podrían estar afectando a la expresión o la función del receptor FFAR4 o estar estrechamente ligadas a otras variantes que estén produciendo estos efectos.

Además, tenemos la hipótesis de que los niveles de expresión del gen *FFAR4* podrían estar correlacionados significativamente con la obesidad infantil y/o sus comorbilidades. Estas correlaciones podrían deberse tanto a un efecto de estas patologías sobre la expresión del gen como al revés, es decir, que sea una diferencia de expresión del gen la que afecte a las patologías, incluso podría darse el caso de que se afectaran mutuamente.

Finalmente, planteamos la hipótesis de que la secuencia del gen *FFAR4* tiene que tener más variantes que se relacionen directamente con la obesidad y sus patologías asociadas, ya que, por el momento, solo hay una variante que se haya descrito formalmente como factor de riesgo. Creemos que un estudio de secuenciación dirigido a zonas específicas como regiones regulatorias o regiones que contengan algún SNP, ya sea asociado a la obesidad o a sus comorbilidades, sería una buena estrategia.

4. OBJETIVOS

- OBJETIVO 1:**

Realizar un estudio con 4 SNPs candidatos del gen *FFAR4* (rs10882273, rs12415204, rs12243124 y rs11187533) para analizar su posible relación con rasgos fenotípicos asociados a la obesidad en una población con obesidad infantil.

- OBJETIVO 2:**

Llevar a cabo un estudio de la expresión de *FFAR4* para comprobar si existe una implicación de este en el desarrollo de la obesidad y sus comorbilidades.

- OBJETIVO 3:**

En caso de encontrar algún SNP con asociaciones significativas, realizar un estudio de expresión de los diferentes genotipos de este SNP para ver si, este SNP y/o cualquiera de su bloque de ligamiento tiene una relación directa a nivel molecular con los rasgos fenotípicos asociados previamente.

- OBJETIVO 4:**

En caso de encontrar algún SNP con asociaciones significativas, realizar una secuenciación de la región colindante que a la vez quede más cerca de una región regulatoria o de empalme de exones para identificar otras variantes implicadas y describir el posible haplotipo que puedan formar en conjunto.

5. METODOLOGÍA

5.1. GENERALIDADES

Todos los individuos que forman parte de nuestro estudio fueron reclutados en la Unidad de Nutrición Pediátrica del Hospital Universitario Dr. Peset. El Comité de Ética del Hospital aprobó los estudios clínicos y genéticos. Todos los padres y participantes (mayores de 12 años) dieron su consentimiento informado por escrito.

Criterios de inclusión:

- Tener edades entre 5 y 16 años.
- Tener un IMC Z-score superior a 2 desviaciones estándar (67).
- Etnia caucásica

Criterios de exclusión:

- Padecer enfermedades genéticas, metabólicas o endocrinas relacionadas con la obesidad y sus comorbilidades.
- Estar bajo algún tratamiento médico que pueda interferir en el estudio.
- Seguir una dieta o régimen alimentario especial (diferente a la dieta mediterránea, típica de la región donde se realiza el estudio).

5.2. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN CON SNPs DEL GEN FFAR4

Para esta primera parte del estudio se incluyó una cohorte de 203 individuos en edad pediátrica (106 niños y 97 niñas). Para calcular el tamaño poblacional adecuado para el estudio de SNPs se utilizó como proporción de referencia (Figura 8) la frecuencia del alelo menor SNP con la frecuencia más baja (rs12243124; alelo C; frecuencia: 0,19), un nivel de confianza del 95% (1,96) y una precisión entre 5-10% (0,75) (68). Con estos datos: $N=1,962(0,19(1-0,19))/0,082=105$. Por tanto, sería necesario como mínimo un tamaño poblacional de 105 individuos para conseguir un poder estadístico adecuado. Como ahora veremos, nuestro tamaño muestral es de casi el doble.

$$N = Z_{\alpha}^2 \frac{p(1 - p)}{\delta^2}$$

N: tamaño muestral;
 Z_{α} : nivel de confianza;
p: proporción poblacional;
 δ : precisión de la estimación.

Figura 8. Fórmula matemática utilizada para el cálculo de un tamaño muestral adecuado con una proporción de referencia.

Para la elección de los SNPs más apropiados para el estudio, se utilizó el Gene Tagger del software de Haplovew versión 4.2. Se utilizó un punto de corte de r^2 de 0,8 y una frecuencia del alelo menor $\geq 5\%$ para cubrir la región entre el último intrón y el 5'-UTR del gen *FFAR4*. La r^2 es el coeficiente de correlación del desequilibrio de ligamiento entre 2 SNPs y nos indica el grado de ligamiento entre ellos, siendo 0 el valor más bajo de ligamiento y 1 el más alto. En cuanto a la frecuencia mayor del 5%, esta nos permitió tener un número de suficiente de individuos que posean el genotipo menos frecuente para poder hacer un análisis comparativo con suficiente fuerza estadística.

Se seleccionaron la variante rs10882273 T/C de la región 3'-UTR y 3 variantes intrónicas: rs12415204, rs12243124 T/C y la rs11187533 C/T. En un principio se seleccionaron 4 SNPs pero el rs12415204 no pudo ser genotipado en ninguna muestra, por lo que fue descartado. No encontramos ninguna asociación significativa descrita previamente entre los SNP seleccionados y parámetros relacionados con la obesidad y sus comorbilidades.

El ADN genómico se obtuvo a partir de células nucleadas de sangre periférica con el kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Izasa, Madrid, España). En este método, el ADN se une específicamente a la membrana de gel de sílice QIAamp mientras los contaminantes pasan a través de ellas. Los inhibidores de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como los cationes divalentes y las proteínas, se eliminan por completo en dos pasos de lavado eficientes, lo que permite que el ácido nucleico puro se eluya en agua o en un tampón proporcionado con el kit.

El genotipado de estos SNPs se realizó mediante sondas TaqMan® (Thermo-Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EE. UU.). Las sondas TaqMan son específicas de cada SNP y tienen un fluoróforo distinto para cada alelo. El ADN genómico se introdujo en una mezcla de reacción que consta de una mezcla maestra (principalmente polimerasa y nucleótidos), cebadores y dos sondas TaqMan®. Cada sonda (en el centro) y los cebadores (en la zona colindante) se unen específicamente a su secuencia complementaria. Cuando la sonda está intacta, un supresor suprime la fluorescencia del fluoróforo, pero cuando la actividad exonucleasa de la polimerasa fragmenta las sondas hibridadas, al sintetizar la hebra complementaria, se separa el fluoróforo del supresor y aparece la fluorescencia. Esta fluorescencia es diferente para cada alelo del SNP.

El proceso de genotipado con sondas TaqMan se llevó a cabo mediante una PCR a tiempo real (RT-PCR) en un termociclador 7300 (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) y el software SDS 1.6.3 (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido). Dentro de este equipo se realizan sucesivos ciclos de PCR con estas sondas midiendo a tiempo real el tipo de fluorescencia en cada ciclo, que dependerá del alelo del SNP a la que estas se puedan unir.

Los parámetros bioquímicos (glucosa, insulina, colesterol, triglicéridos, alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y gamma-glutamiltransferasa

(GGT)) se midieron en suero mediante métodos directos automatizados (Architect C 16000; Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL, EE. UU.). Para la evaluación de la resistencia a la insulina se utilizó índice de evaluación del modelo homeostático (HOMA-IR), que se calculó como el nivel de insulina en ayunas (μ U/mL) \times glucosa en ayunas (mmol/L) / 22,5 (69). Los niveles de proteína C reactiva de alta sensibilidad (hsCRP) fueron medidos por inmunonefelometría en un analizador Beckman Immage 800 (Beckman Coulter Canada Inc., Mississauga, ON, Canadá). Todos ellos fueron determinados en el laboratorio de análisis clínicos del Hospital Universitario Dr. Peset.

Estadística

El análisis estadístico de la asociación de los SNPs con las variables clínicas se realizó con el software SnpStats del Instituto Catalán de Oncología (disponible en <https://www.snpstats.net/>). Todos los análisis de asociación se ajustaron para igualar la obesidad variable de nuestra población. Las variables sanguíneas que definen la inflamación del hígado (AST, ALT y GGT), la inflamación vascular (hsCRP), los niveles de glucosa en ayunas y el HOMA-IR se analizaron cuantitativamente asumiendo una población única y modelos de regresión lineal.

Las comparaciones SNP-fenotipo se clasificaron en 5 modelos de herencia (codominante, dominante, recesivo, aditivo y sobredominante). En el modelo codominante cada alelo aporta un efecto sumatorio y equivalente. En el dominante, es el primer alelo el que produce el mayor efecto sobre el fenotipo. En el recesivo, es la presencia de los dos alelos cambiantes los que producen el efecto que vemos. El modelo aditivo es como el codominante pero cada alelo sube exponencialmente el efecto sobre el fenotipo. El sobredominante predice un efecto mayor sobre los heterocigotos que sobre los dos homocigotos. El modelo de elección para cada comparación es el que muestra valores más bajos para el Criterio de Información de Akaike y el Criterio de Información Bayesiano.

Fue utilizada la corrección de Bonferroni para considerar la significación estadística y obtener un mayor rigor en los resultados. Considerando nuestros SNPs como cada una de las variables y un $\alpha=0,05$: $0,05/4=0,0125$. Los valores p por debajo de este umbral fueron considerados significativos, mientras que los valores entre 0,05 y 0,0125 fueron considerados marginalmente significativos.

5.3. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE FFAR4

Para la segunda parte del estudio se incluyeron 42 niños (22 niños y 20 niñas). Fueron seleccionados aleatoriamente de los 203 individuos incluidos en el estudio de SNPs. Estos niños permanecieron en estricto ayuno nocturno durante doce horas hasta la extracción de la muestra para evitar variaciones en la expresión del gen *FFAR4*.

De los 42 niños estudiados, veinticuatro niños tenían una puntuación Z del IMC entre 2-4 desviaciones estándar y dieciocho niños tenían obesidad extrema con una puntuación Z del IMC superior a 4 desviaciones estándar (67). Además de estos 42 individuos, incluimos cinco niños con una puntuación Z de IMC inferior a 2 desviaciones estándar en el estudio. Con la sangre de estos 5 niños se elaboró una mezcla que nos sirvió de referencia y que es necesaria para el análisis de expresión.

Los parámetros bioquímicos glucosa, insulina, HOMA-IR (69), PCR, colesterol, triglicéridos, ALT y GGT se midieron para estos 42 individuos de la misma manera que para el estudio de SNPs (sección 5.2).

El ARN se aisló de sangre periférica y se obtuvo después del ayuno nocturno de los niños. La sangre fue extraída y almacenada directamente utilizando tubos de ARN de sangre Tempus™ (Applied Biosystems™ Waltham, Massachusetts, EE. UU.). Estos tubos contienen un reactivo en su interior que es capaz de lisar las células sanguíneas y estabilizar el ARN durante la misma extracción de la sangre. Los lisados fueron conservados a -20 °C hasta su extracción de ARN.

El aislamiento de ARN desde los lisados sanguíneos fue realizado con el kit de extracción de ARN MagMAX™ Total RNA Isolation Kit (Ambion®). Este kit está basado en la adición al lisado de bolas magnéticas con una superficie de unión a ácidos nucleicos. Seguidamente, las bolas magnéticas y los ácidos nucleicos unidos a ellas se capturan magnéticamente y se lavan para eliminar las proteínas y los inhibidores de la RT-PCR. Finalmente, los ácidos nucleicos se tratan con ADNasas y se eluye el ARN total.

La integridad del ARN se midió para todas las muestras usando la Agilent 4200 TapeStation y el kit RNA ScreenTape Analysis (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.

UU.) para obtener el número de integridad del ARN (RIN). La integridad es muy importante a la hora de cuantificar un ARN determinado ya que el ARN tiende a degradarse con mucha facilidad y de manera desequilibrada entre los diferentes tipos de ARN. Por ello, si hay mucha degradación en las muestras analizadas se pueden obtener resultados erróneos. Para solucionar o reducir este problema, las muestras con un RIN inferior a 5 fueron eliminadas del estudio (70). Siguiendo esta pauta, fueron eliminadas del análisis 4 muestras y se realizó el estudio posterior con 38 niños. Las cinco muestras de la mezcla de referencia tenían un RIN>5.

Para su posterior cuantificación, es necesario transformar el ARN obtenido en ADN complementario (ADNc). La síntesis de ADNc se llevó a cabo con SuperScript IV VILO Master Mix (Thermo-Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EE. UU.). Con este kit se sintetiza directamente el ADNc utilizando una transcriptasa inversa y cebadores de ADN específicos.

Para cuantificar específicamente el ARN de interés, se utilizaron TaqMan Gene Expression Assays y el TaqMan Gene Expression Master Mix (Thermo-Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EE. UU.). Estas sondas son similares a las sondas TaqMan de genotipado, pero solo tienen un tipo de sonda TaqMan (no una para cada alelo). Se usó una sonda TaqMan (Hs699184_m1) para medir los niveles de copias totales de ARN mensajero (ARNm) de *FFAR4*. La sonda TaqMan *GAPDH* (gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa) (Hs3929097_g1) se eligió como gen de referencia (gen constitutivo). Estos genes mantienen una expresión baja y constante en todas las células por lo que se utilizan como representantes de una expresión basal con la que comparar.

Para analizar los valores de expresión de cada muestra se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (71,72). Este método compara los valores obtenidos de la cuantificación con 2 muestras de referencia diferente que veremos a continuación.

Para todas las muestras de ARN de los 38 niños y las 5 muestras (mezcladas en una sola muestra) se cuantifican los valores de Ct para *FFAR4* y *GAPDH*. Primero se normalizan los valores de *FFAR4* con *GAPDH* (normalización interna de cada muestra). Segundo se normalizan los valores anteriores con los de la mezcla de referencia (normalización externa a la muestra). Los datos se presentan en una escala logarítmica debido a la doble normalización (gen de referencia y mezcla de muestras de referencia). Los resultados de la

expresión del ARNm de *FFAR4* se clasifican como sobreexpresión cuando los valores de $2^{-\Delta\Delta Ct} > 1$ e infraexpresión cuando los valores de $2^{-\Delta\Delta Ct} < 1$. El análisis se llevó a cabo utilizando el sistema de RT-PCR 7300 (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) y el software SDS 1.6.3 (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido).

Estadística

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo con el software SPSS v.26 (SPSS, Inc., Chicago, IL, EE. UU.). Se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para examinar si las variables tenían una distribución normal para aplicar estudios paramétricos o no paramétricos.

La comparación entre los niveles de expresión de *FFAR4* y el SNP rs11187533, puesto que cumplía el criterio de normalidad, se realizó mediante la prueba t de Student. El análisis de los datos de expresión de *FFAR4* entre los niños obesos y el grupo de referencia se realizó con una prueba t de Student para una muestra única. Se utilizó un valor de referencia de 1 como valor arbitrario referido a la media de las 5 muestras de referencia de niños normales. Las correlaciones entre los datos de expresión de *FFAR4* y los rasgos fenotípicos se determinaron mediante los coeficientes de Pearson (datos paramétricos) o Spearman (datos no paramétricos). El análisis de la puntuación z del IMC y el HOMA-IR como variables dicotómicas se realizó mediante la prueba t de Student para datos paramétricos y la prueba U de Mann-Whitney para datos no paramétricos. Se determinaron dos grupos según el z-score del IMC: niños con obesidad (≥ 2 a < 4 DE) y niños con obesidad extrema (≥ 4 DE). Se utilizó un punto de corte de 3,42 en el valor HOMA-IR para definir los grupos insulinoresistentes (69). Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

5.4. ESTUDIO DE SECUENCIACIÓN DEL GEN FFAR4

Fueron seleccionados los ADN de 10 niños candidatos de los 38 niños del estudio de expresión anterior y que estaban también genotipados para el SNP rs11187533. Para ello, fueron elegidos al azar 5 homozigotos C/C y otros cinco heterocigotos C/T. De esta manera se pudo analizar las variantes que están ligadas a cada uno de los alelos de este SNP rs11187533.

Fue secuenciada la región que se extiende desde el rs11187533 hasta la primera parte de la región 3'UTR. Pensamos que si hubiese alguna variante ligada a rs11187533 que pudiese tener algún efecto sobre el fenotipo estudiado es probable que estuviese cerca de la zona de empalme, el último exón o la región reguladora 3'UTR.

La secuenciación de la región de interés de *FFAR4* fue realizada mediante el método de Sanger. Los cebadores de la PCR fueron diseñados por nuestro equipo y se sintetizaron a demanda (Isogen Life Science B.V. Utrecht, Países Bajos). Para cubrir la región de estudio con una buena resolución se utilizaron dos amplicones superpuestos. El primer amplicón tiene una longitud de 592 pares de bases (pb) y fueron utilizados los siguientes cebadores: F (5'-CCAAACAAGGCCAAAGAAAT-3') y R (5' GTGCCTCTGGGACTTTGTGT-3'). El segundo amplicón tiene una longitud de 591 pb y fueron utilizados los siguientes cebadores: F (5'-GGGGTCCCATTCTCCAG-3') y R (5'-TCGCCAGGTGTGAGAAACTC-3').

Las PCRs previas se realizaron con el reactivo AmpliTaq Gold™ (Thermo-Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EE. UU.). Este reactivo contiene la ADN polimerasa y los nucleótidos para la síntesis. Este reactivo se mezcla con los cebadores diseñados y al ADN de partida para estos 10 casos. Como tenemos 2 amplicones esto genera un total de 20 reacciones de PCR individuales. Una vez realizadas las mezclas se llevó a cabo la reacción PCR en el termociclador Veriti (Thermo-Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EE. UU.). Esta PCR previa a la reacción Sanger se realiza para amplificar considerablemente la región de interés.

Previamente a la reacción de Sanger, las reacciones PCRs se purificaron con el kit de Illustra ExoProStar™ (Cytiva UK Limited, Little Chalfont, Inglaterra). Utilizando la actividad fosfatasa y exonucleasa de los enzimas incorporados en este kit y una incubación de 15

minutos este reactivo es capaz de eliminar los nucleótidos no incorporados en la PCR y los cebadores sobrantes.

Para la realización de la reacción de Sanger de los amplicones producidos anteriormente y purificados, se utilizó el kit BigDye™ Terminator v3.1. Este producirá una reacción PCR especial con dos tipos de nucleótido para cada una de las bases, un nucleótido normal sin fluorescencia y otro con fluorescencia y con la capacidad de detener la formación de la hebra. Solo se utiliza uno de los 2 cebadores de la reacción anterior, dependiendo de la hebra que se quiera leer (*forward* en nuestro caso). Esto genera un conjunto de amplicones que acaban en todas las bases que contiene la secuencia y que están marcados en su parte final. Ordenando estos amplicones marcados en una electroforesis capilar se obtiene la secuencia deseada. Las reacciones Sanger se llevaron a cabo en el termociclador Veriti (Thermo-Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EE. UU.)

El producto de esta reacción se purificó con los cartuchos de filtración Performa DTR Kit gel (Edge BioSystems, San Jose, CA, EE. UU.). Estos filtros de gel son capaces de retener el tampón utilizado para la reacción Sanger, los nucleótidos sobrantes y todas las moléculas de ADN por debajo de 20 nucleótidos de longitud.

La electroforesis capilar se realizó con el analizador genético 3130 XL (Thermo-Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EE. UU.). Previamente a su carga, se desnaturizó el ADN en presencia de formamida (evita la formación de la doble hebra de nuevo) y una incubación a 90 °C.

Los datos de secuenciación obtenidos en el Genetic Analyzer se analizaron posteriormente en el software Chromas 2.6.6 (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane QLD, Australia).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN CON SNPs DEL GEN FFAR4

Los 3 SNPs de *FFAR4* estudiados (rs10882273 T/C, rs12243124 T/C y rs11187533 C/T) se genotiparon correctamente en el 100 % de las muestras. Las frecuencias alélicas mínimas (MAFs) de los SNPs estudiados en nuestra población fueron similares a las del estudio HapMap para la población europea, a excepción de rs10882273, cuya frecuencia del alelo menor fue mayor en nuestra muestra de estudio (Tabla1).

Todos los SNPs de nuestro estudio están en equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla 1). Este equilibrio define las relaciones que guardarían las frecuencias alélicas y las frecuencias genotípicas en una población en equilibrio genético. La mayoría de estas desviaciones son producidas por errores en el genotipado, aunque también pueden deberse a presiones selectivas, subestructuras poblacionales o procreación no aleatoria.

Los desequilibrios de ligamiento entre los 3 SNPs en nuestra población fueron bajos ($r=0,4182$; $r=0,4413$ y $r=0,4012$), lo que indica que estos SNPs se heredan de forma independiente. Cabe destacar que para la elección de SNPs marcamos un límite de $r^2=0,8$.

En cuanto las asociaciones encontradas entre los SNPs y los rasgos bioquímicos, identificamos una asociación significativa entre el SNP rs11187533 y la glucemia en ayunas ($P=0,011$) con un modelo recesivo. Específicamente, el genotipo del alelo menor homocigoto T/T se asoció con niveles más bajos de glucosa (Tabla 2). Sin embargo, los niveles de insulina no mostraron ninguna asociación. En consecuencia, la asociación con los valores de HOMA-IR tampoco fue estadísticamente significativa ($P=0,066$).

Además, identificamos dos asociaciones marginalmente significativas ($0,0125>P<0,05$) entre el SNP rs11187533 y los parámetros relacionados con la inflamación del hígado GGT y ALT (Tabla 2).

Tabla 1. Frecuencias alélicas, frecuencias genotípicas y equilibrios de Hardy-Weinberg de los SNPs incluidos en el estudio.

SNP	Frecuencias alélicas			Frecuencias genotípicas			Equilibrio de Hardy-Weinberg
	Alelo	n	Proporción	Genotipo	n	Proporción	
rs10882273	T	222	0,55	T/C	96	0,47	0,57
				T/T	63	0,31	
	C	184	0,45	C/C	44	0,22	
rs12243124	T	329	0,81	T/T	129	0,64	0,07
				T/C	71	0,35	
	C	77	0,19	C/C	3	0,01	
rs11187533	C	299	0,74	C/C	108	0,53	0,59
				C/T	83	0,41	
	T	107	0,26	T/T	12	0,06	

El genotipo homocigoto T/T se asoció con una disminución en los niveles de ALT ($P=0,022$) y GGT ($P=0,015$) en comparación con los genotipos C/C + C/T, también según un modelo recesivo. Por el contrario, esta variante no mostró ninguna asociación con los niveles de PCR.

No se encontraron más asociaciones entre el SNP rs11187533 y otros rasgos metabólicos (colesterol y triglicéridos). No se encontró tampoco ninguna asociación significativa para los otros 2 polimorfismos (rs10882273 T/C y rs12243124 T/C).

El análisis muestra que el genotipo homocigoto menor T/T del SNP rs11187533 se asocia significativamente con niveles más bajos de glucosa en ayunas en niños con obesidad. Por lo tanto, esta variante podría conferir una ventaja genética en esta población con respecto a las alteraciones metabólicas observadas.

Tabla 2. Asociaciones entre los SNPs de *FFAR4* seleccionados y los parámetros relacionados con las comorbilidades de la obesidad.

Parámetros	SNP ID	Genotipo	n	Media (EEM)	Diferencia (95% IC) ^a	valor p ^b	Mejor Modelo
AST (U/L)	rs10882273	T/T-C/C	107	23,1 (0,5)	1,1 (-1,2 – 3,3)	0,39	Sobredominante
		T/C	96	24,0 (1,1)			
	rs12243124	T/T-C/C	132	23,0 (0,5)	1,8 (-1,6 – 4,3)	0,15	Sobredominante
		T/C	71	24,5 (1,4)			
	rs11187533	C/C	108	24,5 (1,0)	-1,8 (-3,7 – 0,1)	0,07	Aditivo
		C/T	83	22,6 (0,7)			
		T/T	12	21,3 (2,0)			
ALT (U/L)	rs10882273	T/T-C/C	107	21,7 (0,9)	1,8 (-1,5 – 5,1)	0,29	Sobredominante
		T/C	96	23,0 (1,4)			
	rs12243124	T/T-C/C	132	22,2 (1,1)	0,9 (-2,6 – 4,3)	0,61	Sobredominante
		T/C	71	22,5 (1,4)			
	rs11187533	C/C-C/T	191	22,7 (0,9)	-8,1 (-15,0 – -1,2)	0,022	Recesivo
		T/T	12	15,8 (1,1)			
GGT (U/L)	rs10882273	T/T-T/C	159	17,6 (0,6)	1,4 (-1,2 – 4,2)	0,28	Recesivo
		C/C	44	19,0 (1,3)			
	rs12243124	T/T	129	18,5 (0,8)	-1,4 (-3,6 – 0,8)	0,21	Aditivo
		T/C	71	16,9 (0,8)			
		C/C	3	11,7 (1,7)			
	rs11187533	C/C-C/T	191	18,2 (0,6)	-5,9 (-10,6 – -1,2)	0,015	Recesivo
		T/T	12	13,2 (0,7)			
hsCRP (nmol/L)	rs10882273	T/T	63	57,8 (9,9)	-10,3 (-20,9 – -0,29)	0,06	Aditivo
		T/C	96	45,1 (4,5)			
		C/C	44	37,1 (4,4)			
	rs12243124	T/T-T/C	200	47,8 (3,9)	-30,2 (-93,6 – 33,3)	0,35	Recesivo
		C/C	3	15,6 (10,0)			
	rs11187533	C/C-T/T	120	44,6 (5,0)	7,6 (-8,0 – 23,3)	0,34	Sobredominante
		C/T	83	51,3 (6,0)			
Glucosa (mmol/L)	rs10882273	T/T	63	5,18 (0,05)	-0,02 (-0,1 – 0,05)	0,50	Aditivo
		T/C	96	5,17 (0,04)			
		C/C	44	5,14 (0,05)			
	rs12243124	T/T-T/C	200	5,17 (0,03)	-0,3 (-0,72 – 0,13)	0,17	Recesivo
		C/C	3	4,92 (0,05)			
	rs11187533	C/C-C/T	191	5,18 (0,03)	-0,28 (-0,5 – -0,07)	0,011	Recesivo
		T/T	12	4,48 (0,08)			
HOMA-IR	rs10882273	T/T	63	3,65 (0,28)	0,38 (-0,36 – 1,11)	0,31	Dominante
		T/C-C/C	140	3,93 (0,22)			
	rs12243124	T/T-T/C	200	3,87 (0,18)	-1,44 (-4,25 – 1,38)	0,32	Recesivo
		C/C	3	2,11 (0,26)			
	rs11187533	C/C-C/T	191	3,90 (0,18)	-1,30 (-2,67 – 0,08)	0,09	Recesivo
		T/T	12	2,77 (0,39)			

^a Máxima diferencia significativa entre medias.

^b Tras la corrección de Bonferroni, los valores de p ≤ 0,0125 se consideraron estadísticamente significativos, y aquellos entre 0,05 y 0,0125 se consideraron marginalmente significativos (en negrita en la tabla).

ALT, alanina transaminasa; AST, aspartato transaminasa; IC: intervalo de confianza; GGT, gamma-glutamiltransferasa; HOMA-IR, modelo de homeostasis de resistencia a la insulina; hsCRP, proteína C reactiva de alta sensibilidad; EEM, error estándar de la media.

A pesar de que no haber encontrado en la bibliografía previa ninguna asociación significativa del SNP rs11187533 con las variables fenotípicas estudiadas, sí encontramos un estudio GWAS donde teniendo una asociación baja de los SNPs del gen *FFAR4* con la obesidad (en comparación con otros genes), el SNP en cuestión tiene la asociación más significativa del gen ($P_{\text{gwas}}=1,10E-14$, $\beta=0,024696$) (73). Esto nos podría indicar la importancia de este SNP dentro de los numerosos SNPs con MAFs lo suficientemente altas como para ser medidas en un GWAS.

La activación de FFAR4 regula directa o indirectamente el metabolismo de los lípidos y/o la glucosa en los tejidos adiposo, hepático y muscular. Este receptor está involucrado en diversos procesos, incluidos la sensibilización a la insulina y la captación de glucosa y, por ello, se ha asociado un mal funcionamiento de este (o una baja expresión) a niveles elevados de glucosa en plasma (60, 74) y HOMA-IR altos (59, 61, 63).

Es sabido que la variante de baja frecuencia p.R270H (rs116454156) que inhibe la actividad de FFAR4, podría aumentar los niveles de glucosa en ayunas dentro de un rango fisiológico normal (60). En el estudio citado, fueron genotipados para esta variante 8996 individuos de origen europeo y edades diversas. Se encontró una asociación significativa entre el alelo menos frecuente de esta variante y el incremento de las concentraciones de glucosa en sangre de estos individuos con una $P=0,0004$ (60).

Una función deficiente de la vía de señalización de FFAR4 (sección 1.5.2) puede dar como resultado niveles elevados de glucosa en sangre, mientras que su regulación positiva daría como resultado niveles más bajos de glucosa en sangre. Este papel del receptor es ejecutado básicamente por dos vías directas como son el aumento de la expresión de GLUT4 en tejidos receptores y la regulación hormonal ejercida por grelina, GLP-1, CCK e insulina. También hay una vía indirecta que podría afectar y se derivaría del papel de FFAR4 en los procesos inflamatorios y la consecuente resistencia a insulina.

En nuestro estudio, la presencia del alelo menor homocigoto recesivo rs11187533 se asoció con niveles más bajos de glucosa en ayunas. Por ello, podríamos pensar que los individuos con este genotipo podrían mostrar mayor activación de la función de FFAR4, aunque de momento y, sin una explicación molecular clara del efecto de este SNP sobre FFAR4 y los procesos fisiológicos que conllevan a la disminución de los niveles de glucosa

en sangre, solo podríamos catalogarlo como un SNP cuya presencia de su alelo menor en un individuo conlleva un menor riesgo poblacional de incremento de los valores de glucosa.

Con respecto a la relación del gen *FFAR4* con la resistencia a la insulina, no se encontró una relación fuerte entre el SNP rs11187533 y HOMA-IR a pesar de obtener valores p relativamente bajos. En un estudio reciente, sí se ha demostrado una asociación significativa entre 4 SNPs del gen FFAR4 y los niveles de insulina y HOMA-IR, cuando los individuos estaban siendo suplementados con aceite de pescado, rico en DHA y EPA, activadores del receptor FFAR4 (59). Es posible que solo con la activación directa del receptor previa a las medidas de insulina y glucosa se puedan obtener resultados positivos para este tipo de asociaciones. De acuerdo con esto, Bonnefond *et al.* 2015 obtuvo resultados significativos para asociaciones de FFAR4 con niveles de glucosa en sangre, pero no para insulina y HOMA-IR (60). En este trabajo, ya comentado anteriormente, y donde se utilizó como variante la p.R270H (rs116454156), tampoco se utilizó ninguna dieta o suplementación capaz de activar el receptor FFAR4.

También observamos una asociación marginalmente significativa (por debajo del 0,0125 autoestablecido) del doble homocigoto T/T de la misma variante con los niveles de ALT y GGT, 2 marcadores de daño hepático. Los niveles de estas enzimas hepáticas se presentan más bajas en los individuos con la presencia de esta variante en homocigosis. Aunque nuestro resultado con estos dos metabolitos no tiene mucha fuerza estadística, sí que existen estudios que respaldarían la relación entre una mala función de FFAR4 y el daño hepático medido con la enzima ALT. Se ha descrito que el alelo infrecuente de la variante p.R270H de *FFAR4* (rs116454156) está significativamente asociada con los niveles de ALT en niños cuando el hígado sufre una acumulación intrahepática excesiva de ácidos grasos (13).

Es bien sabido que el receptor FFAR4 tiene un papel importante en el mantenimiento de interacciones normales entre el tejido adiposo y el hígado. Por ello, la activación de FFAR4 con la suplementación de DHA puede facilitar la lipogénesis normal en los tejidos adiposo y hepático, previniendo así la esteatosis hepática (12). Por otra parte, es conocido el papel de FFAR4 como sensor dieta-dependiente (activado por los ácidos grasos ingeridos) que expresado en las células Kupffer puede regular las respuestas inflamatorias en el

hígado, bloqueando la vía de señalización de los TLRs y reprimiendo la inflamación tisular crónica (11,15,16). Por lo tanto, el funcionamiento normal del receptor FFAR4 podría impedir la deposición inadecuada de lípidos y el estrés inflamatorio en el hígado y, en consecuencia, la disminución de los niveles séricos de ALT y GGT.

Los niveles séricos de GGT no han sido asociados a ninguna variante de *FFAR4*, siendo esta asociación novedosa para este gen. A pesar de que la principal protagonista del daño hepático es la ALT, junto con la AST, los niveles séricos de GGT podrían también aumentar levemente por los mismos procesos que elevarían los de ALT. De hecho, recientemente se ha asociado un aumento anormal de GGT en sangre durante períodos determinados a un incremento de la frecuencia de aparición de hígado graso (75).

Aunque somos conscientes de que el número de sujetos estudiados puede ser una limitación potencial por el hecho de que los resultados son más fiables a medida que aumenta el tamaño de la muestra, hemos establecido un umbral por debajo de la corrección de Bonferroni para 3 SNPs, utilizando la de 4 SNPs previamente establecida. Esto nos permitirá reducir las posibilidades de obtener falsos positivos.

También nos gustaría destacar el rigor aplicado en el reclutamiento de la cohorte analizada. El hecho de que el estudio esté realizado en niños, podría reducir las diferencias en gravedad y duración de la obesidad que están presentes en edades adultas y que podrían enmascarar los efectos fisiopatológicos del receptor FFAR4. Además, este enfoque nos permitió identificar más fácilmente los efectos de los marcadores genéticos frente a los de los factores ambientales experimentados durante la vida humana.

En resumen, pensamos que la presencia del alelo menor del polimorfismo rs11187533 C/T podría considerarse como un factor de riesgo de tener niveles más elevados de glucosa, ALT y GGT en sangre en poblaciones en edades pediátricas con obesidad variable. Los motivos por los cuales esta variante es capaz de producir estos efectos son de momento desconocidos, pero podemos citar varias hipótesis:

- El alelo menor T de rs11187533 podría condicionar la regulación del gen *FFAR4* al afectar la transcripción o el empalme de exones ("splicing"). El análisis "in silico" realizado para el SNP rs11187533 en <https://www.snp-nexus.com>.

org/index.htm no reveló ningún elemento regulatorio sobre el que pudiera afecta a la expresión de *FFAR4*.

- Alternativamente, podría estar estrechamente ligado a otras variantes próximas a este y que fueran las verdaderas protagonistas de los efectos observados en este estudio. Debido a su posición dentro del intrón 2 (637 pb del exón 3), lo más probable es que estas variantes se situaran próximas a la región de empalme del exón 3 o en la región 3'UTR.

Por todo ello, se llevaron a cabo 2 estudios más para completar y determinar el efecto de rs11187533 sobre la expresión de *FFAR4* y su posible ligamiento a otras variantes próximas a este SNP. Por una parte, se aprovechó el estudio de asociación de la expresión de *FFAR4* con la obesidad y sus comorbilidades para analizar la media de expresión del gen de cada uno de los genotipos de este SNP. Por otra parte, se realizó una secuenciación de la región aguas abajo del SNP rs11187533 de individuos candidatos, en busca de variantes fuertemente ligadas a este que pudiesen producir los efectos vistos en este análisis.

6.2. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE FFAR4

Se observó que la expresión de ARNm de *FFAR4* disminuye en niños con obesidad en comparación con niños con peso normal. De los 38 niños estudiados, 29 niños (76,32%) presentaron una expresión menor que el pool de referencia (niños con normopeso) y solo 9 niños (23,68%) presentaron una expresión mayor que pool de referencia ($P=0,001$) (Figura 9).

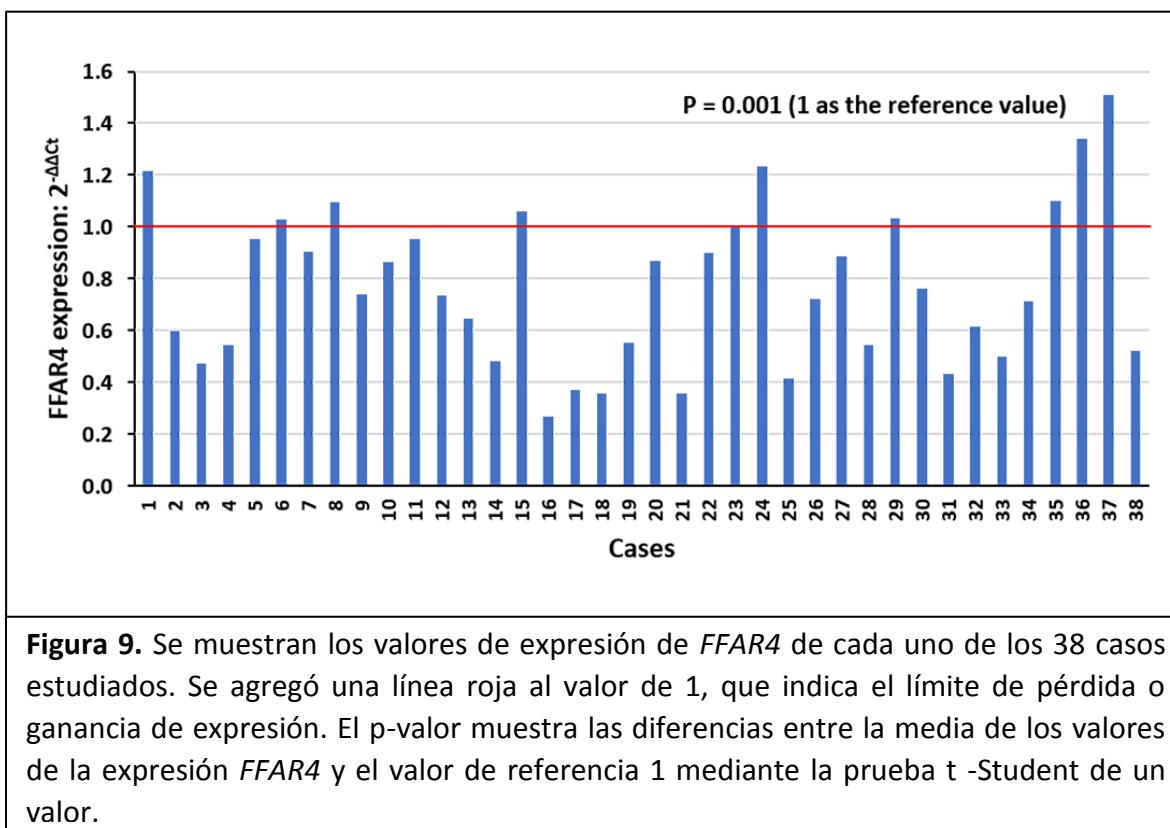
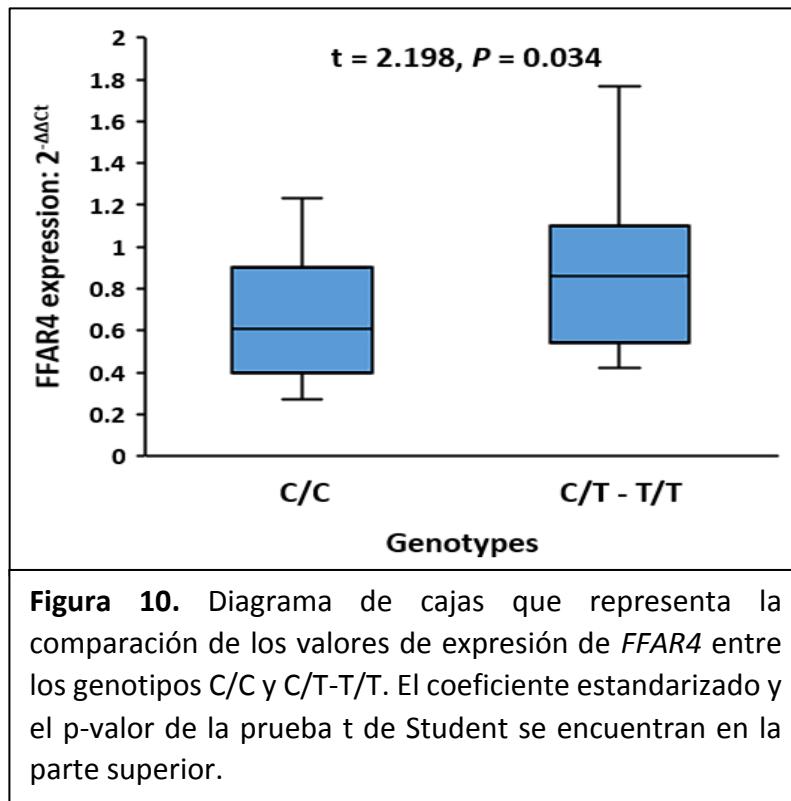


Figura 9. Se muestran los valores de expresión de *FFAR4* de cada uno de los 38 casos estudiados. Se agregó una línea roja al valor de 1, que indica el límite de pérdida o ganancia de expresión. El p-valor muestra las diferencias entre la media de los valores de la expresión *FFAR4* y el valor de referencia 1 mediante la prueba t -Student de un valor.

En cuanto a la evaluación de los niveles de expresión de *FFAR4* de los genotipos del SNP rs11187533, los niños con genotipo C/C ($N=17$) presentaron una media de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de 0,661, mientras que los niños con genotipos C/T-T/T ($N=21$) presentaron una media de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de 0,860. Utilizando la prueba t-Student se observó una diferencia significativa ($P=0,044$) entre los dos grupos (Figura 10), lo que sugiere que la presencia del alelo minoritario T del SNP rs11187533, además de estar asociada a una menor gravedad de las comorbilidades de la obesidad, podría implicar una mayor expresión de *FFAR4*.



El análisis de las correlaciones entre los valores de expresión de *FFAR4* y los parámetros asociados a comorbilidades de la obesidad mostró correlaciones significativas fuertes e inversas con los valores de insulina ($r=-0,43$, $P=0,008$) y de HOMA-IR ($r=-0,40$, $P=0,012$) (Figura 11).

Además, se observó una correlación significativa de menos fuerza e inversa entre la expresión de *FFAR4* y los valores de ALT ($r=-0,32$, $P=0,048$). Otros parámetros como IMC z-score, glucosa, colesterol, triglicéridos, AST, GGT y hsCRP no mostraron ninguna correlación significativa.

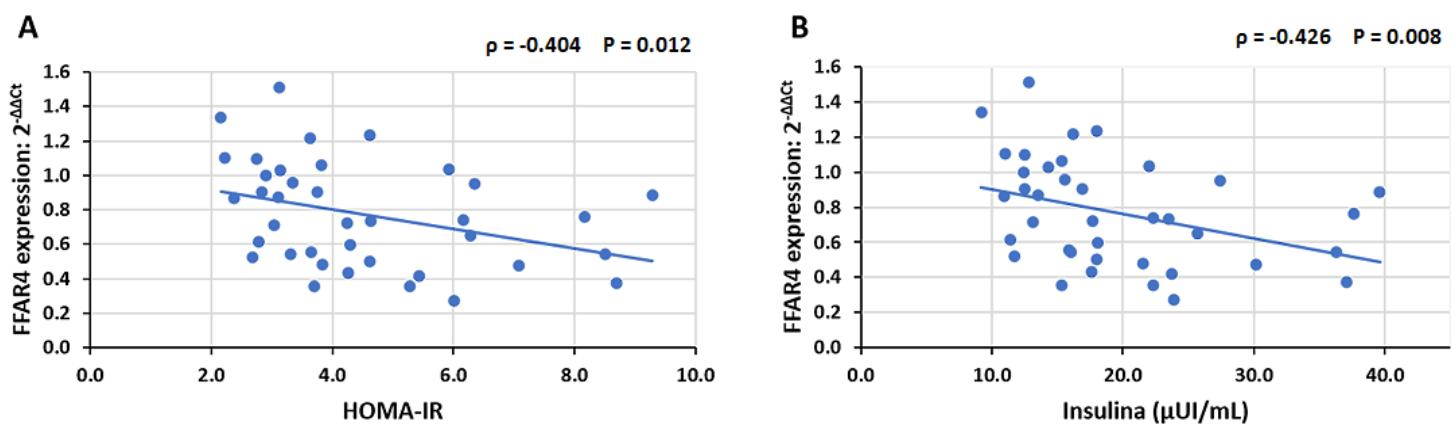
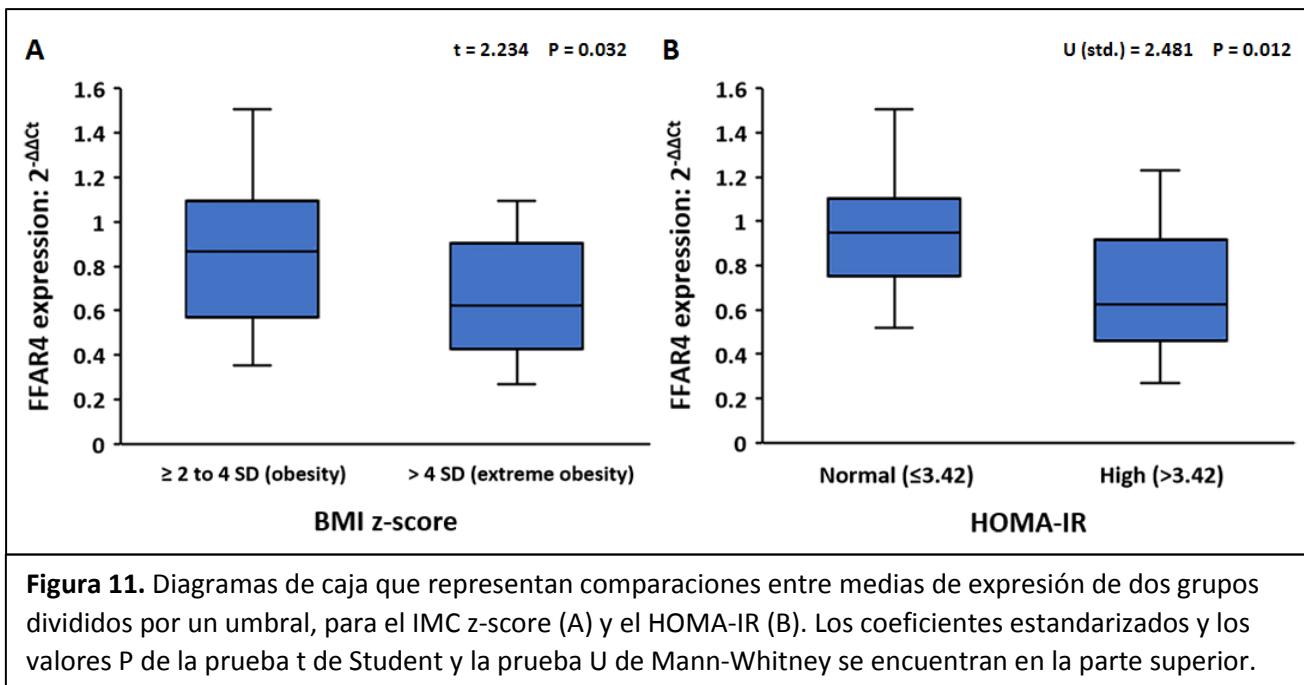


Figura 11. Gráficos de dispersión y línea de tendencia de las correlaciones entre la expresión de *FFAR4* y la resistencia a la insulina (HOMA-IR) (A) e insulina (B). Los coeficientes de Spearman (ρ) y sus valores P se adjuntan en la parte superior derecha.

También realizamos el análisis comparativo de expresión de *FFAR4* para la obesidad y la resistencia a insulina utilizando variables dicotómicas. Encontramos que los niños con valores de IMC z-score mayores a 4 DE ($N=18$) presentaron una media de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de 0,661 ($DE=0,255$), mientras que los niños con valores entre dos y cuatro DE ($N=20$) presentaron una media de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ media de 0,871 ($DE=0,317$). Así, se observó una diferencia significativa entre los dos grupos ($P=0,032$) (Figura 11). Por tanto, los niños con obesidad extrema mostraron valores significativamente más bajos de expresión de *FFAR4*.

Con respecto a los valores de HOMA-IR, 24 niños tenían valores por encima del valor umbral establecido (3,42) y 14 niños tenían valores de HOMA-IR por debajo del valor umbral. Los niños con niveles altos de HOMA-IR presentaron una media de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de 0,677 ($DE=0,280$), mientras que en los niños con niveles normales de HOMA-IR la media de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ fue de 0,933 ($DE=0,284$). Se observó una diferencia significativa entre los dos grupos (Figura 11). Los valores más bajos de expresión de *FFAR4* estuvieron presentes en niños con valores patológicos de HOMA-IR ($P=0,012$).



El estudio de la expresión de *FFAR4* en niños con obesidad muestra lo siguiente: 1) el alelo menor del SNP rs11187533 se asoció con una mayor expresión de *FFAR4* en una población de niños obesos; 2) encontramos una pérdida de expresión asociada con la obesidad de estos niños, especialmente con la obesidad extrema; y 3) se observaron valores de expresión más bajos de *FFAR4* en los niños con valores más altos de HOMA-IR encontrando también una correlación negativa entre ellos.

Previamente, vimos que los genotipos C/T-T/T del SNP rs11187533 estaban asociados con niveles más bajos de glucosa y con marcadores de daño hepático. Esto demuestra que la presencia del alelo T en una población infantil con diferentes grados de obesidad supondría un menor riesgo poblacional de tener valores elevados de estos parámetros. Ahora, se evidencia que los individuos con genotipos C/T-T/T de este SNP de *FFAR4* tienen un nivel medio de expresión del mismo gen significativamente mayor que el genotipo C/C, vinculando los valores de expresión al fenotipo asociado al SNP.

Si pensamos en el SNP rs11187533 como actor principal por sus asociaciones con glucosa, ALT y GGT en niños con obesidad y por su relación con los niveles de expresión de *FFAR4*, se podría pensar en algún tipo de regulación en el proceso de empalme del último exón. Por otra parte, y como se ha comentado también en el apartado anterior, si el SNP

rs11187533 estuviera fuertemente ligado a alguna o algunas variantes en regiones próximas aguas abajo como el exón 3 o la región 3'UTR, estas podrían producir indirectamente los efectos que estamos viendo.

Es bien conocido que variantes en la región 3'UTR pueden causar los efectos que hemos visto y existen numerosos estudios que describen cómo la presencia de variantes en esta región puede conducir a la alteración de la expresión del gen donde se encuentran (76) y la consecuente modulación del fenotipo que estos genes controlan, en nuestro caso, la obesidad y sus comorbilidades (77). En la tercera parte de tesis, se ha realizado una secuenciación de esta región corriente abajo para buscar variantes fuertemente ligadas a este SNP y que puedan influir en el fenotipo de estos niños con obesidad y en los niveles de expresión de *FFAR4* encontrados.

Hemos demostrado que la mayoría de los niños con obesidad incluidos en el estudio (76%) presentaban una reducción en la expresión de *FFAR4* y que los valores más bajos se encuentran en los individuos con obesidad extrema. Estos resultados confirmarían lo expuesto en la bibliografía previa, donde se ha documentado la asociación de la infraexpresión de *FFAR4* en sangre con la obesidad (63,64).

Gozal *et al.* demostró una correlación significativa negativa entre los niveles de FFAR4 y el IMC z-score (63). En este estudio, fueron estudiados 226 niños a los que se les extrajo sangre en ayunas para cuantificar los niveles de expresión de ARNm de *FFAR4* en monocitos y los niveles de la proteína FFAR4 en sangre. A pesar de que encontraron una correlación significativa entre el IMC z-score y los niveles proteicos de FFAR4 en sangre, la asociación de este mismo parámetro con los niveles de expresión de *FFAR4* por ARNm no están claros, encontrando solo una tendencia a la bajada de expresión de *FFAR4* en obesos. Por el contrario, si se obtuvieron valores estadísticamente significativos con el ARNm de *FFAR4* cuando se compararon los niños que padecían apnea obstructiva nocturna y los que no la padecían.

Existe otro estudio íntimamente relacionado al nuestro, donde sí se encontró una asociación significativa inversa entre la expresión de ARNm de *FFAR4* (en tejido adiposo visceral y en células mononucleares de sangre periférica humana) y la obesidad, principalmente en la obesidad extrema (64). En este trabajo se analizaron las diferencias de

expresión de ARNm de *FFAR4* entre un grupo de 13 adultos no obesos y 33 adultos con obesidad mórbida. Se encontró una infraexpresión de *FFAR4* en células mononucleares sanguíneas de los individuos con obesidad mórbida. Esta infraexpresión se vio todavía más acusada cuando se sometieron a los dos grupos de estudio a una comida rica en grasas 3 horas antes de la medición. En este estudio, al igual que en el nuestro, se pone de manifiesto la incapacidad para mantener una expresión de *FFAR4* basal adecuada cuando los individuos tienen niveles de obesidad extrema.

Los mecanismos por los que una infraexpresión generalizada (si se diera el caso) de *FFAR4* se relaciona con el aumento de peso no son bien conocidos, aunque existen diferentes razones propuestas. Cabe destacar también que todos los resultados evidenciados en este tipo de correlaciones podrían darse en cualquiera de las dos direcciones, es decir, que la infraexpresión de *FFAR4* aumente los niveles de obesidad en estos individuos o que la obesidad esté afectando de una manera u otra a la expresión de *FFAR4*. Además, cabe la posibilidad de que una variable afecte a la otra y viceversa, elevándose recíprocamente durante un tiempo prolongado. Esta incertidumbre se aplicará también al resto de variables estudiadas.

Si nos centramos en la infraexpresión de *FFAR4* como protagonista del aumento de la obesidad podemos pensar que los efectos observados se deben a la desregulación del gasto energético que ya se demostró en ratones deficientes en *FFAR4* (10). Hay que tener en cuenta la multitud de hormonas relacionadas con el metabolismo que controla FFAR4, sobre todo las que controlan el balance de glucosa en sangre. También es importante el papel de FFAR4 en el tejido adiposo donde expresado en la superficie de adipocitos indiferenciados, es capaz de responder a sus ligados promoviendo la mitosis y la adipogénesis (47).

Otra posible explicación sería la relacionada a un control deficiente del apetito, ya que *FFAR4* posee un nivel de expresión elevado en el núcleo arqueado del hipotálamo y media en los efectos de los ácidos grasos en la inhibición del apetito (78).

En cuanto a la relación entre el gen *FFAR4* y las comorbilidades relacionadas con la obesidad, encontramos una asociación entre la expresión de *FFAR4* y los niveles de insulina y de HOMA-IR. Los efectos sobre la función sensibilizadora de la insulina de *FFAR4* están mediados principalmente por los macrófagos (11,15,16). La activación de *FFAR4* por sus

ligandos en la superficie de los macrófagos puede mantener un estado de sensibilidad a la insulina in vivo a través de la supresión de la inflamación tisular. El FFAR4 activado es capaz de bloquear la vía de inflamación del factor nuclear kappa-B (11,15,16). Si esta vía de señalización inflamatoria no se bloquea adecuadamente, se produce un aumento de la liberación de citoquinas inflamatorias que puede producir un aumento de la resistencia a insulina en el tejido colindante.

Por otro lado, se ha demostrado que la activación de *FFAR4* también inhibe la inducción de ciclooxygenasa-2, aumentando la liberación de prostaglandina E y la producción de interleucina-6 (79). De un modo similar, se ha descubierto recientemente que *FFAR4* también regula el balance de las oxilipinas, implicadas también en la inflamación generalizada, la insuficiencia cardiaca y el síndrome metabólico (80).

Todas estas citoquinas reducen la expresión de los genes del receptor de insulina y reducen la activación de la proteína quinasa B en sus tejidos diana. Ambos procesos disminuyen la translocación del receptor de insulina y la expresión de GLUT4, lo que conduce a la resistencia a la insulina (11,15,16). Además, es bien conocido que la activación y posterior migración de los macrófagos al páncreas podría modular la producción de insulina mediante la liberación de citoquinas inflamatorias en los islotes de Langerhans (81,82). Esto produciría un aumento en la liberación de insulina y, por lo tanto, hiperinsulinismo (83).

Por todo lo expuesto, una correlación significativa inversa entre la expresión de *FFAR4* en células nucleares sanguíneas (principalmente monocitos, que es donde se expresa de forma elevada) y los valores de HOMA-IR sería una asociación que iría en consonancia con la bibliografía previa, donde se exponen además varias vías para la posible relación de *FFAR4* con la resistencia a insulina. Al contrario que con la obesidad, en este caso sí que podríamos exponer la hipótesis de que es la bajada de expresión de *FFAR4* en estos monocitos, los cuales posteriormente se transformarán en macrófagos, la que produce un aumento de la HOMA-IR.

El artículo de Gozal *et al.*, ya comentado para la asociación de expresión de FFAR4 con la obesidad, también contiene un análisis de correlación entre los niveles totales de proteína FFAR4 en sangre y los valores de HOMA-IR de estos individuos. Al igual que en nuestro estudio, obtuvieron una correlación negativa significativa entre estos dos parámetros.

También encontramos una asociación de menor fuerza entre los valores de ALT, indicativo de daño hepático, y la expresión de *FFAR4*, la cual va en consonancia con la bibliografía previa al respecto. La relación entre las alteraciones en la función del receptor FFAR4 y la enfermedad del hígado graso han sido previamente demostradas en niños con obesidad (13). Se ha documentado una mejora significativa en los valores de ALT en sangre después de la suplementación de estos individuos con omega-3 en la enfermedad del HGNA (84). Además, se ha visto recientemente que estos efectos beneficiosos de los omega-3 se producen vía FFAR4 en los adipocitos, disminuyendo la inflamación de estos últimos (85).

Por otro lado, en estudios con animales de experimentación, se vio que la suplementación con omega-3 disminuía los valores de ALT en sangre de ratones de tipo salvaje, pero no en ratones *knock-out* para *FFAR4* (12).

Se deben abordar varias limitaciones para evaluar la importancia potencial de nuestros hallazgos. En el presente estudio, el número de sujetos estudiados fue limitado, pero las condiciones fueron estrictamente controladas. Además, todos los niños siguieron el mismo horario de la cena anterior y consumieron el mismo tipo de alimentos. Esta observación es importante porque se sabe que este gen puede verse muy afectado por el tiempo transcurrido desde la ingesta y el tipo de alimentación (64).

Encontramos una relación entre la disminución de la expresión del ARNm de *FFAR4*, la obesidad y sus comorbilidades, aunque en esta relación, como ya se ha comentado, no sabemos quién está modulando al otro, es decir, podría ir en cualquier dirección e incluso las dos a la vez, modulándose recíprocamente. Los argumentos que definen a la infraexpresión de *FFAR4* como protagonista de la modulación de los parámetros estudiados ya han sido expuestas a lo largo de la discusión. Sin embargo, no se han comentado los posibles mecanismos por los que un estado de sobrepeso u obesidad (con sus respectivas comorbilidades) durante un tiempo prolongado podría alterar de manera definitiva o transitoria la expresión de *FFAR4*. Estos procesos son llevados a cabo mediante modificaciones epigenéticas que son capaces de modular la expresión de los genes como la metilación de ADN, la modificación de histonas, las alteraciones de la estructura de la cromatina y las diferentes funciones de los ARNs no codificantes como los microARNs. Existen multitud de trabajos que nos hablan de las reprogramaciones epigenéticas

producidas desórdenes metabólicos como la obesidad y sus comorbilidades, a corto o a largo plazo (86). Esta modulación puede implicar a genes directamente relacionados con el metabolismo (sobre todo los genes que controlan la función endocrina), pero también a otros genes que no lo están, como los que controlan el sistema inmunológico (87).

6.3. ESTUDIO DE SECUENCIACIÓN DEL GEN FFAR4

Los dos amplicones de cada uno de los 10 individuos del estudio se secuenciaron con éxito y la calidad de las secuencias fue lo suficientemente buena para poder leer correctamente las secuencias seleccionadas.

Además del SNP rs11187533 C/T (SNP de referencia), se encontraron variaciones genéticas en 11 SNP descritos previamente (rs11187534 G/A, rs12241416 G/A, rs60239627 G/A, rs17108968 G/A, rs11187535 G/T, rs11187536 G/T, rs11187537 G/C, rs61254968 C/T, rs11187538 C/G, rs11187539 G/A, rs41290218 C/A). Diez de ellos estaban ubicados en el último intrón del gen FFAR4 y uno en la región 3'UTR (rs41290218 C/A). No se encontraron variantes en el exón 3. Tampoco se encontraron inserciones ni delecciones (Tabla 3).

Tabla 3. Genotipado de los SNPs encontrados por secuenciación aguas abajo del SNP rs11187533 C/T.												
Casos	rs11187533 C/T	rs11187534 G/A	rs12241416 G/A	rs60239627 G/A	rs17108968 G/A	rs11187535 G/T	rs11187536 G/T	rs11187537 G/C	rs61254968 C/T	rs11187538 C/G	rs11187539 G/A	rs41290218 C/A
1	C/C	G/G	C/C	C/C	G/G	C/C						
2	C/C	G/G	C/C	C/C	G/G	C/C						
3	C/C	G/G	C/C	C/G	G/G	C/C						
4	C/C	G/A	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	C/C	C/G	G/A	C/C
5	C/C	G/G	C/C	C/C	G/G	C/C						
6	C/T	G/A	G/A	G/G	G/G	G/T	G/T	G/C	C/C	G/G	A/A	C/A
7	C/T	G/G	G/A	G/A	G/A	G/T	G/T	G/C	C/T	C/G	G/A	C/C
8	C/T	G/G	G/A	G/G	G/G	G/T	G/T	G/C	C/C	C/G	G/A	C/A
9	C/T	G/G	G/A	G/G	G/G	G/T	G/T	G/C	C/C	C/G	G/A	C/A
10	C/T	G/G	G/A	G/G	G/G	G/T	G/T	G/C	C/C	C/G	G/A	C/A

El SNP rs11187533 apareció fuertemente ligado a los SNPs rs12241416 G/A, rs17108968 G/A, rs11187535 G/T, rs11187536 G/T y rs11187537 G/C (Tabla 4). Cuando el SNP rs11187533 se presenta como homocigoto C/C estos 4 SNPs aguas abajo se presentan mayoritariamente como homocigotos G/G y cuando el SNP rs11187533 se presenta como heterocigoto C/T los otros cuatro SNPs se presentan mayoritariamente como heterocigotos G/A, G/T y G/C. Este hecho nos reveló la presencia de dos haplotipos con una fuerte presencia de ligamiento entre estos 5 SNPs: el haplotipo más frecuente C-G-G-G-G y el menos frecuente T-A-T-T-C (Tablas 3, Tabla 4).

Tabla 4. Desequilibrio de ligamiento entre el SNP rs11187533 y los otros 11 SNP identificados. Se utilizó la herramienta online SNP Stats.

	rs11187534 G/A	rs12241416 G/A	rs60239627 G/A	rs17108968 G/A	rs11187535 G/T	rs11187536 G/T	rs11187537 G/C	rs61254968 C/T	rs11187538 C/G	rs11187539 G/A	rs41290218 C/A
rs11187533 C/T	D = 0	D = 0.1874	D = 0.0374	D = 0.0374	D = 0.1874	D = 0.1874	D = 0.1874	D = 0.0374	D = 0.1499	D = 0.1624	D = 0.15
	D' = 0	D' = 0.9996	D' = 0.9985	D' = 0.9985	D' = 0.9996	D' = 0.9996	D' = 0.9996	D' = 0.9985	D' = 0.9995	D' = 0.9996	D' = 0.9997
	r = 0	r = 0.9996	r = 0.3968	r = 0.3968	r = 0.9996	r = 0.9996	r = 0.9996	r = 0.3968	r = 0.7068	r = 0.7865	r = 0.8657
	valor P = 1	valor P = 0	valor P = 0.076	valor P = 0.076	valor P = 0	valor P = 0	valor P = 0	valor P = 0.076	valor P = 0.0016	valor P = 0.0004	valor P = 0.0001

Además, el SNP rs11187533 aparecía ligado con menos fuerza a los SNPs rs11187538 C/G, rs11187539 G/A y rs41290218 C/A. El más ligado a rs11187533 de estos 3 SNPs fue rs41290218, que solo mostró discordancia en 1 caso de los 10 casos que teníamos y que muestra una correlación de r=0,8657 (Tabla 4, Tabla 5).

En cuanto a los datos de ligamiento entre SNPs almacenados en bases de datos, se realizó un análisis de la región entre el SNP rs11187533 y el SNP rs41290218 del gen *FFAR4* (localización: 10:93586500-93587839), utilizando para ello la herramienta on-line de la web de Ensembl (https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/LD). Se utilizaron los datos de poblaciones ibéricas de Super-Population, 1000 GENOMES, Phase 3, EUROPE; que contienen datos de genotipado de 503 individuos (Figura 12).

En la figura 12 se pueden ver los SNPs comunes en esta población, los cuales coinciden al 100% con los SNPs identificados en la secuenciación realizada. Siguiendo hacia abajo se puede seguir la marca del SNP hasta el mapa de calor que indica los niveles de ligamiento entre los SNPs analizados. En este tipo de gráfico, un color más rojizo entre cada uno de los puntos de corte entre los SNPs indica un valor de r más elevado y, por tanto, un mayor ligamiento entre ellos. Se puede ver como desde el SNP rs11187533 se extiende una franja rojiza en diagonal que abarca a la mayoría de SNPs, los cuales están ligados a este con altos valores de r ($r>0,8$). Los 3 SNPs que en nuestro estudio tienen valores más bajos de ligamiento coinciden con las 2 partes más claras de esta franja rojiza, indicando un valor menor de ligamiento (Figura 12).

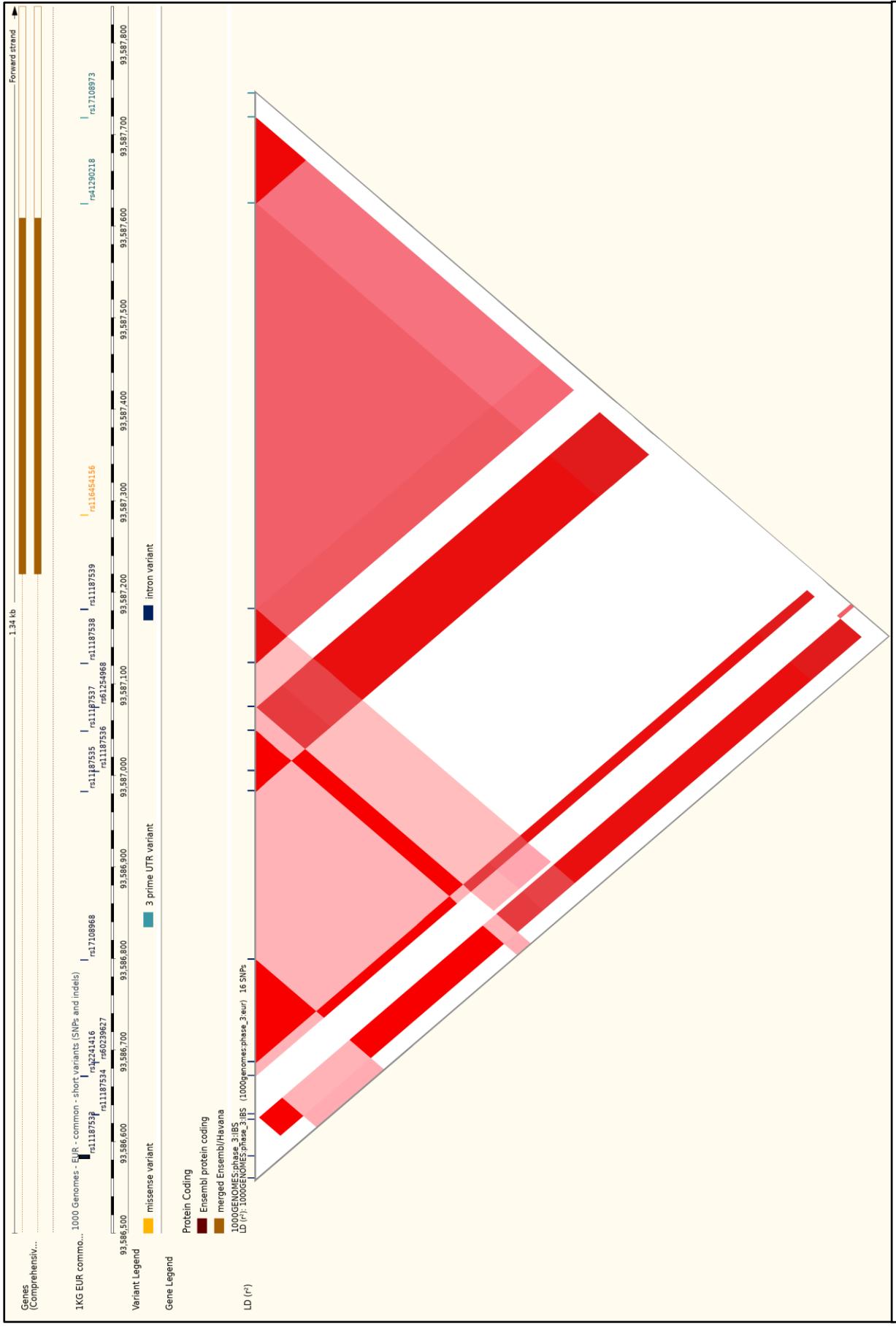


Figura 12. Análisis de ligamiento de la región comprendida entre el SNP rs11187533 y el SNP rs41290218 del gen *FFAR4* (localización: 10:93586500-93587839). Datos obtenidos de la herramienta on-line de Ensembl. Población ibérica con 503 individuos de Super-Population, 1000 GENOMES, Phase 3, EUROPE.

La presencia de un haplotipo estable entre el SNP rs11187533 y los 4 SNPs que hemos visto podría indicar que los efectos sobre el fenotipo que observamos previamente asociados al SNP rs11187533 podrían provenir de cualquiera de estos. Además, los otros 3 SNPs vinculados con menor fuerza podrían estar influyendo también en el fenotipo final, especialmente, el rs41290218 que obtuvo el valor más alto de ligamiento de los 3 (Tabla 4) y, además, se localiza en una región reguladora (3'UTR). Cabe destacar que otros SNPs no localizados en este análisis, tanto aguas arriba como abajo de la región que hemos secuenciado, podrían estar afectando también al fenotipo final.

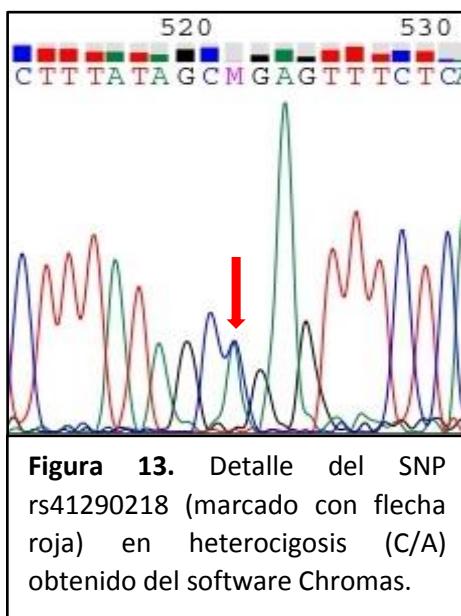
En un estudio reciente de SNPs del gen *FFAR4* (59), uno de los SNPs que componen el haplotipo más estable descrito (4 SNPs), el rs11187537, se asoció con niveles altos de insulina en ayunas (valor P=0,003) y el HOMA-IR (valor P=0,01) en un análisis de asociación genética con la interacción de una dieta específica. Cuando analizaron los efectos de este SNP a nivel molecular vieron que podría crear un sitio aceptor para un empalme alternativo (*alternative splicing*), pero los ensayos *in silico* predijeron que el impacto de los alelos de este SNP sobre el *splicing* del exón 3 eran modestos. También analizaron el SNP rs11187534, pero no demostraron ninguna interacción gen-dieta.

Vamos a centrarnos en el SNP rs41290218 (Figura 13) que, como ya se ha comentado, es el SNP con mayor valor de ligamiento al SNP rs11187533 de los 3 SNPs ligados con menos fuerza, y además está localizado en la región regulatoria 3'UTR del gen *FFAR4*. El valor de ligamiento r entre rs11187533 y rs41290218 obtenido en nuestro estudio de secuenciación con 10 individuos (0,8657) es más bajo que el obtenido en la base de datos del Ensembl visto anteriormente (0,9132). Al proceder este último dato de un análisis con un tamaño poblacional mayor, es muy probable que el valor de ligamiento r sea más fiable. Exactamente, rs11187533 está ubicada a 15 pb aguas abajo del comienzo de la región reguladora 3'UTR, muy próximo, por tanto, al final del exón 3. Esta variante no está reportada en la base de datos de ClinVar y no se ha encontrado ninguna publicación relacionada con ella.

El software en línea de mirdb.org predice la localización de una diana de un microARN justo sobre el SNP rs41290218 (5'-agc[c]gag-3'). Se trata del micro-ARN hsa-miR-4638-5p (5'-acuc[g]gcugcgguggacaagu-3'), el cual es el tercer microARN con mejor puntuación diana

que predice mirDB para el gen *FFAR4*. Además, esta diana en *FFAR4* es la cuarta en importancia que predice este software para este micro-ARN.

Como es bien sabido, los microARNs reducen la expresión de un gen al inhibir la traducción de este y reducir el número de copias de ARNm disponibles (88). Los polimorfismos en las dianas de estos microARNs pueden modificar la regulación sobre estos genes diana causando sobreexpresión o infraexpresión (89). Además, se ha demostrado que estos polimorfismos en estas dianas pueden causar enfermedad o empeorarla. Esto sería muy importante en la desregulación de los oncogenes donde una mutación en el microARN o en su diana podría causar una sobreexpresión del oncogén, produciendo la proliferación descontrolada del tejido donde se exprese (90).



El hecho de que exista una variante genética en la diana de *FFAR4* para el microARN hsa-miR-4638-5p como en este caso, con un cambio de G por A, dificultaría la unión de este micro-ARN a su diana, y por tanto, la inhibición que hace sobre la traducción de *FFAR4* podría verse reducida. De esta manera, se podría explicar cómo una variante en la diana del micro-ARN podría aumentar ligeramente la expresión de *FFAR4*, y en consecuencia aumentar su función y el impacto sobre el fenotipo al que se asocia.

Son numerosos los estudios que definen este tipo de variantes sobre dianas de microARNs. Recientemente, se ha publicado un estudio que asocia la variante rs1046322, situada en la región 3'UTR del gen la wolframina (*WFS1*) con la obesidad (91). Se trata de una proteína transmembrana del retículo endoplasmático que se expresa en diferentes tejidos (como cerebral y pancreático) y cuya función exacta todavía no está del todo clara. La ausencia total o parcial de esta proteína puede conllevar trastornos neurodegenerativos, diabetes u obesidad. Esta variante dificulta la unión del microARN-668 a esta región y, por tanto, dificulta la inhibición de la traducción del gen *WFS1*.

Si tenemos en cuenta que el cambio de G por A en el SNP rs41290218 aparece ligado con una frecuencia elevada al cambio de C por T de rs11187533, podríamos predecir que los cambios de expresión y fenotípicos que se pudieran producir con la presencia de la A en la primera variante se producirían con mucha frecuencia con la presencia de T en la segunda. Es decir, que los efectos observables podrían ser similares en cualquiera de las dos variantes.

En resumen, rs41290218 podría estar afectando o provocando, en gran parte, de los efectos observados para rs11187533, teniendo, en este caso, una explicación molecular concreta que los respalde. La variante rs11187537 podría estar colaborando también, con su posible efecto sobre el empalme de exones (59), produciendo un efecto sumatorio. A pesar de ello, pensamos que la asociación observada en rs11187537 podría ser debida al SNP rs41290218, ya que en poblaciones ibéricas (datos de Ensembl) tienen entre ellas el mismo valor de ligamiento r que rs11187533 y rs41290218 (0,9132).

Solo se ha documentado un trabajo que relacione el gen *FFAR4* con microARNs (92). Este estudio se centra en la regulación de *FFAR4* sobre la termogénesis del tejido adiposo marrón, mediante la regulación positiva de diversos microARNs. No habla en ningún caso de las posibles dianas para microARNs sobre la secuencia de *FFAR4*.

7. CONCLUSIONES FINALES

Este estudio confirmaría la importancia que tiene el gen *FFAR4* en la obesidad y sus patologías asociadas, ya descritas previamente en numerosos trabajos. La capacidad de entender por completo cómo funciona el receptor FFAR4, qué niveles de expresión presenta en diferentes ambientes, cuáles son sus variantes deletéreas o cuáles son sus agonistas más selectivos, nos permitirá en un futuro comprender mejor el proceso de transición obesidad-comorbilidades y nos podría facilitar el tratamiento de los individuos con obesidad.

Parte de estos hallazgos (estudio de SNPs y estudio de la expresión) han sido publicados ya en dos artículos en dos revistas distintas por el mismo autor principal de esta tesis doctoral (93,94). Estos artículos se adjuntan en los Anexos de esta tesis.

- Conclusión 1:**

Hemos demostrado que el alelo menor T del SNP rs11187533 está asociado a niveles más bajos de glucosa ALT y GGT. Por ello, poseer este alelo podría atenuar las consecuencias metabólicas que acompañan a la obesidad y podría ayudar a completar, junto a otras variantes de otros genes, la identificación de individuos obesos metabólicamente sanos a edades tempranas. Encontramos una asociación significativa entre los niveles de expresión de los genotipos del SNP rs11187533 de *FFAR4*. El genotipo C/C presentó significativamente menos expresión de FFAR4 que los genotipos C/T-T/T. Por tanto, los efectos del SNP rs11187533 en las comorbilidades de la obesidad podrían estar relacionados con la expresión insuficiente del gen *FFAR4* asociado con el alelo mayor C.

- Conclusión 2:**

Hemos observado que la obesidad extrema en los niños se asocia con una expresión insuficiente de *FFAR4*. Además, encontramos una correlación negativa significativa entre los niveles de expresión de *FFAR4* y los niveles de insulina y HOMA-IR. Esto sería una prueba directa de la relación recíproca entre la regulación

del gen *FFAR4* y las comorbilidades de la obesidad. Creemos que estos resultados son importantes para la evaluación temprana de la obesidad en niños y nos ofrecen más información sobre cómo se comporta este gen en niños con obesidad.

- **Conclusión 3:**

Encontramos una asociación significativa entre los niveles de expresión de los genotipos del SNP rs11187533 de *FFAR4*. El genotipo C/C presentó significativamente menos expresión de *FFAR4* que los genotipos C/T-T/T. Por tanto, los efectos del SNP rs11187533 en las comorbilidades de la obesidad podrían estar relacionados con la expresión insuficiente del gen *FFAR4* asociado con el alelo mayor C.

- **Conclusión 4:**

Por último, hemos identificado un haplotipo bastante frecuente en nuestra población de estudio, asociado al SNP rs11187533 del gen *FFAR4*, que incluye 7 SNPs con un alto nivel de ligamiento aguas abajo del mismo gen. Esto demostraría que los hallazgos encontrados previamente para este SNP podrían deberse a cualquier SNP de este haplotipo. Uno de estos SNPs, rs41290218, es una diana muy probable para el micro-ARN hsa-miR-4638-5p. Otro de ellos, el rs11187537, más ligado aún que el anterior, podría tener un efecto relativo sobre el empalme de exones y producir un efecto sumatorio. Los procesos regulatorios a nivel molecular de estos dos SNPs podrían explicar la regulación positiva asociada con el alelo menos frecuente de SNP rs11187533 y la asociación con diferentes fenotipos en población infantil con obesidad.

RESUMEN CONCLUSIONES

- El alelo T del SNP rs11187533 de *FFAR4* está asociado a niveles más bajos de glucosa, ALT y GGT.
- La obesidad extrema en los niños se asocia con una baja expresión de *FFAR4* y existe una correlación negativa significativa entre los niveles de expresión de *FFAR4* y los niveles de insulina y HOMA-IR.
- Los individuos con genotipo C/C para rs11187533 presentan significativamente menos expresión de *FFAR4* que los genotipos C/T-T/T.
- El SNP rs11187533 se presenta fuertemente ligado a 7 SNPs más aguas abajo de este, dos de los cuales (rs41290218 y rs11187537) presentan ciertas características que los hace candidatos a producir los efectos observados en este SNP.

8. DESARROLLO FUTURO DEL TEMA TRATADO

Actualmente, siguen apareciendo numerosos estudios que buscan posibles relaciones entre las funciones fisiológicas del receptor celular FFAR4 y multitud de patologías de carácter metabólico. Son de especial relevancia los trabajos que se centran en la búsqueda de agonistas de FFAR4 para su posterior uso en el tratamiento de patologías de carácter metabólico como la Diabetes Mellitus Tipo II (95) o patologías de carácter inflamatorio como la enfermedad inflamatoria intestinal (96,97). Los agonistas derivados de la molécula TUG-891 han sido los más importantes en los últimos años, cultivos e in vitro, sobre todo en el tratamiento de la resistencia a insulina y la inflamación, así como en la DMII (98). Además, se están llevando a cabo también algunos ensayos clínicos como el ya completado con la molécula KDT501 (99).

Tanto los estudios de asociación de SNPs de *FFAR4* como sus niveles de expresión con diferentes patologías podrían ser útiles en un futuro próximo en este tipo de estudios nutrigenéticos, con el objetivo de realizar una suplementación más específica con omega-3 o agonistas selectivos como TUG-891. Para obtener un mayor rendimiento de los tratamientos en este tipo de estudios los individuos podrían ser agrupados por genotipos o niveles de expresión del gen *FFAR4* y, de esta manera, controlar mejor los efectos de la activación del mismo.

Para completar los análisis realizados en nuestro trabajo y avanzar en el conocimiento del gen *FFAR4* y su papel en los procesos relacionados con la obesidad, se podrían llevar a cabo diferentes tipos de estudios que se describirán a continuación.

Para ampliar el conocimiento de las variantes genéticas de *FFAR4*, sería interesante realizar otro estudio de SNPs con el rs11187533 y el rs41290218 junto con otros SNPs que no formaran parte de este bloque de ligación y combinarlo con una dieta específica suplementada con DHA. De esta manera, se podría valorar la modulación de estos SNPs sobre la activación directa del gen *FFAR4*. Sería interesante mantener las características de la población en los que se refiere a sus edades y grado de obesidad, pero aumentar el tamaño de la muestra.

Para analizar de manera más completa los niveles de expresión de cada uno de los alelos de los SNPs rs11187533 y el rs41290218, se podría realizar una prueba de funcionalidad en modelos celulares humanos (63). De esta manera, se realizarían clonaciones con construcciones de distintas combinaciones de alelos de estos dos SNPs y se mediría su expresión con la actividad de la luciferasa de las construcciones.

En cuanto al SNP rs41290218 como diana del hsa-miR-4638-5p, se podría realizar un ensayo de expresión similar al anterior, pero combinado con la presencia o ausencia del mismo microARN (100). Así, se podría comprobar si de verdad hay una inhibición real de la expresión de *FFAR4* y si esta inhibición se ve afectada por la presencia del alelo menor de este SNP, situado en su diana.

Si queremos seguir indagando en los niveles de expresión de *FFAR4* en niños con obesidad y su relación con las comorbilidades de esta obesidad, sería interesante ahora estudiar los niveles de expresión en otros tejidos donde se exprese en abundancia. Este tipo de estudios son difíciles de realizar en humanos ya que en muchos casos como el páncreas, el hipotálamo, el hígado o el tejido adiposo la posibilidad de obtener una muestra para su análisis es imposible en niños. En adultos, sería posible obtener muestras de tejido adiposo de las liposucciones, donde se ha demostrado un papel muy importante de *FFAR4* (101). Esto sería interesante ya que todos estos individuos tendrían obesidad extrema y ya hemos demostrado que, en estos casos, es cuando hay una infraexpresión más notoria. Por otra parte, y como es más común en la mayoría de la bibliografía, este tipo de estudios se llevan a cabo en modelos animales o cultivos celulares.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Estudio ALADINO 2019: Estudio sobre Alimentación, Actividad Física, Desarrollo Infantil y Obesidad en España 2019. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Ministerio de Consumo.
2. Bouchard C. Genetics of Obesity: What We Have Learned Over Decades of Research. *Obesity* (Silver Spring). 2021 May; 29(5):802-820.
3. Pérusse L, Jacob R, Drapeau V, Llewellyn C, Arsenault BJ, Bureau A, Labonté MÈ, Tremblay A, Vohl MC. Understanding Gene-Lifestyle Interaction in Obesity: The Role of Mediation versus Moderation. *Lifestyle Genom*. 2022; 15(2):67-76.
4. Blüher M. Metabolically Healthy Obesity. *Endocr Rev*. 2020 May 1; 41(3):bnaa004.
5. Iacobini C, Pugliese G, Blasetti Fantauzzi C, Federici M, Menini S. Metabolically healthy versus metabolically unhealthy obesity. *Metabolism*. 2019 Mar; 92:51-60.
6. Tsatsoulis A, Paschou SA. Metabolically Healthy Obesity: Criteria, Epidemiology, Controversies, and Consequences. *Curr Obes Rep*. 2020 Jun; 9(2):109-120.
7. Smith GI, Mittendorfer B, Klein S. Metabolically healthy obesity: facts and fantasies. *J Clin Invest*. 2019 Oct 1; 129(10):3978-3989.
8. Claussnitzer M, Susztak K. Gaining insight into metabolic diseases from human genetic discoveries. *Trends Genet*. 2021 Dec; 37(12):1081-1094.
9. Meigs JB. The Genetic Epidemiology of Type 2 Diabetes: Opportunities for Health Translation. *Curr Diab Rep*. 2019 Jul 22; 19(8):62.
10. Ichimura A, Hirasawa A, Poulain-Godefroy O, Bonnefond A, Hara T, Yengo L, Kimura I, Leloire A, Liu N, Iida K, Choquet H, Besnard P, Lecoeur C, Vivequin S, Ayukawa K,

- Takeuchi M, Ozawa K, Tauber M, Maffeis C, Morandi A, Buzzetti R, Elliott P, Pouta A, Jarvelin MR, Körner A, Kiess W, Pigeyre M, Caiazzo R, Van Hul W, Van Gaal L, Horber F, Balkau B, Lévy-Marchal C, Rouskas K, Kouvatsi A, Hebebrand J, Hinney A, Scherag A, Pattou F, Meyre D, Koshimizu TA, Wolowczuk I, Tsujimoto G, Froguel P. Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. *Nature*. 2012 Feb 19; 483(7389):350-4.
11. Zhang D, Leung PS. Potential roles of GPR120 and its agonists in the management of diabetes. *Drug Des Devel Ther*. 2014 Jul 29; 8:1013-27.
12. Nakamoto K, Shimada K, Harada S, Morimoto Y, Hirasawa A, Tokuyama S. DHA supplementation prevent the progression of NASH via GPR120 signaling. *Eur J Pharmacol*. 2018 Feb 5; 820:31-38.
13. Marzuillo P, Grandone A, Conte M, Capuano F, Cirillo G, Di Sessa A, Umano GR, Romano R, Perrone L, del Giudice EM. Novel association between a nonsynonymous variant (R270H) of the G-protein-coupled receptor 120 and liver injury in children and adolescents with obesity. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2014 Oct; 59(4):472-5.
14. Im DS. FFA4 (GPR120) as a fatty acid sensor involved in appetite control, insulin sensitivity and inflammation regulation. *Mol Aspects Med*. 2018 Dec; 64:92-108.
15. Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Immamura T, Morinaga H, Fan W, Li P, Lu WJ, Watkins SM, Olefsky JM. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell*. 2010 Sep 3; 142(5):687-98.
16. Oh DY, Walenta E, Akiyama TE, Lagakos WS, Lackey D, Pessentheiner AR, Sasik R, Hah N, Chi TJ, Cox JM, Powels MA, Di Salvo J, Sinz C, Watkins SM, Armando AM, Chung H, Evans RM, Quehenberger O, McNelis J, Bogner-Strauss JG, Olefsky JM. A Gpr120-selective agonist improves insulin resistance and chronic inflammation in obese mice. *Nat Med*. 2014 Aug; 20(8):942-7.

17. Schetz M, De Jong A, Deane AM, Druml W, Hemelaar P, Pelosi P, Pickkers P, Reintam-Blaser A, Roberts J, Sakr Y, Jaber S. Obesity in the critically ill: a narrative review. *Intensive Care Med.* 2019 Jun; 45(6):757-769.
18. Güngör NK. Overweight and obesity in children and adolescents. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2014 Sep; 6(3):129-43.
19. Tseng CH, Wu CY. The gut microbiome in obesity. *J Formos Med Assoc.* 2019 Mar; 118 Suppl 1:S3-S9.
20. Hoddy KK, Potts KS, Bazzano LA, Kirwan JP. Sleep Extension: A Potential Target for Obesity Treatment. *Curr Diab Rep.* 2020 Dec 4; 20(12):81.
21. Valaiyapathi B, Gower B, Ashraf AP. Pathophysiology of Type 2 Diabetes in Children and Adolescents. *Curr Diabetes Rev.* 2020; 16(3):220-229.
22. Staiano AE, Katzmarzyk PT. Ethnic and sex differences in body fat and visceral and subcutaneous adiposity in children and adolescents. *Int J Obes (Lond).* 2012 Oct; 36(10):1261-9.
23. Rochlani Y, Pothineni NV, Kovelamudi S, Mehta JL. Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2017 Aug; 11(8):215-225.
24. Powell-Wiley TM, Poirier P, Burke LE, Després JP, Gordon-Larsen P, Lavie CJ, Lear SA, Ndumele CE, Neeland IJ, Sanders P, St-Onge MP; American Heart Association Council on Lifestyle and Cardiometabolic Health; Council on Cardiovascular and Stroke Nursing; Council on Clinical Cardiology; Council on Epidemiology and Prevention; and Stroke Council. Obesity and Cardiovascular Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation.* 2021 May 25; 143(21):e984-e1010.

25. Maurice J, Manousou P. Non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Med (Lond)*. 2018 Jun; 18(3):245-250.
26. Romero-Corral A, Caples SM, Lopez-Jimenez F, Somers VK. Interactions between obesity and obstructive sleep apnea: implications for treatment. *Chest*. 2010 Mar; 137(3):711-9.
27. Chen HH, Tseng YJ, Wang SY, Tsai YS, Chang CS, Kuo TC, Yao WJ, Shieh CC, Wu CH, Kuo PH. The metabolome profiling and pathway analysis in metabolic healthy and abnormal obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2015 Aug; 39(8):1241-8.
28. Masih D, Tripathi JK, Rakhra G, Vats A, Verma SK, Jha PK, Sharma M, Ashraf MZ, Singh SN. Deciphering Biochemical and Molecular Signatures Associated with Obesity in Context of Metabolic Health. *Genes (Basel)*. 2021 Feb 19; 12(2):290.
29. Spoto B, Di Betta E, Pizzini P, Lonardi S, Mallamaci F, Tripepi G, Kanbay M, Cancarini G, Zoccali C. Inflammation biomarkers and inflammatory genes expression in metabolically healthy obese patients. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2023 Mar; 33(3):584-591.
30. Davenport CB. Body Build and its Inheritance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1923 Jul; 9(7):226-30.
31. Llewellyn CH, Trzaskowski M, Plomin R, Wardle J. Finding the missing heritability in pediatric obesity: the contribution of genome-wide complex trait analysis. *Int J Obes (Lond)*. 2013 Nov; 37(11):1506-9.
32. Farooqi S, O'Rahilly S. Genetics of obesity in humans. *Endocr Rev*. 2006 Dec; 27(7):710-18.
33. Saeed S, Bonnefond A, Manzoor J, Shabbir F, Ayesha H, Philippe J, Durand E, Crouch H, Sand O, Ali M, Butt T, Rathore AW, Falchi M, Arslan M, Froguel P. Genetic variants

- in LEP, LEPR, and MC4R explain 30% of severe obesity in children from a consanguineous population. *Obesity (Silver Spring)*. 2015 Aug; 23(8):1687-95.
34. Yupanqui-Lozno H, Bastarrachea RA, Yupanqui-Velazco ME, Alvarez-Jaramillo M, Medina-Méndez E, Giraldo-Peña AP, Arias-Serrano A, Torres-Forero C, Garcia-Ordoñez AM, Mastronardi CA, Restrepo CM, Rodriguez-Ayala E, Nava-Gonzalez EJ, Arcos-Burgos M, Kent JW Jr, Cole SA, Licinio J, Celis-Regalado LG. Congenital Leptin Deficiency and Leptin Gene Missense Mutation Found in Two Colombian Sisters with Severe Obesity. *Genes (Basel)*. 2019 May 7; 10(5):342.
35. Doulla M, McIntyre AD, Hegele RA, Gallego PH. A novel MC4R mutation associated with childhood-onset obesity: A case report. *Paediatr Child Health*. 2014 Dec; 19(10):515-8.
36. Loos RJ, Yeo GS. The bigger picture of FTO: the first GWAS-identified obesity gene. *Nat Rev Endocrinol*. 2014 Jan; 10(1):51-61.
37. Chauhdary Z, Rehman K, Akash MSH. The composite alliance of FTO locus with obesity-related genetic variants. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2021 Jul; 48(7):954-965.
38. Smemo S, Tena JJ, Kim KH, Gamazon ER, Sakabe NJ, Gómez-Marín C, Aneas I, Credidio FL, Sobreira DR, Wasserman NF, Lee JH, Puvilindran V, Tam D, Shen M, Son JE, Vakili NA, Sung HK, Naranjo S, Acemel RD, Manzanares M, Nagy A, Cox NJ, Hui CC, Gomez-Skarmeta JL, Nóbrega MA. Obesity-associated variants within FTO form long-range functional connections with IRX3. *Nature*. 2014 Mar 20; 507(7492):371-5.
39. Vettori A, Pompucci G, Paolini B, Del Cioldolo I, Bressan S, Dundar M, Kenanoğlu S, Unfer V, Bertelli M; Geneob Project. Genetic background, nutrition and obesity: a review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019 Feb; 23(4):1751-1761.
40. Samblas M, Milagro FI, Martínez A. DNA methylation markers in obesity, metabolic syndrome, and weight loss. *Epigenetics*. 2019 May; 14(5):421-444.

41. Rohde K, Keller M, la Cour Poulsen L, Blüher M, Kovacs P, Böttcher Y. Genetics and epigenetics in obesity. *Metabolism*. 2019 Mar; 92:37-50.
42. Moraes-Vieira PM, Yore MM, Dwyer PM, Syed I, Aryal P, Kahn BB. RBP4 activates antigen-presenting cells, leading to adipose tissue inflammation and systemic insulin resistance. *Cell Metab*. 2014 Mar 4; 19(3):512-26.
43. Nono Nankam PA, Blüher M. Retinol-binding protein 4 in obesity and metabolic dysfunctions. *Mol Cell Endocrinol*. 2021 Jul 1; 531:111312.
44. Shajarian M, Rafiee L, Naji-Esfahani H, Haghjooy-Javanmard S, Nizal S. Association of RBP4 gene variants with adverse lipid profile and obesity. *Gene*. 2015 Apr 25; 561(1):1-5.
45. Codoñer-Franch P, Carrasco-Luna J, Allepuz P, Codoñer-Alejos A, Guillem V. Association of RBP4 genetic variants with childhood obesity and cardiovascular risk factors. *Pediatr Diabetes*. 2016 Dec; 17(8):576-583.
46. Watson SJ, Brown AJ, Holliday ND. Differential signaling by splice variants of the human free fatty acid receptor GPR120. *Mol Pharmacol*. 2012 May; 81(5):631-42.
47. Hilgendorf KI, Johnson CT, Mezger A, Rice SL, Norris AM, Demeter J, Greenleaf WJ, Reiter JF, Kopinke D, Jackson PK. Omega-3 Fatty Acids Activate Ciliary FFAR4 to Control Adipogenesis. *Cell*. 2019 Nov 27; 179(6):1289-1305.e21.
48. Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, Sugimoto Y, Miyazaki S, Tsujimoto G. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med*. 2005 Jan; 11(1):90-4.
49. Moran BM, Abdel-Wahab YH, Flatt PR, McKillop AM. Evaluation of the insulin-releasing and glucose-lowering effects of GPR120 activation in pancreatic β-cells. *Diabetes Obes Metab*. 2014 Nov; 16(11):1128-39.

50. Stone VM, Dhayal S, Brocklehurst KJ, Lenaghan C, Sörhede Winzell M, Hammar M, Xu X, Smith DM, Morgan NG. GPR120 (FFAR4) is preferentially expressed in pancreatic delta cells and regulates somatostatin secretion from murine islets of Langerhans. *Diabetologia*. 2014 Jun; 57(6):1182-91.
51. Im DS. Functions of omega-3 fatty acids and FFA4 (GPR120) in macrophages. *Eur J Pharmacol*. 2016 Aug 15; 785:36-43.
52. Stuttgen GM, Sahoo D. FFAR4: A New Player in Cardiometabolic Disease? *Endocrinology*. 2021 Aug 1; 162(8):bqab111.
53. Senatorov IS, Moniri NH. The role of free-fatty acid receptor-4 (FFA4) in human cancers and cancer cell lines. *Biochem Pharmacol*. 2018 Apr; 150:170-180.
54. Costanzo A, Liu D, Nowson C, Duesing K, Archer N, Bowe S, Keast R. A low-fat diet up-regulates expression of fatty acid taste receptor gene FFAR4 in fungiform papillae in humans: a co-twin randomised controlled trial. *Br J Nutr*. 2019 Dec 14; 122(11):1212-1220.
55. Martin C, Passilly-Degrace P, Chevrot M, Ancel D, Sparks SM, Drucker DJ, Besnard P. Lipid-mediated release of GLP-1 by mouse taste buds from circumvallate papillae: putative involvement of GPR120 and impact on taste sensitivity. *J Lipid Res*. 2012 Nov; 53(11):2256-65.
56. Djuricic I, Calder PC. Beneficial Outcomes of Omega-6 and Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Human Health: An Update for 2021. *Nutrients*. 2021 Jul 15; 13(7):2421.
57. Mobraten K, Haug TM, Kleiveland CR, Lea T. Omega-3 and omega-6 PUFAs induce the same GPR120-mediated signalling events, but with different kinetics and intensity in Caco-2 cells. *Lipids Health Dis*. 2013 Jul 13; 12:101.

58. Waguri T, Goda T, Kasezawa N, Yamakawa-Kobayashi K. The combined effects of genetic variations in the GPR120 gene and dietary fat intake on obesity risk. *Biomed Res.* 2013 Apr; 34(2):69-74.
59. Vallée Marcotte B, Cormier H, Rudkowska I, Lemieux S, Couture P, Vohl MC. Polymorphisms in FFAR4 (GPR120) Gene Modulate Insulin Levels and Sensitivity after Fish Oil Supplementation. *J Pers Med.* 2017 Nov 6; 7(4):15.
60. Bonnefond A, Lamri A, Leloir A, Vaillant E, Roussel R, Lévy-Marchal C, Weill J, Galan P, Hercberg S, Ragot S, Hadjadj S, Charpentier G, Balkau B, Marre M, Fumeron F, Froguel P. Contribution of the low-frequency, loss-of-function p.R270H mutation in FFAR4 (GPR120) to increased fasting plasma glucose levels. *J Med Genet.* 2015 Sep; 52(9):595-8.
61. Lamri A, Bonnefond A, Meyre D, Balkau B, Roussel R, Marre M, Froguel P, Fumeron F; D.E.S.I.R. Study Group. Interaction between GPR120 p.R270H loss-of-function variant and dietary fat intake on incident type 2 diabetes risk in the D.E.S.I.R. study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2016 Oct; 26(10):931-6.
62. Vestmar MA, Andersson EA, Christensen CR, Hauge M, Glümer C, Linneberg A, Witte DR, Jørgensen ME, Christensen C, Brændlund I, Lauritzen T, Pedersen O, Holst B, Grarup N, Schwartz TW, Hansen T. Functional and genetic epidemiological characterisation of the FFAR4 (GPR120) p.R270H variant in the Danish population. *J Med Genet.* 2016 Sep; 53(9):616-23.
63. Gozal D, Kheirandish-Gozal L, Carreras A, Khalyfa A, Peris E. Obstructive sleep apnea and obesity are associated with reduced GPR 120 plasma levels in children. *Sleep.* 2014 May 1; 37(5):935-41.
64. Rodriguez-Pacheco F, Garcia-Serrano S, Garcia-Escobar E, Gutierrez-Repiso C, Garcia-Arnes J, Valdes S, Gonzalo M, Soriguer F, Moreno-Ruiz FJ, Rodriguez-Cañete A, Gallego-

- Perales JL, Martinez-Ferriz A, Rojo-Martínez G, Garcia-Fuentes E. Effects of obesity/fatty acids on the expression of GPR120. *Mol Nutr Food Res.* 2014 Sep; 58(9):1852-60.
65. Fabisiak A, Bartoszek A, Talar M, Binienda A, Dziedziczak K, Krajewska JB, Mosińska P, Niewinna K, Tarasiuk A, Mokrowiecka A, Wierzchniewska-Ławska A, Małecka-Panas E, Salaga M, Fichna J. Expression of FFAR3 and FFAR4 Is Increased in Gastroesophageal Reflux Disease. *J Clin Med.* 2020 Dec 20; 9(12):4111.
66. Meng FT, Huang M, Shao F, Huang Q. Upregulated FFAR4 correlates with the epithelial-mesenchymal transition and an unfavorable prognosis in human cholangiocarcinoma. *Cancer Biomark.* 2018; 23(3):353-361.
67. Carrascosa A, Yeste D, Moreno-Galdó A, Gussinyé M, Ferrández Á, Clemente M, Fernández-Cancio M. Índice de masa corporal e índice de masa triponderal de 1.453 niños no obesos ni malnutridos de la generación del milenio. Estudio longitudinal de Barcelona [Body mass index and tri-ponderal mass index of 1,453 healthy non-obese, non-undernourished millennial children. The Barcelona longitudinal growth study]. *An Pediatr (Engl Ed).* 2018 Sep; 89(3):137-143. Spanish.
68. Esparragón FR, Pérez JC, Bello MA. Guía práctica a los estudios de asociación genética. Consideraciones sobre su utilidad clínica [Practical Guide to genetic association studies. Considerations for its clinical use]. *Nefrologia.* 2009; 29(6):582-8. Spanish.
69. Shashaj B, Luciano R, Contoli B, Morino GS, Spreghini MR, Rustico C, Sforza RW, Dallapiccola B, Manco M. Reference ranges of HOMA-IR in normal-weight and obese young Caucasians. *Acta Diabetol.* 2016 Apr; 53(2):251-60.
70. Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med.* 2006 Apr-Jun; 27(2-3):126-39.
71. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008; 3(6):1101-8.

72. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath.* 2013 Aug; 3(3):71-85.
73. Christakoudi S, Evangelou E, Riboli E, Tsilidis KK. GWAS of allometric body-shape indices in UK Biobank identifies loci suggesting associations with morphogenesis, organogenesis, adrenal cell renewal and cancer. *Sci Rep.* 2021 May 21; 11(1):10688.
74. Sundström L, Myhre S, Sundqvist M, Ahnmark A, McCoull W, Raubo P, Groombridge SD, Polla M, Nyström AC, Kristensson L, Någård M, Winzell MS. The acute glucose lowering effect of specific GPR120 activation in mice is mainly driven by glucagon-like peptide 1. *PLoS One.* 2017 Dec 5; 12(12):e0189060.
75. Fujii H, Doi H, Ko T, Fukuma T, Kadono T, Asaeda K, Kobayashi R, Nakano T, Doi T, Nakatsugawa Y, Yamada S, Nishimura T, Tomatsuri N, Sato H, Okuyama Y, Kimura H, Kishimoto E, Nakabe N, Shima T. Frequently abnormal serum gamma-glutamyl transferase activity is associated with future development of fatty liver: a retrospective cohort study. *BMC Gastroenterol.* 2020 Jul 10; 20(1):217.
76. Antonio de Luis D, Aller R, Izaola O, Primo D, Bachiller R. The rs10401670 variant in resistin gene improved insulin resistance response and metabolic parameters secondaries to weight loss after a hypocaloric diet. *Clin Nutr ESPEN.* 2016 Aug; 14:14-18.
77. Sivaprakasam S, Sikder MOF, Ramalingam L, Kaur G, Dufour JM, Moustaid-Moussa N, Wachtel MS, Ganapathy V. SLC6A14 deficiency is linked to obesity, fatty liver, and metabolic syndrome but only under conditions of a high-fat diet. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2021 May 1; 1867(5):166087.
78. Auguste S, Fisette A, Fernandes MF, Hryhorczuk C, Poitout V, Alquier T, Fulton S. Central Agonism of GPR120 Acutely Inhibits Food Intake and Food Reward and

Chronically Suppresses Anxiety-Like Behavior in Mice. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2016 Jul 5; 19(7):pyw014.

79. Li X, Yu Y, Funk CD. Cyclooxygenase-2 induction in macrophages is modulated by docosahexaenoic acid via interactions with free fatty acid receptor 4 (FFA4). *FASEB J.* 2013 Dec; 27(12):4987-97.
80. Zhang N, Harsch B, Zhang MJ, Gyberg DJ, Stevens JA, Wagner BM, Mendelson J, Patterson MT, Orchard DA, Healy CL, Williams JW, Townsend D, Shearer GC, Murphy KA, O'Connell TD. FFAR4 regulates cardiac oxylipin balance to promote inflammation resolution in HFpEF secondary to metabolic syndrome. *J Lipid Res.* 2023 Jun; 64(6):100374.
81. Zhao Y, Zha D, Wang L, Qiao L, Lu L, Mei L, Chen C, Qiu J. Phenotypic characterization of GPR120-expressing cells in the interstitial tissue of pancreas. *Tissue Cell.* 2013 Dec; 45(6):421-7.
82. Garcia-Contreras M, Tamayo-Garcia A, Pappan KL, Michelotti GA, Stabler CL, Ricordi C, Buchwald P. Metabolomics Study of the Effects of Inflammation, Hypoxia, and High Glucose on Isolated Human Pancreatic Islets. *J Proteome Res.* 2017 Jun 2; 16(6):2294-2306.
83. Ying W, Fu W, Lee YS, Olefsky JM. The role of macrophages in obesity-associated islet inflammation and β-cell abnormalities. *Nat Rev Endocrinol.* 2020 Feb; 16(2):81-90.
84. Nobili V, Carpino G, Alisi A, De Vito R, Franchitto A, Alpini G, Onori P, Gaudio E. Role of docosahexaenoic acid treatment in improving liver histology in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *PLoS One.* 2014 Feb 4; 9(2):e88005.
85. Nakamoto K, Tokuyama S. Docosahexaenoic Acid Attenuates the Progression of Nonalcoholic Steatohepatitis by Suppressing the Adipocyte Inflammation via the G

Protein-Coupled Receptor 120/Free Fatty Acid Receptor 4 Pathway. Pharmacology. 2022; 107(5-6):330-338.

86. Cheng Z, Zheng L, Almeida FA. Epigenetic reprogramming in metabolic disorders: nutritional factors and beyond. *J Nutr Biochem*. 2018 Apr; 54:1-10.
87. Justice AE, Chittoor G, Gondalia R, Melton PE, Lim E, Grove ML, Whitsel EA, Liu CT, Cupples LA, Fernandez-Rhodes L, Guan W, Bressler J, Fornage M, Boerwinkle E, Li Y, Demerath E, Heard-Costa N, Levy D, Stewart JD, Baccarelli A, Hou L, Conneely K, Mori TA, Beilin LJ, Huang RC, Gordon-Larsen P, Howard AG, North KE. Methylome-wide association study of central adiposity implicates genes involved in immune and endocrine systems. *Epigenomics*. 2020 Sep; 12(17):1483-1499.
88. Catalanotto C, Cogoni C, Zardo G. MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions. *Int J Mol Sci*. 2016 Oct 13; 17(10):1712.
89. Sethupathy P, Collins FS. MicroRNA target site polymorphisms and human disease. *Trends Genet*. 2008 Oct; 24(10):489-97.
90. Salzman DW, Weidhaas JB. SNPing cancer in the bud: microRNA and microRNA-target site polymorphisms as diagnostic and prognostic biomarkers in cancer. *Pharmacol Ther*. 2013 Jan; 137(1):55-63.
91. Hammad MM, Abu-Farha M, Hebbar P, Anoop E, Chandy B, Melhem M, Channanath A, Al-Mulla F, Thanaraj TA, Abubaker J. The miR-668 binding site variant rs1046322 on WFS1 is associated with obesity in Southeast Asians. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023 Oct 4; 14:1185956.
92. Kim J, Okla M, Erickson A, Carr T, Natarajan SK, Chung S. Eicosapentaenoic Acid Potentiates Brown Thermogenesis through FFAR4-dependent Up-regulation of miR-30b and miR-378. *J Biol Chem*. 2016 Sep 23; 291(39):20551-62.

93. Codoñer-Alejos A, Carrasco-Luna J, Codoñer-Franch P. The rs11187533 C>T Variant of the FFAR4 Gene Is Associated with Lower Levels of Fasting Glucose and Decreases in Markers of Liver Injury in Children with Obesity. *Ann Nutr Metab.* 2020; 76(2):122-128.
94. Codoñer-Alejos A, Carrasco-Luna J, Carrasco-García Á, Codoñer-Franch P. Reduced Free Fatty Acid Receptor 4 Gene Expression is Associated With Extreme Obesity and Insulin Resistance in Children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2022 Apr 1; 74(4):535-540.
95. Jhinjharia D, Kaushik AC, Sahi S. A high-throughput structural dynamics approach for identification of potential agonists of FFAR4 for type 2 diabetes mellitus therapy. *J Biomol Struct Dyn.* 2023 Nov; 18:1-21.
96. Di Petrillo A, Kumar A, Onali S, Favale A, Fantini MC. GPR120/FFAR4: A Potential New Therapeutic Target for Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2023 Dec 5;29(12):1981-1989.
97. Li MY, Wu YZ, Qiu JG, Lei JX, Li MX, Xu N, Liu YH, Jin Z, Su ZR, Lee SM, Zheng XB, Xiao-Qi H. Huangqin Decoction ameliorates ulcerative colitis by regulating fatty acid metabolism to mediate macrophage polarization via activating FFAR4-AMPK-PPAR α pathway. *J Ethnopharmacol.* 2023 Jul 15; 311:116430.
98. Carullo G, Mazzotta S, Vega-Holm M, Iglesias-Guerra F, Vega-Pérez JM, Aiello F, Brizzi A. GPR120/FFAR4 Pharmacology: Focus on Agonists in Type 2 Diabetes Mellitus Drug Discovery. *J Med Chem.* 2021 Apr 22; 64(8):4312-4332.
99. Son SE, Kim NJ, Im DS. Development of Free Fatty Acid Receptor 4 (FFA4/GPR120) Agonists in Health Science. *Biomol Ther (Seoul).* 2021 Jan 1; 29(1):22-30.
100. Karthi S, Rajeshwari M, Francis A, Saravanan M, Varalakshmi P, Houlden H, Thangaraj K, Ashokkumar B. 3'-UTR SNP rs2229611 in G6PC1 affects mRNA stability, expression and Glycogen Storage Disease type-Ia risk. *Clin Chim Acta.* 2017 Aug; 471:46-54.

101.Xu G, Meng Y, Wang L, Dong B, Peng F, Liu S, Li S, Liu T. miRNA-214-5p inhibits prostate cancer cell proliferation by targeting SOX4. *World J Surg Oncol.* 2021 Dec 4; 19(1):338.

10. ANEXOS

The rs11187533 C>T Variant of the *FFAR4* Gene Is Associated with Lower Levels of Fasting Glucose and Decreases in Markers of Liver Injury in Children with Obesity

Alan Codoñer-Alejos^a Joaquín Carrasco-Luna^{a,b} Pilar Codoñer-Franch^{a,c}

^aDepartment of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology, University of Valencia, Valencia, Spain; ^bDepartment of Experimental Science, Catholic University of Valencia, Valencia, Spain; ^cDepartment of Pediatrics, University Hospital Dr. Peset, Foundation for the Promotion of Health and Biomedical Research in the Valencian Region (FISABIO), Valencia, Spain

Keywords

Gene · Obesity · Pediatrics

Abstract

Introduction: Genetic factors can modulate the development of associated comorbidities in obesity. It has been shown that loss-of-function variants of the *free fatty acid receptor 4* (*FFAR4*) gene negatively affect obesity comorbidities such as insulin resistance and fatty liver disease. **Objective:** To test the relationships of metabolic factors in children with obesity with variants of the *FFAR4* gene. **Methods:** We performed an association study of 3 single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *FFAR4* (rs10882273 T>C, rs12243124 T>C, and rs11187533 C>T) covering the last intron and last exon of *FFAR4* in a cohort of 203 children with obesity. Cardiometabolic factors were determined, including parameters related to insulin resistance, liver injury, and high-sensitivity C-reactive protein as an inflammatory marker. **Results:** Significant genotype – phenotype interactions occurred between the rs11187533 SNP and glucose levels ($p = 0.011$). Moreover, we identified 2 marginally significant associations between this SNP and the hepatic enzymes alanine aminotransferase ($p = 0.022$) and gamma-glutamyltransferase ($p = 0.015$). The homozygous minor allele genotype (TT) was as-

sociated with a decrease in glucose levels. **Conclusion:** The homozygous minor allele genotype of the rs11187533 SNP might be protective against metabolic consequences accompanying obesity and could allow the identification of metabolically healthy obese individuals at early ages.

© 2020 S. Karger AG, Basel

Introduction

Obesity is a multifactorial disease that involves both environmental and genetic factors. However, many studies suggest a stronger genetic component in humans with obesity. Some studies report that as much as 70% of the population variance in body mass index (BMI) or related measures of adiposity is attributable to inherited factors, and this percentage is further increased when pediatric obesity is considered [1].

In children, excess body fat can negatively affect future health. Specifically, obesity has been associated with several comorbidities that increase the risk of cardiovascular diseases, type 2 diabetes, and some cancers in adult life. The worst metabolic profile includes a combination of impaired glucose tolerance, dyslipidemia, hypertension, and systemic inflammation. Nevertheless, the mecha-

nisms by which nutritional excess leads to metabolic complications are not well characterized and remain widely debated, and obesity-related metabolic disturbances vary widely among individuals with obesity [2].

In this context, obese but metabolically healthy subjects have been identified who do not present associated cardiovascular risk [3] or insulin resistance [4] despite exhibiting a high BMI. The genetic factors involved in the subset of individuals with obesity who do not display disturbed metabolic profiles or an increased risk of cardio-metabolic disease remain an area of continued study.

To date, relatively few studies have specifically focused on the interactions between childhood obesity and genetic polymorphisms in the development of metabolic complications. The identification of genetic markers that distinguish metabolically healthy or unhealthy obese individuals at an early age could be useful for the planning of interventions prescribed to children with obesity [5].

The *free fatty acid receptor 4 (FFAR4)* gene, also known as *G-protein-coupled receptor 120*, is a candidate gene encoding a cellular membrane receptor that binds omega-3 and -6 long-chain fatty acids [6]. *FFAR4* is ubiquitously expressed and has recently been shown to modulate a variety of important anti-inflammatory and metabolic processes. The binding of the *FFAR4* membrane protein to its ligand triggers several cellular signaling pathways and improves chronic low-grade inflammation elicited by insulin resistance [7, 8]. Moreover, *FFAR4* is an important gene in the regulation of insulin secretion and glucose homeostasis and plays a role in type 2 diabetes pathophysiology [9]. Dysfunction of the *FFAR4* gene induces obesity in humans and mice [10] and is associated with a poorer prognosis of several obesity comorbidities, including nonalcoholic steatohepatitis [11].

Some single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of *FFAR4* showing a significant association with obesity or obesity-related parameters have been described [12, 13]. Among these polymorphisms, the p.R270H loss-of-function variant of *FFAR4* (rs116454156) is the most extensively studied. It increases inflammation in adipose and hepatic tissues, favoring the development of comorbidities [14, 15]. However, p.R270H is not highly represented in European populations [16].

The aim of the present study was to test the relationships of the glucidic profile, parameters of liver injury, and inflammatory markers with 3 SNPs of *FFAR4* located in a region covering the last intron and last exon of *FFAR4* (rs10882273 T>C, rs12243124 T>C, and rs11187533 C>T). Our analysis therefore covered the ad-

jacent region of the p.R270H variant and the splicing site of the last exon. We tested these relationships in children with obesity who had normal fasting glucose values and no clinical evidence of liver steatosis, dyslipidemia, or hypertension, who were thus considered to be metabolically healthy.

Materials and Methods

The study population included a cohort of 203 Caucasian children aged 5–16 years (106 boys and 97 girls) who were studied for obesity in the Pediatric Nutrition Unit of Dr. Peset University Hospital with a BMI Z-score higher than 2 standard deviations according to the World Health Organization standards. The Hospital Ethics Committee approved the clinical and genetic studies. All parents and participants older than 12 years provided written informed consent.

Biochemical parameters (glucose, insulin, cholesterol and fractions, triglycerides, alanine aminotransferase [ALT], aspartate aminotransferase [AST], and gamma-glutamyltransferase [GGT]) were measured in serum via direct methods (Architect C 16000; Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL, USA). The homeostasis model assessment for the insulin resistance index (HOMA-IR) was calculated as the fasting insulin level (μ U/mL) \times fasting glucose (mmol/L)/22.5 [17]. High-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) levels were measured by immunonephelometry in a Beckman Image 800 analyzer (Beckman Coulter Canada Inc., Mississauga, ON, Canada). Abdominal echography was performed as a habitual clinical practice with a UGEO HM70A system with an L5–13 linear probe (Samsung Medison, Gyeonggi-do, Republic of Korea).

We used Gene Tagger in the Haploview version 4.2 software to choose the SNPs that were most appropriate for the current study. A cutoff of $r^2 \geq 0.8$ for a proxy and a minor allele frequency $\geq 5\%$ were used to analyze the region between the last intron and the 5'-UTR of the *FFAR4* gene. The 3'-UTR rs10882273 T>C variant and 2 intron variants, rs12243124 T>C and rs11187533 C>T, were chosen. We did not find any significant associations that were previously described between the selected SNPs and any parameter related to obesity in the genome-wide association studies catalog of the NHGRI-EBI.

The genotyping of the *FFAR4* rs10882273 T>C, rs12243124 T>C, and rs11187533 C>T SNPs was performed using TaqMan SNP genotyping on demand assays (Thermo-Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA). Genomic DNA was obtained from peripheral white blood cells with the QIAamp DNA Blood Mini Kit (QiaGen, Izasa, Madrid, Spain).

The statistical analysis of the association of the SNPs with clinical variables was performed with the SnpStats software of the Catalan Institute of Oncology (available in <https://www.snpstats.net/>). All association analyses were adjusted for obesity. Blood variables that define liver inflammation (AST, ALT, and GGT), vascular inflammation (hs-CRP), fasting glucose levels, and HOMA-IR were quantitatively tested assuming a unique population and linear regression models. The genotypes were grouped into 5 models of inheritance (codominant, dominant, recessive, additive, and overdominant). To select the best inheritance mod-

Table 1. Allele frequencies, genotype frequencies and Hardy-Weinberg equilibriums of the SNPs included in the study

SNP ID	Allele frequencies			Genotype frequencies			Hardy-Weinberg equilibrium <i>p</i> value
	allele	count	proportion	genotype	count	proportion	
rs10882273	T	222	0.55	T/C	96	0.47	0.57
	C	184	0.45	T/T	63	0.31	
rs12243124	T	329	0.81	C/C	44	0.22	0.07
	C	77	0.19	T/T	129	0.64	
rs11187533	C	299	0.74	T/C	71	0.35	0.59
	T	107	0.26	C/C	108	0.53	
				C/T	83	0.41	
				T/T	12	0.06	

SNPs, single-nucleotide polymorphisms.

el for each polymorphism, SnpStats also calculated the Akaike information criterion and Bayesian information criterion. The model showing the best fit to the data was that with the lowest Akaike information criterion and Bayesian information criterion values. We used the Bonferroni correction to consider statistical significance. *p* values of ≤ 0.0125 were considered significant, whereas values between 0.05 and 0.0125 were considered marginally significant.

Results

The 3 *FFAR4* SNPs studied (rs10882273 T>C, rs12243124 T>C, and rs11187533 C>T) were correctly genotyped in 100% of the samples. The minimal allele frequencies of the SNPs studied in our population were similar to those in the HapMap study of the European population except for rs10882273, whose minor allele frequency was higher in the study sample. All SNPs were in Hardy-Weinberg equilibrium (Table 1). The linkage disequilibrium between the 3 SNPs was low ($D' = 0.5258$), indicating that these SNPs are independently inherited.

Respecting the associations found between the SNPs and biochemical traits, we identified a significant association between the rs11187533 SNP and fasting blood glucose ($p = 0.011$) with a recessive model. Specifically, the homozygous minor allele genotype (TT) was associated with lower glucose levels (Table 2). However, insulin levels did not show any association. Consequently, the association with HOMA-IR values was not statistically significant ($p = 0.066$).

In addition, we identified a marginally significant association between the rs11187533 SNP and parameters related to liver inflammation (Table 2). The homozygous minor allele genotype (TT) was associated with a decrease in ALT ($p = 0.022$) and GGT ($p = 0.015$) levels compared with the CC + CT genotypes, also according to a recessive model. In contrast, this variant did not show any association with hs-CRP levels.

Pathologic levels of hepatobiliary enzymes, defined as AST >34 IU/L, ALT >55 IU/L, and GGT >65 IU/L, were present in 11, 9 and 0 children, respectively. Because no child with rs11187533 T/T had an abnormal result, we could not perform the statistical analysis of the genotype – phenotype interaction.

Other metabolic traits (high-density lipoprotein cholesterol, triglycerides, and blood pressure) were also analyzed. No association with the rs11187533 SNP was found.

With respect to ultrasound examination, only 2 boys with rs11187533 C/C showed a bright, markedly hyper-echoic liver compared to the adjacent renal cortex.

No significant associations of metabolic traits were found for the other 2 polymorphisms (rs10882273 T>C and rs12243124 T>C).

Discussion/Conclusion

The present study shows that the TT minor homozygous genotype of the rs11187533 SNP is significantly associated with lower levels of fasting glucose in children with obesity. Thus, this mutation might confer a genetic

Table 2. Association of FFAR4 SNPs with the parameters related to obesity comorbidities

Parameters	SNP ID	Genotype	Number	Mean (SEM)	Difference (95% CI) ^a	p value ^b	Best model
AST, IU/L	rs10882273	T/T-C/C	107	23.1 (0.5)	1.1 (-1.2 to 3.3)	0.39	Overdominant
		T/C	96	24.0 (1.1)			
	rs12243124	T/T-C/C	132	23.0 (0.5)	1.8 (-1.6 to 4.3)	0.15	Overdominant
		T/C	71	24.5 (1.4)			
	rs11187533	C/C	108	24.5 (1.0)	-1.8 (-3.7 to 0.1)	0.07	Additive
		C/T	83	22.6 (0.7)			
		T/T	12	21.3 (2.0)			
ALT, IU/L	rs10882273	T/T-C/C	107	21.7 (0.9)	1.8 (-1.5 to 5.1)	0.29	Overdominant
		T/C	96	23.0 (1.4)			
	rs12243124	T/T-C/C	132	22.2 (1.1)	0.9 (-2.6 to 4.3)	0.61	Overdominant
		T/C	71	22.5 (1.4)			
	rs11187533	C/C-C/T	191	22.7 (0.9)	-8.1 (-15.0 to -1.2)	0.022	Recessive
		T/T	112	15.8 (1.1)			
GGT, IU/L	rs10882273	T/T-T/C	159	17.6 (0.6)	1.4 (-1.2 to 4.2)	0.28	Recessive
		C/C	44	19.0 (1.3)			
	rs12243124	T/T	129	18.5 (0.8)	-1.4 (-3.6 to 0.8)	0.21	Additive
		T/C	71	16.9 (0.8)			
	rs11187533	C/C	3	11.7 (1.7)			
		C/C-C/T	191	18.2 (0.6)	-5.9 (-10.6 to -1.2)	0.015	Recessive
		T/T	12	13.2 (0.7)			
hs-CRP, nmol/L	rs10882273	T/T	63	57.8 (9.9)	-10.3 (-20.9 to -0.29)	0.06	Additive
		T/C	96	45.1 (4.5)			
	rs12243124	C/C	44	37.1 (4.4)			
		T/T-T/C	200	47.8 (3.9)	-30.2 (-93.6 to 33.3)	0.35	Recessive
	rs11187533	C/C	3	15.6 (10.0)			
		C/C-T/T	120	44.6 (5.0)	7.6 (-8.0 to 23.3)	0.34	Overdominant
		C/T	83	51.3 (6.0)			
Glucose, mmol/L	rs10882273	T/T	63	5.18 (0.05)	-0.02 (-0.1 to 0.05)	0.50	Additive
		T/C	96	5.17 (0.04)			
	rs12243124	C/C	44	5.14 (0.05)			
		T/T-T/C	200	5.17 (0.03)	-0.3 (-0.72 to 0.13)	0.17	Recessive
	rs11187533	C/C	3	4.92 (0.05)			
		C/C-C/T	191	5.18 (0.03)	-0.28 (-0.5 to -0.07)	0.011	Recessive
		T/T	12	4.48 (0.08)			
HOMA-IR	rs10882273	T/T	63	3.65 (0.28)	0.38 (-0.36 to 1.11)	0.31	Dominant
		T/C-C/C	140	3.93 (0.22)			
	rs12243124	T/T-T/C	200	3.87 (0.18)	-1.44 (-4.25 to 1.38)	0.32	Recessive
		C/C	3	2.11 (0.26)			
	rs11187533	C/C-C/T	192	3.90 (0.18)	-1.30 (-2.67 to 0.08)	0.09	Recessive
		T/T	11	2.77 (0.39)			

^a Maximum significative difference between means.^b Following Bonferroni correction, p values ≤0.0125 were considered statistically significant and those between 0.05 and 0.0125 were regarded as marginally significant (in bold in the Table).

FFAR4, free fatty acid receptor 4; ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; GGT, gamma-glutamyltranspeptidase; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein; SEM, standard error of the mean; SNP, single-nucleotide polymorphisms.

advantage in this population with respect to metabolic alterations.

FFAR4 is a gene that is strongly implicated in the etiology and pathogenesis of obesity and its comorbidities. *FFAR4* activation directly or indirectly regulates lipid and/or glucose metabolism in adipose, liver, and muscle tissues. This receptor is involved in diverse processes, including insulin sensitization and glucose uptake. Low levels of *FFAR4* expression or function have been correlated with increased plasma glucose levels [14, 18] and high HOMA-IR [13, 18, 19].

It has been found that the low-frequency p.R270H variant (rs116454156), which inhibits *FFAR4* activity, might increase fasting glucose levels within a normal physiological range. No significant association with T2D risk, fasting insulin levels, or the homeostasis model of insulin resistance has been shown [14].

In adipose tissue, the ligand binding of fatty acids by *FFAR4* recruits the Gαq/11 protein and stimulates phospholipase-C, increasing the intracellular Ca²⁺ concentration. This situation results in the activation of protein kinase B, which promotes glucose uptake by stimulating glucose transporter type 4 [7, 8]. Thus, a poor function of this signaling pathway may result in elevated blood glucose levels, whereas its upregulation results in lower levels. In our study, the presence of the homozygous recessive rs11187533 minor allele was associated with lower levels of fasting glucose. We hypothesized that individuals with this genotype could show activation of *FFAR4* function.

With respect to the relationship to insulin resistance, recent developments have shown that *FFAR4* activation induces glucagon-like peptide-1 secretion from enteroendocrine cells, increasing insulin sensitivity. In mice, the activation of *FFAR4* with agonists causes an increase in insulin and a decrease in glucose. Blocking the glucagon-like peptide-1 receptor with antagonists results in the inhibition of hypoglycemic effects induced by *FFAR4* activation. Therefore, dysfunction of *FFAR4* could impact insulin release, leading to an increase in HOMA-IR [18]. A recent study has shown an association between 4 SNPs of the *FFAR4* gene (rs11187537, rs17108973, rs7081686, and rs17484310) and fasting insulin levels and HOMA-IR. Specifically, individuals homozygous for the major allele showed a decrease in these traits after docosahexaenoic acid supplementation [13]. A study performed in a pediatric population also showed a significant linear correlation between *FFAR4* expression in plasma and HOMA-IR [19]. However, in our study, we did not find any association between the rs11187533 SNP

and HOMA-IR. It is possible that the pattern of *FFAR4* expression is modulated by other factors in addition to the determined variant that explains this fact.

We also observed a marginally significant association of the TT minor allele of the same variant with ALT and GGT levels, which are 2 markers of liver injury that were lower in the presence of this variant. Previously, it was found that the p.R270H variant of *FFAR4* (rs116454156) was significantly associated with ALT levels when the liver suffered intrahepatic accumulation of fatty acids [15]. The *FFAR4* gene can contribute to metabolic homeostasis via its important role in maintaining normal adipose – liver interactions. Thus, the activation of *FFAR4* by FFAs may facilitate normal lipogenesis in adipose and liver tissues, thereby preventing hepatic steatosis [11]. Moreover, *FFAR4* acts as a dietary sensor expressed in immune cells that regulates inflammatory responses via β-arrestin 2 by blocking the signaling pathway of Toll-like receptors and repressing macrophage-induced chronic tissue inflammation [7, 8]. Therefore, the normal functioning of *FFAR4* prevents both inadequate lipid deposition and inflammatory stress in the liver and, consequently, increases in ALT and GGT levels.

Although we are aware that the number of subjects studied can be a potential limitation because the results are more reliable as the sample size increases, we have set a more stringent threshold for statistical significance than $p < 0.05$ (i.e., Bonferroni correction to reduce the chances of obtaining false-positive results). We would also like to highlight the stringency applied in the recruitment of the analyzed cohort. The fact that the study was conducted in children was expected to obviate various confounding factors present in adulthood due to differences in the severity and duration of obesity that could mask the pathophysiological effects of the *FFAR4* receptor. Additionally, this approach allowed us to more easily identify the effects of genetic markers versus those of environmental factors experienced by the human lifespan. The studied children were of Caucasian origin. Other ethnic groups could present different associations. In fact, the most extensively studied variant of *FFAR4* (p.R270H) was not associated with glucose-related traits in an adult Danish population, contrary to classic studies [20].

We hypothesized that the influence of the rs11187533 C>T polymorphism could be ascribed to the effect of the minor allele on the modulation of *FFAR4*. This variant could condition the regulation of the *FFAR4* gene by affecting transcription or splicing. In silico analysis per-

formed for the rs11187533 SNP at <https://www.snp-nexus.org/index.htm> did not reveal any regulatory elements for damage prediction. Alternatively, it could be that this SNP is closely linked to another gene region producing protective effects. Due to its position within intron 2 (637 bp from exon 3), it is more likely that these effects are due to the deregulation of splicing resulting from other SNPs in its downstream linkage block. A functional study would be necessary to analyze these possible effects on *FFAR4* expression.

In summary, we found that the homozygous minor allele genotype of the rs11187533 SNP might be protective against metabolic consequences accompanying obesity and could allow the identification of metabolically healthy obese individuals at early ages. It could be useful in nutrigenetics to recommend more-specific supplementation with docosahexaenoic acid or specific agonists of the receptor. These results require further validation in larger series and other ethnicities.

Acknowledgment

We are grateful to all study participants and Dr. Vicent Guillem for his advice in the interpretation of data.

References

- Choh AC, Lee M, Kent JW, Diego VP, Johnson W, Curran JE, et al. Gene-by-age effects on BMI from birth to adulthood: the Fels Longitudinal Study. *Obesity (Silver Spring)*. 2014 Mar;22(3):875–81.
- Samocha-Bonet D, Dixit VD, Kahn CR, Leibel RL, Lin X, Nieuwoudorp M, et al. Metabolically healthy and unhealthy obese—the 2013 Stock Conference report. *Obes Rev*. 2014 Sep; 15(9):697–708.
- Samocha-Bonet D, Chisholm DJ, Tonks K, Campbell LV, Greenfield JR. Insulin-sensitive obesity in humans - a ‘favorable fat’ phenotype? *Trends Endocrinol Metab*. 2012 Mar; 23(3):116–24.
- Karelis AD, Rabasa-Lhoret R. Obesity: can inflammatory status define metabolic health? *Nat Rev Endocrinol*. 2013 Dec;9(12):694–5.
- Codoñer-Franch P, Carrasco-Luna J, Allepuz P, Codoñer-Alejos A, Guillem V. Association of RBP4 genetic variants with childhood obesity and cardiovascular risk factors. *Pediatr Diabetes*. 2016 Dec;17(8):576–83.
- Mobraten K, Haug TM, Kleiveland CR, Lea T. Omega-3 and omega-6 PUFAs induce the same GPR120-mediated signalling events, but with different kinetics and intensity in Caco-2 cells. *Lipids Health Dis*. 2013 Jul;12(1):101.
- Zhang D, Leung PS. Potential roles of GPR120 and its agonists in the management of diabetes. *Drug Des Devel Ther*. 2014 Jul;8:1013–27.
- Oh DY, Walenta E, Akiyama TE, Lagakos WS, Lackey D, Pessentheiner AR, et al. A Gpr120-selective agonist improves insulin resistance and chronic inflammation in obese mice. *Nat Med*. 2014 Aug;20(8):942–7.
- Taneera J, Lang S, Sharma A, Fadista J, Zhou Y, Ahlqvist E, et al. A systems genetics approach identifies genes and pathways for type 2 diabetes in human islets. *Cell Metab*. 2012 Jul;16(1):122–34.
- Ichimura A, Hirasawa A, Poulaing-Godefroy O, Bonnefond A, Hara T, Yengo L, et al. Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. *Nature*. 2012 Feb;483(7389):350–4.
- Nakamoto K, Shimada K, Harada S, Morimoto Y, Hirasawa A, Tokuyama S. DHA supplementation prevent the progression of NASH via GPR120 signaling. *Eur J Pharmacol*. 2018 Feb;820:31–8.
- Waguri T, Goda T, Kasezawa N, Yamakawa-Kobayashi K. The combined effects of genetic variations in the GPR120 gene and dietary fat intake on obesity risk. *Biomed Res*. 2013 Apr; 34(2):69–74.
- Vallée Marcotte B, Cormier H, Rudkowska I, Lemieux S, Couture P, Vohl MC. Polymorphisms in FFAR4 (GPR120) Gene Modulate Insulin Levels and Sensitivity after Fish Oil Supplementation. *J Pers Med*. 2017 Nov; 7(4):E15.
- Bonnefond A, Lamri A, Leloir A, Vaillant E, Roussel R, Lévy-Marchal C, et al. Contribution of the low-frequency, loss-of-function p.R270H mutation in FFAR4 (GPR120) to increased fasting plasma glucose levels. *J Med Genet*. 2015 Sep;52(9):595–8.
- Marzuillo P, Grandone A, Conte M, Capuano F, Cirillo G, Di Sessa A, et al. Novel association between a nonsynonymous variant (R270H) of the G-protein-coupled receptor 120 and liver injury in children and adolescents with obesity. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2014 Oct;59(4):472–5.
- Stryjecki C, Alyass A, Meyre D. Ethnic and population differences in the genetic predisposition to human obesity. *Obes Rev*. 2018 Jan;19(1):62–80.
- Shashaj B, Luciano R, Contoli B, Morino GS, Spreghini MR, Rustico C, et al. Reference ranges of HOMA-IR in normal-weight and obese young Caucasians. *Acta Diabetol*. 2016 Apr;53(2):251–60.

Statement of Ethics

The research was conducted ethically in accordance with the World Medical Association Declaration of Helsinki. The Hospital Ethics Committee approved the clinical and genetic studies. All parents and participants older than 12 years provided written informed consent.

Disclosure Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

Funding Sources

The funding was provided by the Foundation for the Promotion of Health and Biomedical Research in the Valencian Region (FISABIO), Spain.

Author Contributions

A.C.-A. participated in the acquisition, analysis of data and interpretation of data, and drafted the manuscript. J.C.-L. participated in the acquisition and analysis of data. P.C.-F. conceived the study, participated in its design and coordination, and helped to draft the manuscript. All authors have read and approved the final version of the manuscript to be published.

- 18 Sundström L, Myhre S, Sundqvist M, Ahnmark A, McCoull W, Raubo P, et al. The acute glucose lowering effect of specific GPR120 activation in mice is mainly driven by glucagon-like peptide 1. *PLoS One*. 2017 Dec;12(12):e0189060.
- 19 Gozal D, Kheirandish-Gozal L, Carreras A, Khalyfa A, Peris E. Obstructive sleep apnea and obesity are associated with reduced GPR120 plasma levels in children. *Sleep (Basel)*. 2014 May;37(5):935–41.
- 20 Vestmar MA, Andersson EA, Christensen CR, Hauge M, Glümer C, Linneberg A, et al. Functional and genetic epidemiological characterisation of the FFAR4 (GPR120) p.R270H variant in the Danish population. *J Med Genet*. 2016 Sep;53(9):616–23.

Reduced Free Fatty Acid Receptor 4 Gene Expression is Associated With Extreme Obesity and Insulin Resistance in Children

*Alan Codoñer-Alejos, *†Joaquín Carrasco-Luna, *Álvaro Carrasco-García,
and *‡Pilar Codoñer-Franch

ABSTRACT

Objectives: Free fatty acid receptor 4 (FFAR4) is a G-protein-coupled membrane receptor highly expressed in macrophages that triggers anti-inflammatory effects and promotes insulin sensitization. We have previously found significant associations between the *FFAR4* rs11187533 single nucleotide polymorphism (SNP) and various obesity comorbidity parameters. We aimed to verify the *FFAR4* expression levels in children with obesity and the associated comorbidities.

Methods: Thirty-eight children with obesity were studied. Clinical and anthropometric evaluation was performed. A venous sample under fasting conditions was obtained. Biochemical study included parameters of metabolic risk. DNA was extracted and genotyped for the rs11187533 *FFAR4* SNP. Real-time PCR technique was performed to investigate the gene expression. Relative *FFAR4* mRNA levels were determined according to the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

Results: Significant differences in *FFAR4* expression levels between the CC and CT-TT genotypes of the rs11187533 *FFAR4* SNP were observed ($P=0.034$). The minor allele T presented higher levels of *FFAR4* expression. We found that a loss of *FFAR4* expression was associated with extreme obesity ($P=0.032$). The lowest *FFAR4* expression levels were observed in children who had higher insulin ($P=0.008$) and homeostasis model assessment insulin resistance values ($P=0.012$) and lower quantitative insulin-sensitivity check index ($P=0.033$).

Conclusions: The underexpression of *FFAR4* was associated with extreme obesity and parameters indicative of obesity comorbidities in children. This under expression could be partially influenced by the presence of the C allele rs11187533 *FFAR4* SNP.

Key Words: body mass index, free fatty acid receptor 4, homeostasis model assessment of insulin resistance, quantitative insulin-sensitivity check index

(*JPGN* 2022;74: 535–540)

Received July 11, 2021; accepted October 27, 2021.

From the *Department of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology, University of Valencia, the †Department of Experimental Science, Catholic University of Valencia, Valencia, and the ‡Department of Pediatrics, University Hospital Dr Peset, Foundation for the Promotion of Health and Biomedical Research in the Valencian Region (FISABIO), Valencia, Spain.

Address correspondence and reprint requests to Alan Codoñer-Alejos, Msc, Department of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology, Medicine School, University of Valencia, Avda. Blasco Ibañez 15, 46010 Valencia, Spain (e-mail: acoa3@alumni.uv.es).

The authors report no conflicts of interest.

Copyright © 2021 by European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition and North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition

DOI: 10.1097/MPG.0000000000003360

What Is Known

- The involvement of the Free fatty acid receptor 4 (*FFAR4*) gene in obesity and its comorbidities.
- The association between the rs11187533 single nucleotide polymorphisms (SNPs) and obesity-related parameters.

What Is New

- The association of the mutant T allele of the rs11187533 SNP with high *FFAR4* expression levels.
- The relationship between *FFAR4* underexpression and extreme obesity in children.
- The relationship between *FFAR4* underexpression and insulin resistance in children with obesity.

Free fatty acid receptor 4 (FFAR4) is a G-protein-coupled membrane receptor for unsaturated long-chain fatty acids. The human *FFAR4* gene is encoded on chromosome 10.q23.3, whose activation elicits various physiological activities that have a stabilizing effect on metabolic homeostasis, such as regulation of energy metabolism (1), reduction of insulin resistance (2,3), inhibition of lipolysis (4) and anti-inflammatory effects (2,3,5–7). *FFAR4* is highly expressed in proinflammatory macrophages and monocytic cells (2,3,5). *FFRA4* activation mitigates the inflammatory response and promotes insulin sensitization (3,5,7). Moreover, abnormal *FFAR4* function is linked to obesity (8), type 2 diabetes (5), and nonalcoholic steatohepatitis (9). Decreased FFAR4 plasma levels in children with obesity have been associated with higher values of both the body mass index (BMI) α scores and the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) (10). Additionally, expression levels were lower in peripheral white blood cells of children with obstructive sleep apnea (10). Thus, changes in gene expression are important contributors to phenotypic traits.

Previous studies by our group have found significant associations between the *FFAR4* rs11187533 single nucleotide polymorphism (SNP) located in intron 2 and several obesity comorbidity parameters (11). Specifically, the mutated C/T/T genotypes were associated with lower values of blood glucose, alanine transaminase (ALT) and gamma-glutamyl transpeptidase (GGT), which suggests a protective effect of the minor T allele.

In this report, we expand previous knowledge about this variant with the *FFAR4* expression data. We analyzed the gene expression level of *FFAR4* in peripheral blood cells in children with obesity. Our hypothesis is that the genetic variation of the rs11187533 SNP within *FFAR4* could be related to reduced *FFAR4* expression in children with obesity and can contribute to the interindividual variability in the metabolic and inflammatory-related traits associated with obesity. Therefore, to evaluate the effect of reduced levels of expression on metabolic parameters, we analyzed the association between *FFAR4* expression levels and markers of insulin resistance, lipid profile, liver injury and inflammation in children with obesity.

MATERIALS AND METHODS

Study recruitment was conducted between January 1 and March 31, 2019. Children with obesity according to WHO criteria (12) were referred by primary care pediatrician for further evaluation at the Pediatric Nutrition Unit of Dr Peset University Hospital. The children were recruited consecutively by the clinicians at their first appointment to the pediatric clinic. Individuals with genetic or endocrine disorders and those taking medication or special diets were excluded. At least 38 children should be included following the sample size calculation criteria with a confidence level of 85% and a precision of 5%. Initially, 42 Caucasian children with obesity ages 7–14 years were consecutively recruited. Four children were removed from the study due to the poor RNA integrity in the blood samples. Finally, the study was conducted on 38 children (16 boys and 22 girls) with Tanner staging between I to III. Height and weight were measured to calculate the BMI *z* score (12). Twenty children had a BMI *z* score between 2 and 4 standard deviation (SD). Eighteen children had extreme obesity with a BMI *z* score greater than 4 SD. The children remained on a strict overnight fast for twelve hours until sample extraction to avoid variations in *FFAR4* expression.

The study was approved by the Dr Peset Hospital Ethics Committee. All parents and participants older than 12 years provided written informed consent. All data provided were protected by the EU General Data Protection Regulation: RGPD 2016/679 of the European Parliament and modified May 25, 2018 and LOPDGDD 3/2018.

Biochemical Parameters

Biochemical parameters were determined in serum via direct methods (Architect C 16000; Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL, USA). To study the relationship between *FFAR4* expression and carbohydrate metabolism, glucose and insulin levels were analyzed, and the surrogate HOMA-IR and quantitative insulin-sensitivity check index (QUICKI) indexes were calculated (13). To evaluate lipid metabolism and cardiometabolic risk, total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), triglyceride and triglyceride/HDL-C ratio levels were measured. Other parameters that can be altered in children with obesity, such as aspartate aminotransferase, ALT and GGT, were also analyzed. Finally, to take into account the subclinical generalized inflammation produced by obesity, the level of high-sensitivity C-reactive protein was determined (Beckman Immage 800 immunoassay analyzer, Beckman Coulter Inc., Mississauga, ON, Canada).

RNA Isolation and Integrity Analysis

For expression analysis, mRNA was isolated from peripheral blood that was obtained after overnight fasting and collected in

Tempus Blood RNA Tubes (Applied Biosystems Waltham, Massachusetts, USA). Nucleated blood cells were immediately lysed, and the RNA was stabilized and extracted with the MagMAX Stabilized Blood Tubes RNA Isolation Kit (Ambion).

The integrity of the RNA was determined for all samples using an Agilent 4200 TapeStation, RNA ScreenTape Analysis (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and electrophoresis to obtain the RNA integrity number (RIN) (14). Samples with a RIN lower than 5 were removed from the study. Thus, four samples from children with obesity were removed, and a subsequent study was performed on 38 children.

cDNA Obtention and q-PCR

cDNA synthesis was carried out with SuperScript IV VILO Master Mix (Thermo-Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA). Taq-Man Gene Expression Master Mix and TaqMan Gene Expression Assays (Thermo-Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) were used to analyze the expression values of each sample using the $2^{-\Delta Ct}$ method (15,16).

A TaqMan probe (Hs699184_m1) was used to measure the levels of total *FFAR4* mRNA copies. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase–gene TaqMan probe (Hs3929097_g1) was chosen as a reference housekeeping gene and samples from five children without obesity ($\text{RIN} > 5$) were used as a second normalization (15,16). For expression normalization, we have followed the Minimum Information for Publication of Quantitative RT-PCR Experiments (MIQE) guidelines recommendations (17).

All samples from the 38 children with obesity and the five reference samples were extracted and retrotranscribed in parallel. Then, the five reference samples were mixed in a pool that was compared to each one of 38 children with obesity. The samples were analyzed in triplicate and their mean was subsequently calculated. Data are presented on a logarithmic scale due to double normalization (reference gene and reference sample pool). The analysis was carried out using a 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Warrington, UK) and SDS 1.6.3 software (Applied Biosystems, Warrington, UK).

$2^{-\Delta Ct}$ Calculation

To calculate relative changes in gene expression we used the $2^{-\Delta Ct}$ method. Three replicates of the threshold cycle (Ct) values from the real-time quantitative PCR experiment were obtained both for the *FFAR4* and *GAPDH* probes for each sample. Furthermore, three replicates of Ct values were obtained for the *FFAR4* and *GAPDH* probes in each 96-well plate, using a single reference sample pool (a pool of five samples obtained each one from five normal weight children).

First, the mean of the three Ct values was calculated, both for each sample and for the reference sample pool. Second, the Ct increments (ΔCt) between each average value of the *FFAR4* probe and *GAPDH* probe were calculated for each sample and the reference sample pool ($\Delta Ct = Ct_{(FFAR4)} - Ct_{(GAPDH)}$). Third, the ΔCt increments ($\Delta \Delta Ct$) between the ΔCt sample values and ΔCt reference sample pool values were calculated ($\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{sample})} - \Delta Ct_{(\text{reference sample pool})}$). Fourth, the exponents $2^{-\Delta \Delta Ct}$ were calculated for each sample as follows:

$$2^{-(\Delta Ct_{(\text{sample})} - \Delta Ct_{(\text{reference sample pool})})}$$

The *FFAR4* mRNA expression results are categorized as overexpression when $2^{-\Delta \Delta Ct}$ values > 1 and underexpression when $2^{-\Delta \Delta Ct}$ values < 1 .

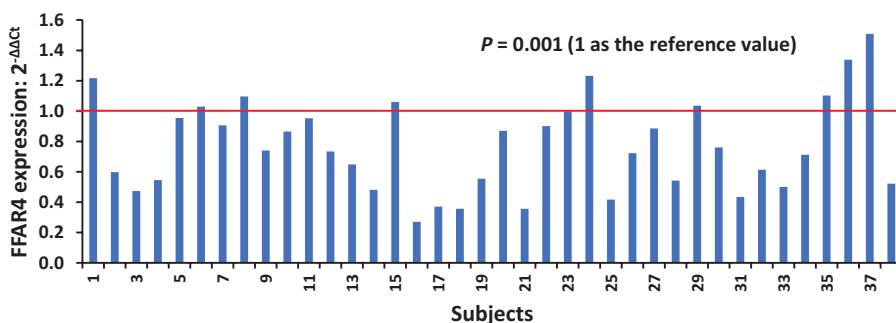


FIGURE 1. Bar chart showing the free fatty acid receptor 4 (FFAR4) expression values of each of the 38 studied samples. A red line was added at the value of 1, to show the limit of loss or gain of expression. The *P* value shown indicates the significance of the differences between the mean of the FFAR4 expression values and the reference value 1 by Student *t*-test.

DNA Obtaining and rs11187533 C>T Genotyping

To compare the *FFAR4* expression data with the rs11187533 genotypes, the DNA of the 38 children with obesity was extracted from peripheral blood. Genomic DNA was obtained from the buffy coat with the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Izasa, Madrid, Spain). Genotyping of the rs11187533 C>T SNP (C_11756866_20) was performed using TaqMan SNP genotyping on demand assays (Thermo-Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA). TaqMan genotyping PCR and the analysis were carried out with the same equipment and software used for qPCR.

Statistical Methods

Data were analyzed with SPSS v.26 software (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA). The Kolmogorov-Smirnov test was applied to examine whether variables were normally distributed. The strength of the *FFAR4* expression association was measured by Spearman (ρ) correlation coefficient for variables with non-normal distribution and by Pearson (r) correlation coefficient in the case of variables with normal distribution.

Analysis of the *FFAR4* expression was performed by a one-sample Student *t*-test. Analysis of the BMI *z* score, HOMA-IR and QUICKI as dichotomous variables was performed using Student *t*-test for parametric data and the Mann-Whitney *U* test for nonparametric data. Two groups were determined according to the BMI *z* score: children with obesity (>2 to <4 SD) and children with extreme obesity (>4 SD). A cut off point of 3.42 for HOMA-IR and 0.32 for QUICKI value was used to define insulin-resistant groups (13). *P* values <0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

The mRNA expression of *FFAR4* was decreased in children with obesity. Of the 38 children studied, 29 children (76.32%) presented lower expression than the reference pool, and only 9 children (23.68%) showed $2^{-\Delta\Delta CT}$ values >1 of the reference pool ($P = 0.001$) (Fig. 1). There were no differences regarding age, sex and pubertal stage.

The effect of the presence of the minor allele T of the rs11187533 SNP on the expression of *FFAR4* was assessed. Children with obesity and the CC wild-type genotype ($N = 17$) presented a $2^{-\Delta\Delta CT}$ mean of 0.661 ($SD = 0.281$), while children with heterozygous and homozygous mutated CT-TT genotypes ($N = 21$) presented a $2^{-\Delta\Delta CT}$ mean of 0.860 ($SD = 0.300$). A significant difference ($P = 0.034$) was observed between the two groups

(Fig. 2), suggesting that the rs11187533 SNP mutation involves a higher expression of *FFAR4* in both.

Analysis of the relationships between the *FFAR4* expression values and parameters of cardiometabolic risk showed a significant inverse correlation only with insulin ($\rho = -0.402$, $P = 0.012$) and HOMA-IR values ($\rho = -0.374$, $P = 0.021$) and positive correlation with QUICKI ($r = 0.376$, $P = 0.020$) (Fig. 3). A marginal association was also observed between ALT and *FFAR4* expression ($r = 0.32$, $P = 0.048$). Other parameters, such as BMI *z* score, glucose, total, LDL-C and HDL-C, triglycerides, triglyceride/HDL-C ratio, aspartate transaminase, GGT, high-sensitivity C-reactive protein did not show a significant correlation.

We also performed the analysis of dichotomous variables to evaluate extreme values. We found that children with BMI *z* score values greater than four SD ($N = 18$) presented a $2^{-\Delta\Delta CT}$ mean of 0.661 ($SD = 0.255$), while children with values between two and four SD ($N = 20$) presented a $2^{-\Delta\Delta CT}$ mean of 0.871 ($SD = 0.317$). Thus, a significant difference was observed between the two groups ($P = 0.032$) (Fig. 4). Children with extreme obesity showed lower mRNA expression values of *FFAR4*.

With respect to HOMA-IR values, 24 children had values above the threshold value (3.42), and 14 children had HOMA-IR

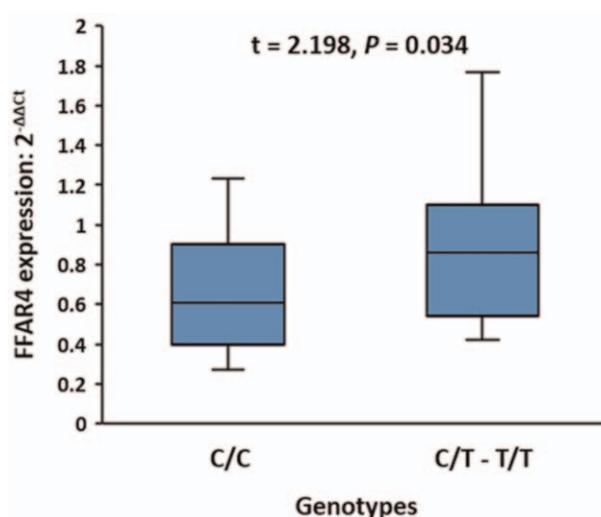


FIGURE 2. Boxplot representing the comparison of the free fatty acid receptor 4 (FFAR4) expression values between the C/C and C/T-T/T genotypes.

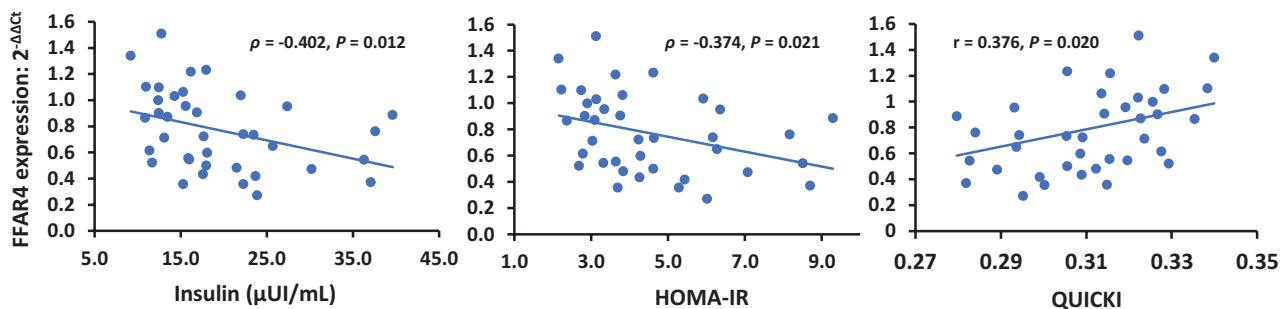


FIGURE 3. Scatter plots and trend line of the correlations between the expression of *FFAR4* and insulin, the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) and QUICKI values. QUICKI = quantitative insulin-sensitivity check index.

values below the threshold value. Children with high HOMA-IR levels presented a $2^{-\Delta\Delta Ct}$ mean of 0.677 ($SD=0.280$), whereas in children with normal HOMA-IR levels, the mean $2^{-\Delta\Delta Ct}$ was 0.933 ($SD=0.284$). A significant difference was observed between the two groups (Fig. 4). Regarding QUICKI index, 26 children have a level lower than 0.32 a mean $2^{-\Delta\Delta Ct}$ of 0.776 ($SD=0.343$) and 12 children had normal levels with a mean $2^{-\Delta\Delta Ct}$ of 0.963 ($SD=0.283$). Thus, lower values of *FFAR4* mRNA expression were present in children with pathological values of HOMA-IR ($P=0.012$) and QUICKI ($P=0.033$) (Fig. 4).

DISCUSSION

The relationship between the *FFAR4* gene and obesity in mammals has been previously described (1,4,8). The *FFAR4* gene has an important role in the differentiation and maturation of adipocytes (18) and plays a key role in blood-glucose homeostasis and beta-cell function (19). Ichimura et al (8) showed that double deletion of the *FFAR4* gene in mice resulted in obesity and exacerbated fat accumulation in the abdominal region. In humans, *FFAR4* is extensively expressed, and many *FFAR4* functions in different tissues could control weight. In this sense, *FFAR4* controls appetite and glucose uptake by adipocytes and regulates hormone secretion related to metabolism (1). The present study of *FFAR4* expression in children with obesity shows the following: the minor allele of the rs11187533 SNP was associated with higher expression of *FFAR4*; there was a loss of expression associated with obesity, especially with extreme obesity; and lower expression values of *FFAR4* were found in individuals with higher HOMA-IR values.

We previously found that the C/T-T/T genotypes in the rs11187533 SNP were associated with lower levels of fasting glucose and markers of liver injury, suggesting a protective role of the minor T allele (11). In the present study, we show that the C/T-T/T genotypes have significantly higher expression of *FFAR4* than the C/C genotype, linking the expression values to the rs11187533 SNP genotypes. This finding has not been reported previously and highlights the importance of genotype influence. In this sense, the rs11187533 SNP exerts a protective effect. The rs11187533 SNP is an intron 2 variant located 637 bp upstream of exon 3. We suggest that the effects of this SNP on the phenotype of obese children and the *FFAR4* expression level could be due to the splicing process. If the SNP was linked to some variant in neighboring splicing or 3'UTR regions, they could modify the regulation of *FFAR4* expression levels and, consequently, the effects of the gene. It would be interesting to sequence the downstream region of the rs11187533 SNP to find variants affecting the phenotype.

We have shown that most children with obesity included in the study (76%) presented a reduction in *FFAR4* mRNA expression.

The lowest values were found in individuals with extreme obesity. These results confirm previous studies that have documented *FFAR4* under expression in blood monocytes related to obesity (10,20). Gozal et al also demonstrated a significant negative correlation between the serum levels of the *FFAR4* protein in the blood and BMI z score (10) suggesting a possible link between *FFAR4* activation and protection from obesity. Other authors also found an inverse association between *FFAR4* mRNA expression in visceral adipose tissue and in human peripheral blood mononuclear cells and obesity, mainly in extreme obesity (20). The mechanisms by which the generalized underexpression of *FFAR4* is related to weight gain are not well known. This could be due to reduced energy expenditure, which was demonstrated in *FFAR4*-deficient mice (8). *FFAR4* is highly expressed in the arcuate nucleus of the hypothalamus, which mediates the effects of fatty acids in appetite inhibition (21). Furthermore, in adipose tissue, where it is also highly expressed, it helps in the differentiation of adipocytes and in the uptake of glucose (1), and in pancreatic tissue, an increase in *FFAR4* expression is related to insulin production (1). Thus, *FFAR4* expression supports beneficial effects related to metabolic activation.

Regarding the relationship between the *FFAR4* gene and comorbidities related to obesity, we found an association of *FFAR4* expression with the blood levels of insulin, HOMA-IR and QUICK indexes since the reduced expression is more evident in insulin-resistant subjects. The effects on the insulin-sensitizing role of *FFAR4* are mediated mainly by omega-3 polyunsaturated long-chain fatty acids in cells that endogenously express *FFAR4*, such as macrophages (2,3,5). The activation of *FFAR4* exerts potent insulin sensitivity effects in vivo through the suppression of macrophage-induced tissue inflammation. *FFAR4* activated by omega-3 fatty acids is able to block the nuclear factor kappa-B inflammation pathway (2,3,5). Decrease in *FFAR4* receptor expression affects the modulation of this inflammatory pathway. Moreover, it has been shown that the activation of *FFAR4* also inhibits cyclooxygenase-2 induction, increasing prostaglandin E release and interleukin-6 production (22). All these cytokines lower the expression of insulin receptor genes and lower the activation of protein kinase B in their target tissues. Both processes decrease insulin receptor translocation and glucose transporter type 4 expression, thus leading to insulin resistance (2,3,5). Furthermore, the activation and subsequent migration of macrophages to the pancreas increases insulin release through stimulation of the islets by inflammatory cytokines and hence hyperinsulinism (23–25). In this way, inflammatory factors dependent on *FFAR4* under expression can contribute to the development of insulin resistance in obese subjects.

In the present study, we also found a marginal association between ALT values, which are indicative of liver injury, and *FFAR4* expression. The relationship between alterations in the

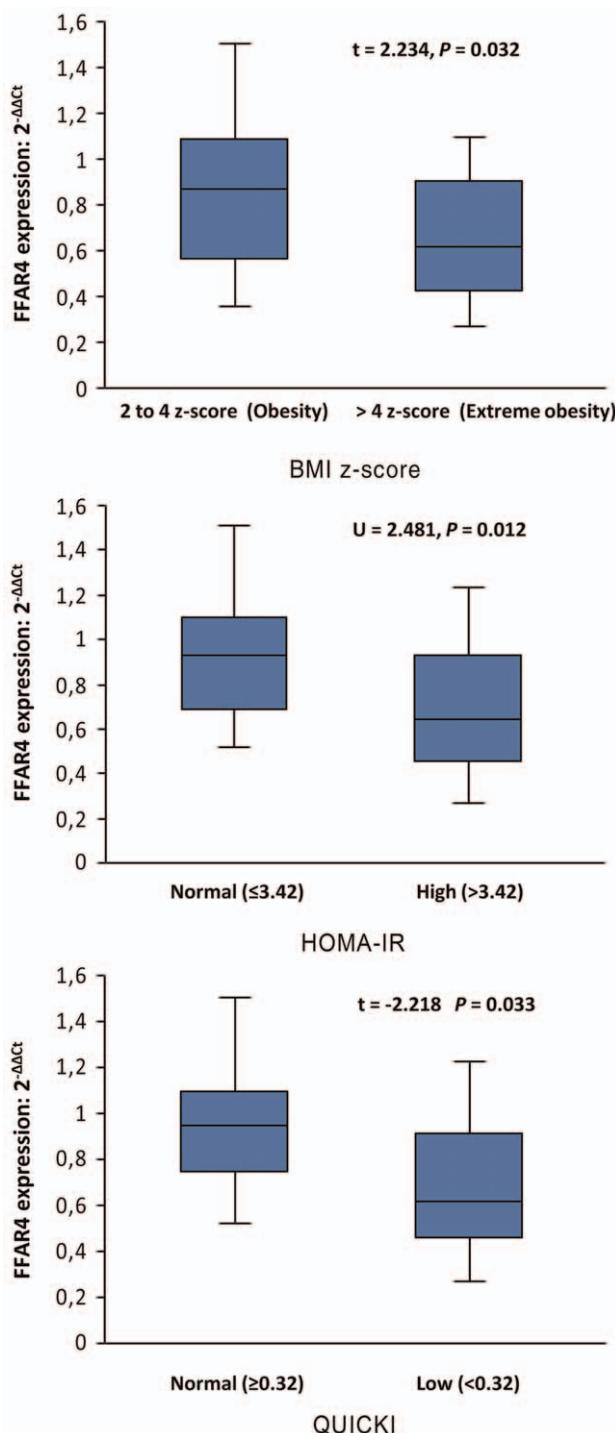


FIGURE 4. Boxplots representing comparisons between two groups of expression means, which represent normal and high values for body mass index (BMI) z score, homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) and QUICKI indexes. QUICKI = quantitative insulin-sensitivity check index.

function of the FFAR4 receptor and fatty liver disease has been previously demonstrated in children with obesity (26). Additionally, a significant improvement in ALT values was found after docosahexanoic acid supplementation in nonalcoholic fatty liver

disease (27). Consistent with this, docosahexanoic acid supplementation decreases ALT values in wild-type but not in *FFAR4* knockout mice (9).

Several limitations should be addressed to assess the potential significance of our findings. In the present study, the number of subjects studied was limited, but the conditions were strictly controlled. Additionally, all the children followed the same schedule for the previous dinner and consumed the same type of food. This remark is important because it is known that this gene could be greatly affected by the time elapsed since food intake and the type of food (19).

In summary, we found a relationship between decreased expression of *FFAR4* mRNA and obesity comorbidity parameters. Although a relationship does not imply causality, there is a sufficient molecular basis that involves the function of the *FFAR4* gene that could explain its role in comorbidities development. We think that these results are important to the evaluation of obesity in children, offering more information about how this gene behaves in this period of life. Moreover, it could be useful for appealing therapies that target this receptor (28).

REFERENCES

1. Stuttgen GM, Sahoo D. FFAR4: a new player in cardiometabolic disease? *Endocrinology* 2021;162:bqab111.
2. Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, et al. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* 2010;142:687–98.
3. Oh DY, Walenta E, Akiyama TE, et al. A Gpr120-selective agonist improves insulin resistance and chronic inflammation in obese mice. *Nat Med* 2014;20:942–7.
4. Husted AS, Ekberg JH, Tripp E, et al. Autocrine negative feedback regulation of lipolysis through sensing of NEFAs by FFAR4/GPR120 in WAT. *Mol Metab* 2020;42:101103.
5. Zhang D, Leung PS. Potential roles of GPR120 and its agonists in the management of diabetes. *Drug Des Devel Ther* 2014;8:1013–27.
6. Muredda L, Kępczyńska MA, Zaibi MS, et al. IL-1 α and TNF β inhibit GPR120 (FFAR4) and stimulate GPR84 (EX33) and GPR41 (FFAR3) fatty acid receptor expression in human adipocytes: implications for the anti-inflammatory action of n-3 fatty acids. *Arch Physiol Biochem* 2018;124:97–108.
7. Im DS. Functions of omega-3 fatty acids and FFA4 (GPR120) in macrophages. *Eur J Pharmacol* 2016;785:36–43.
8. Ichimura A, Hirasawa A, Poulin-Godefroy O, et al. Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. *Nature* 2012;483:350–4.
9. Nakamoto K, Shimada K, Harada S, et al. DHA supplementation prevent the progression of NASH via GPR120 signaling. *Eur J Pharmacol* 2018;820:31–8.
10. Gozal D, Kheirandish-Gozal L, Carreras A, et al. Obstructive sleep apnea and obesity are associated with reduced GPR 120 plasma levels in children. *Sleep* 2014;37:935–41.
11. Codoñer-Alejos A, Carrasco-Luna J, Codoñer-Franch P. The rs11187533 C>T variant of the FFAR4 gene is associated with lower levels of fasting glucose and decreases in markers of liver injury in children with obesity. *Ann Nutr Metab* 2020;76:122–8.
12. de Onis M, Onyango AW, Borghi E, et al. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents (Z-score). *Bull World Health Organ* 2007;85:660–7.
13. García Cuartero B, García Lacalle C, Jiménez Lobo C, et al. The HOMA and QUICKI indexes, and insulin and C-peptide levels in healthy children. Cut off points to identify metabolic syndrome in healthy children. *An Pediatr (Barc)* 2007;66:481–90.
14. Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med* 2006;27:126–39.
15. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008;3:1101–8.
16. Rao X, Huang X, Zhou Z, et al. An improvement of the $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath* 2013;3:71–85.

17. Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009;55:611–22.
18. Hilgendorf KI, Johnson CT, Mezger A, et al. Omega-3 fatty acids activate ciliary FFAR4 to control adipogenesis. *Cell* 2019;179:1289–305.
19. Croze ML, Flisher MF, Guillaume A, et al. Free fatty acid receptor 4 inhibitory signaling in delta cells regulates islet hormone secretion in mice. *Mol Metab* 2021;45:101166.
20. Rodriguez-Pacheco F, Garcia-Serrano S, Garcia-Escobar E, et al. Effects of obesity/fatty acids on the expression of GPR120. *Mol Nutr Food Res* 2014;58:1852–60.
21. Auguste S, Fisette A, Fernandes MF, et al. Central agonism of GPR120 acutely inhibits food intake and food reward and chronically suppresses anxiety-like behavior in mice. *Int J Neuropsychopharmacol* 2016;19:yw014.
22. Li X, Yu Y, Funk CD. Cyclooxygenase-2 induction in macrophages is modulated by docosahexaenoic acid via interactions with free fatty acid receptor 4 (FFA4). *FASEB J* 2013;27:4987–97.
23. Zhao Y, Zha D, Wang L, et al. Phenotypic characterization of GPR120-expressing cells in the interstitial tissue of pancreas. *Tissue Cell* 2013;45:421–7.
24. Garcia-Contreras M, Tamayo-Garcia A, Pappan KL, et al. Metabolomics study of the effects of inflammation, hypoxia, and high glucose on isolated human pancreatic islets. *J Proteome Res* 2017;16:2294–306.
25. Ying W, Fu W, Lee YS, et al. The role of macrophages in obesity-associated islet inflammation and β-cell abnormalities. *Nat Rev Endocrinol* 2020;16:81–90.
26. Marzuillo P, Grandone A, Conte M, et al. Novel association between a nonsynonymous variant (R270H) of the G-protein-coupled receptor 120 and liver injury in children and adolescents with obesity. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2014;59:472–5.
27. Nobili V, Carpino G, Alisi A, et al. Role of docosahexaenoic acid treatment in improving liver histology in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *PLoS One* 2014;9:e88005.
28. Carullo G, Mazzotta S, Vega-Holm M, et al. GPR120/FFAR4 pharmacology: focus on agonists in type 2 diabetes mellitus drug discovery. *J Med Chem* 2021;64:4312–32.